

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

GABRIELA GOMES CARDOSO GASTALDI

**FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM 685 nm SOBRE ESFEROIDES DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS: CONCEITO,
CARACTERIZAÇÃO E PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA
REGENERATIVA ÓSSEA**

ARARAQUARA, SP

2021

GABRIELA GOMES CARDOSO GASTALDI

**FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM 685 nm SOBRE ESFEROIDES DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS: CONCEITO,
CARACTERIZAÇÃO E PERSPECTIVAS PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA
REGENERATIVA ÓSSEA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Prof. Dr. André Capaldo Amaral
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

ARARAQUARA, SP

2021

G233f Gastaldi, Gabriela Gomes Cardoso

Fotobiomodulação laser em 685nm sobre esferoides de células-tronco mesenquimais humanas: conceito, caracterização e perspectivas para aplicação em medicina regenerativa óssea/Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.
94f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

1. Fotobiomodulação. 2. Imunomodulação. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Medicina regenerativa. 5. Células-tronco mesenquimais. I. Título.

CDU 62-1

GABRIELA GOMES CARDOSO GASTALDI

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 19 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)
Universidade de Araraquara – UNIARA


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Universidade de Araraquara – UNIARA


Profª. Drª. ANA PAULA DE SOUZA FALONI
Universidade de Araraquara – UNIARA


Profª. Drª. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI
Universidade Nove de Julho - UNINOVE


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO BOSSINI
Instituto de Pesquisa e Ensino em Ciências da Saúde de São Carlos – NUPEN

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente à DEUS, pelo dom da vida e pela força nos momentos que me encontrei incapaz de prosseguir;

Ao meu pai Marcelo Antonio Gastaldi, pelo seu apoio e amor incondicional, acreditando em sonho e caminhando ao meu lado, me apoiando em todos os momentos, sempre me encorajando e guiando meus passos;

Aos meus avós Antonio Augusto Gastaldi e Leonor Trombini Gastaldi, que também sempre estiveram ao meu lado, me apoiando de maneira incondicional, principalmente nos momentos mais difíceis;

A minha mãe Sandra Aparecida Gomes Cardoso e aos meus avós Dorival de Lima Cardoso e Jandira Gomes de Lima, mesmo que distantes fisicamente, sempre estiveram ao meu lado me apoiando, incentivando e orando por mim.

Aos meus sobrinhos Otávio Gauna Gastaldi, João Marcelo Gastaldi e Sophia Gauna Gastaldi que são a alegria da minha vida. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Araraquara - UNIARA, pela oportunidade de cursar o Programa de Doutorado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal, acreditando em meu profissionalismo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de estudos;

Aos professores André Capaldo Amaral pela orientação, apoio e incentivo deste trabalho, e Nivaldo Antonio Parizotto pela coorientação;

Ao Laboratório de Ensaio Clínicos Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara (LECER/UNIARA), e todos os alunos que fizeram parte desses 4 anos de pesquisa, onde conheci pessoas incríveis e pudemos trocar experiências. Em especial agradeço a Renata Aquino de Carvalho, por todo o auxílio e apoio nos momentos em que mais precisei;

À professora Fernanda Anibal por ceder o Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas – UFSCar e contribuir com parte das análises deste trabalho. As alunas de pós-doutorado Cynthia Aparecida de Castro e Patrícia Brassolatti por todos os ensinamentos e contribuição;

Aos meus amigos da Biologia – UNIARA, em especial o Eduardo Donato Alves, que me fizeram rir, e me incentivaram em todos os momentos;

Ao meu querido amigo Lucas Andreo, que mesmo distante, me ajudou em todos os momentos que precisei;

À toda minha família, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando e acreditando em meus sonhos;

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para o sucesso deste trabalho.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.*

(Marcel Proust)

RESUMO

A terapia celular (TC) busca melhorar as limitações das abordagens terapêuticas convencionais. Visando melhorar o reparo ósseo, as células-tronco mesenquimais (CTMs) vêm se tornando uma alternativa e, associadas com a fotobiomodulação (FBM) e o cultivo tridimensional (3D), podem se tornar uma estratégia promissora. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da FBM com laser de baixa intensidade (685 nm) sobre esferoides multicelulares (EMs) de células-tronco mesenquimais da bursa subacromial humana (CTMBSH) como conceito para aplicação em TC. Para tal, CTMBSH foram extraídas, isoladas e caracterizadas quanto ao perfil mesenquimal pelo potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica. Para a constituição dos EMs foram utilizados moldes de agarose contendo micropoços, que foram semeados ($3,5 \times 10^5$ células/ml) e mantidos sob condições ideais de cultivo. Os moldes foram irradiados por 5 dias consecutivos totalizando 5 aplicações (685 nm 35 mW, 9 mW/cm² 0.5 1.0 e 1.5 J/cm², com 55, 110 e 165 s). A constituição dos EMs foi analisada através de imagens de microscopia de campo aberto. A viabilidade celular foi quantificada ao final da constituição dos EMs e 4 dias após transferência e cultivo 2D. O potencial de diferenciação osteogênica foi avaliado pela detecção por fotogrametria dos nódulos de mineralização. O perfil de produção e liberação de citocinas foi estabelecido pela determinação, por imunodeteção, dos níveis de citocinas liberados em meio de cultura das interleucinas 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6), 10 (IL-10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). O potencial de liberação de biomoléculas no meio de cultivo de EMs de CTMBSH permite avaliar a capacidade de proliferação e migração celular para através do Ensaio de Ferida. Os resultados obtidos referentes à FBM sobre os EMs demonstraram a influência de efeito biomodulador dose-dependente sobre a constituição dos EMs. As fluências utilizadas não exerceram influência bioestimuladora sobre as viabilidades e sobre o processo de diferenciação osteogênica. Houve influência bioinibitória na fluência de 1.5 J/cm² no perfil de liberação de IL-6 e influência bioestimuladora na produção de TNF- α . No fechamento da ferida as fluências de 0.5 e 1.0 J/cm² exerceram influência bioestimuladora na liberação de fatores de crescimento, aumentando proliferação e migração celular, e a fluência de 1.5 J/cm² apresentou um efeito bioinibitório. Conclui-se que a FBM é capaz de exercer influência biomoduladora em CTMBSH cultivadas em EMs e contribuir nas estratégias de TC utilizadas na Medicina Regenerativa (MR).

Palavras-chave: Fotobiomodulação; Imunomodulação; Laser de Baixa Intensidade; Medicina Regenerativa; Células-tronco Mesenquimais.

ABSTRACT

Cell therapy (CT) seeks to improve the limitations of conventional therapeutic approaches. In order to improve bone repair, mesenchymal stem cells (MSCs) have become an alternative and, associated with photobiomodulation (PBM) and three-dimensional culture (3D), can become a promising strategy. The aim of this study was to analyze the effects of PBM with low-level laser (685 nm) on multicellular spheroids (MSs) of human subacromial bursa mesenchymal stem cells (hMSCSB) as a concept for application in CT. For this purpose, hMSCSB were extracted, isolated and characterized as to the mesenchymal profile by the potential for differentiation in the osteogenic and adipogenic strains. For the constitution of MSs, agarose molds containing microwells were used, which were seeded (3.5×10^5 cells/ml) and kept under ideal culture conditions. The molds were irradiated for 5 consecutive days totaling 5 applications (685nm 35 mW, 9 mW/cm² 0.5 1.0 and 1.5 J/cm², with 55, 110 and 165 s). The constitution of MSs was analyzed using open field microscopy images. Cell viability was quantified at the end of the constitution of MS and 4 days after transfer and 2D culture. The potential for osteogenic differentiation was assessed by photogrammetry detection of the mineralization nodules. The production and release profile of cytokines was established by the determination, by immunodetection, of the levels of cytokines released in culture medium of interleukins 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6), 10 (IL-10) and factor of tumor necrosis alpha (TNF- α). The potential for biomolecules to be released into the MS culture medium of hMSCSB allows to evaluate the ability of cell proliferation and migration through the Scratch Assay. The results obtained regarding FBM on MSs demonstrated the influence of a dose-dependent biomodulator effect on the constitution of MSs. The fluences used did not exert a biostimulating influence on the viability and on the osteogenic differentiation process. There was a bioinhibitory influence on the fluence of 1.5 J/cm² in the IL-6 release profile and a biostimulatory influence on the production of TNF- α . At wound closure, fluences of 0.5 and 1.0 J/cm² exerted a biostimulatory influence on the release of growth factors, increasing cell proliferation and migration, and fluency of 1.5 J/cm² had a bioinhibitory effect. We conclude that FBM is capable of exerting a biomodulating influence on hMSCSB grown in MSs and contributing to the CT strategies used in Regenerative Medicine (RM).

Keywords: Photobiomodulation; Immunomodulation; Low Intensity Laser; Regenerative Medicine; Mesenchymal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fases do reparo de fraturas: formação de hematoma, após inicia-se a inflamação e recrutamento celular, vascularização do tecido, processo de formação de calo ósseo e diferenciação osteogênica e remodelação do calo ósseo e reparo da fratura.....24
- Figura 2** – Representação esquemática das estratégias utilizadas na medicina regenerativa. Existem substancialmente três abordagens: terapia celular baseadas em células, moléculas sinalizadoras do processo de reparação tecidual e a bioengenharia dos suportes (scaffolds).....26
- Figura 3** - A capacidade de se diferenciar em outros tipos de células é definida como “potência celular” classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e onipotentes.....29
- Figura 4** - Atividade imunomodulatória das CTMs. As CTMs influenciam as células imunes para induzirem as células reguladoras. Essas células imunológicas reguladoras, como Tregs, células APCs e NKs, criam um ambiente tolerogênico adequado para modular a resposta imune.....32
- Figura 5** - Esquema ilustrando a diferença entre o arranjo espacial de culturas em monocamada (2D) e em culturas tridimensionais (3D).....34
- Figura 6** - Desenho esquemático do esferoide e seu mecanismo de formação. (A) Células semeadas em ambiente não aderente; (B) Formação dos esferoides baseada em aglomeração por agrupamento (cultivo estático) e aglomeração baseado em colisão (cultivo dinâmico); (C) Padrão de consolidação do esferoide (auto-organização); (D) Esferoide multicelular, a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas.....35
- Figura 7** - Diferença entre a luz laser e luz convencional. A luz laser é monocromática (frequência única) e as ondas luminosas são coerentes (concordância de fase) e paralelas, enquanto a luz convencional é policromática (mistura de várias frequências) e as ondas luminosas não são coerentes.....38
- Figura 8** - O efeito da radiação LASER no metabolismo celular ocorre nas mitocôndrias, deslocando o óxido nítrico (NO) da cadeia respiratória e elevando os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas mudanças atuam via adenosina cíclica monofosfato (cAMP) e proteína quinase D (PKD) que ativa os fatores de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NFκ-B), resultando em alterações na expressão gênica e produção de mensageiros químicos implicados nas alterações celulares.....40
- Figura 9** - Visão artroscópica do momento da obtenção de uma amostra de bursa subacromial (*). Abaixo da bursa subacromial observa-se o tendão do supraespinhal (**)......44
- Figura 10** - Processo de extração das CTMBSH. (A) Fragmentos da bursa subacromial após serem trituradas em uma placa de Petri e (B) Precipitado celular (seta) após o processo de digestão enzimática e centrifugação.....45
- Figura 11** - Cultura de CTMBSH. (A) Quarto dia de cultivo para isolamento. A seta indica células de morfologia fusiforme e aderidas na garrafa. (B) décimo primeiro dia de cultura celular, onde houve um aumento na confluência celular. Objetivas de 10x.....45

Figura 12- Fotografia do contramolde (*) e do molde de agarose (**) contendo os micropoços de cultivo celular para formação dos EMs.....	47
Figura 13 - Esquema representativo das etapas de constituição dos EMs. Os moldes foram acondicionados em placas de 12 poços em quadruplicata para cada grupo experimental. (A) molde de agarose sem células, (B) suspensão de CTMBSH (semeadura) (C) células dentro dos poços do molde, (D) esferoides formados dentro dos poços.....	48
Figura 14 - Equipamento Thera Lase®, fornecido pela empresa DMC Equipamentos, utilizado nos experimentos.....	49
Figura 15 – Plataforma para irradiação indicada pela seta (A), seta (B) garra de posicionamento e fixação da probe óptica, e a seta (C) guia utilizado na orientação da placa, viabilizando a realização dos procedimentos de irradiação.....	50
Figura 16 – Esquema cronológico do procedimento experimental.....	51
Figura 17 – Micrografias da determinação do perfil mesenquimal das células da bursa subacromial humana incubadas com meio de diferenciação por 14 dias. (A) As setas indicam os nódulos de mineralização corados com <i>Alizarina red</i> , característica da diferenciação osteogênica e (B) A seta indica as gotículas de gordura coradas com <i>Oil red</i> , característica da diferenciação adipogênica. Objetivas de 40x.....	56
Figura 18 – Micrografias da sequência temporal do processo de constituição e compactação dos EMs do GC. Objetivas de 4x.....	57
Figura 19 - Representação gráfica dos diâmetros dos EMs durante o processo de constituição e tabela de valores significantes da comparação dos diâmetros entre os grupos experimentais. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001).....	58
Figura 20 - Representação gráfica dos ensaios de viabilidade celular em porcentagem dos EMs ao final do processo de constituição e pós-carreamento em cultivo 2D. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (p<0,05).....	59
Figura 21 – Micrografias da adesão dos EMs no quarto dia pós-carreamento do GC. (A) Nota-se o processo de adesão e o perfil indicativo do processo de povoamento celular na placa. (B) Observa-se o espraiamento celular e a proliferação celular, evidenciando um núcleo de celularização individualizado. Objetivas de 10x e 20x.....	60
Figura 22 – Representação gráfica da quantificação em porcentagem dos nódulos de mineralização depositados pelas CTMBSH pós-carreamento. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (p<0,05).....	60
Figura 23 - Micrografias referentes aos nódulos de mineralização dos grupos experimentais após 14 dias de indução osteogênica pós-transferência. (A) Nódulos de mineralização referentes ao grupo GC, (B) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-0.5, (C) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-1.0 e (D) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-1.5. Objetivas de 20x.....	61
Figura 24 - Representações gráficas da comparação entre os grupos experimentais dos ensaios de imunoabsorção enzimática, referente ao perfil de liberação das citocinas (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IL-1β e (D) TNF-α. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (*p<0,05; **p<0,01).....	62

Figura 25 - Micrografias representativas do ensaio de ferida, nos tempos 0 hora e 24 horas dos grupos GC- SFB, GC, G-0.5, G-1.0 e G-1.5. Objetivas de 10x.....63

Figura 26 - Representação gráfica dos percentuais de fechamento da ferida. Análise perfil de liberação de biomoléculas durante o processo de constituição dos EMs, e sua influência na proliferação e migração celular no processo de fechamento da ferida em culturas de OSTEO-1. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (***p<0,0001).....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros do laser de baixa intensidade utilizados no procedimento de irradiação dos EMS.....	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP – Adenosina trifosfato
BMPs - Proteínas morfogenéticas ósseas
BMP2 - Proteína morfogenética óssea - 2
cm² – Centímetro quadrado
CD – Marcador Classe de diferenciação
CE - Células endoteliais
CT – Célula-tronco
CTA – Célula-tronco adiposa
CTHs – Células-tronco hematopoéticas
CTMs – Células-tronco mesenquimais
CTMBSH – Célula-tronco mesenquimal da Bursa subacromial humana
CPEs – Células progenitoras endoteliais
CO₂ – Gás carbônico
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DNA – Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
EMs – Esferoides multicelulares
ERO/ROS – Espécies reativas de oxigênio
FBM – Fotobiomodulação
FGF – Fator de crescimento fibroblástico
FGF23 - Fator de crescimento fibroblástico 23
G – Giros
g – Grama
GLP-1 - Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
IL – Interleucina
J - Joules
J/cm²– Joules por centímetro quadrado
l – Litro
LBI – Laser de baixa intensidade
LECER – Laboratório de ensaios celulares e engenharia regenerativa
M – Mol

min – Minutos
MC – Meio condicionado
mg – Miligramas
ml – Mililitros
MR – Medicina regenerativa
mM - Milimolar
mW – Miliwatts
nm - nanômetro
NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NO – Óxido nítrico
O₂ – Oxigênio
PBS - Tampão fosfato salino
PDGF – BB - Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
PTH – paratormônio
RUNX2 – Fator de transcrição 2 relacionado à runt
RNA – Ácido ribonucléico
RT – Transcrição reversa
s – Segundos
SDF – 1 - Fator derivado de células estromais -1
SFB – Soro fetal bovino
TA – Temperatura ambiente
TC – Terapia celular
TGF – Fator de crescimento transformador
TGF – β – Fator de transformação do crescimento beta
TLBI – Terapia laser de baixa intensidade
TNF- Fator de necrose tumoral
TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa
U/ml - Unidades por mililitros
UV - Ultravioleta
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
v/v – Volume/volume
W/cm² – Watts por centímetro quadrado
 μ g – Micrograma

μl – Microlitros

μM - Micromolar

μm - Micrômetros

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Revisão da literatura	
2.1 Tecido ósseo.....	22
2.2 Medicina Regenerativa.....	25
2.3 Célula-tronco mesenquimais.....	28
2.3.1 Imunomodulação das CTMs.....	30
2.4 Esferoides Multicelulares e Terapia Celular.....	33
2.5 Laser em Baixa Intensidade.....	37
2.5.1 Características da luz LASER.....	37
2.5.2 Fotobiomodulação.....	39
3. Objetivos.....	42
4. Materiais e Métodos	
4.1 Sujeito.....	43
4.2 Extração e isolamento das células-tronco da bursa subacromial.....	43
4.3 Caracterização morfológica e determinação do perfil mesenquimal.....	46
4.4 Constituição dos esferoides multicelulares.....	46
4.5 Laser em Baixa Intensidade (LBI).....	48
4.5.1 Dispositivo emissor da radiação laser.....	48
4.5.2 Plataforma de irradiação.....	49
4.5.3 Procedimento de irradiação.....	50
4.6 Análise da constituição dos EMs.....	52
4.7 Análise de viabilidade e carreamento celular.....	52
4.8 Diferenciação osteogênica pós-carreamento.....	53
4.9 Análise do perfil de produção de citocinas.....	53
4.10 Ensaio de ferida.....	54
4.11 Análise estatística.....	55
5.Resultados	
5.1 Caracterização do perfil mesenquimal das células da bursa subacromial humana.....	56

5.2 Constituição dos esferoides multicelulares.....	56
5.3 Análise de viabilidade e carreamento celular.....	59
5.4 Diferenciação osteogênica pós-carreamento.....	60
5.5 Análise do perfil de produção de citocinas.....	61
5.6 Ensaio de ferida.....	62
6. Discussão.....	65
7. Conclusão.....	73
8. Referências bibliográficas.....	74
9. Anexos	
9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	87
9.2 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa – UNIARA.....	90

1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa (MR) consiste em uma ciência interdisciplinar destinada ao desenvolvimento de produtos, métodos e técnicas direcionadas ao aprimoramento da eficiência do processo de reparo intrínseco na restauração estrutural e funcional de tecidos e órgãos. Sua abordagem busca superar as limitações dos tratamentos convencionais e consiste na utilização de suportes biológicos, células e biomoléculas, com a finalidade de orientar e estimular a regeneração do novo tecido (HENSON et al., 2012; SAMPOGNA et al., 2015; DOLAN et al., 2018).

A proposta de terapia celular (TC) em MR é potencializar o processo de restauração tecidual como o uso de células-tronco mesenquimais (CTMs), facilitando o repovoamento e a modulação do ambiente de reparo no “nicho celular”. O potencial terapêutico das CTMs começou a ser utilizado há aproximadamente quatro décadas, após as descobertas de Friedenstein e colaboradores (1968) (BIANCO et al., 2006; COLOMBO et al., 2017). A utilização de CTMs se justifica como alternativa, com grande potencial estratégico, pela possibilidade de ampliação do contingente de reparo, pela maior possibilidade de diferenciação em células teciduais específicas e pelo potencial de modulação bioquímica do microambiente de reparo. Em teoria, tais influências potencializam os fenômenos celulares do processo de auto-reparo trazendo novas perspectivas para o tratamento de diversas patologias, inclusive no processo de reparo ósseo (VOGEL et al., 2003; SCHMITT et al., 2012; ZHANG et al., 2017; SHOJAEI et al., 2019).

O tecido ósseo, diferente de outros tecidos, possui a capacidade de regeneração, restabelecendo todas as propriedades preexistentes de sua estrutura e função originais sem a formação de um tecido cicatricial. Porém, existem algumas condições que comprometem o processo de auto-regeneração, como nos casos de condições biológicas e/ou biomecânicas desfavoráveis ou na reconstrução de grandes defeitos ósseos criados por trauma, infecção, tumores e anormalidades esqueléticas (DIMITRIOU et al., 2011; LICHTÉ et al., 2011).

Em condições nas quais as lesões ósseas não são capazes de se regenerar são utilizados usualmente enxertos ósseos, porém, esse recurso possui algumas limitações como: a quantidade limitada de tecido a ser retirado do local doador e um trauma adicional. A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa, vêm buscando

estratégias para melhorar o processo de reparo ósseo nos tratamentos de lesões e fraturas (SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011; MADRID et al., 2019; SHARMA et al., 2019).

As células utilizadas em TC são geralmente autólogas e, na grande maioria dos casos, precisam ser cultivadas e expandidas *in vitro*, em ambiente bidimensional, considerando a necessidade de um maior contingente celular antes do carreamento para o tecido alvo (MOUNT et al., 2015).

Apesar das pesquisas *in vitro* baseadas em cultivo bidimensional (2D), ou monocamada, terem sido um método valioso, suas limitações estão sendo cada vez mais discutidas (FENNEMA et al., 2013; EDMONDSON et al., 2014). O cultivo tridimensional (3D) vem demonstrando mimetizar de maneira mais realística o microambiente *in vivo*, proporcionando desde a aquisição de uma morfologia celular mais fiel como de condições metabólicas (geração de gradiente para nutrientes, gases, fatores de crescimento e demais moléculas de sinalização) típicas dos tecidos biológicos, tanto em condições fisiológicas como patológicas (HUANG; GAO, 2018; TOMASI et al., 2020). Um dos modelos mais utilizados de cultivo 3D são os esferoides multicelulares (EMs). Os EMs são agregados celulares que não possuem um substrato que auxilie nas interações das células durante o processo de cultivo (ACHILLI et al., 2012; WANG et al., 2013).

A fim de maximizar o potencial terapêutico da proposta, sobretudo preservando a viabilidade celular após implantação, diversas pesquisas estão sendo conduzidas buscando avaliar a influência de recursos biomodulatórios ainda durante a fase de cultivo celular (IMURA et al., 2019; O'SULLIVAN et al., 2019).

A fotobiomodulação (FBM), é uma forma de terapia de luz que utiliza fontes de luz, incluindo LASERS, diodos emissores de luz (LEDs) e luz de amplo espectro, nos parâmetros de luz visível e infravermelho. A FBM com uso do laser de baixa intensidade (LBI) é um recurso terapêutico reconhecido que, atuando em nível celular, é capaz de provocar modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, que culminam na modulação do metabolismo, da proliferação, diferenciação celular e perfil de liberação de biomoléculas (ALVES et al., 2014; ABD-ELAA et al., 2015).

O estabelecimento e a caracterização da influência fotobiomodulatória do LBI vermelho sobre CTMs, cultivadas em EMs mimetizando a etapa de cultivo *in vitro* pré-carreamento, faz-se necessários para determinar o real potencial do uso deste recurso

a fim de potencializar os resultados almeçados com a terapia celular em MR óssea. Ressalta-se que não foram localizadas publicações científicas relacionadas a este tema.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um órgão responsável pela proteção, homeostase mineral e suporte estrutural do corpo humano, sendo constituído por um tecido dinâmico e bastante vascularizado que cresce, renova-se e mantém-se ativo durante toda a vida do organismo sem deixar cicatriz. O esqueleto adulto é composto por 206 ossos individuais que são divididos em cinco categorias principais: ossos longos responsáveis em apoiar o peso corporal; curtos proporcionando movimento e estabilidade; planos para a proteção de órgãos internos; irregulares e ossos sesamóides que são embutidos nos tendões (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001; LOPES et al., 2018).

O osso é composto por tecido conjuntivo especializado, altamente vascularizado e innervado que forma juntamente com a cartilagem, o sistema esquelético. Dentre as funções do tecido ósseo no organismo, três apresentam destaque, que são: promover suporte mecânico e ser um sítio para associação de músculos, a fim de haver locomoção; proteger órgãos vitais e a medula óssea, uma vez que esta encontra-se alojada no interior de ossos longos e planos; e reservar cálcio e fósforo utilizados para a manutenção da homeostase (BARON, 2008).

Recentemente, avanços na biologia óssea têm destacado a importância do esqueleto como órgão endócrino, que modula a tolerância à glicose e a produção de testosterona pela secreção de uma proteína óssea específica, a osteocalcina e controlarem a homeostase dos íons minerais como o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23). O osso é alvo de diferentes glândulas endócrinas ou tecidos por meio de vários hormônios e/ou moléculas como o peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1), paratormônio (PTH), adipocinas e citocinas produzidas por células imunes (YODA, 2016; BRUNETTI et al., 2017).

O tecido ósseo é composto por diferentes tipos de células como osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células de revestimento (osteoprogenitoras ou células osteogênicas). O osteoblasto, a célula óssea responsável pela formação de um novo osso, é encontrado nas porções crescentes do osso, incluindo o perióstio e o endóstio. Osteoblastos, que não se dividem, sintetizam e secretam os constituintes

elementares da matriz, tal como moléculas de colágeno e glicoproteínas. À medida que a matriz secretada ao redor do osteoblasto se calcifica, o osteoblasto pode ficar preso dentro dela. Como resultado, ele muda de estrutura tornando-se um osteócito, a célula mais numerosa do osso maduro e o tipo mais comum de célula óssea. Cada osteócito está localizado em um espaço (lacuna) cercado por tecido ósseo. Os osteócitos mantêm a concentração de minerais da matriz por meio da secreção de enzimas. Diferente dos osteoblastos, os osteócitos não têm atividade mitótica. Eles são capazes de se comunicar uns com os outros e receber nutrientes por meio de longos processos citoplasmáticos que se estendem pelos canalículos, canais dentro da matriz óssea (MOHAMED, 2008; SILVA et al., 2015).

A matriz extracelular é composta por uma fase inorgânica mineralizada, composta por 65% de hidroxiapatita e fosfato tricálcico, e um componente extracelular orgânico, composto por 35% de colágeno I e proteínas não colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; GARTNER; HIATT, 2014). O componente orgânico da matriz óssea representa por volta de 35% do peso seco do osso e é formado por colágeno tipo I em sua maioria, e uma pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas.

O colágeno representa 90 a 95% de todo o componente orgânico, sendo disposto em feixes de 50 a 70 nm de diâmetro, apresentando grande quantidade de ligações cruzadas. Os outros componentes orgânicos da matriz óssea incluem glicosaminoglicanas ligadas ao ácido hialurônico, como o sulfato de condroitina e sulfato de queratano, e as glicoproteínas ósseas, representadas pela osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

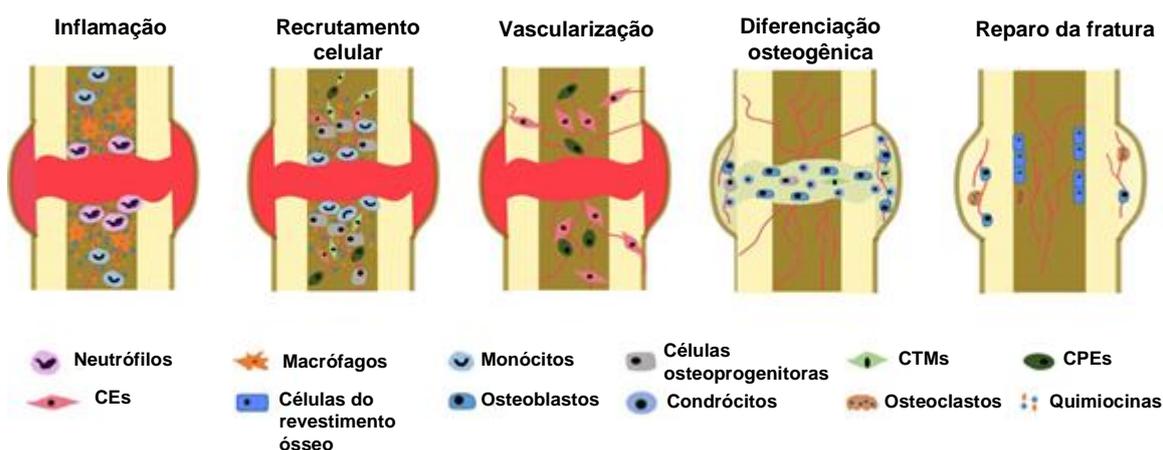
O osso é constantemente renovado através do processo de remodelação óssea, que ocorre em cerca de 10% do esqueleto adulto a qualquer momento. Embora o tecido ósseo apresente uma capacidade regenerativa quando lesado, observa-se que essa propriedade se torna ineficiente diante de lesões mais extensas, tais quais os defeitos ósseos críticos, requerendo assim intervenções externas que promovam estímulos ao processo de cicatrização (CALABRESE et al., 2012; MOREIRA et al., 2018). Diante dessas circunstâncias, fica evidente a necessidade de desenvolvimento de novos e eficazes tratamentos. Dentre as causas de defeitos ósseos pode-se citar os traumas de alta energia, tumores, infecções (osteomielite) e anomalias congênitas, que acarretam um impacto na qualidade de vida de milhões de pessoas em todo o mundo. Espera-se que as fraturas ósseas relacionadas à idade aumentem nos

Estados Unidos de 2,1 milhões em 2005, para mais de três milhões de fraturas em 2025, considerando apenas a população idosa. Na Europa, estima-se que o número anual de fraturas suba 28% em relação de 2010 até 2025, com um aumento de 3,5 milhões para 4,5 milhões de fraturas (BRASSOLATTI et al., 2018; LOPES et al., 2018).

A auto recuperação das fraturas é um processo bem orquestrado e envolve uma cascata de eventos biológicos, dentre os quais a inflamação, a vascularização, o recrutamento celular e a diferenciação osteogênica são os mais importantes e os mais investigados (LI et al., 2019).

O reparo ósseo se inicia quando os vasos sanguíneos do osso fraturado se rompem causando a hemorragia, que resulta na formação de um hematoma no local da ruptura (Figura 1). Os vasos sanguíneos danificados nas extremidades fraturadas do osso são selados pelo processo de coagulação. As células ósseas, privadas de nutrientes, começam a morrer (hipóxia secundária).

Figura 1 – Fases do reparo de fraturas: formação de hematoma, após inicia-se a inflamação e recrutamento celular, vascularização do tecido, processo de formação de calo ósseo e diferenciação osteogênica, remodelação do calo ósseo e reparo da fratura.



Fonte: Adaptado Li et al., 2019.

A fase seguinte do reparo é caracterizada pelo processo inflamatório, diretamente responsável pelo controle orquestrado de eventos vasculares e celulares que culminam na regeneração tecidual. Na fase inicial da inflamação, citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento transformador (TGF), interleucina um (IL-1) e interleucina seis (IL-6), recrutam células inflamatórias responsáveis pela fagocitose do tecido necrótico e produção de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB)

e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e fatores pró-osteogênicos, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que serão responsáveis, respectivamente, pelos eventos de revascularização e neoformação óssea (LI et al., 2019).

Todos os eventos biológicos relacionados à neoformação óssea são realizados por CTMs residentes no periósteo e endósteo, denominadas células precursoras osteogênicas (CPO), que são recrutadas para o local da lesão, sofrem proliferação e diferenciação celular sob ação de moléculas de sinalização como BMPs, fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator derivado de células estromais -1 (SDF-1). Tais moléculas de sinalização podem ser liberadas da matriz ou secretadas por outras células presentes no sítio de reparo (CUI et al., 2016; CANADAS et al., 2018).

O tecido de reparo provisoriamente formado entre as extremidades do osso quebrado, na etapa inicial da fase fibroproliferativa do processo de reparo, tem característica fibrocartilaginosa e é composto de uma mescla de cartilagem hialina e fibrocartilagem. No final dessa fase, concluindo o processo de regeneração óssea, tal tecido fibrocartilaginoso é substituído em tecido ósseo pela ação dos osteoblastos oriundos da diferenciação das CPOs. Ressalta-se que tal etapa é dependente do processo de revascularização. O osso recém formado, após o processo de remodelamento que conclui o processo de reparo, apresenta características semelhantes, estrutural e funcionalmente, ao osso original (DESCHASEAUX et al., 2009; LI et al., 2019; PIÑEIRO-RAMIL et al., 2019).

Atualmente, a MR vem buscando melhorar o processo de reparo ósseo, visando melhorar a osteogênese tanto em condições saudáveis quanto inflamatórias (WYSOCKA et al., 2019).

2.2 MEDICINA REGENERATIVA

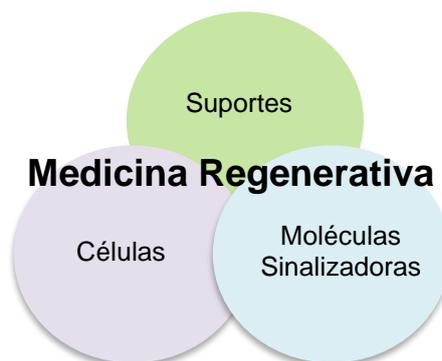
O bom funcionamento dos tecidos e órgãos do corpo depende de processos regenerativos naturais, que mantêm a homeostase celular e substituem as células danificadas após a lesão. Em muitos, embora não em todos os tecidos, o potencial regenerativo é determinado pela presença e funcionalidade de uma população de

CTMs e progenitoras, que respondem a estímulos para produzir células de reposição quando necessário (WAGERS, 2012).

Quando os processos regenerativos naturais falham, sequelas podem ser geradas determinando severo comprometimento na função e qualidade de vida. A fim de reduzir a ocorrência dessas sequelas, e aprimorar o potencial intrínseco de reparo, novas estratégias terapêuticas vêm sendo desenvolvidas (DOLAN et al, 2018).

A medicina regenerativa (MR) consiste em uma ciência interdisciplinar aplicada destinada ao desenvolvimento de produtos, métodos e técnicas direcionadas ao aprimoramento da eficiência do processo de reparo intrínseco na restauração estrutural e funcional de tecidos e órgãos. Sua abordagem se fundamenta na utilização de suportes biológicos, de biomoléculas e/ou da terapia com células tronco mesenquimais autólogas (Figura 2), como estratégias isoladas ou combinadas, com a finalidade de reduzir o tempo e/ou melhorar a qualidade do tecido neoformado a fim de restaurar, ao máximo, sua estrutura e função (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015; DOLAN et al, 2018).

Figura 2 – Representação esquemática das estratégias utilizadas na medicina regenerativa. Existem substancialmente três abordagens: terapia celular baseada em células, moléculas sinalizadoras do processo de reparação tecidual e a bioengenharia dos suportes (*scaffolds*).



Fonte: Adaptado SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015

A proposta de terapia celular (TC) em MR é acelerar e potencializar as fases do processo regenerativo e melhorar a qualidade da regeneração tecidual, com a restauração do tecido mais próximo possível do natural. Utiliza, preferencialmente, CTMs, considerando seu potencial de diferenciação em células teciduais específicas e de modulação bioquímica do microambiente de reparo. Em teoria, tais influências

potencializam os fenômenos celulares do processo de autorreparo (ZHANG et al., 2017; CLARKE et al., 2018; SHOJAEIF et al., 2019).

A MR óssea é um campo de pesquisa que vem crescendo devido às limitações significativas encontradas pelas opções atuais de tratamento e pela elevada incidência de lesões decorrentes de traumas. O risco de fraturas ocasionadas por acidentes automobilísticos representa um grave problema, sobretudo para o crescente número de pessoas que habitam grandes centros urbanos. Além disso, o aumento da expectativa de vida eleva o risco de ocorrência de lesões associadas ao tecido ósseo entre a população (ORCIANI et al., 2017).

A principal condição responsável pelas elevadas taxas de insucesso no reparo ósseo intrínseco são os denominados defeitos críticos, principalmente gerados pelas fraturas complexas associadas às fraturas de alta energia ou pela ressecção de tumores. Esses casos são frequentemente abordados com a utilização de enxertos ósseos autólogos, considerados o padrão ouro no tratamento ortopédico. Em contrapartida, esses procedimentos também apresentam limitações e estão associados a efeitos deletérios no organismo dos pacientes. Dentre eles pode-se citar a restrição do tamanho do enxerto que pode ser colhido e o risco adicional de morbidade e complicações no sítio doador, incluindo infecção e dor contínua após cirurgia. Dessa maneira, há a necessidade do desenvolvimento de abordagens na área de engenharia de tecidos que promovam o remodelamento e a regeneração do tecido ósseo, de modo que ele volte a ser saudável e funcional, utilizando uma série de abordagens interdisciplinares, incluindo a biologia do desenvolvimento, a ciência dos materiais, as células-tronco (CT) e a bioengenharia (SISTI et. al., 2016; TURNBULL et. al., 2018).

As CTMs são consideradas a melhor opção dentre os tipos de CT devido a sua disponibilidade nos tecidos, ausência de problemas éticos e/ou religiosos para a sua utilização em pesquisas científicas e a não formação de teratomas (MACHADO, 2013).

Nos últimos anos, a introdução do potencial uso de CTMs, trouxe novas perspectivas para o tratamento celular de patologias, inclusive no processo de reparo ósseo. Devido esta plasticidade no potencial de diferenciação, as CTMs são alternativa com grande potencial estratégico para aplicações ortopédicas, pois contribuem com o processo de reparo tecidual modulando o microambiente, atuando

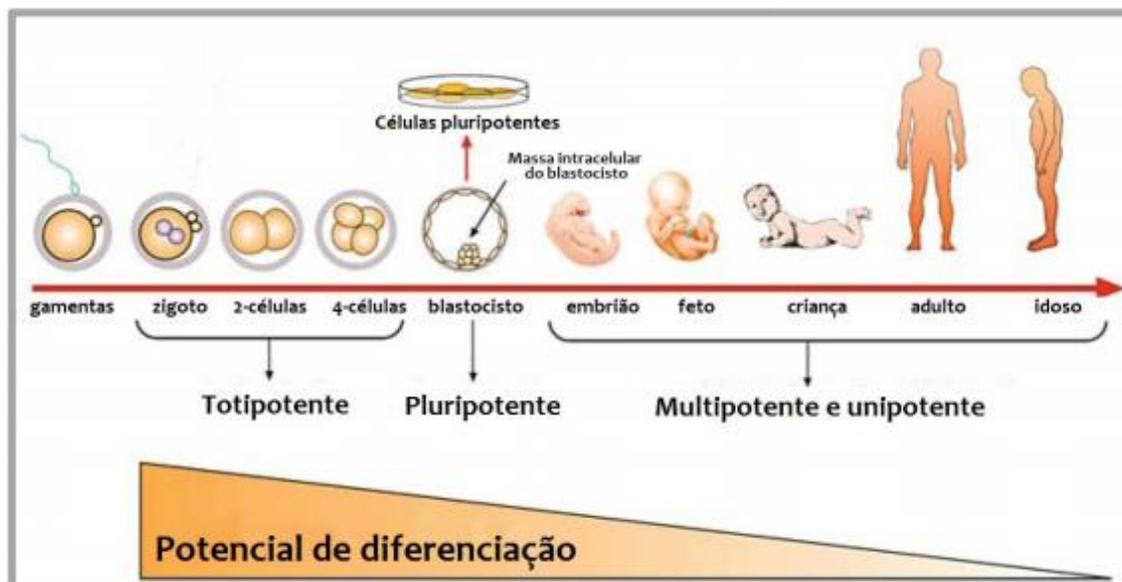
sobre o processo inflamatório, estimulando o processo de revascularização, com a restauração da matriz extracelular e também com o repovoamento por células diferenciadas específicas do tecido (VOGEL et al., 2003; ROSENTHAL; BADYLAK, 2016; VAN GOGH et al., 2019).

2.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Células-tronco (CT) foram descritas originalmente como “células progenitoras adultas”, não-fagocíticas, não hematopoiéticas e semelhantes a fibroblastos que foram isoladas *ex vivo* em pequeno número celular por possuírem aderência plástica (FRIEDENSTEIN et. al., 1968).

As CTs são classificadas em células-tronco embrionárias (CTEs), células-tronco do sangue do cordão umbilical e células-tronco do líquido amniótico, células-tronco não embrionárias adultas (CTAs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). As CTEs são células pluripotentes com potencial ilimitado de auto-renovação e diferenciação, sendo obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto (MITALIPOV; WOLF, 2009). Durante o processo de organogênese, as células diferenciam-se progressivamente, tornando-se específicas e perdendo a capacidade de se diferenciar em outras células. A capacidade de se diferenciar em outros tipos de células também pode ser definida como plasticidade das CT. O desenvolvimento de um indivíduo começa a partir de uma única célula, o zigoto (Figura 3). O zigoto e cada blastômero do embrião primário são totipotentes, com o potencial de desenvolver um organismo inteiro. Conforme o desenvolvimento se desenrola, a plasticidade de células-tronco declina gradualmente, resultando em células pluripotentes, multipotentes, unipotentes e células somáticas terminalmente diferenciadas (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Figura 3 - A capacidade de se diferenciar em outros tipos de células é definida como “potência celular” classificada em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e onipotentes.



Fonte: Adaptado de MITALIPOV; WOLF, 2009.

As CTMs foram descritas inicialmente por Pittenger e colaboradores (1999), que demonstraram o potencial de diferenciação. São células aderentes progenitoras multipotentes, capazes de multiplicar mantendo-se indiferenciadas por longos períodos, proporcionando uma reposição ativa e constante nos tecidos, e nos mais diversos tipos celulares. Podem se diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendíneo, muscular e estroma medular, capazes de promoverem o restabelecimento da homeostase (BYDLOWSKI et al., 2006; STRIOGA et al., 2012; WYSOCKA et al., 2019).

O Comitê da Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy - ISCT*) estipulou alguns critérios mínimos para definir CTMs, independente de sua fonte: adesão plástica em condições de cultura padrão; expressão de marcadores positivos CD105, CD90 e CD73 e expressão negativa de CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19; não expressarem complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II); diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições estímulo *in vitro* (MOSNA et al., 2010; GOULART et al., 2017).

As CTMs possuem grande potencial terapêutico devido suas características de “*homing*” para tecidos lesados e por produzirem diversos fatores tróficos como citocinas e fatores de crescimento, os quais podem estar relacionados principalmente

a mecanismos de imunorregulação, anti-fibrótico, inibição do estresse oxidativo, indução da proliferação de células progenitoras teciduais, anti-apoptóticos, pró-angiogênicos e quimioatração (MEIRELLES et al., 2009; MITCHELL et al., 2016).

2.3.1 Imunomodulação das CTMs

As possibilidades terapêuticas regenerativas das CTMs vêm sendo amplamente estudadas, assim como suas propriedades imunomoduladoras. O microambiente onde as CTMs residem, conhecido como “nicho”, foi proposto pela primeira vez por Schofield (1978) como um ambiente especializado necessário para que estas células mantivessem as suas características indiferenciadas. O nicho é responsável pela regulação e equilíbrio entre a auto renovação e/ou a diferenciação celular através de uma constante comunicação entre as CTMs e as células do nicho onde se encontram (LIAO et al., 2011; SONG; SCHOLTEMEIJER; SHAH, 2020).

Sinais apropriados endereçados às CTMs, emitidos de maneira autócrina, Parácrina ou até endócrina, direcionam as interações das mesmas com as células residentes do nicho assim como com as moléculas da matriz extracelular, proporcionando a regulação e a manutenção adequada das CTs neste microambiente especializado (WALKER et al., 2008; LIAO et al., 2011; GUO et al., 2019).

O mecanismo de secreção Parácrino das CTMs caracteriza seu poder imunomodulatório via supressão da resposta imune através da inibição da proliferação de linfócitos T e B, células *natural killer* (NK) e células apresentadoras de antígenos. A propriedade imunossupressora dessas células não é inata, mas mediada por citocinas inflamatórias. Essa capacidade imunossupressora é altamente plástica em resposta a alterações dinâmicas do nicho inflamatório, incluindo a concentração de citocinas inflamatórias, os tipos de citocinas e a presença de agentes imunossupressores (SALEM; THIEMERMANN, 2010; CAO et al., 2015).

Lesões teciduais desencadeiam processos inflamatórios e seus mediadores podem atuar como vias quimiotáticas, mobilizando e direcionando as CTMs aos locais danificados. Antes do reparo do tecido, as CTMs preparam um microambiente através de sua capacidade de modular respostas imunológicas e conseqüentemente alterando a progressão inflamatória, liberando fatores de crescimento. Esse processo denominado *crosstalk* entre CTMs e respostas imunes têm mostrado potenciais

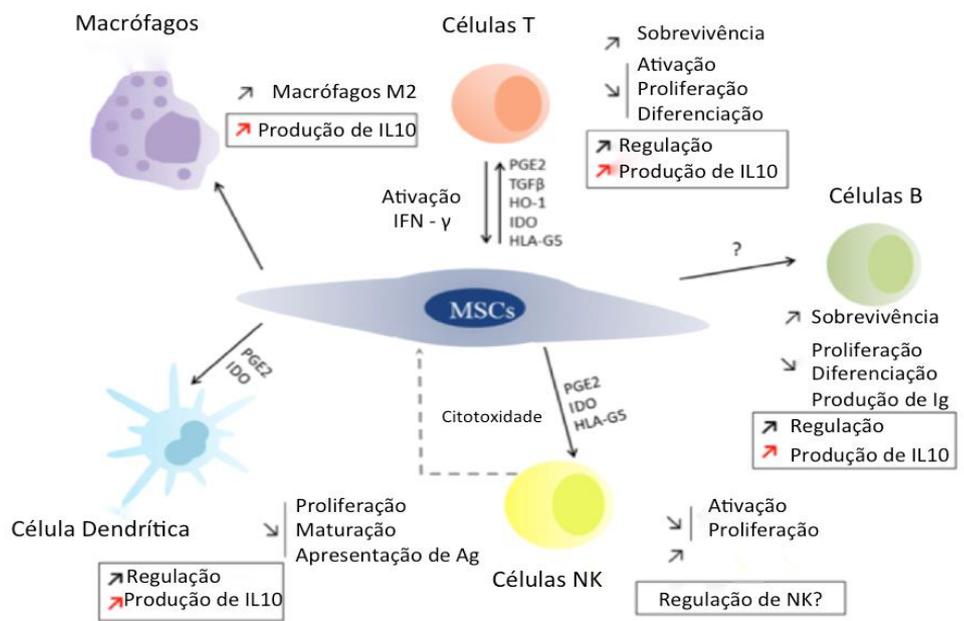
aplicações clínicas, como por exemplo, no tratamento de defeitos ósseos e doenças autoimunes (MA et al., 2014).

Não somente a abundância de fatores de crescimento produzidos pelas CTMs é aprimorada durante a inflamação, mas também a imunossupressão de citocinas inflamatórias. A progressão de doenças inflamatórias, as quantidades e tipos de citocinas inflamatórias podem mudar dinamicamente, resultando em imunossupressão ou aprimoramento imune pelas CTMs (QI et al., 2018).

As CTMs secretam uma ampla ordem de citocinas. Geralmente as citocinas são classificadas em pró ou anti-inflamatórias dependendo da via que influenciam o processo inflamatório. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF α , IL-6) podem estar envolvidas na iniciação e amplificação do processo inflamatório, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) modulam negativamente esses eventos. (CALIXTO et. al., 2004). A função imunossupressora das CTMs é mediada por citocinas anti-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as citocinas anti-inflamatórias como TGF- β , interleucinas (IL-6, IL-10, IL-27, IL-17E, IL-13, IL-12) e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). Em contrapartida, ressalta-se que também podem ser secretadas citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-8, CXCL-8, IL-9 e IL-1 β (LICHTMAN; PILLAI, 2008; NAJAR et al., 2016).

Sob o estímulo de citocinas combinadas, as CTMs produzem ainda várias moléculas imunossupressoras (Figura 4) como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), morte celular programada-1 (PD-L1), hemoxigenase-1 (HO-1), fator inibidor de leucócitos (LIF), antígeno leucocitário humano G classe 5 (HLA-G5) e quimiocinas. Todos esses fatores podem exercer a imunorregulação de CTMs (PAWITAN, 2014; CHO et al., 2017).

Figura 4 - Atividade imunomodulatória das CTMs. As CTMs influenciam as células imunes para induzirem as células reguladoras. Essas células imunológicas reguladoras, como Linfócitos T Regulatórios (Tregs), Células Apresentadoras de Antígenos (APCs) e NKs, criam um ambiente tolerogênico adequado para modular a resposta imune.



Fonte: Adaptado de NAJAR et al., 2016.

O fator de necrose tumoral (TNF) é um exemplo onde se observa a alteração da expressão de citocinas nas CTMs. A IL-6 por sua vez pode estimular respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunológicas ou fatores de estresse ambientais, como infecções e lesões nos tecidos (TANAKA et al., 2014; TABARELLI et al., 2019). Pricola e colaboradores (2009) demonstraram que a IL-6 pode contribuir para manutenção de CTMs em seu estado indiferenciado e proliferativo, protege da apoptose.

A IL-10 foi inicialmente denominada como fator inibidor da síntese de citocinas por Fiorentino e colaboradores (1991). A importância desta citocina dá-se devido às suas propriedades anti-inflamatórias e por exercer de forma geral um efeito inibitório que pode modular tanto a deposição quanto a degradação tecidual (MOORE et al., 2001; GARLET et al., 2007).

A IL-1β é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (ANDREI et al., 2004). Sonomoto e colaboradores

(2012) demonstraram que a IL-1 β induziu eficaz e rapidamente a diferenciação de CTMs humanas em osteoblastos e mineralização.

Pesquisas têm demonstrado que CTMs secretam, além das citocinas, fatores de crescimento e moléculas bioativas responsáveis por efeitos de reparo e regeneração tecidual (REHMAN et. al., 2004; GU et. al., 2014; GUO et. al., 2016; NOVERINA et al., 2019). Aproximadamente 2.000 proteínas foram identificadas nos MCs, como: Fatores de crescimento e matrizes extracelulares associadas à formação óssea, como colágeno-1, sialoproteína-2 óssea, osteopontina, osteocalcina, fibronectina, fator de crescimento endotelial vascular e decorina. Curiosamente, proteína morfogenética óssea (BMP), PDGF-BB, e Fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2), que são relatados para ser eficaz na formação óssea, não foram detectados no meio condicionado (MC) (HIBI, 2016; TAFTI et al. 2018).

2.4 ESFEROIDES MULTICELULARES E TERAPIA CELULAR

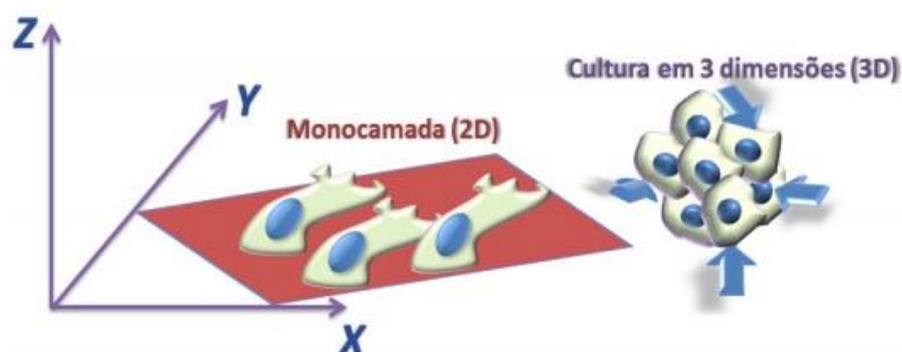
Experimentos com cultura de células representam um valioso recurso para a pesquisa científica. Compreendem um conjunto de técnicas que envolvem o isolamento e cultivo de células em um ambiente artificial (*in vitro*) e altamente controlado, viabilizando a análise de mecanismos bioquímicos, biofísicos e moleculares nas mais diversas condições experimentais. Os resultados obtidos a partir de experimentos *in vitro* tornaram-se indispensáveis para o avanço científico e tecnológico nas áreas de farmacologia, biotecnologia, biomedicina, medicina regenerativa e engenharia de tecidos (FRESHNEY, 2006; MOLINARO et al., 2010).

Em um experimento *in vitro* padrão, as células são cultivadas aderidas a superfícies de garrafas ou poços em placas, especialmente tratadas para facilitar a interação da célula com o substrato. Nesse modelo, as células aderem, adquirem uma conformação espalhada bidimensional e, durante a fase de expansão do cultivo, passam a proliferar e ocupar a área disponível constituindo uma monocamada. As características morfológicas e fisiológicas resultantes do cultivo 2D influenciam diretamente a organização do citoesqueleto, a forma do seu núcleo e o acesso aos nutrientes, com significativa repercussão no perfil de expressão gênica e nas capacidades de proliferação e diferenciação celular. Infelizmente, atividades promissoras observadas em cultura 2D nem sempre podem ser satisfatoriamente

confirmadas em estudos com animais ou em ensaios clínicos, devido à incapacidade de mimetizar o microambiente extracelular onde as células residem em tecidos (FENNEMA et al., 2013; EDMONDSON et al., 2014; GONG et al., 2015).

O cultivo 2D originou avanços conceituais em biologia celular, a compreensão e função de tecidos, porém, o cultivo *in vitro* tridimensional (3D) vem demonstrando mimetizar o microambiente *in vivo*, resultando em um modelo melhor em relação ao cultivo 2D (Figura 5). O cultivo 3D teve início na década de 70, com a finalidade de obtenção de um modelo fisiologicamente mais relevante e que se aproximasse, de forma mais fiel, ao microambiente vivenciado pelas células em tecidos e órgãos *in vivo* (SIMIAN; BISSELL, 2016; DUVAL et al., 2017).

Figura 5 - Esquema ilustrando a diferença entre o arranjo espacial de culturas em monocamada (2D) e em culturas tridimensionais (3D).



Fonte: AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011.

Células semeadas na ausência de um arcabouço passam por um processo de agregação ou “automontagem” e, neste processo, as células em suspensão começam a agregar-se de forma espontânea e a formar os EMs. Os EMs são agregados celulares que não possuem um substrato artificial que auxilie nas interações das células, produzindo e organizando sua própria matriz, a arquitetura do tecido é definida, dentre alguns mecanismos, pelo mecanismo de coesão, refletindo na forma e no arranjo celular (ACHILLI et al., 2012; WAGERS, 2012; CANADAS et al., 2018).

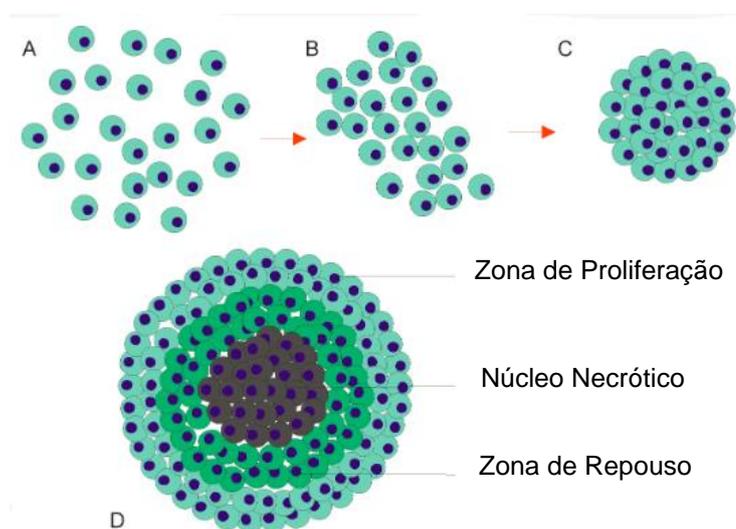
O mecanismo de formação dos EMs baseia-se na capacidade de adesão hemotípica célula-célula, quando sua adesão ao plástico dos frascos de cultura é impedida. Esse processo se dá através de proteínas como as caderinas, que são responsáveis pela adesão entre as células. As diferentes concentrações de caderinas controlam a auto-organização no momento de estruturação nos EMs, as células que

apresentam uma alta concentração da proteína formam o centro do esferoide, e células com menores concentrações se deslocam para a superfície. Outras proteínas, como a conexina 43, criam uma junção adesiva entre pares de célula e o efeito desta proteína age em conjunto com as caderinas (BAO et al, 2011; ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2015).

As células estabelecem relações célula-célula e célula-matriz mais compatíveis com o microambiente encontrado nos tecidos biológicos que resultam na geração de gradiente para nutrientes, gases, fatores de crescimento e fatores de sinal. Já o comportamento celular (proliferação, diferenciação, morte, motilidade, por exemplo) é intimamente influenciado pelo microambiente (ACHILLI et al., 2012; RIMANN; GRAF-HAUSNER, 2012; WANG et al., 2014; GIONET-GONZALES; LEACH, 2018).

Os EMs possuem uma morfologia padrão dependente do tipo celular utilizado, caracterizada pela formação de uma estrutura esférica organizada em regiões distintas (Figura 6). Geralmente são organizadas em uma região periférica ou proliferativa, formada por células metabolicamente ativas e com elevado potencial de proliferação; região intermediária ou quiescente formada por células com membranas mais compactadas e atividade metabólica reduzida; e a região central ou necrótica constituída por células mortas (VADIVELU et al., 2017; ZHANG, 2017).

Figura 6 - Desenho esquemático do esferoide e seu mecanismo de formação. (A) Células semeadas em ambiente não aderente; (B) Formação dos esferoides baseada em aglomeração por agrupamento (cultivo estático) e aglomeração baseado em colisão (cultivo dinâmico); (C) Padrão de consolidação do esferoide (auto-organização); (D) Esferoide multicelular, a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas.



Fonte: Adaptado VADIVELU et al., 2017.

O modelo desenvolvido por Napolitano e colaboradores (2007) é baseado em um hidrogel não adesivo que minimiza as interações célula-substrato, maximizando as interações célula-célula e permite a formação de agregados celulares com tamanho homogêneo. Além disso, a semeadura de células nesse sistema permite a formação de agregados celulares através da decantação. De acordo com a teoria de automontagem, os esferoides assumem a geometria esférica minimizando a energia e maximizando a adesão intercelular (NAPOLITANO et al., 2007).

As CTMs aceleram e melhoram a qualidade do tecido regenerado, porém o tecido lesado apresenta um ambiente desfavorável com presença de fatores pró-apoptóticos, estresse oxidativo e baixa nutrição, reduzindo o desempenho pleno das CTMs. Existem algumas estratégias que contribuem para amplificar o seu potencial terapêutico em sua implantação, aderência, sobrevivência e proliferação (SHOJAEI et al., 2019).

A capacidade de diferenciação celular depende de características funcionais, como o gênero e a idade do doador. Atualmente, existe a necessidade de expandir as CTMs *in vitro* para a obtenção da quantidade suficiente de células, porém, recomenda-se utilizar apenas as quatro primeiras passagens em cultura *in vitro*. Com o avanço do número de passagens, os níveis de diversos marcadores diminuem significativamente com passagens sucessivas, seu metabolismo fica comprometido e as células perdem sua capacidade de crescimento e potencial de migração (MNICH et al., 2019; DAROUIE et al., 2020).

Os EMs, devido sua estrutura densa, representam uma alternativa para suprir as deficiências no carreamento e implantação celular quando comparadas com células individuais injetadas ou transplantadas livremente no corpo. A utilização de EMs aderidos ou presos em suportes biológicos ou sintéticos (*scaffolds*), vem sendo cada vez mais estudadas em terapias baseadas em células (GIONET-GONZALES; LEACH, 2018).

Outra variável importante a ser considerada é o diâmetro dos EMs, pois podem ser administrados aos tecidos isquêmicos. O baixo oxigênio e glicose, as condições de pH alteradas encontradas após o processo de transplante impactam negativamente em sua capacidade regenerativa (MAMIDI et al., 2012). O aumento da apoptose após o transplante é outra grande preocupação, que desencadeia reações

imunológicas, resultando em qualquer agravamento da doença ou rejeição das células transplantadas (OSUGI et al., 2012; DANG et al., 2015).

2.5 LASER EM BAIXA INTENSIDADE (LBI)

2.5.1 Características da luz laser

Albert Einstein, em 1916, em seu artigo “*Zur Quantum Theories der Strahlung*” (VEÇOSO, 1993) descreveu os princípios físicos da radiação laser, abreviação de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (LASER)*” e as classificou em “alta potência” (potencial destrutivo), e “baixa potência” (sem potencial destrutivo) (ROCHA, 2004; JUNIOR et al, 2006).

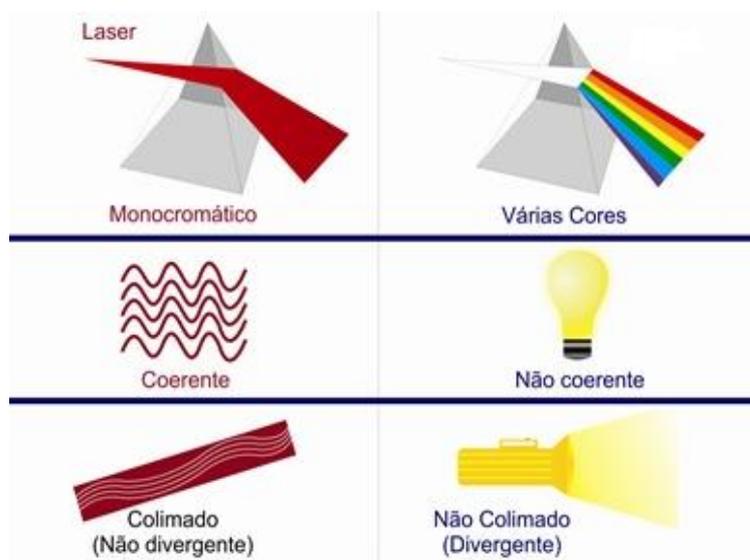
O primeiro feixe de luz laser de material sólido foi constituído utilizando um cristal de rubi com comprimento de onda visível de faixa vermelha do espectro eletromagnético e produzido em 1960 por Theodore Maiman (BAXTER, 1997).

O laser é um instrumento de altíssima precisão geométrica e possui uma ampla utilização. Inicialmente, foi desenvolvido o laser de alta potência, *High Level Laser Treatment (HLLT)*, com efeitos destrutivos e utilizado em tecidos para cortar, coagular e cauterizar. Após anos, deu-se ênfase para aplicações com baixas potências, ficando então conhecido como *Low Level Laser Therapy (LLL T)* (KARU, 1999).

A luz laser possui apenas uma cor (monocromática), seus fótons são idênticos e propagam-se em trajetórias paralelas, ondas em fase e luz polarizada. Trata-se de uma luz coerente, ou seja, as ondas viajam de forma organizada em relação ao tempo, e as amplitudes são iguais e se mantém ao longo do tempo e espaço (Figura 7) (HALLIDAY; RESNICK, 1988; ROCHA, 2004; NEVES et al., 2005).

A luz convencional é composta por uma combinação de mais cores (policromática), possuem fótons com vários comprimentos de onda e propagam-se em todas as direções, as ondas são fora de fase e não são polarizadas (HALLIDAY; RESNICK, 1988; ROCHA, 2004; NEVES et al., 2005).

Figura 7 - Diferença entre a luz laser e luz convencional. A luz laser é monocromática (frequência única) e as ondas luminosas são coerentes (concordância de fase) e paralelas, enquanto a luz convencional é policromática (mistura de várias frequências) e as ondas luminosas não são coerentes.



Fonte: <https://blogfisioterapia.com.br/tratamento-com-luz-intensa-pulsada>

A luz laser possui unidirecionalidade ou colimação, onde o feixe de fótons é paralelo ao eixo do tubo que produz este tipo de energia, possuindo um único foco e uma pequena divergência angular. Seu funcionamento é baseado na absorção de energia para que os átomos se excitem e os elétrons "saltem" de órbitas de baixa energia para órbitas de energia mais alta, e quando retornam ao seu estado fundamental e realizam a liberação de fótons idênticos (HALLIDAY; RESNICK, 1991; NEVES et al., 2005).

O LBI mais utilizado tem emissão a partir de diodos semicondutores, que emitem luz na faixa do visível (vermelho) e na faixa do infravermelho. A onda emitida na faixa do vermelho apresenta um comprimento de onda (λ) entre 630 e 760 nanômetros (nm), e o infravermelho está situado na faixa de 760 e 4.000 nm (infravermelho próximo), sendo os mais utilizados entre 808-810 nm. A radiação vermelha apresenta finalidade de reparação de tecidos mais superficiais, pois seu comprimento de onda não permite uma transmissão efetiva da luz nos tecidos profundos. Já a radiação infravermelha é utilizada quando há a necessidade de influenciar tecidos mais profundos, ou quando se espera efeito analgésico (CRIVELLO, 2010). O laser é classificado como um recurso terapêutico modulador de

processos biológicos por bioestimulação ou bioinibição, dependendo da forma de aplicação e os parâmetros utilizados (GOMES; SCHAPOCHNIK, 2017).

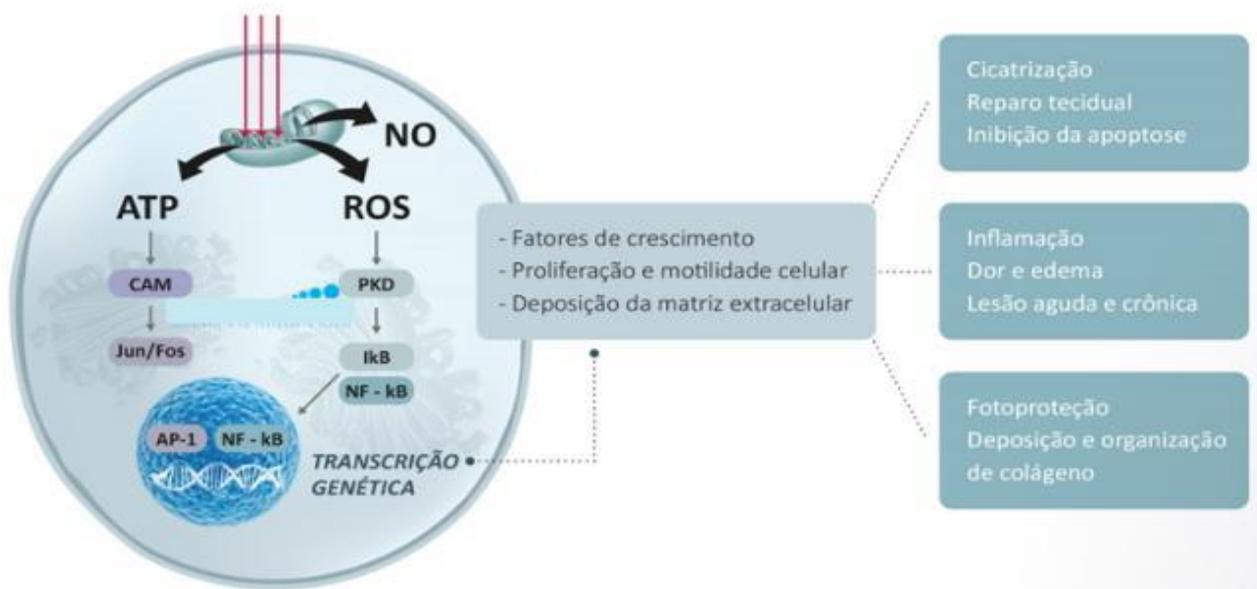
2.5.2 Fotobiomodulação

A fotobiomodulação (FBM) caracteriza o fenômeno interferência na atividade biológica dos seres vivos que resulta da utilização de formas não ionizantes de fontes de luz; incluindo lasers, diodos emissores de luz (LEDs) e luz de amplo espectro nos parâmetros de luz visível e infravermelho (TSAI; HAMBLIN, 2017). A natureza do efeito modulador pode ser de estímulo ou inibição de uma função. Seu mecanismo de ação consiste teoricamente na absorção de luz (fótons) pelos fotorreceptores presentes nas células e conhecidos como cromóforos, modulando as reações fotoquímicas e bioquímicas, sintetizando ATP na mitocôndria através da aceleração da cadeia transportadora de elétrons. Sugere-se que, dentre tais fotorreceptores, as mitocôndrias, que fornecem energia para as células, contém uma série de enzimas que participam nas reações redox da cadeia respiratória, tornando-se o principal mecanismo das reações metabólicas ocorridas em uma célula, além do citocromo-c oxidase e superóxido dismutase-NADH, que demonstraram alteração após emissão de fótons, alterando o nível de oxidação e alterando a fluência dos elétrons de uma molécula, capazes de aumentar a síntese de DNA e RNA (HU et al., 2007; ALGHAMDI; MOUSSA, 2012; ASSIS et al., 2012).

Os efeitos fotobiomoduladores podem ser divididos em diretos e indiretos, sendo os diretos aqueles observados logo após a fototerapia, e os efeitos indiretos são observados horas ou dias após a exposição ao laser e pode exercer três efeitos principais: redução da dor, modulação da inflamação e aceleração da cicatrização.

Após a absorção dos fótons pelas células (Figura 8), vias de sinalização são ativadas, ocorrendo a ativação de fatores de transcrição. Esses fatores podem promover um aumento da expressão de genes relacionados a síntese proteica, migração e proliferação celular, sinalização anti-inflamatória, vias anti-apoptóticas e enzimas antioxidantes (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; HOCHMAN, 2018).

Figura 8 - O efeito da radiação LASER no metabolismo celular ocorre nas mitocôndrias, deslocando o óxido nítrico (NO) da cadeia respiratória e elevando os níveis de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas mudanças atuam via adenosina cíclica monofosfato (cAMP) e proteína quinase D (PKD) que ativa os fatores de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NFκ-B), resultando em alterações na expressão gênica e produção de mensageiros químicos implicados nas alterações celulares.



Fonte: Adaptado de FERREIRA; BONFIM, 2018.

Para o uso terapêutico da radiação laser, alguns parâmetros devem ser considerados para que o efeito seja efetivo sobre o tecido. A interação do laser com os tecidos biológicos depende do comprimento de onda, densidade de energia, área do feixe, intervalo de aplicação, forma de aplicação (contato ou varredura), área irradiada e a forma de onda (contínuo ou pulsado) (MOORE et al., 2005).

Em culturas celulares convencionais, há uma preferência pela utilização de fluências baixas, sendo de 0,5 J/cm² a 4 J/cm² as mais utilizadas (ARANY et al., 2014; DINIZ; MATOS; MARQUES, 2015; ZACCARA et al., 2015).

Ginani e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da radiação LASER na proliferação de CTMs demonstrando que a terapia fotobiomoduladora parece uma alternativa promissora para a estimulação de proliferação celular *in vitro*, inclusive nos procedimentos de engenharia tecidual. A FBM com LBI pode induzir múltiplos efeitos biológicos no tecido, acelerando a cura de fraturas e reparação óssea, além de possuir a capacidade de modular as funções biológicas de CTMs (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Wu e colaboradores (2012) demonstraram que a atividade da fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação precoce dos osteoblastos, foi significativamente aumentada após tratamento com LBI, além do aumento da proliferação após o tratamento em CTMs da medula óssea, células-tronco adiposas (CTA) e polpa dentária humana. Em relação à proliferação de CTMs, o LBI mostrou resultados positivos e efeitos promissores; entretanto, os mecanismos biológicos desses efeitos permanecem parcialmente não compreendidos.

Nurković e colaboradores (2017) mostraram que houve aumento na velocidade de proliferação, diferenciação, síntese de osteocalcina e do fator de transformação de crescimento $\beta 1$ em células osteoblásticas humanas após a irradiação com LBI. Os autores sugerem que a FBM pode ser uma preliminar na preparação *in vitro* de CTMs, antes das células serem transplantadas no sítio da lesão em condições desfavoráveis.

Entretanto, apesar das pesquisas que mostram o potencial osteogênico do LBI, os parâmetros utilizados em cada protocolo de tratamento como o comprimento de onda, potência, fluência, energia, número de pontos a serem aplicadas, frequência do tratamento, e diâmetro da lesão; ainda são muito discrepantes que dificultam a escolha do melhor ou mais adequado protocolo de tratamento (MOREIRA et al., 2018).

As CTMs vêm surgindo como alternativas promissoras no processo de reparo ósseo, e a FBM influencia a função celular melhorando o processo de reparo. Porém, são escassos estudos com ambas as terapias associadas ao cultivo celular 3D. Segundo nossa hipótese, suportadas por trabalhos científicos que utilizam a FBM com LBI como estímulo ao reparo tecidual, os efeitos biomoduladores da FBM durante o processo de constituição de EMs *in vitro* possam melhorar as respostas celulares para o uso em MR óssea.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi analisar a influência fotobiomoduladora induzida pela radiação laser de baixa intensidade, no comprimento de onda de 685 nm, em células-tronco mesenquimais da bursa subacromial humana (CTMBSH) cultivadas como EMs para futura aplicação em MR óssea.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência fotobiomodulatória induzida pela radiação laser no processo de constituição (formação) dos EMs;
- Analisar a influência fotobiomodulatória induzida pela radiação laser na viabilidade celular dos EMs ao final de sua constituição e após transferência (carreamento) e adesão em ambiente 2D;
- Analisar a influência fotobiomodulatória induzida pela radiação laser sobre o perfil de diferenciação osteogênica das CTMBSH após carreamento e adesão em cultura 2D;
- Analisar a influência fotobiomodulatória induzida pela radiação laser sobre o perfil de produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α durante o processo de constituição dos EMs;
- Analisar a influência fotobiomodulatória induzida pela radiação laser sobre perfil de liberação de biomoléculas, como fatores de crescimento, durante o processo de constituição dos EMs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUJEITO

Uma voluntária, S.A. C, 39 anos de idade, clinicamente saudável, que não fez uso de medicamentos que acarretam alterações hematológicas, foi submetida à cirurgia eletiva artroscópica do ombro esquerdo devido a uma lesão do manguito rotador, realizada por um cirurgião ortopédico.

Previamente ao procedimento cirúrgico, a voluntária foi devidamente informada sobre os benefícios e riscos relacionados à pesquisa, bem como os procedimentos a serem realizados para a coleta da amostra de bursa subacromial durante a cirurgia.

A participação como voluntária foi confirmada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo item 9.1) de acordo com as normas previstas pelo Conselho Nacional de Saúde nº 466, de 2012 do Ministério da Saúde. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara, CEP UNIARA, sob o número do parecer 3.893.032 (Anexo item 9.2).

4.2 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO DA BURSA SUBACROMIAL

As CTMBSH foram coletadas durante o procedimento cirúrgico utilizando o protocolo descrito por Steinert e colaboradores (2015). Durante a inspeção artroscópica de rotina da região subacromial, faz-se necessária a ressecção parcial da bursa para visualização da lesão do manguito rotador, sendo esta parte da bursa subacromial desprezada. A figura 9 demonstra o momento da captura dos fragmentos da bursa subacromial utilizados nesta pesquisa.

Figura 9 - Visão artroscópica do momento da obtenção de uma amostra de bursa subacromial (*). Abaixo da bursa subacromial observa-se o tendão do supraespinhal (**).

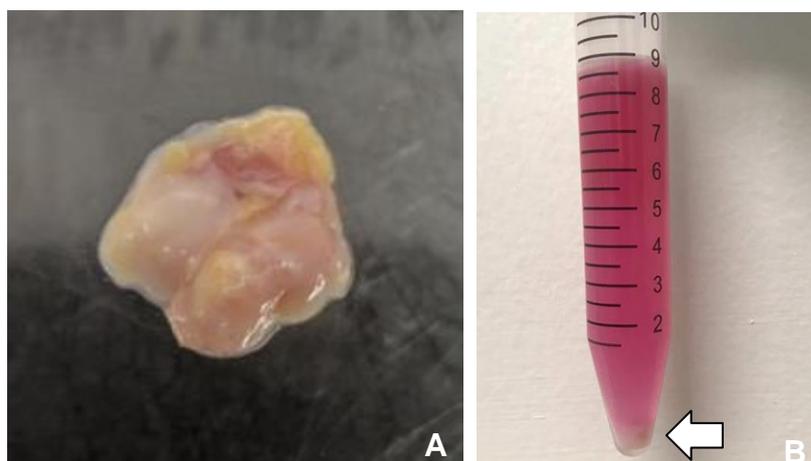


Fonte: Arquivo Sandro Baraldi Moreira, 2019.

Os fragmentos coletados foram transferidos de forma antisséptica para um tubo Falcon de 50 ml, contendo solução estéril tampão de fosfato salino (PBS-1X – Constituído por NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7,4). Posteriormente, os fragmentos foram conduzidos até o Laboratório de Ensaios Clínicos Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara (LECER/UNIARA) cerca de 2 horas após serem coletados em cirurgia, para início do processo de extração celular.

Os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri (Figura 10-A) em ambiente estéril, triturada com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 24, e acondicionada em 4ml de solução de colagenase tipo I (1 mg/ml - Sigma-Aldrich) para realização da digestão enzimática das amostras teciduais, permanecendo incubada a 37°C por 4 horas (STEINERT et al., 2015). Após incubação, a enzima foi inativada pela adição de 4 ml de meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Sigma-Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS - Vitrocell), 1% Penicilina (100 U/ml - Vitrocell) e Estreptomicina (100µg/ml - Vitrocell). A amostra foi centrifugada a 300G por 3 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular obtido (Figura 10-B) foi ressuscitado em 1 ml do mesmo meio de cultura e transferido para uma garrafa de cultivo celular (75 cm² - KASVI) contendo 6 ml de meio de cultivo. A garrafa foi acondicionada em estufa de cultura celular (Panasonic – CO₂ Incubator MOC -19 AIC-UV), com temperatura de 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

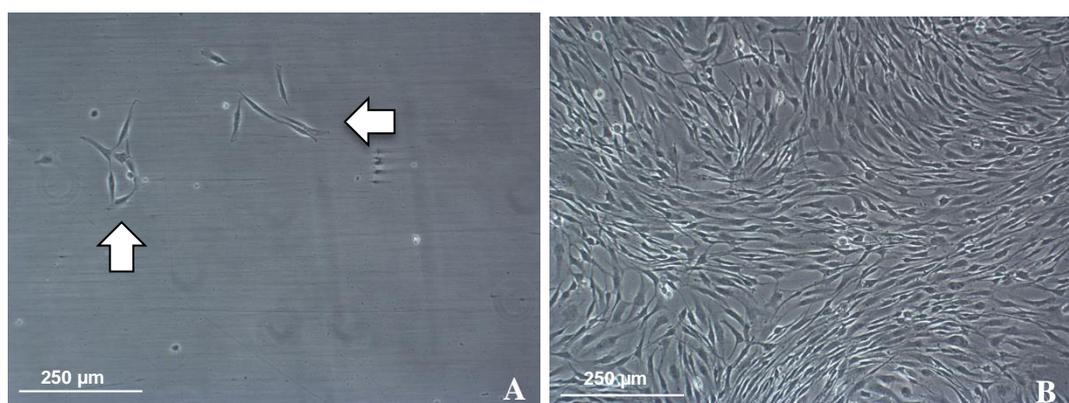
Figura 10 - Processo de extração das CTMBSH. (A) Fragmentos da bursa subacromial após serem trituradas em uma placa de Petri e (B) Precipitado celular (seta) após o processo de digestão enzimática e centrifugação.



Fonte: Própria autora

Após 72 horas, o meio de cultura foi removido, a garrafa foi lavada com PBS-1X por três vezes, e substituído por 6 ml de meio de cultivo. Foram observadas poucas células aderidas à superfície da garrafa de cultivo (Figura 11-A), com morfologia fusiforme, caracterizando a fase de isolamento por adesão preferencial. O acompanhamento da aderência e o crescimento celular foi realizado por meio de microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) utilizando objetivas de 4 e 10x. As trocas do meio de cultivo foram realizadas a cada 48 horas, e o tempo médio de cultivo foi de 11 dias até as células atingirem 80% de confluência (Figura 11-B).

Figura 11 - Cultura de CTMBSH. (A) Quarto dia de cultivo para isolamento. As setas indicam células de morfologia fusiforme e aderidas na garrafa. (B) décimo primeiro dia de cultura celular, onde houve um aumento na confluência celular. Objetivas de 10x.



Fonte: Própria autora

4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL

As CTMs isoladas foram submetidas a diferenciação osteogênica e adipogênicas para comprovação do perfil mesenquimal. As células, na segunda passagem (P2), foram removidas da garrafa pela adição de solução de tripsina/EDTA (0,25% - GIBCO), e ressuspensas em 1 ml meio de cultivo DMEM. As células foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer e semeadas na densidade de 3×10^5 células/poço, em uma placa de 12 poços. Após a adesão o meio de cultura foi substituído por meios específicos de indução para diferenciação osteogênica e adipogênica por um período de 14 dias utilizando protocolo de Maniopoulos e colaboradores (1988).

O meio de diferenciação osteogênica foi composto por: meio de cultura de Eagle's modificado por Dulbecco (DMEM - Vitrocell), suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, 10 mM de β -glicerofosfato, 0,1 μ M de dexametasona e 50 μ M de ácido ascórbico. O meio de diferenciação adipogênica foi constituído de: meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 μ M de dexametasona, 200 μ M de indometacina, 10 μ M de insulina (MANIATOPOULOS et al., 1988).

O emprego do meio DMEM isento de suplementação, com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina foi utilizado como controle negativo. Após o período de diferenciação, os poços foram lavados com 300 μ l de PBS-1X, e as células foram fixadas em 1 ml paraformaldeído 10%, e após sua remoção, coradas com 1 ml *Alizarina Red* (ARS-Sigma) para detecção de diferenciação osteogênica e por 1 ml *OilRed* (ORO-Sigma) para a detecção de diferenciação adipogênica.

4.4 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES MULTICELULARES

Para a constituição dos EMs foi utilizado um protocolo modificado de Napolitano e colaboradores (2007), baseado no princípio de cultivo em micropoços com superfície não aderente. Para o preparo da agarose a 2% foram utilizados 100 ml de PBS- 1X para 2g de agarose. A solução foi fundida em micro-ondas por

aproximadamente 1 minuto e 10 segundos em potência máxima até obter homogeneidade e transparência. Após a fusão o recipiente foi retirado do microondas, e transferido para um banho-maria para a temperatura permanecer em torno de 60°C e o gel não se solidificar.

Com auxílio de um pipetador automático, o volume de 2 ml de agarose líquida foi inserido no interior de um contramolde para posterior solidificação. O contramolde utilizado, produzido por impressão 3D e fornecido pelo Centro de Tecnologia e Informação Renato Archer, gera moldes constituídos por 164 micropoços com diâmetro individual de 500 µm (Figura 12).

Figura 12 - Fotografia do contramolde (*) e do molde de agarose (**) contendo os micropoços de cultivo celular para formação dos EMs.



Fonte: Própria autora

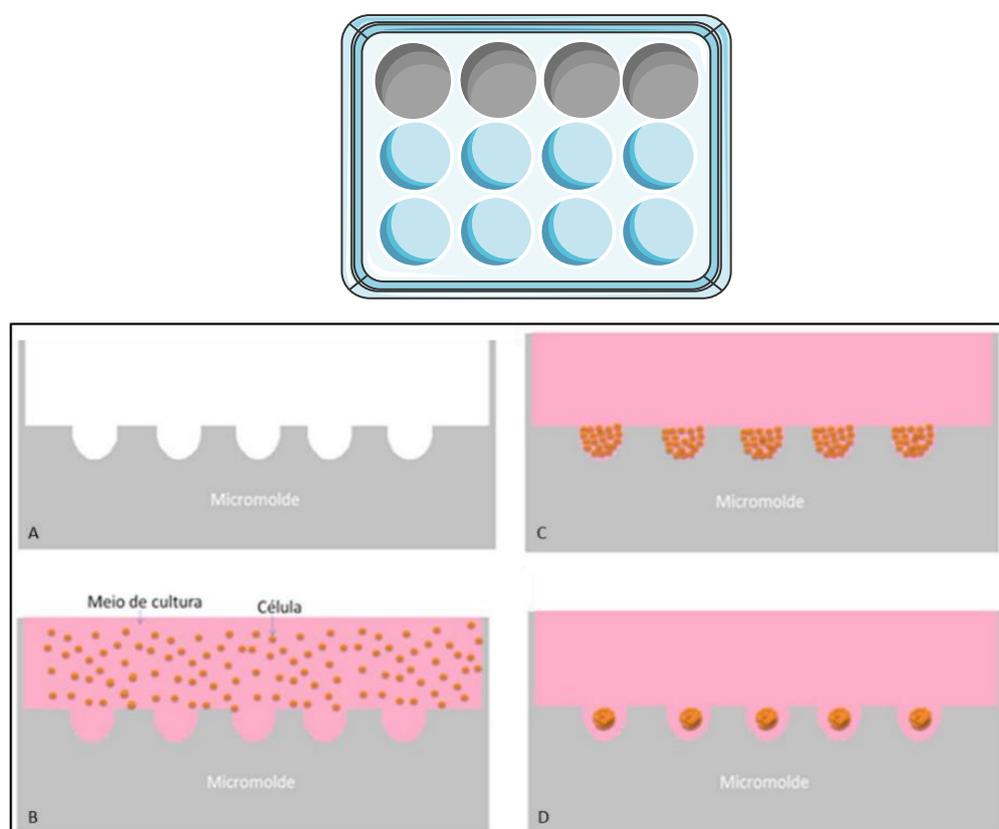
A esterilização dos 20 moldes foi realizada em fluxo laminar com a luz ultravioleta ligada (UV), e submersos em etanol 70%. O etanol foi trocado por três vezes a cada 30 minutos, totalizando 1 hora e 30 minutos. Após a esterilização, os moldes foram lavados três vezes com PBS-1X e armazenados em tubos Falcon de 50 ml contendo DMEM sem suplementação e mantidos na geladeira por 5 dias.

As CTMBSH utilizadas na realização do experimento encontravam-se na terceira passagem (P3). Após a remoção das células pelo método de tripsinização e ressuspensão em meio DMEM suplementado com 5% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina. As células foram quantificadas e semeadas na densidade de $3,5 \times 10^5$ células/molde. A redução do SFB foi realizada com o intuito de expor as

CTMBSH a condições de desfavorecimento de vários componentes que melhoram o desenvolvimento celular, a fim de verificar a influência da radiação evidenciando a amplificação da resposta biológica das células nestas condições.

Foram utilizados quatro moldes por grupo experimental inseridos em placas distintas de culturas de 12 poços (KASVI). Os moldes permaneceram submersos em 1 ml de meio de cultura, e mantidos em condições ideais de cultivo por cinco dias, tempo necessário à formação dos EMs conforme Figura 13.

Figura 13 - Esquema representativo das etapas de constituição dos EMs. Os moldes foram acondicionados em placas de 12 poços em quadruplicata para cada grupo experimental. (A) molde de agarose sem células, (B) suspensão de CTMBSH (semeadura) (C) células dentro dos poços do molde, (D) esferoides formados dentro dos poços.



Fonte: Adaptado de SANTOS, 2014.

4.5 LASER EM BAIXA INTENSIDADE (LBI)

4.5.1 Dispositivo emissor de radiação LASER

O equipamento utilizado foi o Thera Lase® (DMC, São Carlos-SP, Brasil)

(Figura 14), constituído de diodos semicondutores e emissores da radiação proposta. Caracteriza-se pela emissão da radiação por meio de uma fibra óptica e o feixe colimado, divergindo a partir da extremidade da fibra e determinando uma relação diretamente proporcional entre a distância de um alvo e a área de projeção do feixe.

O equipamento permite a seleção de comandos do λ , modo de emissão (contínuo ou pulsado), dose de radiação e potência. O equipamento foi submetido previamente à aferição da radiação para a garantia dos parâmetros dosimétricos planejados.

Figura 14 - Equipamento Thera Lase[®], fornecido pela empresa DMC Equipamentos, utilizado nos experimentos.



Fonte: Própria autora

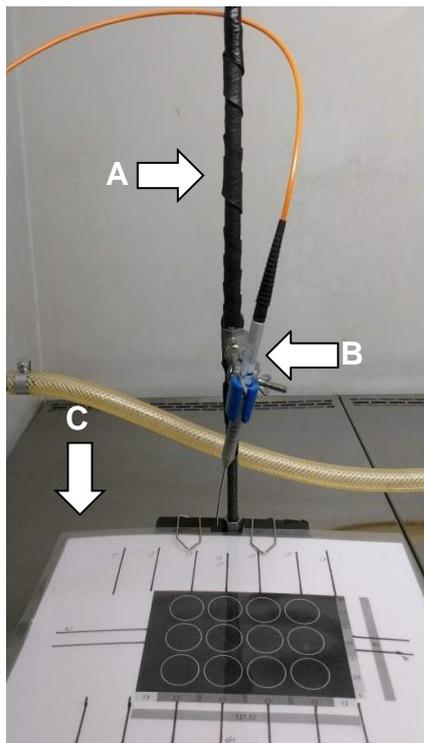
4.5.2 Plataforma para irradiação

Para viabilizar o processo de irradiação, foi desenvolvido um dispositivo de suporte constituído de uma base e uma haste vertical. A plataforma foi posicionada para proporcionar o adequado posicionamento da placa de cultura e da probe emissora da radiação, para que a probe se mantivesse perpendicular e imóvel em relação à superfície de irradiação durante todo o procedimento. A probe emissora de radiação possui uma leve angulação, o que tornou necessário encontrarmos a garra para sua fixação correta, a fim de proporcionar o adequado posicionamento do feixe,

na posição perpendicular.

A superfície da base, da cor preta para redução da reflexão da radiação que transpassa o molde, contém um guia com marcações destinadas à orientação do posicionamento da placa a fim de garantir a incidência do feixe de radiação sobre a área de cada molde. A haste foi projetada para fixar a probe e proporciona o posicionamento ideal e estabilidade durante as irradiações (Figura 15).

Figura 15- Plataforma para irradiação indicada pela seta (A), seta (B) garra de posicionamento e fixação da probe óptica, e a seta (C) guia utilizado na orientação da placa, viabilizando a realização dos procedimentos de irradiação.



Fonte: Própria autora.

4.5.3 Procedimento de irradiação

Foram estabelecidos 4 grupos experimentais, sendo 1 grupo controle (**GC**) e 3 grupos de irradiação LASER, com as respectivas fluências de 0.5 J/cm² (**G-0.5**), 1.0 J/cm² (**G-1.0**) e 1.5 J/cm² (**G-1.5**). Os moldes do GC foram submetidos aos mesmos procedimentos de manipulação dos grupos irradiados, mas com o equipamento desligado, com os parâmetros utilizados dispostos na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros do laser de baixa intensidade utilizados no procedimento de irradiação dos EMs.

Meio ativo	Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl)
Comprimento de onda	685 nm
Potência de saída	35 mW
Modo de emissão	Contínuo
Área de irradiação	3.85 cm ²
Densidade de potência	9 mW/cm ²
Densidade de energia	0.5 J/cm ² / 1.0 J/cm ² / 1.5 J/cm ²
Tempo de exposição	55 s/110 s/165 s
Energia depositada	1.9 J/ 3.8 J/ 5.7 J
Distância da probe/molde	4 cm

As irradiações foram realizadas no interior do fluxo laminar em ambiente estéril. Durante os procedimentos de irradiação, as tampas das placas foram removidas e a luz do fluxo desligada. O protocolo de irradiação consistiu de seis aplicações, sendo a primeira realizada imediatamente após a semeadura dos moldes, com intervalo de 24 horas entre cada irradiação. O desenho experimental (Figura 16) demonstra as etapas de irradiação e as análises realizadas durante o experimento.

Figura 16 – Esquema cronológico do procedimento experimental.



No dia 0 do experimento, os moldes foram celularizados, fotografados e irradiados. Nos dias 1 ao 5, os moldes foram fotografados, amostras de meio de cultura foram coletadas e os moldes irradiados. Foram coletados diariamente 200 µl de meio de cultura dos moldes antes de cada processo de irradiação, e armazenados no freezer -80°C para análise do perfil de liberação de citocinas no meio de cultura durante o processo de constituição dos EMs, e o mesmo volume de meio foi

adicionado para manter as condições experimentais.

Ao final do processo de constituição dos EMs, no dia 6, foram retirados e armazenados todos os meios de cultura dos grupos experimentais para a análise do perfil de liberação de biomoléculas. Após a retirada dos meios, foi realizado o ensaio de viabilidade celular dos EMs nos moldes, e posteriormente, foi realizado o ensaio de carreamento dos EMs para uma placa 2D.

No dia 10, os EMs aderidos foram fotografados e realizado o ensaio de viabilidade celular. O meio de cultura dos EMs aderidos foi substituído pelo meio de diferenciação osteogênico, para indução da diferenciação celular por 14 dias. Ao final do período de indução, no dia 24, foi realizada a coloração dos nódulos de matriz mineralizada e os nódulos foram fotografados.

4.6 ANÁLISE DA CONSTITUIÇÃO DOS EMs

Imagens digitais foram obtidas diariamente durante o processo de constituição dos esferoides utilizando a microscopia de campo aberto, sem o contraste de fase. As placas contendo os moldes celularizados foram observadas ao microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100) e o software TCapture IS 500 foi utilizado para medir os diâmetros dos EMs. Foram fotografados os mesmos campos de cada molde contendo sete esferoides em cada grupo experimental por seis dias (Dia 0 ao Dia 5).

4.7 ENSAIO DE VIABILIDADE E CARREAMENTO CELULAR

A viabilidade celular foi realizada por ensaio de fluorescência Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido). A Resazurina é um corante azul pouco fluorescente que permite quantificar viabilidade celular através da oxirredução, onde é convertida em Resorufina, que possui uma coloração rósea de alta fluorescência, segundo protocolo descrito por Pagé e colaboradores (1993). O ensaio foi realizado em dois momentos: no quinto dia após a formação dos EMs, sem serem retirados dos moldes e após a realização do carreamento e adesão celular.

Para realização do carreamento, os EMs foram retirados dos moldes por meio de lavagens utilizando 1 ml de meio de cultura, homogeneizando com auxílio de um pipetador (1.000 µl) lentamente para que não sofressem danos. Os EMs

correspondentes a cada molde foram transferidos para um poço em uma placa de 24 poços (KASVI) e após quatro dias encontravam-se aderidos e um novo teste de viabilidade celular foi realizado.

Para a análise de viabilidade celular, o meio de cultivo dos moldes foi substituído por um meio de cultivo suplementado com Resazurina (100 µg/ml). As placas foram novamente acondicionadas em estufa por um período de quatro horas.

Após esse período, foram retiradas alíquotas de 100 µl do meio de cultivo, foram transferidas para poços em uma placa de 96 poços e, posteriormente, submetidas à análise de fluorescência em leitor de placa (Biotek®), com excitação e detecção nos comprimentos de 530 e 590 nm, respectivamente. O mesmo protocolo foi utilizado para análise de viabilidade pós adesão, e os resultados foram expressos em forma percentual em relação aos valores obtidos no GC.

4.8 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA PÓS-CARREAMENTO

Foi analisado o potencial de diferenciação osteogênica das CTMBSH após a simulação do carreamento celular através da quantificação de nódulos de mineralização produzidos.

Para tal determinação, foram retirados os meios de cultura e os poços foram lavados com PBS-1X, o meio de cultura foi substituído por um meio de diferenciação osteogênica, descrito anteriormente no item 4.3. A quantificação de matriz foi realizada através do software ImageJ (National Institutes of Health, MA, EUA) utilizando cinco campos de cada grupo experimental utilizando as objetivas de 20x.

4.9 ANÁLISE DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS

O perfil de produção de citocinas foi estabelecido pela determinação de imunodeteção, e os níveis de expressão de citocinas foram determinados utilizando meios de cultura. As análises foram realizadas no Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar (Universidade Federal de São Carlos) com colaboração da Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal.

As concentrações de IL-6, IL-10, IL-1 β , e TNF- α presentes no meio de cultura condicionado coletado durante o desenvolvimento dos EMs foram mensuradas por

meio de ensaios enzimáticos (*ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando *kits* comerciais e seguindo os protocolos descritos pelos fabricantes.

Para as análises das citocinas IL-6 e TNF- α foram utilizados *kits* OptEIA (BD Biosciences), para análises de IL-1 β e IL-10 foram utilizados os *kits* DuoSet ELISA (R&D Systems). A técnica se baseia no modelo ELISA sanduíche: As microplacas de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e permaneceram *overnight* em 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 300 μ l/poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com a solução bloqueadora contendo albumina (PBS pH 7,2 + 4% Albumina bovina) por 1 hora, à TA. Em seguida, após mais um ciclo de lavagens, as amostras dos MCs coletados foram adicionadas e efetuadas curvas padrão de citocinas recombinantes. As placas foram mantidas em TA por 2 horas e, em seguida, foi realizada uma nova lavagem. Foram então adicionados anticorpos anti-citocinas biotinilados ou conjugados com enzima peroxidase e mantidos por 1 hora e 30 minutos em TA. Após cinco lavagens com PBS-Tw, foi adicionado 100 μ l da solução reveladora contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi bloqueada com 50 μ L de ácido sulfúrico 1M e a leitura realizada no espectrofotômetro em 450 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml.

4.10 ENSAIO DE FERIDA

O ensaio de ferida foi realizado para avaliar o perfil de liberação de biomoléculas, como fatores de crescimento, no meio de cultura durante o processo de constituição dos EMs, e seu potencial de indução do fechamento da ferida através da proliferação e migração celular, utilizando protocolo descrito por Rodriguez e colaboradores (2005).

Foram utilizadas células osteoblásticas da linhagem OSTEO -1 (DEBONI, 1995), cultivadas em garrafas com meio de cultura de *Eagle's* modificado por *Dulbecco* (DMEM - Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Nutricell), Penicilina (100 U/ml - Vitrocell) e Estreptomicina (100 μ g/ml - Vitrocell), e mantidas em estufa de cultivo celular (Panasonic – Co₂ incubator MOC -19 AIC-UV) à

temperatura de 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

As células foram removidas das garrafas de cultivo, quantificadas e ressuspensas em 1 ml de DMEM suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina, e semeadas na densidade de 2x10⁴ células/poço em uma placa de 48 poços (KASVI), em triplicata para cada grupo experimental. Após 24 horas foi realizada uma escarificação linear em cada poço com o auxílio de uma ponteira de 10 µl (KASVI) estéril. Foi realizado uma lavagem com PBS-1X para retirada de células em suspensão e foram adicionados 300 µl/poço de meio de cultivo de acordo com cada grupo experimental: **Grupo GC-SFB** (Controle DMEM com 10% SFB); **Grupo GC** (Controle DMEM sem SFB); **Grupo G-0.5** (150 µl de meio condicionado G-0.5 + 150 µl de DMEM sem SFB); **Grupo G-1.0** (150 µl de meio condicionado G-1.0 + 150 µl de DMEM sem SFB); **Grupo G-1.5** (150 µl de meio condicionado G-1.5 + 150 µl DMEM sem SFB).

Microfotografias de campo foram retiradas no momento da escarificação e após 24 horas. A quantificação da ocupação celular para o fechamento da ferida foi realizada pela porcentagem da área recoberta no tempo de 24 horas em relação ao tempo zero hora. Foram utilizados três campos de cada grupo experimental com a objetiva de 10x e as imagens foram analisadas através do software ImageJ.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

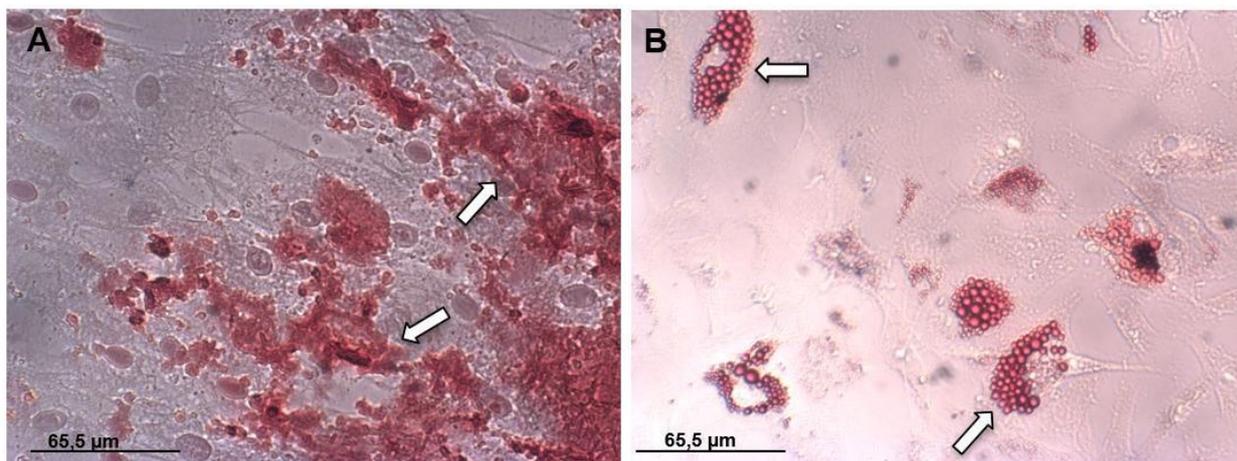
Os dados referentes aos valores dos ensaios realizados foram tabulados e submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prisma 7.01. Foi utilizado o teste paramétrico ANOVA One-Way, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os resultados obtidos foram expressos em Média ± Erro Padrão (EP) e o nível de significância adotado foi de 5% (p<0,05).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL MESENQUIMAL

Os ensaios de potencial de diferenciação das células cultivadas foram realizados para a verificação do perfil mesenquimal caracterizado pelo potencial de diferenciação multilinhagem. Os resultados referentes ao perfil mesenquimal demonstraram que as células extraídas e isoladas da bursa subacromial exibiram o perfil mesenquimal. As micrografias das células isoladas foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênica (Figura 17-A) apresentaram nódulos de mineralização, e as cultivadas em meio de diferenciação adipogênico (Figura 17-B) apresentaram gotículas de gordura.

Figura 17 - Micrografias da determinação do perfil mesenquimal das células da bursa subacromial humana incubadas com meio de diferenciação por 14 dias. (A) As setas indicam os nódulos de mineralização corados com *Alizarina red*, característica da diferenciação osteogênica e (B) A seta indica as gotículas de gordura coradas com *Oil red*, característica da diferenciação adipogênica. Objetivas de 40x.



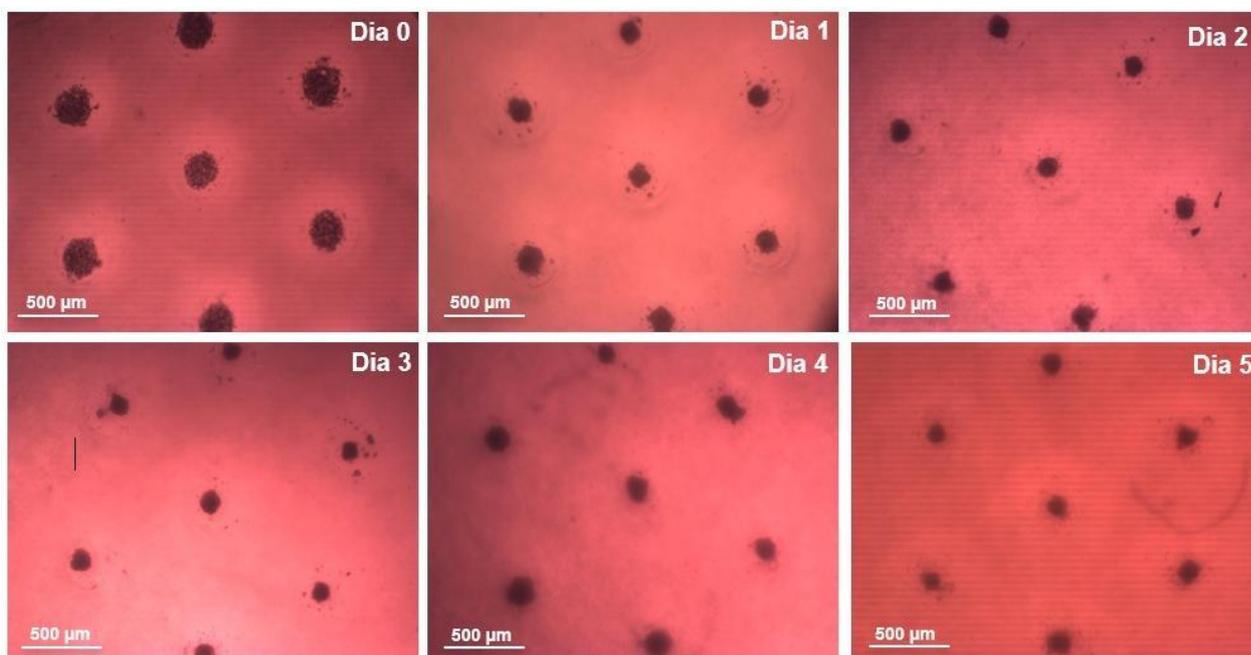
Fonte: Própria autora

5.2 CONSTITUIÇÃO DOS ESFEROIDES MULTICELULARES

A constituição dos EMs foi observada diariamente como demonstrado pela figura 18. Observou-se que no dia da celularização dos moldes, as CTMBSH encontravam-se dispersas nos micropoços (Dia 0). Após 24 horas foi possível observar a ocorrência da fase de aglomeração celular. A partir de 48 horas (Dia 2) foi

identificado a compactação caracterizada pela diminuição do diâmetro, que progrediu até o sexto dia de cultivo (Dia 5), encerrando o processo de constituição. Esta cinética foi observada nos GC, G-0.5 e G-1.0.

Figura 18 - Micrografias da sequência temporal do processo de constituição e compactação dos EMs do GC. Objetivas de 4x.

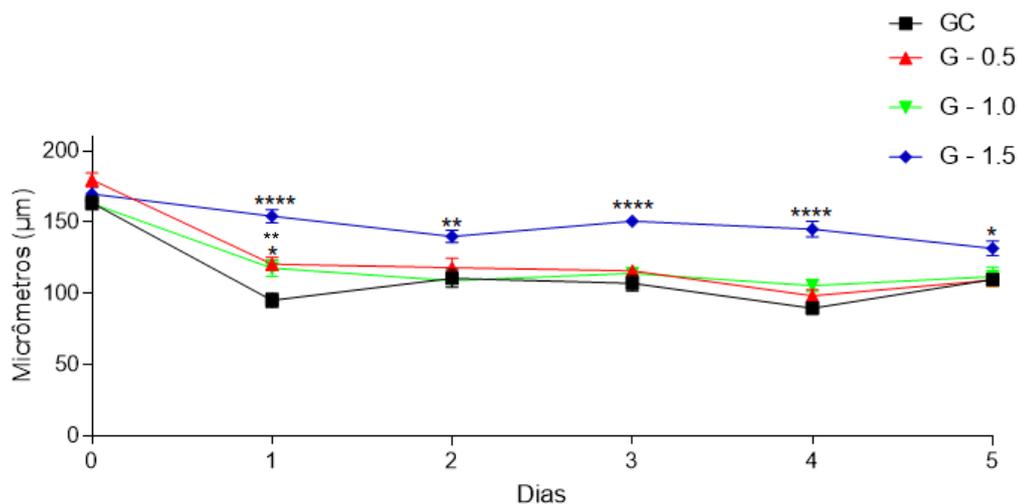


Fonte: Própria autora

Os resultados das análises comparativas do processo de constituição dos EMs, permite observar nos grupos G-0.5 e G-1.0 um padrão de constituição similar ao GC em todos os tempos. No grupo G-1.5 os EMs não apresentaram a mesma cinética de compactação observado nos demais grupos.

A figura 19 demonstra as medidas dos diâmetros dos EMs e seus valores significantes durante o processo de constituição, demonstrando a diferença significativa entre os diâmetros do G-1.5 em comparação com os demais grupos experimentais, sugerindo uma interferência da radiação em todas as etapas do processo de constituição dos EMs neste grupo.

Figura 19 – Representação gráfica dos diâmetros dos EMs durante o processo de constituição e tabela de valores significantes da comparação dos diâmetros entre os grupos experimentais. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001).

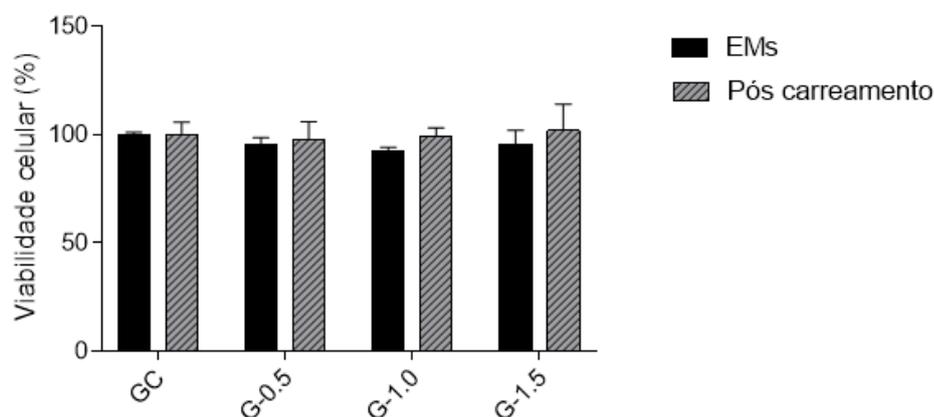


Dia	Grupos Experimentais	MD ± EP (µm)	Valor de p
1	GC x G-0.5	107.93 ± 4.83	< 0,01
	GC x G-1.0	106.58 ± 5.41	< 0,05
	GC x G-1.5	124.78 ± 4.83	<0,0001
	G-0.5 x G-1.5	137.4 ± 4.56	<0,001
	G-1.0 x G – 1.5	136.1 ± 5.15	<0,001
2	GC x G-1.5	125.4 ± 5.15	<0,01
	G-0.5 x G-1.5	113.7 ± 5.14	<0,05
	G-1.0 x G – 1.5	124.6 ± 3.85	<0,05
3	GC x G-1.5	128.95 ± 4.70	<0,0001
	G-0.5 x G-1.5	133.35 ± 3.90	<0,05
	G-1.0 x G – 1.5	132.55 ± 3.85	<0,05
4	GC x G-1.5	117.44 ± 4.43	<0,0001
	G-0.5 x G-1.5	121.81 ± 4.90	<0,0001
	G-1.0 x G – 1.5	125.35 ± 4.82	<0,0001
5	GC x G-1.5	120.8 ± 4.51	<0,05
	G-0.5 x G-1.5	120.6 ± 3.21	<0,05
	G-1.0 x G – 1.5	121.8 ± 5.88	<0,05

5.3 ANÁLISE DE VIABILIDADE E CARREAMENTO CELULAR

Os resultados obtidos no ensaio de viabilidade ao final da constituição dos EMs, e no quarto dia após o carreamento dos EMs em cultivo convencional (2D), demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 20). Tais resultados sugerem a inexistência de uma influência modulatória da radiação na viabilidade celular no processo de constituição dos EMs e pós-carreamento.

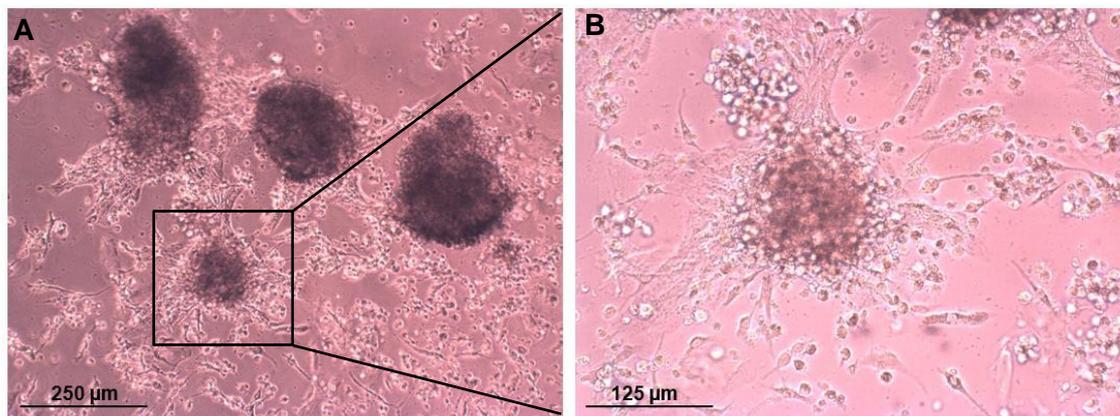
Figura 20 – Representação gráfica dos ensaios de viabilidade celular em porcentagem dos EMs ao final do processo de constituição e pós-carreamento em cultivo 2D. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey ($p < 0,05$).



Na figura 21-A observa-se a adesão pós-carreamento dos EMs do GC após quatro dias. As células apresentaram perfil indicativo de povoamento da placa através do espriamento e proliferação celular observada pelo aumento do contingente celular ao redor dos EMs aderidos, tornando-se um núcleo de celularização individualizado.

Também é possível observar, que as células da parte superior do EM (Figura 21-B) mantiveram-se estruturadas. Ressalta-se que o mesmo padrão se manteve em todos os grupos experimentais.

Figura 21 - Micrografias da adesão dos EMs no quarto dia pós-carreamento do GC. (A) Nota-se o processo de adesão e o perfil indicativo do processo de povoamento celular na placa. (B) Observa-se o espriamento celular e a proliferação celular, evidenciando um núcleo de celularização individualizado. Objetivas de 10x e 20x.

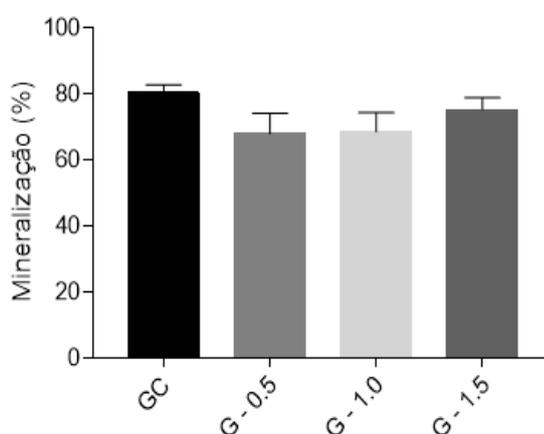


Fonte: Própria autora

5.4 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA PÓS CARREAMENTO

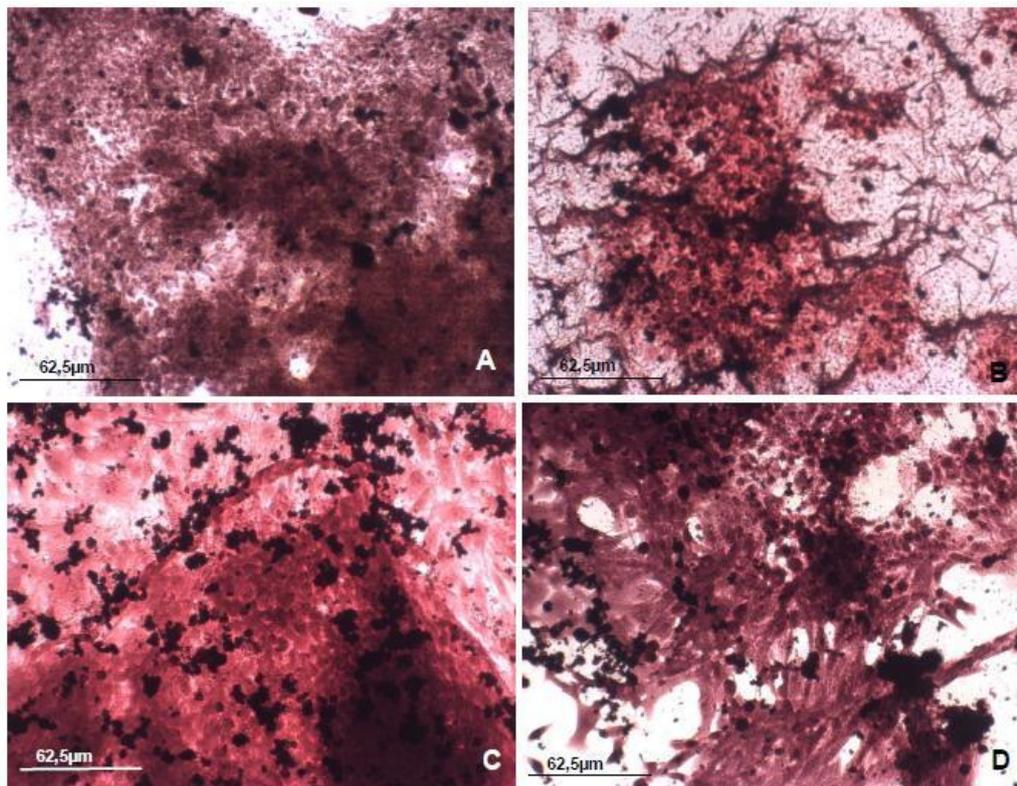
Os resultados referentes à quantificação de nódulos de mineralização produzidos pelas CTMBSH pós-carreamento, demonstram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais como observado na figura 22.

Figura 22 – Representação gráfica da quantificação em porcentagem dos nódulos de mineralização depositados pelas CTMBSH pós-carreamento. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey ($p < 0,05$).



A figura 23, ilustra a formação dos nódulos de mineralização em cada grupo experimental. Tais resultados, sugerem que não houve um efeito biomodulador na diferenciação osteogênica.

Figura 23 - Micrografias referentes aos nódulos de mineralização dos grupos experimentais após 14 dias de indução osteogênica pós-transferência. (A) Nódulos de mineralização referentes ao grupo GC, (B) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-0.5, (C) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-1.0 e (D) nódulos de mineralização referentes ao grupo G-1.5. Objetivas de 20x.



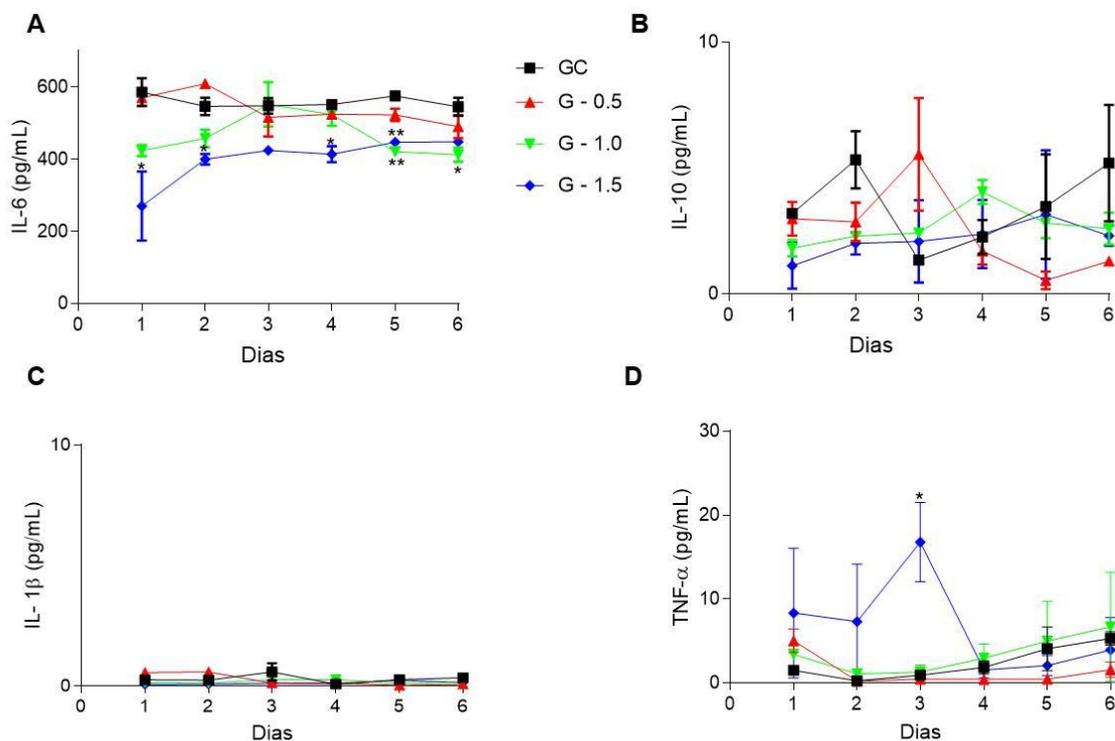
Fonte: Própria autora

5.5 PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Os resultados obtidos nos ensaios de perfil de produção e liberação de citocinas durante o processo de constituição dos EMs, referentes às citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α estão apresentados na figura 24. Os resultados da liberação de IL-10 e IL-1 β evidenciam a inexistência da influência moduladora da FBM em todos os grupos experimentais.

Os resultados da liberação de IL-6 demonstraram comportamento similar nos grupos GC e G-0.5, enquanto no G-1.0 houve uma diminuição significativa nos dias 5 e 6. O G-1.5 demonstrou uma diminuição significativa da liberação de IL-6 e aumento na liberação de TNF- α . Tais resultados evidenciam a influência moduladora da radiação nessas citocinas.

Figura 24 - Representações gráficas da comparação entre os grupos experimentais dos ensaios de imunoborção enzimática, referente ao perfil de liberação das citocinas (A) IL-6, (B) IL-10, (C) IL-1 β e (D) TNF- α . Valores expressos em MD \pm EP, ANOVA/ Tukey (*p<0,05; **p<0,01).

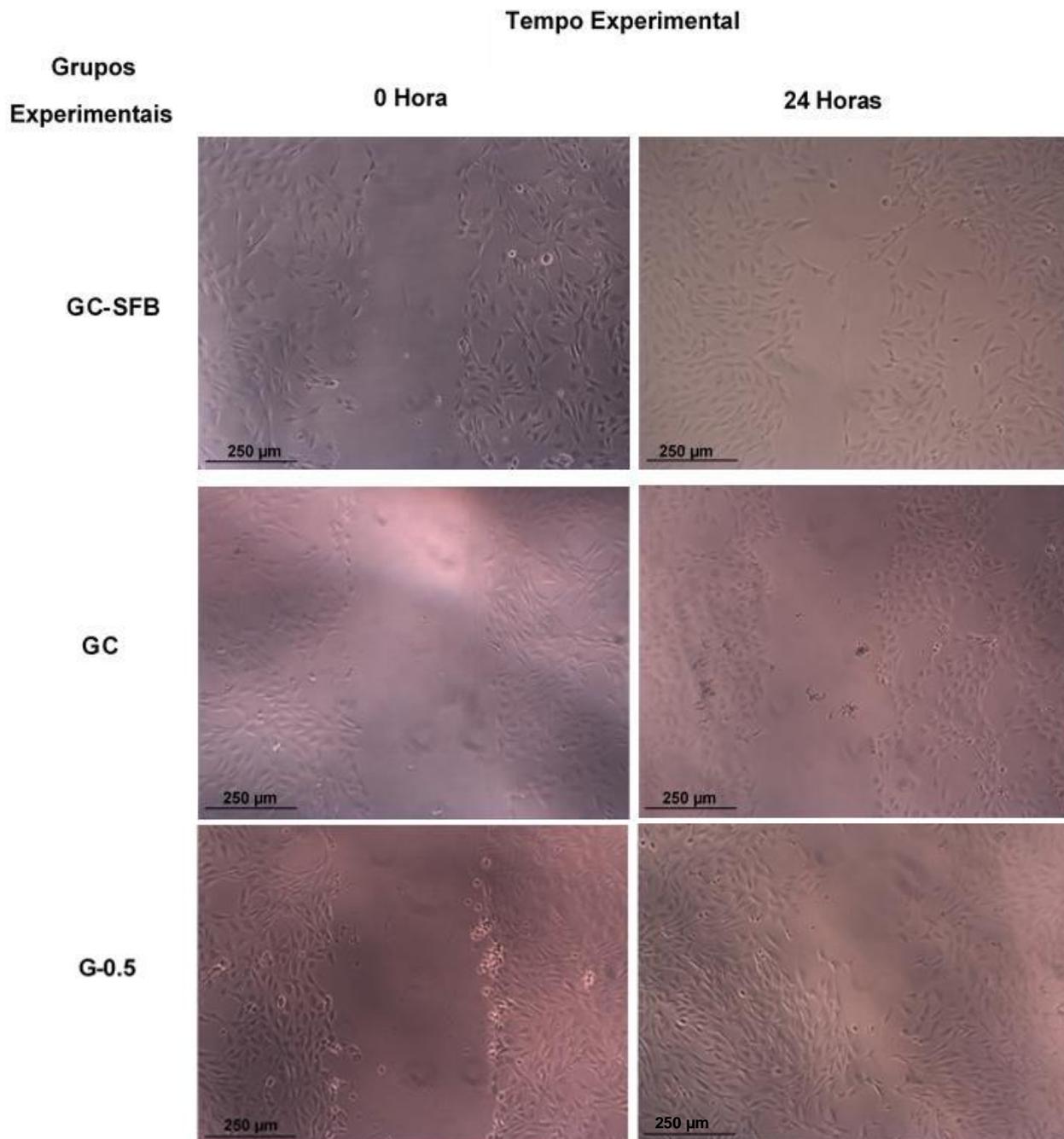


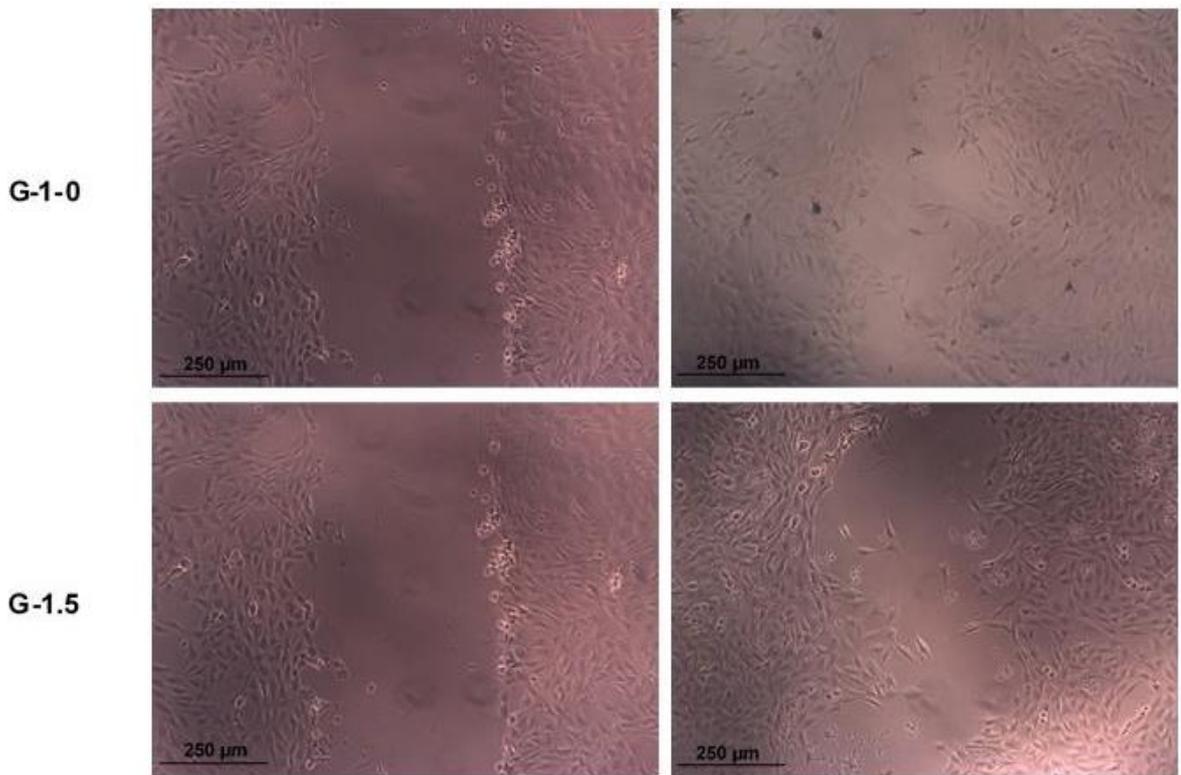
5.6 ENSAIO DE FERIDA

O ensaio de ferida foi realizado para avaliar o perfil de liberação de biomoléculas durante o processo de constituição dos EMs e sua influência na proliferação celular e no processo de migração. A figura 25 demonstra as micrografias obtidas após a realização da ferida (0 hora) e a troca dos meios de cultura dos grupos experimentais: GC- SFB (DMEM com 10% SFB); GC (DMEM sem SFB); G-0.5 (Meio condicionado G-0.5 + DMEM sem SFB); G-1.0 (Meio condicionado G-1.0 + DMEM sem SFB); G-1.5 (Meio condicionado G-1.5 + DMEM sem SFB).

Após 24 horas, foram realizadas novas micrografias, e os resultados demonstram que a FBM exerceu influência biomodulatória no processo de fechamento da ferida.

Figura 25 - Micrografias representativas do ensaio de ferida, nos tempos 0 hora e 24 horas dos grupos GC- SFB, GC, G-0.5, G-1.0 e G-1.5. Objetivas de 10x.

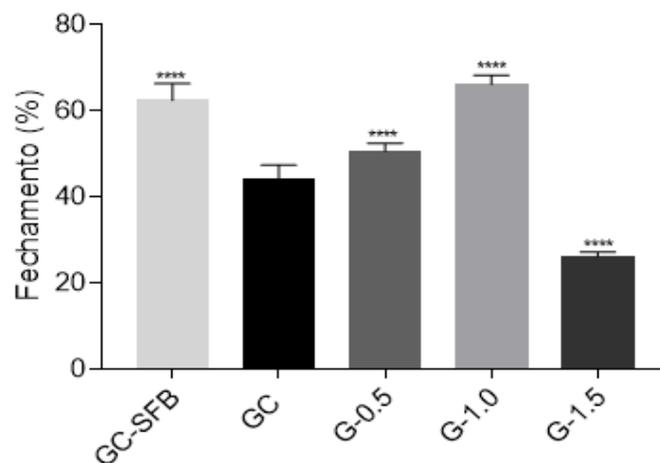




Fonte: Própria autora

Na figura 26, os grupos G-0.5 e G-1.0 apresentaram fechamento de 51% e 66% respectivamente da ferida, sugerindo que a radiação tenha exercido uma ação bioestimulatória em relação à proliferação celular e no processo de migração celular. Em contrapartida, o G-1.5 demonstrou ação bioinibitória da radiação com redução de 18% do contingente celular em comparação ao GC.

Figura 26 – Representação gráfica dos percentuais de fechamento da ferida. Análise perfil de liberação de biomoléculas durante o processo de constituição dos EMS, e sua influência na proliferação e migração celular no processo de fechamento da ferida em culturas de OSTEO-1. Valores expressos em MD±EP, ANOVA/ Tukey (****p<0,0001).



6. DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos terapêuticos almejados no tratamento direcionado às lesões ósseas é de estimular o processo de reparo tecidual, buscando o restabelecimento pleno de sua estrutura e função. Atualmente são utilizados diversos recursos terapêuticos, sendo recursos eletrofísicos ou biológicos, devido à potencialidade de interagir e estimular as células responsáveis pelo processo de regeneração, potencializando a funcionalidade celular e contribuindo para recuperação e obtenção de qualidade funcional (MEDALHA et al., 2016).

A proposta da TC em MR, utilizando CTMs, se justifica devido seu elevado potencial de diferenciação celular, execução de ação biomodulador e baixo grau de imunogenicidade, o que as torna capazes de influenciar o ambiente e contribuir com o processo de reparo tecidual (ZHANG et al., 2017; SHOJAEI et al., 2019).

Utsunomiya e colaboradores (2013) demonstraram que fragmentos descartados em procedimentos cirúrgicos da bursa subacromial podem ser utilizados como fonte de obtenção de CTMs e poderiam ser utilizados para o aumento biológico do reparo de lesões devido a seu potencial de proliferação.

As células utilizadas nesta pesquisa foram obtidas de uma mulher, com 39 anos de idade. Tais características são fundamentais para o uso em MR, e garantir que todas as funções celulares sejam exercidas. Zaim e colaboradores (2012) demonstraram que a idade do doador, o sexo, e o número de passagens do cultivo *in vitro*, são parâmetros críticos que afetam a morfologia, o potencial de proliferação e a capacidade de diferenciação de CTMs. Esses parâmetros devem ser considerados ao escolher uma fonte de obtenção de CTMs antes dos estudos e carreamento celular.

Este é o primeiro estudo a avaliar *in vitro* os efeitos do LBI em CTMBSH em cultivo 3D, onde os resultados obtidos nesta pesquisa possuem maior similaridade com os *in vivo*. A forma em que a radiação interage com os EMs mimetiza de maneira mais fidedigna, a interação que ocorre em ambiente tecidual em relação ao gradiente de energia depositada e a influência da FBM, podendo contribuir para a utilização desta associação como estratégias para a MR.

A formação de esferoides é caracterizada pela formação de agregados de células soltas, em um ambiente sem aderência, via ligação integrina-matriz extracelular. A caderina é acumulada na superfície da membrana e as células são

compactadas em agregados sólidos, formando esferoides compactos por meio de interações hemofílicas caderina-caderina (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017).

Os EMs podem apresentar variabilidade no diâmetro e na morfologia entre o mesmo grupo experimental devido a estruturação ser um processo que mimetiza a morfogênese e organogênese (BRAND et al., 2018). Diferenças na capacidade de estabelecer adesão célula-célula podem influenciar no processo de formação dos EMs, podendo apresentar menor compactação e superfície irregular, ou serem mais compactos com a superfície uniforme.

Os resultados obtidos referentes aos aspectos de constituição dos EMs utilizando CTMBSH nos permitiram identificar a evolução temporal do processo. As células encontravam-se dispersas no dia da celularização e após 24 horas observou-se a formação de aglomerados celulares por agrupamento e colisão. Após 48 horas os EMs apresentaram o padrão de auto-organização e compactação celular, caracterizada pela diminuição do diâmetro. Essa dinâmica foi observada nos grupos GC, G-0.5 e G-1.0. Em contrapartida, o grupo G-1.5 demonstrou evolução apenas até o processo de aglomeração celular, obtendo o diâmetro médio 23.5% maior em comparação ao GC. A acumulação de altas doses de energia podem gerar respostas negativas em altas energias como de 5,04 J no λ de 660 nm; aplicada em sessão única apresenta resultados positivos, mas quando acumuladas as doses pode resultar em inibição celular (KARU, 1988; HUANG et al., 2011; ANDRADE et al., 2019). Tais resultados, sugerem que a radiação tenha exercido influência bioinibitória no grupo G-1.5 onde a energia depositada de 5.7 J, influenciando mecanismos bioquímicos regulatórios presentes nas células durante o período de constituição dos EMs.

O tamanho médio de EMs encontra-se entre 100 e 500 μm e está diretamente relacionado à densidade de semeadura e às características do modelo de constituição, assim como o tempo de cultivo (FRIEDRICH et al., 2009; HUANG; GAO, 2018). Os EMs apresentaram diâmetros abaixo de 200 μm , e tais resultados são considerados diâmetros favoráveis para que ocorra a regulação positiva de fatores essenciais para a sobrevivência das células. Ressalta-se que, quanto maior o seu tamanho, maior a dificuldade de difusão de nutrientes e oxigênio ao centro dos EMs e maior o grau de necrose em sua região central (ZANONI et al., 2016; VADIVELU et al., 2017).

Após a constituição, foi possível simular a estratégia de carreamento dos EMs onde são entregues no ambiente de lesão tecidual na TC. Foram identificados pós-carreamento a ocorrência dos processos de adesão dos EMs, o espraiamento, expansão nos poços de cultivo, tornando-se um núcleo de celularização individualizado. Tais eventos são imprescindíveis para o repovoamento celular em um sítio de reparo, reforçando a possibilidade do uso de EMs irradiados em TC como um sistema eficiente de entrega celular.

Esperava-se uma influência da FBM no tempo de adesão dos EMs e proliferação celular (VILLIERS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2011; MOORE et al., 2005; STEIN et al., 2005), porém, os resultados demonstram que não houve influência da FBM no processo de adesão e proliferação celular dos grupos irradiados em comparação com o GC. Canadas e colaboradores (2018) demonstram a preocupação da ciência em garantir que o cultivo *in vitro* e expansão celular de CTMs não trarão prejuízos associados ao uso da TC, devido ao processo vigente necessitar de uma expansão celular abrangente até que os números terapêuticos sejam alcançados.

A viabilidade celular é um dos principais fatores na TC durante o processo de carreamento celular. Garantir a sobrevivência das células em um ambiente desfavorável é fundamental para o sucesso do processo de repovoamento no reparo tecidual (SHIM et al., 2013). Os resultados referentes à viabilidade celular realizados após a constituição e carreamento dos EMs não demonstraram diferença entre os grupos experimentais, sugerindo que não houve influência bioestimuladora da radiação no aumento da taxa metabólica celular nas doses utilizadas.

O aumento da viabilidade celular influenciada pela ação da FBM é bem consolidado em cultivos 2D (PETRI et al., 2010; AMID et al., 2014; ATES et al., 2017; DEANA et al., 2018), porém, são escassas pesquisas relacionando a influência da FBM em cultivos 3D. Durante o processo de constituição dos EMs as células sofrem mudanças morfológicas e funcionais no perfil metabólico e de expressão gênica em diversos genes (TIRIER et al., 2019). Cesaez e Tamama (2016) demonstram que após uma análise por *microarrays* houve uma mudança expressiva no perfil de expressão gênica entre monocamada e esferoide de CTMs. No entanto, ainda se sabe pouco em relação à mediação da sinalização molecular das propriedades dos esferoides de CTMs. Tais modificações podem estar relacionadas com a maneira que a radiação

influencia as células, por não estarem igualmente expostas ao meio ambiente e estímulos a ele relacionados.

Em culturas celulares, há preferência pela utilização de fluências mais baixas de radiação, sendo de 0.5J/cm² a 4 J/cm² as mais utilizadas (ARANY et al., 2014; DINIZ; MATOS; MARQUES, 2015; ZACCARA et al., 2015). As fluências de 0.5, 1.0 e 1.5 J/cm² utilizadas nesta pesquisa não alteraram a viabilidade celular, e a falta de bioestimulação pode estar relacionado com o perfil de difusão. O perfil de difusão é um fator de interferência, e de acordo com a região do esferoide onde as células se encontram, eventos celulares como a viabilidade, perfil metabólico, expressão gênica e a taxa de proliferação celular podem variar de forma significativa (CHITCHOLTAN et al., 2013; DERNOWSEK et al., 2016).

Os resultados referentes ao processo de diferenciação osteogênica das CTMBSH carreadas na presente pesquisa, demonstraram que a FBM não exerceu influência biomoduladora na formação de nódulos de mineralização. A FBM atua sobre células osteoblásticas influenciando a proliferação, o amadurecimento e mineralização, através do aumento na expressão de proteínas morfogenéticas (PYO, 2013), fosfatase alcalina (SOLEIMANI et al., 2012) e osteocalcina (PETRI et al., 2010), sendo capaz de auxiliar o processo de reparo do tecido ósseo.

Wu e colaboradores (2012) utilizando o λ de 660 nm em CTMs derivadas de medula de rato, nas doses de 1 J/cm², 2 J/cm² e 4 J/cm², demonstram que a expressão dos marcadores osteogênicos BMP2, osteocalcina, fosfatase alcalina e RUNX2, não foram significantes após a radiação. A FBM, segundo Liu e Zhang (2016), no λ de 635 nm com fluência de 0.96 J/cm², aumentou a sobrevivência de CTMs humanas implantadas *in vivo*, porém não se sabe os mecanismos exatos desta ação, e a radiação não exerceu uma influência significativa sobre a diferenciação quando aplicadas sem a associação de fatores de indução à diferenciação.

As pesquisas de Wu e colaboradores (2012) e Liu e Zang (2016) utilizaram CTMs de fontes, linhagens e cultivo celular distintos, porém, ambos concluíram que a FBM com laser de espectro de luz visível (vermelho), com as fluências entre 0.96 a 4 J/cm² não exerceram influência biomoduladora no processo de diferenciação osteogênica e na expressão de marcadores osteogênicos, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa. Ressalta-se que a biomodulação depende nos parâmetros como comprimento de onda, energia, potência e tempo de irradiação,

tipo de célula irradiada, e características fisiológicas celulares (MOORE et al., 2055; GIANINI et al., 2015).

A capacidade imunomoduladora das CTMBSH sob influência da FMB durante o processo de constituição de EMs foi avaliada através da determinação das concentrações das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α liberadas no meio de cultura.

As citocinas são responsáveis pela comunicação química entre as células durante o início de respostas imunes e do processo de reparação tecidual e, em cultivos *in vitro*, sua produção pode variar de acordo com a duração da cultura celular e o tipo de estímulo (POTIAN et al., 2003; WEISS; DAHLKE, 2019).

Os resultados referentes à liberação de IL-10 e IL-1 β demonstraram liberação reduzida das citocinas em todos os grupos experimentais. As CTMs são células capazes de secretar citocinas, porém, os níveis de liberação variam também de acordo com os estímulos do microambiente. Os estímulos dependem de uma sinergia de mecanismos dependentes de contato celular e fatores solúveis (KYUEKCHIEV, 2014; WEISS; DAHLKE, 2019). A liberação de IL-10 por CTMs depende de condições específicas, como em ambientes inflamatórios e na presença de outras citocinas como INF- γ , IL-1 β e TNF- α (CHAUDHRY, et al., 2011).

Os resultados referentes a liberação de TNF- α , demonstraram que houve um aumento significativo na liberação do G-1.5 quando comparado com demais grupos experimentais, sugerindo que nos primeiros dias de constituição dos EMs houve um estímulo para a liberação da citocina. Observou-se que, mesmo com a liberação de TNF- α nos primeiros dias do processo de constituição dos EMs, não foram suficientes para estimular a liberação de IL-10 e IL-1 β .

Os resultados referentes à análise da IL-6 nos grupos experimentais durante o período de constituição dos EMs demonstram que o grupo G-1.5 apresentou níveis significativamente menores na liberação da referida citocina, sugerindo um efeito biomodulador dose-dependente inibitória da radiação sobre a produção e liberação desta citocina. A regulação do sistema imunológico por IL-6 tem sido descrita como uma citocina pró-inflamatória. No entanto, também está envolvida na secreção de moléculas anti-inflamatórias bem conhecidas, como o antagonista do receptor de IL-1 ou IL-10, e redução da liberação de TNF- α (DORRONSORO et al., 2020).

Os resultados obtidos nesta pesquisa referentes ao perfil de liberação das citocinas, evidenciam uma possível redução da inflamação no processo de reparo,

caracterizando um efeito anti-inflamatório influenciado pela ação inibitória da FBM na fluência de 1.5 J/cm². Piva e colaboradores (2011) demonstraram efeitos anti-inflamatórios importantes nos processos iniciais do reparo devido a FBM, como a redução de citocinas.

A influência bioinibitória da FBM está associada, primordialmente, às doses mais elevadas de irradiação. Esta concepção integra a teoria de Arndt-Schulz também aplicável aos mecanismos fotobiomodulatórios, que determina efeitos bioestimulatórios proporcionados por doses dentro de uma faixa ideal e bioinibitórios em doses proporcionalmente mais elevadas (MARQUES et al., 2016). Ressalta-se, também, a influência da irradiância (densidade de potência) nesse perfil modulatório dose-dependente sobre a resposta biológica (EDUARDO et al., 2008).

Sabe-se que o ambiente inflamatório ao qual as CTMs são expostas após o carreamento é um determinante crítico de seu processo regulatório, uma vez que a imunossupressão pelas CTMs não é constitutiva, mas sim desencadeada por *crosstalk* com células do sistema imunológico, conseqüentemente, diferentes cenários patológicos levarão a respostas distintas das CTMs, que devem ser consideradas juntamente com tempo, frequência e doses de tratamento por FBM, como a fonte de obtenção das CTMs (ENGLISH et al., 2007; DELAROSA et al., 2009; KRAMPERA, 2011; DORRONSORO et al., 2020).

O meio de cultura onde as células são cultivadas contém vários produtos como fatores de crescimento e citocinas, que são secretados pelas células durante o processo de cultivo, e possuem o potencial de atuar ativamente no processo de regeneração celular (PAWITAN, 2014). A fim de proporcionar um efeito biomodulador mais expressivo por parte da FBM, o meio de suplementação não foi utilizado, expondo as células a uma condição ainda maior de desfavorecimento, ficando evidente a amplificação da resposta biológica.

O meio de cultura onde as CTMBSH foram cultivadas e irradiadas durante o processo de constituição dos EMs além de conter IL-6 e TNF- α , demonstraram conter outras biomoléculas, entre elas fatores de crescimento, que estimulam a proliferação celular e o fechamento da ferida. Hendudari e colaboradores (2016) demonstraram células ósseas cultivadas em meio condicionado de CTMs de medula óssea irradiadas com LBI (632.8 nm) e fluências de 0.5 e 1.0 J/cm² tiveram aumento na viabilidade e proliferação celular.

Andrade e colaboradores (2019) demonstraram que a PBM por LBI (660 nm) estimulou a proliferação de CTs de tecido adiposo com energias entre 0.56 e 1.96 J. Por outro lado, energias mais elevadas como 5.04 J foram inicialmente eficientes, mas apresentou ação bioinibitória quando aplicado repetidamente.

Os resultados referentes ao fechamento das feridas corroboram com os resultados de Hendudari e colaboradores e de Andrade e colaboradores. Os grupos G-0.5 e G-1.0, com energia de 1.9 J e 3.8 J, respectivamente, obtiveram o maior fechamento da ferida. Em contrapartida, o G-1.5, com energia de 5.7 J, apresentou o menor fechamento. Tais resultados sugerem que as fluências de 0.5 e 1.0 J/cm², possuem influência bioestimulatória na liberação de fatores de crescimento, proliferação e capacidade de migração celular. Em uma pesquisa anterior do nosso grupo, artigo aceito para publicação, a mesma fluência apresentou um aumento significativo na viabilidade celular, demonstrando influência bioestimulante da radiação.

Variações nos parâmetros do laser podem promover a modulação do metabolismo da célula, podendo acelerá-los ou retardá-los. O λ , a densidade de potência e a densidade de energia são parâmetros que devem ser considerados quando aborda o mecanismo fotobiomodulatório. O mecanismo que fundamenta a influência biomodulatória sobre as funções celulares, amplamente descrito pela literatura científica (KARU, 1999; KARU, 2008; DORTBUDAK et al, 2000; STEIN et al, 2005; RENNÓ et al, 2011), é de natureza fotobioquímica, iniciado pela absorção seletiva dos fótons pelos fotorreceptores presentes nas células (cromóforos). A participação desses cromóforos em cascatas bioquímicas específicas permite que seu estado metaestável de excitação eletrônica, induzido pela radiação, altere a cinética das reações bioquímicas intracelulares, influenciando concomitantemente os mecanismos de sinalização e o metabolismo celular (KARU, 2008; DE FREITAS, HAMBLIN, 2016).

Os estudos *in vitro* 2D vêm contribuindo efetivamente com a caracterização da influência destes parâmetros e norteando as pesquisas pré-clínicas e clínicas baseadas no processo da fotobiomodulação. Em contrapartida, os resultados da presente pesquisa evidenciam que o cultivo 3D, representado pelo uso de EMs, também precisa ser explorado, tanto para a real compreensão dos mecanismos fotobiomodulatórios, sobretudo pela maior similaridade com as condições celulares *in*

vivo, como pelo potencial de utilização como estratégia para TC em MR. Assim sendo, torna-se evidente a necessidade de padronização e ampliação das estratégias de cultivo 3D nas pesquisas pré-clínicas envolvendo a fotobiomodulação, considerando o maior mimetismo entre esse tipo de cultivo e o ambiente celular *in vivo*.

Ressalta-se a necessidade de mais pesquisas para a ampliação do entendimento a respeito das características desta influência biomodulatória e identificação dos mecanismos moleculares relacionados à tal influência.

7. CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que FBM com uso do laser de baixa intensidade (685 nm) exerceu efeito biomodulador dose-dependente sobre o processo de constituição dos EMs de CTMBSH.

Os resultados apontam, de forma preliminar, que as fluências utilizadas não exerceram influência bioestimuladora sobre a viabilidade das CTMBSH cultivadas como EMs e pós-carreamento. Observou-se que a FBM não exerceu influência bioestimuladora no processo de diferenciação osteogênica. Em contrapartida, há evidência de uma influência da FBM no processo de constituição dos EMs, e influência bioinibitória, como demonstrado pela fluência de 1.5 J/cm² no perfil de produção de IL-6, e influência bioestimulatória na produção de TNF- α .

No fechamento da ferida, os fatores de crescimento liberados no meio de cultivo de EMs de CTMBSH estimularam a proliferação e migração celular nas fluências de 0.5 e 1.0 J/cm² exercendo um efeito bioestimulatório, em contrapartida, a fluência de 1.5 J/cm² apresentou um efeito bioinibitório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELAA, A.Z.; EL-MEKAWI, H. A.; SAAFAN, A. M.; EL GAWAD, L. A.; EL-HAWARY, Y. M.; ABDELRAZIK, M. A. Evaluation of the effect of low-level diode laser therapy applied during the bone consolidation period following mandibular distraction osteogenesis in the human. **International Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**. n.44, p.989-997, 2015.

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

ALVES, A.C; VIEIRA, R.; LEAL-JUNIOR, E.; DOS SANTOS, S.; LIGEIRO, A.P.; ALBERTINI, R.; JUNIOR, J.; DE CARVALHO, P. Effect of low-level laser therapy on the expression of inflammatory mediators and on neutrophils and macrophages in acute joint inflammation. **Arthritis Res Ther**. v.15, n.5, p.116, 2013.

ALVES, A.N.; FERNANDES, K.P.S.; DEANA, A.M.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R.A. Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: A Systematic Review. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. p. 1–13, 2014.

AMARAL, J.B.; SANTELLI, G.M.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**. v.34, p. 1-20, 2011.

AMID, R.; KADKHOZADEH, M.; AHSAN, M.G.; HAKAKZADEH, A. Effect of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. **J Lasers Med Sci**. v.5, n.4, p.163-170, 2014.

ANDRADE, A.L.M.; LUNA, G.F.; BRASSOLATTI, LEITE, M.N.; PARISI, J.R.; LEAL, A.M.O.; FRADE, M.A.C.; ANIBAL, F.F.; PARIZOTTO, N.A. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells. **J Lasers Med Sci**. v. 34, p. 677–683, 2019.

ANDREI, C.; MARGIOCCO, P.; POGGI, A.; LOTTI, L.V.; TORRISI, M.R.; RUBARTELLI, A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. **Proc Natl Acad Sci U.S. A.**, v.26, p.9745-50, 2004.

ARANY, P.R; CHO, A; HUNT, T.D; SIDHU, G; SHIN, K; HAHM, E; HUANG, G.X; WEAVER, J; CHEN, A.C; PADWA, B.L; HAMBLIN, M.R; BARCELLOS-HOFF, M.H; KULKARNI, A.B; MOONEY, D. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. **Sci Transl Med.**, v.6, n.238, p. 238-269, 2014.

ASSIS, L.; MORETTI, A. I.; ABRAHÃO, T. B.; CURY, V.; SOUZA, H. P.; HAMBLIN, M. R.; PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory

response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Lasers Surg Med.** v. 44, n.9, p.726-35, 2012.

BAXTER, G. D. Therapeutic Lasers: theory and practice. United States of America: **Ed. Churchill Livingstone**, 1997.

BIANCO, P.; KUZNETSOV, S. A.; RIMINUCCI, M.; ROBEY, P. G. Postnatal Skeletal Stem Cells. **Methods in enzymology.** v. 419, p. 117-148, 2006.

BRAND, D.D.; VEELKN, C.; MASSUGER, L.; BROCK, R. Penetration in 3D tumor spheroids and explants: Adding a further dimension to the structure-activity relationship of cell-penetrating peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v. 1860, n. 6, p. 1342-1349, 2018.

BRUNETTI, G.; D'AMELIO, P.; WASNIEWSKA, M.; MORI, G.; FAIENZA, M.F. Editorial: Bone: Endocrine Target and Organ. **Front. Endocrinol**, 2017.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANS, F.L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Rev. Bras. Hemoter.** v.1, p. 25-35, 2009.

CAO, W.; CAO, K.; CAO, J.; WANG, Y.; SHI, Y. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. **Immunology Letters.** v. 168, n. 2, p. 147-153, 2015.

CALIXTO, J.B., CAMPOS, M.M., OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plants origin. Part II, Modulation of Pro-inflammatory cytokines, Chemokines and Adhesion molecules. **Planta Med**, v.70, p.93-103, 2004.

CANADAS, R.F.; PIRRACO, R.P.; OLIVEIRA, J.M.; REIS, R.L.; MARQUES, A.P. Stem Cells for Osteochondral Regeneration. **Adv Exp Med Biol.**, v.1059, p.219-240, 2018.

COLOMBO, F.; GIANLUCA, S.; GIOVANNI, C.; SALMAN, Y.G.; ANTONELLO, F. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. **Journal of Microscopy & Ultrastructure.** v.5, p.1-8, 2017.

CUI, Y.; LU, S.; TAN, H.; LI, J.; ZHU, M.; XU, Y. Silencing of long non-coding RNA NONHSAT009968 ameliorates the staphylococcal protein A inhibited osteogenic differentiation in human bone mesenchymal stem cells. **Cell Physiol Biochem** v. 39, p. 1347–1359, 2016.

CHAUDHRY, A.; SAMSTEIN, R.M.; TREUTING, P.; LIANG, Y.; PILS, M.C.; HEINRICH, J.M.; JACK, R.S.; WUNDERLICH, F.T.; BRUNING, J.C.; MULLER, W. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. **Immunity**, v.34, p.566-578, 2011.

CHO, K.A.; LEE, J.K.; KIM, Y.H.; PARK, M.; WOO, S.Y.; RYU, K.H. Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EBI3-dependent manner, **Cell. Mol. Immunol.**, 2017.

CHU, D.T.; PHUONG, T.N.T.; TIEN, N.L.B; et al. An Update on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells. **Int J Mol Sci**. v.21, n.3, p.708, 2020.

CRIVELLO, J.O. Fundamentos de Odontologia: Lasers em Odontologia. 1 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.52 -53, 2010.

DANG, S., YU, Z., ZHANG, C., ZHENG, J., LI, K., WU, Y., QIAN, L., YANG, Z., LI, X., ZHANG, Y., WANG, R. Autophagy promotes apoptosis of mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironment. **Stem Cell Res Ther**. v.6, p.247, 2015.

DAROUIE, S.; MAJD, S.A.; RAHIMI, F., HASHEMI, E.; KABIRSALMANI, M.; DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; ARPANAEI, A. The fate of mesenchymal stem cells is greatly influenced by the surface chemistry of silica nanoparticles in 3D hydrogel-based culture systems. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, p. 1-43, 2020.

DEANA, A.M.; DE SOUZA, A.M.; TEIXEIRA, V.P.; MESQUITA-FERRARI, R.A.; BUSSADORI, S.K.; FERNANDES, K.P.S. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. **Lasers Med Sci**. v.33, n.5, p.1147-1158, 2018.

DEBONI, N.C.Z. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. **Tese (Doutorado) em Patologia Bucal** – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DE FREITAS, L.F.; HAMBLIN, M.R. Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy. **IEEE J Sel Topics Quantum Electron**, v. 22, 2016.

DELAROSA, O. et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. **Tissue Eng. Part A** v. 15, p. 2795–2806, 2009.

DERNOWSEK, J.A: Controle pós-transcricional envolvendo redes de interação miRNAs-mRNAs durante a diferenciação osteoblástica de células tronco da polpa dentária humana. **Tese (Doutorado)**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP-SP, 2014.

DERNOWSEK, J.A.; REZENDE, R.A.; PASSAMAI, V.E.; NORITOMI, P.Y.; KEMMOKU, D.T.; NOGUEIRA, J.A.; LARA, V.F.; MIRONOV, V.; DA SILVA, J.V.L. Tissue spheroids encaged into microscaffolds with internal structure to increase cell viability. **Procedia CIRP**, v.49, p.174-177, 2016.

DESCHASEAUX, F.; SENSE´BE, L.; HEYMANN, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. **Trends in Molecular Medicine** v.15, n.9, p.429-447, 2009.

DIMITRIOU, R. et al.: Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC Medicine**, v.9, n.1, p.66, 2011.

DINIZ, I. M.; MATOS, A. B.; MARQUES, M. M. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives. **Scientific World Journal**, 2015.

DOLAN, C.P.; DAWSON, L.A.; MUNEOKA, K. Digit Tip Regeneration: Merging Regeneration Biology with Regenerative Medicine. **Stem Cells Translational Medicine**. v 7., p.1-9, 2018.

DORTBUDAK, O.; HAAS, R.; MALLATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. Clin, **Oral Implants Res**, v16, p540–545, 2000.

EDUARDO, F. D. E.; BUENO, D. F.; DE FREITAS, P. M.; MARQUES, M. M.; PASSOS-BUENO, M. R.; EDUARDO, C. D. E., ZATZ, M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med.**, v.40, n.6, p. 433-438, 2008.

EDMONDSON, R. et al. Tree-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay and Drug Delivery Technologies**, v.12, n.4, p.-207-218, 2014.

ENGLISH, K.; BARRY, F.P.; FIELD-CORBETT, C.P.; MAHON, B.P. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunol. Lett.** v. 110, p. 91–100, 2007.

FENNEMA E, RIVRON N, ROUWKEMA J, VAN BLITTERSWIJK C, DE BOER J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends Biotechnol.** v.31, p.108–115, 2013.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol.** v.147, n.11, p.3815-22, 1991.

FRIEDRICH, J.; SEIDEL, C.; EBNER, R.; KUNZ-SCHUGHART, L.A. Spheroid-based drug screen: Considerações e abordagem prática. **Nat Protoc** v. 4, p. 309–324,2009.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. L.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cell for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p. 230-247, 1968.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Cartilagem e osso. Tratado de Histologia. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 4, p. 80-107, 2014.

GINANI, F; SOARES, D.M; BARRETO, M.P; BARBOZA, C.A. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci.**,v. 30, n.8, p. 2189-2194, 2015.

GIONET-GONZALES, M.A., KENT LEACH, J. Engineering principles for guiding spheroid function in the regeneration of bone, cartilage, and skin. **Biomed Mater.** v.13, n.3, p.034109, 2018.

GOMES, C.F.; SCHAPOCHNIK, A. The therapeutic use of low intensity laser (LLL) in some diseases and its relation to the performance in speech therapy. **Distúrb Comun**, v.29, n.3, p.570-578, 2017.

GONG, X.; LINM C.; CHENG, J.; SU, J.; ZHAO, H.; LIU, T.; WEN, X.; ZHAO P. Generation of Multicellular Tumor Spheroids with Microwell-Based Agarose Scaffolds for Drug Testing. **PLoSOne**. v.10, n.6, 2015.

GOULART, V.A.; FERREIRA, L.B.; DUARTE, C.A.; LIMA, I.L.; FERREIRA, E.R.; OLIVEIRA, B.C.; VARGAS, L.N.; MORAES, D.D.; SILVA, I.B.B.; FARIA, R.O.; SOUZA, A.G.; CASTRO-FILICE, L.S. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: a literature review. **Biotechnology Research and Innovation**. v.1, 2017.

GUO, X. et al. Enrichment of cancer stem cells by agarose multi-well dishes and 3D spheroid culture. **Cell and Tissue Research**, v. 375, n. 2, p. 397–408, 2019.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R. Fundamentos de Física Óptica e Física Moderna. Tradução de: Adir Moyses Luiz, et al; coordenador da tradução: Adir M. Luiz 2 ed. Rio de Janeiro: **LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**, 1991.

HEO, D.N.; HOSPODIUK, M.; OZBOLAT, I.T. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 95, p. 348-3561, 2019.

HENDUDARI, F.; PIRYAEI, A.; HASSANI, S.N.; DARBANDI, H.; BAYAT, M. Combined effects of low-level laser therapy and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on viability of human dermal fibroblasts cultured. **Lasers Med Sci** v. 31, p. 749–757, 2016.

HENSON, F.; NOORANI, A.; SC, B.; RUSHTON, N. Repair and Regeneration. **YJARS**, v. 28, n. 7, p. 1018–1029, 2012

HIBI, H. Clinical review of bone regenerative medicine and maxillomandibular reconstruction. **Oral Science International**, v. 13, n. 1, p. 15–19, 2016.

HOCHMAN, L. Photobiomodulation Therapy in Veterinary Medicine: A Review. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 33, p.83–88, 2018.

HU, W.P.; YU, C.C; LAN, G.S; CHEN, H.S. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 2048–2057, 2007.

HUANG, B.W., GAO, J.Q. Application of multicellular spheroid tumor models cultured in 3D in the research of drug delivery systems targeting tumors. **J Control Release**. v.270, p.246–259, 2018.

HUANG, Y.Y.; SHARMA, S.K.; CARROLL, J.; HAMBLIN, M.R. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. **Dose-Response** v. 9, p. 602–618, 2011.

IMURA, T., OTSUKA, T., KAWAHARA, Y., YUGE, L. "Microgravity" as a unique and useful stem cell culture environment for cell-based therapy. **Regenerative Therapy**. v.12, p.2-5, 2019.

JUNIOR, A.M.R.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.F. AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual; **An Bras Dermatol**. v. 81, p.150-6, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. Histologia básica. 12. ed. Rio de Janeiro: **Gunabara Koogan**, cap. 8, p. 131-148, 2013.

KARU, T.I. Molecular mechanisms of therapeutic effect of lowintensity laser irradiation. **Laser Life Sci** v. 2, p. 53–74, 1988.

KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiatiion on cells. **J Photochem Photobiol B: Biol**. v. 49, p. 1-17, 1999.

KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol.**, v. 84, n.5, p.1091-1099, 2008.

KRAMPERA, M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. **Leukemia** v. 25, p. 1408–1414, 2011.

LI, L.; LU, H.; ZHAO, Y.; LUO, J.; YANG, L.; LIU, W; HE, Q. Functionalized cell-free scaffolds for bone defect repair inspired by selfhealing of bone fractures: A review and new perspectives. **Materials Science & Engineering: C**. v. 98, p. 1241-1251, 2019.

LIAO et al. Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential. **Exp Hematol**, v. 39, n. 4, p. 393-412, 2011.

LIU, Y.; ZHANG, H. Low-level laser irradiation precondition for cardiac regenerative therapy. **Photomed Laser Surg**, v.34, p.572-579, 2016.

LICHTE, P.; PAPE, H.C.; PUFE, T.; KOBBE, P.; FISCHER, H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 569-573, 2011.

LOPES, D.L.; MARTINS-CRUZ, C.; OLIVEIRA, M.B.; MANO, J.F. Bone Physiology as Inspiration for Tissue Regenerative Therapies. **Biomaterials**, v. 185, p.240-275, 2018.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**. v.21, p.216-225, 2014.

MACHADO, C. V. Imunolocalização de marcadores de célulastronco na polpa de dentes permanentes humanos. **Tese de doutorado**. Universidade Federal da Bahia, 2013.

MADRID, A.P., VRECH, S., SANCHEZ, M., RODRIGUEZ, A. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering**, 2019.

MAMIDI, M.K., NATHAN, K.G., SINGH, G., THRICHELVAM, S.T., YUSOF, N.A.N.M., FAKHARUZI, N.A., ZAKARIA, Z., BHONDE, R., KUMAR DAS, A., MAJUMDAR, A.S. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**. v., p.113:3153–3164, 2012.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A.H.; Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res**. v.254, n.2, p. 317-330, 1988.

MAREI, M.K.; EL BACKLY, R.M. Dental Mesenchymal Stem Cell-Based Translational Regenerative Dentistry: From Artificial to Biological Replacement. **Front Bioeng Biotechnol**. v.6, n.49, 2018.

MARQUES, M.M.; PEREIRA, N.A.; FUJIHARA, N.A.; NOGUEIRA, F.N.; EDUARDO, C.P. Effect of low-power LASER irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **LASERS Surg Med**, 2004.

MARQUES, M. M.; DINIZ, I. M.; DE CARA, S. P.; PEDRONI, A. C.; ABE, G. L.; D'ALMEIDACOUTO, R. S.; LIMA, P. L.; TEDESCO, T. K., MOREIRA, M. S. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. **Photomed Laser Surg**., v. 34, n.11, p.500-508, 2016.

MAZINI, L.; ROCHETTE, L.; AMINE, M.; MALKA, G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). **Int J Mol Sci**. v.20, n.10, p.2523, 2019.

MEDALHA, C.C. et al. Low-level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 179–185, 2016.

MNICH, K.P.; ZIEMBA, B.; SZWED, A.; KOPACZ, K.; SYNDER, M.; BRYSEWSKA, M.; KUJAWA, J. Effect of Photobiomodulation Therapy on the Increase of Viability and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Lasers Surg Med**, v. 51, p. 1-10, 2019.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Advances in Biochemical Eng. Biotec.**, v.114, p.185-99, 2009.

MITCHELL, A.C.; BRIQUEZ, P.S.; HUBBELL, J.A.; COCHRAN, J.R.: Engineering growth factors for regenerative medicine applications, **Acta Biomaterialia** , 2015.
MOORE, K. et al. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** v. 19, p. 683-765, 2001.

MOORE, P.; RIDGWAY, T. D.; HIGBEE, R. G.; HOWARD, E. W.; LUCROY, M. D. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. **Lasers Surg Med**, v.36, p. 8-12, 2005.

MOUNT, N.M.; WARD, S.J.; KEFALAS, P.; HYLLNER, J. Cell-based therapy technology technologyifications and translational challenge. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** v.370, 2015.

MOHAMED, A.M. An Overview of Bone Cells and their Regulating Factors of Differentiation. **Malays J Med Sci**. v.15, n.1, p.4–12, 2008.

MOREIRA, G.S.; MACHADO ALVES, P. H.; ESPER, L. A.; SBRANA, M.C.; DA SILVA, D. G.; NEPELENBROEK, K. H.; FRAGA, A. L. Effect of low-level laser on the healing of bone defects filled with autogenous bone or bioactive glass: *in vivo* study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. v.33, n.1, p.169-174, 2018.

MOSNA, F.; SENSEBE´, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells Dev**, v.9, p.1449–1470, 2010.

MURPHY, K.C.; HOCH, A.I.; HARVESTINE, J.N.; ZHOU, D.; LEACH, J.K. Mesenchymal stem cell spheroids retain osteogenic phenotype through alpha2beta1 signaling. **Stem Cells Transl. Med.**, v.5, n.9, p.1229-1237, 2016.

NAJAR, M.; RAICEVIC, G.; AD-KAZAN, H.F.; BRON, D.; TOUNGOUZ, M.; LAGNEAUX, L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**, n.18, p. 160-171, 2016.

NAPOLITANO, A. P.; CHAI, P.; DEAN, D. M.; MORGAN, J. R. Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. **Tissue engineering**.v. 13, n. 8, p. 2087-2094, 2007.

NEVES, L.S.; SILVA, C.M.S.; HENRIQUES, J.F.C.; CANÇADO, R.H.; HENRIQUES, R.P.; JANSON, G.A utilização do laser em Ortodontia, **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**. v.10, p.149-156, 2005.

NOVERINA, R., WIDOWAT, W., AYUNINGTYAS, W., KURNIAWAN, D., AFIFAH, E., LAKSMITAWATI, D.R., RINENDYAPUTRI, R., RILIANAWATI, R., FARIED, A., BACHTIAR, I., WIRAKUSUMAH, F.F. Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). **Clinical Nutrition Experimental**, v.24, p.34-44, 2019.

NURKOVIĆ, J.; ZALETEL, I.; NURKOVIĆ, S.; et al. Combined effects of electromagnetic field and low-level laser increase proliferation and alter the morphology of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Lasers Med Sci**. v. 32, p. 151–160, 2017.

ORCIANI, M., FINI, M., DI PRIMIO, R., MATTIOLI-BELMONTE, M. Biofabrication and Bone Tissue Regeneration: Cell Source, Approaches, and Challenges. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1-15, 2017.

O'SULLIVAN, G.M., VELICKOVIC, Z.M., KEIR, M.W., MACPHERSON, J.L., RASKO, J.E.J. Cell and gene therapy manufacturing capabilities in Australia and New Zealand. **Cytherapy** v.21, n.12, p.1258-1273, 2019.

OSUGI, M., KATAGIRI, W., YOSHIMI, R., INUKAI, T., HIBI, H., UEDA, M. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. **Tissue Engineering**. v.18, n.13-14, 2012.

PAGÉ, B., PAGÉ, M., NOEL, C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. **International Journal Oncology**, v.3, p.473-476, 1993.

PAWITAN, J.A. Perspective of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. **BioMed Research International**, p.1-14, 2014.

PETRI, A.D.; TEIXEIRA, L.N.; CRIPPA, G.E.; BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. **Braz Dent J**. v.21, n.6, p.491-8, 2010.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143–7, 1999.

PIVA, J.A.A.C.; ABREU, E.M.C.; SILVA, V.S.; NICOLAU, R.A. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **An. Bras. Dermatol**. v.86, n.5, 2011.

POTIAN, J.A.; AVIV, H.; PONZIO, N.M.; HARRISON, J.S.; RAMESHWAR, P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens, **J Immunol** v.171, p.3426-3434, 2003.

PRICOLA, K.L., KUHN, N.Z., HALEEM-SMITH, H., SONG, Y., TUAN, R.S. Interleukin-6 Maintains Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Stemness by an ERK1/2-Dependent Mechanism. **J Cell Biochem**. v.108, n.3, p.577–588, 2009.

PYO, S.J. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- β 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts, **Lasers Med Sci**. v. 28, p. 543–550, 2013.

QI, K.; LI, N.; ZHANG, Z.; MELINO, G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. **Cellular Immunology**. v. 326, p. 83-96, 2018.

RENNÓ, A.C.; TOMA, R.L.; FEITOSA, S.M.; FERNANDES, K.; BOSSINI, O.S.; DE OLIVEIRA, P.; PARIZOTTO, N.; RIBEIRO, D.A. Comparative effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on injured skeletal muscle. **Photomed Laser Surg**, v29, n1, p. 5-10, 2011.

ROCHA, J.C.T.; Terapia Laser: Cicatrização Tecidual e Angiogênese, **RBPS**. v. 17, p. 44-48, 2004.

RODRIGUEZ, L.G., WU, X., GUAN, J.L. Wound-Healing Assay. **Cell Migration**. v.294, 2005.

ROSENTHAL, N.; BADYLAK, S. Regenerative medicine: today's discoveries informing the future of medical practice. **NPJ Regenerative Med.**, v.1, p.1-3, 2016.

SALEM, H., THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**. v.28, n.3, p.585-96, 2010.

SAMPOGNA, G.; GURAYA, S. Y.; FORGIONE, A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 3, p. 101–107, 2015.

SILVA, R.F., SASSO, G.R.S., CERRI, E.S., SIMÕES, M.J., CERRI, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v.2015, p.17, 2015.

SISTI, K.E.; ANDRES, M.C., JOHNSTON, D.; FILHO, E.A., GUASTALDI, A.C., OREFFO, R.O.C. Skeletal stem cell and bone implant interactions are enhanced by LASER titanium modification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 3, p.719-725, 2016.

SOLEIMANI, M.; ABBASNIA, E.; FATHI, M.; SAHRAEI, H.; FATHI, Y.; KAKA, G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts—an in vitro study. **Lasers Med Sci**. v. 27, p. 423–430, 2012.

SOMMERFELDT, D.; RUBIN, C.: Biology of Bone and How It Orchestrates the Form and Function of the Skeleton. **European Spine Journal** v.10, n.2, p.S86–S95, 2001.

SONOMOTO, K., YAMAOKA, K., OSHITA, K., FUKUYO, S., ZHANG, X., NAKANO, K., OKADA, Y., TANAKA, Y. Interleukin-1 β induces differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts via the Wnt-5a/receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 pathway. **Arthritis Rheum**. v.64, n.10, p.3355-63, 2012.

SONG, N.; SCHOLTEMEIJER, M.; SHAH, K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Trends in Photomarcol Scienses**, v.41, n.9, p.653-664, 2020.

SHARMA, P., KUMAR, P., SHARMA, R., BHATT, V.D., DHOT, P.S. Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. **Journal of Medicine and Life**, 2019.

SHIM, W.; MEHTA, A.; WONG, P.; CHUA, T.; HAIKOH, T. Critical path in cardiac stem cell therapy: an update on cell delivery. **Cytotherapy**, v.15, n.4, p.399-415, 2013.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**, Berlin, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978.

SCHROEDER, J.E.; MOSHEIFF, R. Tissue engineering approaches for bone repair: Concepts and evidence. **Injury**, v. 42, n. 6, p. 609–613, 2011.

SCHMITT, A.; GRIENSVEN, M.V.; IMHOFF, A.B.; BUCHMANN, S. Application of Stem Cell in Orthopedics. **Stem Cell Intern.** v.2012, 2012.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomed, Laser Surg**, v 23, p161–166, 2005.

STEINERT, A.F. et al. Characterization of bursa subacromialis-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-14, jun. 2015.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, p. 2724-2752, 2012.

SHOJAEI F, RAHMATI S, BANITALEBI DEHKORDI M. A review on different methods to increase the efficiency of mesenchymal stem cell-based wound therapy. **Wound Repair Regen.** 2019

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v.6, n.10, p.a016295, 2014.

TIRIER, S.M.; PARK, J.; PREUBER, F. et al. Pheno-seq – linking visual features and gene expression in 3D cell culture systems. **Sci Rep** v.9, p.12367, 2019.

TOMASI, R.F.X., SART, S., CHAMPETIER, T., BAROUD, C.N. Individual Control and Quantification of 3D Spheroids in a High-Density Microfluidic Droplet Array. **Cell Reports** v.31, n.8, p.07670, 2020.

TURNBULL, G.; CLARKE, J.; PICARD, F.; RICHES, P.; JIA, L.; HAN, F.; LI, B.; SHU, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v.3, p. 278-314, 2018.

TSAI, S.R., HAMBLIN, M.R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **J Photochem Photobio. B Biology** v.170, p.197-207, 2017.

UM, S.; HA, J.; CHOI, S.J.; OH, W.; JIN, H.J. Prospects for the therapeutic development of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **World journal of stem cells**, v.12, n.12, p.1511–1528, 2020.

UTSUNOMIYA, H.; UCHIDA, S.; SEKIYA, I.; SAKAI, A.; MORIDERA, K.; NAKAMURA, T. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells derived from shoulder tissues involved in rotator cuff tears. **Am J Sports Med.**, v. 41, n. 3, p. 657-668, 2013.

VADIVELU, R.K.; KAMBLE, H.; SHIDDIKY, M.J.A.; NGUYEN, N.T. Microfluidic Technology for the Generation of Cell Spheroids and Their Applications. **Micromachines**, v. 8, n.4, p.94, 2017.

VAN GOGH, A.M.B.S; ARCH, X.L.M.; YOUN, G.M.B.A.; ALVAREZ, A.B.A.; YIN, S.B.S.; CHAKRABARTI, M.O.M.B.B.S.; MCGAHAN, P.J.M.D.; CHEN, J.L.M.D. Arthroscopic Harvesting of Autologous Bone Graft for Use as a Mesenchymal Stem Cell Carrier in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **Arthroscopy Techniques**, 2019.

VEÇOSO, M. C. Laser em fisioterapia. São Paulo: **Lovise**; 1993.

VILLIERS, J.A.; HOURELD, N.N.; ABRAHAMSE, H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. **Stem Cell Rev** v. 7, p. 869–882, 2011.

VOGEL, W.; GRUNEBACH, F.; MESSAM, C.A.; KANZ, L.; BRUGGER, W.; BUHRING, H.J. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. **Haematologica**, v. 88, n.2, p. 126-133, 2003.

WAGERS, A. J. The Stem Cell Niche in Regenerative Medicine. **Cell Stem Cell**. v. 10, p. 362 - 369, 2012.

WANG, C., CHENG, L., LIU, Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. **Theranostics** v.5, p.317-330, 2013.

WEISS, A.R.R.; DAHLKE, M.H. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. **Front Immunol**. v.10, p.1191, 2019.

WU, Y.H.; WANG, J.; GONG, D. X.; GU, H. Y.; HU, S. S.; ZHANG, H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. **Lasers Med Sci** v.27, p. 509–519, 2012.

WU, J.Y.; WANG, Y.H.; WANG, G.J.; HO, M.L.; ZEN, C.; YEH, W.M.L.; CHEN, C.H. Low-Power GaAlAs Laser Irradiation Promotes the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells via IGF1 and BMP2. **Plos One**, v.7, n.9, p.1-10, 2012.

WYSOCKA, A. M.; KOT, M.; MAJKA, M. The Pros and Cons of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. **Cell Transplant**. v.28, n.7, p. 801–812, 2019.

YODA, K. Bone as an endocrine organ: diabetic bone disease as a cause of endocrine disorder via osteocalcin, FGF23 secreted from osteocyte/osteoblast. **Musculoskeletal Disease Associated with Diabetes Mellitus** p.113–23, 2016.

ZAIM, M., KARAMAN, S., CETIN, G. et al. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Ann Hematol** v. 91, p. 1175–1186, 2012.

ZACCARA, I. M.; GINANI, F.; MOTA-FILHO, H. G.; HENRIQUES, Á. C.; BARBOZA, C. A. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers Med Sci.**, v.30, n.9, p.2259-2264, 2015.

ZANONI, M.; et al. 3D tumor spheroid models for *in vitro* therapeutic screening : a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Nature Scientific Reports**, v.6, n.19103, p.1–11, 2016.

ZHANG, J.; SCHWARTZ, M.P.; HOU, Z.; BAI, Y.; ARDALANI, H.; SWANSON, S.; STEILL, J.; RUOTTI, V.; ELWELL, A.; NGUYEN, B.K.; BOLIN, J.; STEWART, R.; THOMSON, J.A.; MURPHY, W.L. A Genome-wide Analysis of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells in 2D or 3D Culture. **Stem Cell Reports.**, v.8, n.4, p.907-918, 2017.

ZHU, W., GEORGE, J.K., SORGER, V.J., ZHANG, L.G. 3D printing scaffold coupled with low level light therapy for neural tissue regeneration. **Biofabrication** v.9, n.2, p.1-10, 2017.

9. ANEXO

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Centro – Araraquara - SP
CEP 14801-320 – Telefone: (16) 3301.7263

www.uniara.com.br/comite-de-etica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: FOTOBIMODULAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS.

Pesquisador Responsável: Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi

Nome do participante:

Data de nascimento:

R.G.:

Você está sendo convidada para participar, como voluntário, do projeto de pesquisa “FOTOBIMODULAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS”, de responsabilidade dos pesquisadores: Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi (doutoranda) e Prof. Dr. André Capaldo Amaral (orientador).

Leia cuidadosamente o que segue e me pergunte sobre qualquer dúvida que você tiver. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que consta em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável. Em caso de recusa você não sofrerá nenhuma penalidade.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem como finalidade avaliar a influência da luz laser na formação de células tronco da Bursa;
2. A minha participação nesta pesquisa consiste em ceder às células tronco da Bursa que foram retiradas durante a cirurgia que realizei para o tratamento da lesão de tendão do ombro, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, realizada pelo médico ortopedista Sandro Baraldi Moreira, CRM: 125.702, no Hospital Carlos Fernando Malzoni, situado na Avenida Sinharinha Frota, n. 556, centro, Matão-SP;
3. As células tronco da Bursa cedidas encontram-se em cultivo no Laboratório de Ensaios Celulares e Engenharia Regenerativa (LECR) da UNIARA e foram utilizadas no projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

Página 1 de 3

DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM CULTIVO 3D DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E DA BURSA SUBACROMIAL DO ÚMERO PROXIMAL DE HUMANOS". do mestrando Sandro Baraldi Moreira, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara (CEP-UNIARA) com número do parecer: 3.255.760;

4. Durante a execução da pesquisa poderá ocorrer o risco de constrangimento caso não seja preservado meu anonimato por parte dos pesquisadores. Tal risco será minimizado pela rigor dos pesquisadores no momento de elaboração da parte escrita da pesquisa (tese), apresentação da pesquisa em eventos científicos e/ou elaboração de artigos científicos;
5. Ao participar deste trabalho estarei contribuindo com a ciência para melhorar os métodos utilizados na área de pesquisa chamada medicina regenerativa, que possam ajudar na cura de lesões de tendão futuramente;
6. A minha participação neste projeto deverá ter a duração de 15 minutos, tempo estimado para leitura, esclarecimentos e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE);
7. Não terei nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderei deixar de participar ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e não sofrerei qualquer prejuízo;
8. Fui informado e estou ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação, no entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, serei ressarcido;
9. Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente de minha participação no estudo, poderei ser compensado conforme determina a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde;
10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade, e se eu desejar terei livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação;
11. Fui informado que os dados coletados serão utilizados, única e exclusivamente, para fins desta pesquisa, e que os resultados poderão ser publicados;
12. As células tronco da Bursa cedidas serão utilizadas, únicas e exclusivamente, para fins dessa pesquisa. Os constituintes não utilizados serão descartados em recipientes específicos de descarte para amostras biológicas para posterior incineração;
13. Os resultados desta pesquisa contribuirão com a determinação da eficácia desses recursos, que poderão ser utilizadas futuramente no tratamento de lesões musculoesqueléticas.

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

Página 2 de 3

14. Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi, doutoranda responsável pela pesquisa, pelo telefone: (16) 99764-0657, e-mail: cardoso.gastaldi@gmail.com, André Capaldo Amaral, orientador da pesquisa, telefone: (16) 99769-0095, e-mail: acamaral@uniara.com.br e/ou ou com Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, localizado na Rua Voluntários da Pátria nº 1309 no Centro da cidade de Araraquara-SP, telefone: 3301.7263, e-mail: comitedeetica@uniara.com.br, atendimento de segunda a sexta-feira das 08h00min. – 13h00min. - 14h00min – 17h00min.

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informado e concordo em participar do projeto acima descrito, cedendo minhas células tronco da Bursa.

Araraquara, ____ de _____ de 20__.

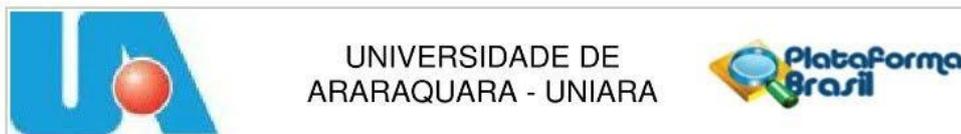
Assinatura Participante

Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

Página 3 de 3

9.2 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa - UNIARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FOTOBIMODULAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Pesquisador: Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 26087719.8.0000.5383

Instituição Proponente: ASSOCIACAO SAO BENTO DE ENSINO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.893.032

Apresentação do Projeto:

A medicina regenerativa consiste em um conjunto de conhecimentos e tem como objetivo um melhor direcionamento e ampliação de técnicas utilizadas no processo de reparo e/ou a substituição de tecidos ou órgãos lesados. Nos últimos anos, a introdução do potencial de uso da célula tronco de origem embrionária ou mesenquimal, trouxe novas perspectivas para o tratamento celular de patologias teciduais, inclusive no processo reparo ósseo. O presente projeto de pesquisa tem por objetivo analisar a influência biomoduladora da radiação do laser de baixa intensidade no nicho celular de células-tronco mesenquimais de medula óssea humana.

A terapia a laser de baixa intensidade (TLBI) é um dos recursos terapêuticos mais utilizados devido ao seu efeito fotobioestimulante em diversos tipos de tecidos e sua eficácia na cicatrização de feridas, ativação, proliferação e diferenciação celular, síntese de colágeno e de fatores de crescimento, deposição matricial, angiogênese, epitelização e osteogênese.

Não existem pesquisas científicas que caracterizem as consequências dessa ação associada aos eventos biológicos que constituem o processo de reparo tecidual utilizando células tronco mesenquimais.

Uma garrafa de cultivo celular de 75 cm² contendo CTMBSH (Célula-tronco mesenquimal de bursa subacromial) armazenada em estudo anterior será reaproveitada neste projeto.

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
Bairro: Centro **CEP:** 14.801-320
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



A análise estatística dos resultados utilizará procedimentos de estatística qualitativa descritiva básica e o teste de análise de variância (ANOVA), com significância adotada de $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa tem por objetivo analisar a influência biomoduladora da radiação do laser de baixa intensidade no nicho celular de células tronco mesenquimais da bursa subacromial humana.

Os objetivos Secundários são:

- Constituir, a partir das CTMBSH, aglomerados celulares (esferoides) pelo método de superfície não aderente;
- Irradiar os esferoides constituídos com laser de baixa intensidade nos comprimentos de onda de 685 nm;
- Analisar viabilidade celular; modulação do meio ambiente e diferenciação óssea das CTMBSH;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Durante a execução da pesquisa poderá ocorrer o risco de constrangimento caso não seja preservado o anonimato do voluntário por parte dos pesquisadores. Tal risco será minimizado pela rigor dos pesquisadores no momento de elaboração da parte escrita da pesquisa (tese), apresentação da pesquisa em eventos científicos e/ou elaboração de artigos científicos;

Benefícios:

Os resultados desta pesquisa contribuirão com a determinação da eficácia desses recursos, que poderão ser utilizadas futuramente no tratamento de lesões musculoesqueléticas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A amostra deste estudo será composta de uma garrafa de cultivo celular contendo CTMBSH em cultivo no LECER, coletada em estudo anterior e armazenada adequadamente. Este material biológico compõe biorrepositório, de acordo com a Resolução CNS 441/11 do Conselho Nacional de Saúde.

As CTMBSH foram armazenadas pelo mestrando Sandro Baraldi Moreira, em estudo aprovado pelo CEP com nº do parecer: 3.255.760.

A cessão desta amostra para o estudo atual está condicionada à tramitação deste protocolo de

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
Bairro: Centro **CEP:** 14.801-320
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comiledeetica@uniara.com.br



UNIVERSIDADE DE
ARARAQUARA - UNIARA



Continuação do Parecer: 3.893.032

pesquisa no CEP e a posterior assinatura do TCLE pela voluntária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos abaixo foram anexado na plataforma para a nova avaliação do protocolo de pesquisa:

TCLE_2.pdf

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1470337.pdf

Recomendações:

Recomendamos que os pesquisadores sigam as determinações apresentadas na Resolução 466/12 do CNS que utilizamos para a apreciação ética dos protocolos de pesquisa encaminhados para este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Segue abaixo a pendência apontada em parecer anterior e a forma como foi atendida:

PENDÊNCIA 1.1: Os pesquisadores adequaram a formação do biorepositório em pesquisa anterior e a inserção do documento "TCLE_Sandro.pdf", assinado na plataforma. No entanto, o TCLE relativo ao estudo atual, "TCLE_Gabriela.pdf", assim como todo o seu protocolo de pesquisa, encontra-se ainda em análise pelo CEP, o que implica que o processo de consentimento e sua assinatura deste documento se darão apenas após a aprovação pelo colegiado. Assim, este TCLE não pode ser inserido na plataforma assinado. Esta etapa deve ocorrer apenas após a sua aprovação.

CONSIDERAÇÕES: Os pesquisadores inseriram o TCLE novamente na plataforma sem a assinatura da voluntária.

Após a análise ética do protocolo de pesquisa, o mesmo foi considerado "APROVADO".

Considerações Finais a critério do CEP:

O Projeto de pesquisa encontra-se adequado e aprovado, de acordo com colegiado e com a Resolução 466/12 CNS. Qualquer alteração que venha ocorrer, em especial Eventos Adversos, pedimos a gentileza de informar este CEP por meio de Emenda e/ou Notificação, junto a Plataforma Brasil e, no decorrer do desenvolvimento da pesquisa solicitamos o encaminhamento do Relatório Parcial, e após a conclusão do mesmo o envio do Relatório Final, procedimentos esses de cunho obrigatório.

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
Bairro: Centro **CEP:** 14.801-320
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 3.893.032

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1470337.pdf	28/02/2020 09:52:57		Aceito
Outros	TCLE_2.pdf	28/02/2020 09:18:03	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Outros	Oficio_Resposta.pdf	14/02/2020 17:44:54	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Sandro.pdf	14/02/2020 17:42:28	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_BURSA_GABRIELA.pdf	19/11/2019 20:00:26	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Outros	Declaracao_Sandro.pdf	19/11/2019 19:54:45	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_LECER.pdf	18/11/2019 16:17:39	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso.pdf	18/11/2019 16:16:37	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	18/11/2019 16:15:29	Gabriela Gomes Cardoso Gastaldi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 02 de Março de 2020

Assinado por:
Adilson César Abreu Bernardi
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309

Bairro: Centro

CEP: 14.801-320

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-7263

Fax: (16)3301-7144

E-mail: comitedeetica@uniara.com.br

