



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA-PRPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA-PPGO**

HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS

**OS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE
EM CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA**

CAMPINA GRANDE-PB

2016

HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS

**OS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Terapias Complementares.

**Orientadora: Prof.^a Dra. Daliana Queiroga
de Castro Gomes**

**Co-orientadora: Prof.^a Dra. Elisanda Gava
de Castro**

CAMPINA GRANDE-PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M488e Medeiros, Hianne Cristinne de Morais.

Os efeitos biológicos da laserterapia de baixa intensidade em células-tronco isoladas da papila apical humana [manuscrito] / Hianne Cristinne de Morais Medeiros. - 2016.
62 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Prof. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Departamento de Odontologia".

1. Células-tronco. 2. Laserterapia. 3. Atividade biológica. 4. Papila apical. I. Título.

21. ed. CDD 617.6

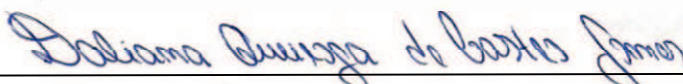
HIANNE CRISTINNE DE MORAIS MEDEIROS

**OS EFEITOS BIOLÓGICOS DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA**

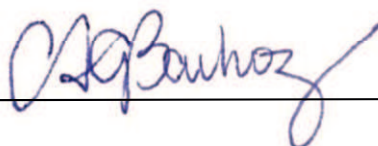
Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Terapias Complementares.

Data da Defesa: 24/07/2016

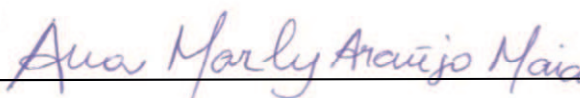
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes
Membro Titular (Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza
Membro Titular (1^a Avaliador)



Prof.^a Dra. Ana Marly Araújo Maia
Membro Titular (2^a Avaliadora)

AGRADECIMENTOS

Desde criança fui ensinada para entender que viver é dar-se a vida. É sempre amor ao próximo. É saber ouvir, saber falar. Saber aprender e saber ensinar. Agradeço aos meus pais e a minha família pela minha educação e por sempre me ensinar que não há nessa vida quem vença sozinho. Sendo assim, a realização deste trabalho não teria sido possível sem a ajuda da minha orientadora **Daliana Queiroga** e minha co-orientadora **Elisandra Gava**. Através delas, encontrei as portas abertas a infinitas oportunidades. Neste caminho percorrido, tive ainda um imenso auxílio de outros Colegas, como **Artur Christian** e **Larissa Matuda**, que compartilharam conhecimento e estiveram sempre de prontidão ao meu auxílio; toda a equipe do **LABTEC-UFG**, chefiado pela **Prof.^a Marize Valadares**, que me proporcionaram um crescimento imensurável na formação acadêmica e a toda equipe do **Laboratório de Imunohistoquímica- UFG** da **Prof.^a Aline Carvalho** pela solidariedade e grande ajuda. Agradeço ainda a Matheus Alves e Naná Carvalho, companheiros em uma longa jornada de crescimento, profissional e pessoal.

A todos os meus amigos, serei sempre grata pelos incentivos, em especial, Fernanda Mariz e Andressa Melo. Também à Matheus Córdula, pela dedicação, paciência e companheirismo.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB** pelas inúmeras possibilidades de crescimento acadêmico que pude desfrutar durante a minha formação enquanto Mestre. A todo o corpo docente que compartilhou seu conhecimento e deixaram a mim a imagem que quero seguir enquanto professora, em especial ao Prof. Cassiano Nonaka, Prof. Edja Maria e Prof. Gustavo Godoy.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelo financiamento desta Dissertação.

Expresso ainda minha grande gratidão a minha turma de Mestrado, companheiros fieis na minha caminhada e essenciais na minha vitória. A Carol e Helen, o meu muito obrigada pelo grande apoio.

Por fim, de nada adianta o esforço se não tivermos equilíbrio espiritual que nos mantém firmes na caminhada. Obrigada ao meu Pai pela plenitude do Teu espírito ter habitado o meu ser durante todo o meu caminho. Amém.

“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é se tornar o opressor.”

Paulo Freire

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu na análise dos efeitos da laserterapia de baixa intensidade (LBI) na atividade biológica de células-tronco isoladas da papila apical (SCAPs). Foram utilizadas células-tronco isoladas da papila apical doadas pelo banco de células do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos da Universidade Federal de Goiás (UFG). As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO₂. Foi utilizado meio de cultura padrão composto por *Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture* F-12 (DMEM/F12), soro fetal bovino a 10%, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Para irradiação, foi utilizado o laser semiconductor diodo (InGaAlP), no comprimento de onda de 660 nm, potência de 100mW, energia de 6J, tempo de irradiação de 60 segundos. Inicialmente, foi avaliada a intensidade do metabolismo mitocondrial por meio de imunofluorescência com o uso do Mitotraker Red. Foram comparadas as intensidades de atividade mitocondrial em células não irradiadas, e após dois tempos de irradiação: imediato à aplicação do LBI e 24h após a aplicação. Com o intuito de avaliar a imunexpressão de proteínas reguladoras, foi realizada imunocitoquímica, empregando os marcadores Ki-67, Ciclina B1, TGF-β2 e TGF-β, p53, Bcl-2. Para cada anticorpo, foram analisados dois grupos distintos de células: um não irradiado (CNT) e outro irradiado (G6J). A análise da progressão do ciclo celular foi realizada no tempo de 8h por meio da marcação com Iodeto de Propídeo, as células foram quantificadas de acordo com a fase do ciclo em que se encontravam, por meio de citometria de fluxo. Foram comparados os resultados obtidos nos grupos irradiados e não irradiados. A normalidade de distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de *Kolmogorov-Sminov*. Para verificar as diferenças nos percentuais de imunoreatividade, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e para verificar se houve diferença estatística entre os grupos quanto a progressão do ciclo celular, foi utilizado o teste T não paramétrico. Em ambos os casos, foi adotada significância de 5%. O aumento da atividade mitocondrial foi evidente desde o momento imediato da irradiação, sendo este aumento metabólico ainda maior após 24h de exposição ao LBI. As células irradiadas com LBI vermelho apresentaram maiores medianas de percentuais de imunopositividade ao Ki-67 e a Ciclina B1. Não houve diferença quanto à expressão de TGF-β. Da mesma forma, também não foi obtida diferença quanto à imunexpressão do p53 e Bcl-2, o que indica que o LBI não desregula genes importantes na manutenção da progressão do ciclo celular e controle da apoptose. Também não houve divergências quanto à cronologia da progressão do ciclo celular entre os grupos irradiados e não irradiados. Desta forma, é possível concluir que a absorção da luz pelas SCAPs resulta em aumento imediato do metabolismo mitocondrial que pode influenciar a maior expressão do marcador de proliferação nestas células. Também foi demonstrado que a irradiação destas células não resulta em nenhum dano à regulação das funções vitais de proliferação celular e apoptose.

Palavras-chave: Células tronco; Laserterapia de baixa intensidade; Proliferação Celular

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of low-intensity laser therapy (LILT) in stem cells from apical papilla (SCAPs) proliferation. Stem cells isolated from apical papilla cells were donated by the cell bank from Pharmaceutical Nanotechnology Laboratory and Drug Delivery Systems, Federal University of Goiás (UFG). Cells were cultured in 75cm² bottles and kept in a humidified stove at 37 °C in a saturated atmosphere at 5% CO₂. Standard culture medium used was composed of Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 (DMEM / F12), 10%, fetal bovine serum, 100 ug / ml streptomycin and 100 U / ml penicillin. For irradiation, the semiconductor laser diode (InGaAlP) was used at a wavelength of 660 nm, 100mW power, 6J energy, 60 seconds for irradiation time and 200 J / cm². Dose. Initially, the intensity of mitochondrial metabolism was evaluated by immunofluorescence. For this, we used Mitotraker Red in a concentration of 100mM. Intensities of mitochondrial activity was compared in non-irradiated cells, and after two irradiation times: immediately to the application of LILT and 24h after application. In order to assess the immunoreactivity of proteins involved in cell proliferation, it performed immunocytochemistry using Ki-67, p53, Bcl-2, Cyclin B1, TGF-β₂ and TGF-β₃. The incubation time for the primary antibody exposure was standardized at 2hours. For each antibody, two different groups were analyzed: non-irradiated (CNT) and irradiated (G6J). The progression of the cell cycle analysis was performed, by flow cytometry. The results obtained in the groups irradiated and non-irradiated were compared. The normality of the data distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. To check the differences in the immunoreactivity between the groups, were used the Mann-Whitney test and to check whether there was a statistical difference between the groups regarding the progression of the cell cycle, we used the nonparametric T test. In both cases, it was adopted significance of 5%. Increased mitochondrial activity was evident immediately from the time of irradiation, and this metabolic activity increase even more after 24 hours of exposure to LILT. The irradiated group showed greater median percentage of immunopositive Ki-67 and Cyclin B1. However, in both cases, there was no statistical significance when compared to control groups. There was no difference in TGF-β expression. Likewise, it was also no difference obtained as the p53 and Bcl-2, which indicates that the LILT does not deregulate the maintenance of cell cycle progression and control of apoptosis. There was no disagreement on the chronology of cell cycle progression between the groups irradiated and non-irradiated. Thus, it is possible to conclude that the LILT increases mitochondrial metabolism of isolated stem cells of the apical papilla and it can influence the immunoreexpression of proliferation marker. Furthermore, the irradiation of SCAPs does not result in any damage to regulation of cell proliferation and apoptosis functions.

Keywords: stem cells; low-intensity laser therapy; Cell proliferation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl- microlitros

akt1- gene regulador da enzima AKT1, do inglês, V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1

Bcl-2- do inglês, B-cell lymphoma 2

Ccnd1- gene regulador da Ciclina D1

CD146- do inglês, Cluster of Differentiation 146

CD90- do inglês, Cluster of Differentiation 90

DAB- 3,3-Diaminobenzina

DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture

GaAlAs- Gálio- Alumínio-Ársênio

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

InGaAlP- Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo

LBI- Laserterapia de Baixa Intensidade ou Laser de Baixa Intensidade

min- Minutos

ml- Mililitros

NGF- do inglês, Neuronal Growth Factor

Oct4- Octamer-binding Transcription Factor 4

P- passagem

PBS- do inglês, phosphate buffered saline

BSA- do inglês, Bovine Serum Albumin

Pik3ca- gene regulador da PIK3CA, do inglês, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

Rpm- Rotações por minuto

SCAPs- do inglês, Stem Cells from Apical Papilla

SFB- Soro Fetal Bovino

TBS- do inglês, Tris-Buffered Saline

TGF-β- do inglês, Transforming Growth Factor Beta

UEPB- Universidade Estadual da Paraíba

UFG- Universidade Federal de Goiás

Vdac1- gene regulador da VDAC1, do inglês, Voltage-dependent anion-selective channel protein 1

VEGF- do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros do Laser de Diodo.	20
Quadro 2. Distribuição dos grupos, para Imunofluorescência, de acordo com o tipo de intervenção.	22
Quadro 3. Especificações dos anticorpos utilizados na reação de imunocitoquímica	25
Quadro 4. Distribuição dos grupos, para citometria de fluxo, de acordo com o tipo de intervenção.	26

ARTIGO

Quadro 1. Especificações dos anticorpos utilizados na reação de imunocitoquímica.	42
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Poço único posicionado sobre a placa molde para irradiação das células previamente ao ensaio de imunofluorescência. **20**
- Figura 2.** . Irradiação das células aderidas na lamínula 24h antes da reação de imunocitoquímica **23**

ARTIGO

- Fig. 1.** Atividade mitocondrial antes da irradiação, imediatamente após a irradiação e 24 após irradiação com LBI. **43**
- Fig. 2** Á esquerda, imunexpressão do Ki-67 no grupo CNT. Á direita, imunexpressão do Ki-67 no grupo G6J. **43**
- Fig. 3** Á esquerda, imunexpressão da Ciclina B1 no grupo CNT. Á direita, imunexpressão da Ciclina B1 no grupo G6J. **43**
- Fig. 4** Distribuição dos percentuais de imunopositividade ao Ki-67 e à Ciclina B1 de acordo com os grupos de intervenção. **44**
- Fig. 5** Distribuição dos percentuais de células de acordo com a fase do ciclo celular nos grupos irradiados e não irradiados. **45**

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	METODOLOGIA	15
3.1	Considerações Éticas	15
3.2	Cultura de Células	15
3.2.1	Manutenção das SCAPs	15
3.2.2	Passagem Celular	15
3.3	Irradiação das Células	17
3.4	Imunocitoquímica	18
3.5	Imunofluorescência	21
3.6	Análise da Progressão do Ciclo Celular	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
	ARTIGO	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A	47
	ANEXO B	61

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As células-tronco ou células progenitoras são células indiferenciadas que quando isoladas são caracterizadas como aderentes e formadoras de colônias. O seu potencial de diferenciação em uma variedade de tipos celulares e as consequentes implicações clínicas deste, despertaram o interesse de diversos pesquisadores nas últimas décadas, que iniciaram uma busca por métodos de isolamento destas células de diferentes tecidos (FRIEDENSTEIN; KURALESOVA, 1971; SONOYAMA et al, 2006).

As células-tronco de origem mesenquimal são caracterizadas pelo seu alto potencial mitótico e sua múltipla capacidade de diferenciação. Inicialmente, estas células foram isoladas da medula óssea e possuíam capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos, miócitos e adipócitos (PITTENGER et al, 1999; PHINNEY; PROCKOP, 2007). Tal descoberta fomentou a curiosidade dos pesquisadores quanto à existência de outros tipos de células pluripotentes em adultos, as quais pudessem contribuir para o desenvolvimento nas áreas de engenharia tecidual e regeneração, inclusive aplicadas à Odontologia (SONOYAMA et al, 2006; BAKOPOULOU et al, 2011).

As primeiras células isoladas de tecidos dentários foram as células-tronco da polpa dentária (GRONTHOS et al, 2000). A partir daí, vários estudos resultaram no isolamento de outros tipos celulares destes tecidos, como as células-tronco derivadas de dentes decíduos (MIURA et al, 2003), do ligamento periodontal (SEO et al, 2004), dos germes dentários (MORSCZECK et al, 2005) e da papila apical (SONOYAMA et al, 2008), visando principalmente a evolução da medicina regenerativa e suas consequentes aplicações clínicas.

Inicialmente, as células-tronco isoladas do órgão dentário são ditas de origem mesenquimal, e caracterizadas pela expressão de Stro-1 e CD146. Porém, é sabido que durante o desenvolvimento dentário, as células da crista neural, de origem ectodérmica, migram e interagem com o epitélio dentário durante a formação do dente (KOUSSOULAKOU; MARGARITI; KOUSSOULAKOU, 2009; MAYO et al, 2014). Este fato permite a discussão de que as células-tronco isoladas do tecido dentário possuíam origem ectomesenquimal, e não apenas mesenquimal. Isto é reforçado por estudos *in vitro*, os quais demonstram que, quando estimuladas por meios neurogênicos, estas células apresentam aumento na produção de Sox-2,

Oct4, p75 e Nistina, o que pode indiciar diferenciação neurogênica (GOVINDASAMY et al, 2011; MAYO et al, 2014).

Quando as células-tronco são isoladas da região apical na fase de desenvolvimento da polpa dentária, são denominadas células-tronco da papila apical (SCAPs, do inglês, *Stem Cells from Apical Papilla*) e possuem um alto índice de proliferação celular comparada a outras células isoladas de tecidos dentários (SONOYAMA et al, 2006; SONOYAMA et al 2008; BAKOPOULOU et al, 2011). Diferente das demais células isoladas do órgão dentário, as SCAPs possuem expressão reduzida de Stro-1 e maior expressão de marcadores neuronais como o CD90 e p75, mesmo na ausência de estímulos neurogênicos. Este fato torna a hipótese de origem ectomesenquimal ainda mais forte para este tipo celular (ABE; YAMAGUCHI; AMAGASA, 2007; SONOYAMA et al, 2008)

As SCAPs possuem maior índice de proliferação que células-tronco do ligamento periodontal (CHEN et al, 2013) e, índices de proliferação semelhantes aos obtidos em células-tronco isoladas de dentes decíduos e do folículo dentário. (GOSAU et al., 2013; CHEN et al, 2015). Desta forma, a caracterização sobre a proliferação e diferenciação das SCAPs é de extremo interesse no estudo da regeneração tecidual aplicada à Odontologia, principalmente no âmbito da endodontia (SONOYAMA et al, 2006; SONOYAMA et al, 2008).

Quando isoladas de terceiros molares impactados, estas células podem se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos, capazes de migrar e produzir tecido mineralizado. Estudos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram o potencial de formação de estrutura semelhante à dentina (SONOYAMA et al, 2008; CHEN et al, 2012).

Também visando o avanço nestas áreas, a laserterapia de baixa intensidade (LBI) vem sendo estudada quanto ao seu efeito na proliferação celular e consequente regeneração tecidual. A LBI, principalmente no comprimento de onda vermelho (635-660nm), promove melhor viabilidade e estímulo de proliferação celular em cultura de células indiferenciadas (CAVALCANTI et al, 2015), o que pode ser demonstrado em análises *in vitro*, em que se observa a associação dos seus efeitos a maior produção de fatores tróficos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento neural (NGF), quando comparados a células não irradiadas (HOU et al, 2008).

Um estudo realizado por Wu et al (2012) analisou os genes reguladores nas células-tronco mesenquimais de rato antes e depois da exposição ao LBI (665nm), com potência de 60mW e dose de 5J/cm². Foi demonstrado que o laser estimulou a superexpressão de alguns genes, com ênfase no gene regulador de Ciclina D1, envolvida diretamente em diversas etapas da proliferação celular. Além deste, vários outros genes, destacando-se os das vias Vdac1, Akt1 e Pick3ca, que desempenham papéis fundamentais na regulação da apoptose e do ciclo celular, também foram influenciados pela exposição ao laser, o que demonstra que o LBI pode ter aplicabilidade na regulação da proliferação de células-tronco mesenquimais.

Ginani et al (2015) realizaram uma revisão sistemática sobre os efeitos do LBI na proliferação de células-tronco mesenquimais, por meio da qual pode-se observar que os resultados dos estudos abordados demonstraram que a LBI influenciou positivamente o aumento da proliferação na maioria das células-tronco estudadas, em especial, as originadas da medula óssea e tecido adiposo.

Apesar dos avanços da fototerapia na medicina regenerativa, ainda não há estudos publicados que evidenciem o efeito do laser de baixa intensidade em cultura de células-tronco isoladas da papila apical. Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste na análise dos efeitos biológico da LBI na em cultura primária de SCAPs.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos biológicos da laserterapia de baixa intensidade em células-tronco isoladas da papila apical humana.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a irradiação com o LBI influencia no metabolismo mitocondrial das SCAPs por meio de imunofluorescência;
- Verificar se o LBI influencia a proliferação das SCAPs por meio da comparação da imunexpressão de Ki-67 entre os grupos irradiados e não irradiados;
- Analisar o efeito do LBI sob o ciclo celular utilizando citometria de fluxo e por meio da imunomarcagem para Ciclina B1 entre grupos irradiados e não irradiados;
- Averiguar se houve desregulação na divisão celular e apoptose por meio da comparação da imunexpressão de TGF- β , p53 e Bcl-2 entre grupos irradiados e não irradiados.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações Éticas

Os experimentos foram realizados com células doadas e previamente caracterizadas do biorrepositório de células-tronco do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os procedimentos de isolamento destas células *in vivo* fazem parte de um projeto paralelo coordenado pela Professora Dr^a Elisandra Gava. Todos os procedimentos antecedentes a estocagem das células seguiram os princípios éticos regidos pelo Código de Helsinque e foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa da UFG, aprovado sob o número CAAE: 44993015.8.0000.5083.

3.2 Cultura de Células

3.2.1 Manutenção das SCAPs

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada a 5% de CO₂. Para cada garrafa, foi utilizado 10 ml de meio de cultura padrão composto por: *Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture* F-12 (DMEM/F12, Sigma-Aldrich® - SLBH2344V), soro fetal bovino (SFB) a 10%, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Este meio foi mantido na garrafa por um período máximo de 3 dias, para não pôr em risco a viabilidade celular.

Para todos experimentos realizados neste estudo, foram utilizadas células isoladas de 4 pacientes distintos.

3.2.2 Passagem Celular

Denomina-se passagem celular o processo de repassar células de uma garrafa para outra ou de uma garrafa para placa de poços. As células isoladas do papila apical e inicialmente cultivadas são chamadas de passagem zero ou apenas P₀. Quando a garrafa P₀ obtém confluência acima de 90%, é possível seguir as seguintes alternativas:

- Dividir a suspensão celular em duas novas garrafas que passarão a representar uma passagem a mais que a garrafa mãe, no caso, a primeira passagem (P_1);
- Utilizar determinada concentração celular no plaqueamento, onde as células cultivadas nos poços também representam P_1 , e são utilizadas nos ensaios experimentais;
- Congelar e Estocar as células. Neste caso, as células congeladas permanecem na mesma passagem da garrafa mãe, mesmo após descongelamento em nova garrafa.

Para todos os ensaios realizados, foram utilizadas células entre a primeira e a quinta passagem, para que as linhagens não entrassem em senescência.

Durante estes experimentos, utilizou-se o seguinte protocolo para passagem celular:

- 1) Retirada do meio de cultura das garrafas;
- 2) Duas Lavagens com solução salina (PBS), para remoção de resíduos de meio e SFB;
- 3) Pipetagem de 500 μ l de tripsina (temperatura ambiente) para dentro das garrafas;
- 4) Homegenização da tripsina por 30 segundos;
- 5) Estimulo mecânico (leves pancadas na lateral da garrafa) para desadesão celular por 30 segundos;
- 6) Adição de 5ml de DMEM +SBF 10% para neutralização da tripsina;
- 7) Transferência da suspensão celular para tubo falcon estéril;
- 8) Centrifugação em velocidade de 1500 rpm e duração de 5 minutos;
- 9) Descarte do meio sobrenadante e resuspensão do pallet de células em 2ml de meio;
- 10) Repetir centrifugação com mesmos parâmetros supracitados;
- 11) Descartar meio sobrenadante e resuspender o pallet de células em 2ml de meio;
- 12) Pipetar 10 μ l de azul de tripan 0,4% em um espendorf e adicionar 10 μ l de suspensão celular;
- 13) Pipetar 10 μ l da suspensão de células em azul de tripan e colocar em slide específico para contador automático. O contador automático fornece o número total de células e a viabilidade celular. Para cálculo do número total de

células na suspensão utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Nº total de células} = \text{Número de células viáveis} \times \text{Fator de diluição}$$

Como as células foram suspensas em 2ml de meio, o fator de diluição foi igual a 2.

14) A suspensão celular pode ser dividida igualmente entre duas novas garrafas ou plaqueada. Para plaqueamento em placa de poços, estipula-se uma concentração de células desejada em cada poço e utiliza-se a seguinte equação:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Onde:

C_1 é o número de células por ml determinado pela contagem;

V_1 representa o volume total da suspensão celular no tubo falcon;

C_2 é a concentração celular que se deseja ter em cada poço;

V_2 é o volume de suspensão a ser pipetado em cada poço.

Caso haja remanescente de suspensão celular após o preenchimento de todos os poços a serem utilizados em um experimento, pode-se transferir este remanescente para uma nova garrafa ou estoca-lo por meio de congelamento em vayo.

3.3 Irradiação das Células

As células foram depositadas em placas de seis poços (EasyPath[®], EP-5125241) ou 12 poços (Falcon[®], 35-3504), na densidade de células específica para cada ensaio, mantendo-se sempre um poço vazio entre dois poços contendo células, de modo a evitar a dispersão de luz não intencional entre os poços durante aplicação do LBI. As células foram irradiadas com um aparelho de Laser semiconductor (InGaAIP), laser DUO MMOPTICS[®] (São Carlos, SP, Brasil.), com as

especificações apresentadas no Quadro 1. Os grupos controle e tratados foram retirados da estufa simultaneamente. A irradiação ocorreu dentro da cabine de fluxo desprovida de iluminação.

Quadro 1. Parâmetros do Laser de Diodo.

Composição	InGaAlP
Potência	100 mW
Comprimento de onda	660 nm
Modo de ação	Contínuo
Diâmetro da ponta	0,03 cm ²
Energia	6 J
Tempo	60s
Modo de aplicação	Sonda de irradiação perpendicular à placa, a 0,5 cm das células

3.4 Imunofluorescência

Para o ensaio de Imunofluorescência, utilizou-se o Mitotraker Red (Molecular Probes[®], MP-07512, Invitrogen[®]) na concentração de 100mM. A técnica consiste na aplicação de um fluorocromo de coloração vermelha que permeabiliza a célula e através de um radical clorometilo se fixa na superfície de mitocôndrias ativas. Quanto maior o metabolismo mitocondrial, maior a fixação do fluorocromo a sua superfície.

Foram utilizadas placas de cultura clonal ou poço único de 35mm (Thermo Scientific[®]- 130180), sendo a densidade de células de 5×10^5 por poço. Os grupos controle e de intervenção foram divididos como exposto no Quadro 2. O grupo CNM foi usado como parâmetro da fluorescência natural de cada célula. O grupo CNT representa a atividade mitocondrial da célula sem tratamento e serviu como parâmetro de comparação com os grupos tratados. O grupo 6JT0 e 6J24h representam os grupos tratados, por meio dos quais pode-se observar a resposta mitocondrial imediata e após 24h das células irradiadas.

Para irradiação, cada poço foi colocado sobre um molde que delimitava cada 1cm^2 da área do poço (Figura 1). O laser vermelho (Quadro 1) foi aplicado no ponto central de cada quadrado, desta forma, toda a superfície do poço foi irradiada uma única vez.

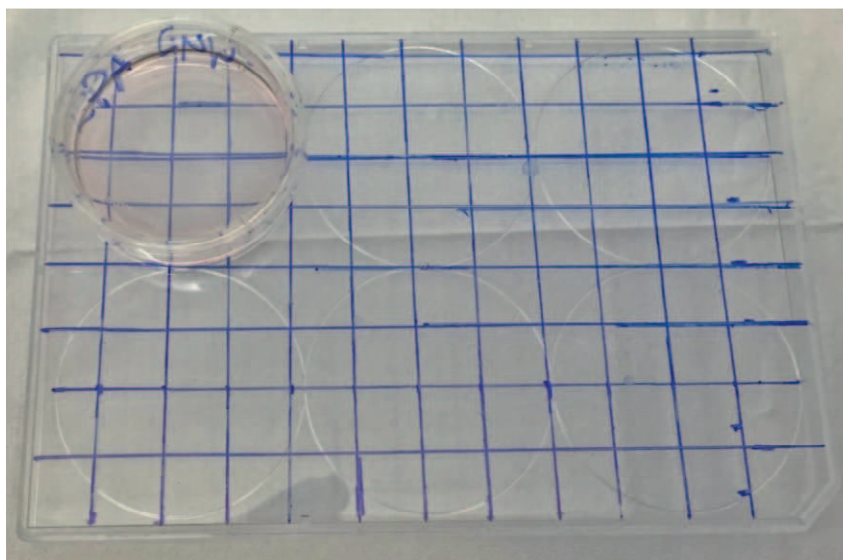


Figura 1. Poço único posicionado sobre a placa molde para irradiação das células previamente ao ensaio de imunofluorescência.

Após exposição ao laser, as células foram incubadas por mais 24h. No caso do grupo T0, não houve incubação. Posteriormente, iniciou-se o ensaio seguindo o protocolo abaixo citado:

- 1) Remover o meio de cultura dos poços;
- 2) Lavar um vez com DMEM sem SFB, com o intuito de que as proteínas do SFB não interajam com o fluorocromo provocando precipitação e consequente coloração de fundo;
- 3) Colocar o Mitotraker(100mM) e incubar por 30 min;
- 4) Remover o corante e lavar uma vez com PBS aquecido;
- 5) Preparar um solução de $150\mu\text{l}$ de PBS aquecido e adicionar $850\mu\text{l}$ de Paraformaldeido a 4% para cada poço. Incubar os poços com a solução por 15min;
- 6) Retirar a solução;
- 7) Lavar com PBS mantendo os poços sob agitação por 5min. Repetir este passo três vezes;
- 8) Realizar leitura em microscópio de fluorescência.

As imagens obtidas através da microscopia de fluorescência foram adquiridas e editadas com o auxílio do software LAS AF 4.1 (Leica®), com objetivo de detectar diferenças na fluorescência mitocondrial entre os grupos irradiados e não irradiados. Esta análise foi realizada apenas de forma qualitativa. Foi comparada a diferença de fluorescências entre os grupos CNT, 6JT0 e 6J24h.

Quadro 2. Distribuição dos grupos, para Imunofluorescência, de acordo com o tipo de intervenção

GRUPO	INTERVENÇÃO
Controle não marcado (CNM)	Sem irradiação e sem marcação do Mitotraker
Controle não tratado (CNT)	Sem irradiação e com marcação do Mitotraker
Irradiado tempo 0 (6J T0)	Irradiação e ensaio de Imunofluorescência sem intervalo de incubação.
Irradiado 24h (6J 24h)	Irradiação e ensaio de Imunofluorescência com intervalo de 24h de incubação.

3.4 Imunocitoquímica

Com o objetivo de analisar o mecanismo de ação do LBI sob as SCAPs, foi realizada técnica de imunocitoquímica, seguindo protocolo do Laboratório de Patologia e Imunohistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO- UFG). Foram utilizados os marcadores Ki-67, p53, Bcl-2, Ciclina B1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (Quadro 3); com o objetivo de verificar se há diferença na regulação da expressão destas proteínas nas células irradiadas e não irradiadas.

Para realização da técnica, foram utilizadas lamínulas circulares (13mm, Glasscyto®) condicionadas em ácido clorídrico, para que houvesse ultra limpeza, e, posteriormente, esterilizadas em autoclave. As lamínulas foram posicionadas em placas de 12 poços (Falcon® 35-3504), imergidas em 200 μ l de SFB e incubadas por 40 minutos. Este processo resulta na decantação de proteínas presentes no soro que agem diretamente na adesão celular, desta forma, as células se concentraram em maior volume na lamínula e não no poço.

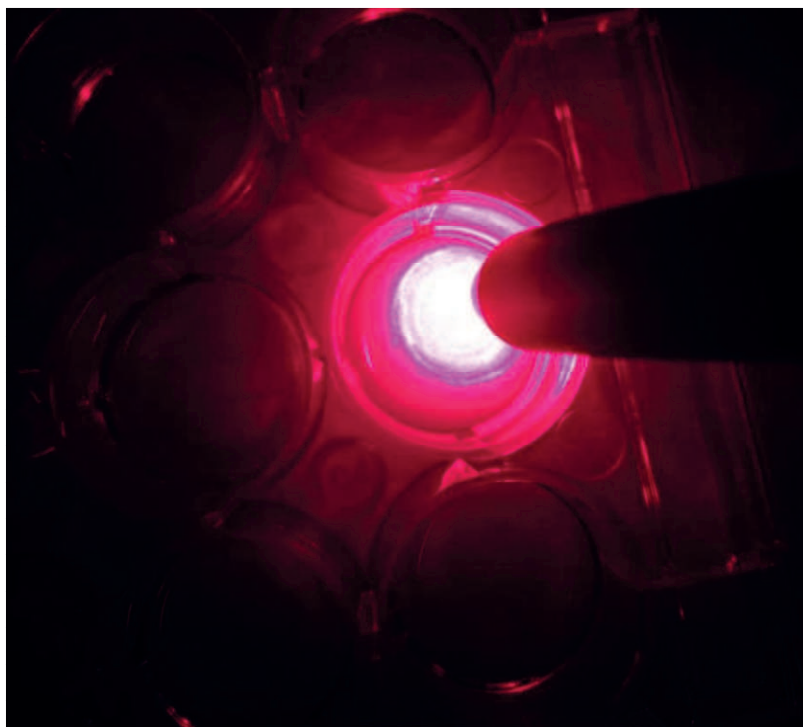


Figura 2. Irradiação das células aderidas na lamínula 24h antes da reação de imunocitoquímica.

Após incubação, retirou-se o SFB remanescente e depositou-se uma suspensão celular concentrada na densidade de 1×10^5 células/ poço. As placas foram armazenadas em estufa e incubadas por mais 24h, para completa adesão. Posteriormente, as células foram irradiadas (Figura. 1) apenas na energia de 6J conforme especificações já descritas (Quadro 1) e incubadas novamente por mais 24h.

Todo o procedimento da imunocitoquímica foi realizado na própria placa com a ajuda de pipetas de pasteur, seguindo-se o seguinte protocolo:

- 1) Retirar todo o meio dos poços;
- 2) Pipetar sobre a lamínula, 200 μ l de acetona P.A refrigerada;
- 3) Envolver a placa em papel alumínio e congelar;
- 4) Após descongelamento, lavar os poços com TBS para remoção do excesso de acetona;
- 5) Pipetar H₂O₂ sobre a lamínula, incubando por 20 min;
- 6) Lavar duas vezes com TBS;
- 7) Pipetar PBS-BSA e incubar por 20 min;
- 8) Lavar duas vezes com TBS;

- 9) Pipetar o anticorpo primário, de acordo com a diluição específica (Quadro 2), e incubar por 2 horas;

Quadro 3. Especificações dos anticorpos utilizados na reação de imunocitoquímica.

Anticorpo	Especificações	Diluição	Sistema	DAB
Ki-67	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Ki-67 humano , MIB1 Dako (NCL-Ki-67-MIB1)	1:100	LSAB	5min
Ciclina B1	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti Ciclina B1 humana, clone 7A9 Novocastra (NCL- Cyclin B1)	1:40	LSAB	7min
TGF- β 2	Anticorpo policlonal de coelho, anti TGF β -2 humano, Santa Cruz (SC-90)	1:100	LSAB	5min
TGF- β 3	Anticorpo policlonal de coelho, anti TGF β -3 humano, Santa Cruz (SC-83)	1:50	LSAB	5min
p53	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-p53 humano, clone DO-7, Dako (NCL-p53-DO-7)	1:200	LSAB	5min
Bcl-2	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Bcl-2 humano , especificação 124, Dako (NCL-Bc-l2-124)	1:100	LSAB	5min

- 10) Lavar cinco vezes com TBS;
- 11) Colocar uma gota anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB) sobre a lamínula e incubar por 30 min;
- 12) Lavar cinco vezes com TBS;
- 13) Colocar uma gota da solução estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB) sobre a lamínula e incubar 30 min;
- 14) Colocar a solução reveladora (DAB) sobre a lamínula por 5min;
- 15) Lavar 5 vezes com TBS;
- 16) Gotejar hematoxilina e incubar por 15min;
- 17) Lavar em água ultrapura ate completa remoção;

18) Imergir em cadeia ascendente de álcool, incubando 1 min em cada concentração (70%; 95%; 100%)

19) Passar rapidamente em xilol e montar em lâminas.

Após a montagem das lâminas, foi realizada a leitura em microscópio óptico. As células imunorreativas apresentam coloração acastanhada: para o ki-67, p53 e Bcl-2, em núcleo; e para os TGFs e Ciclina B1, em citoplasma. Utilizou-se o software AxioVision[®] 4.7.1 para fotografar 3 campos de cada lâmina. A quantificação foi realizada com o auxílio da ferramenta cell counter do software Image J[®], sendo programado o tipo 1, para células negativas e o tipo 2, para células positivas. Por fim, para cada marcador, obtinha-se um somatório de células positivas e negativa nos três campos e calculou-se o percentual de imunoreatividade através da equação:

$$\% \text{ de Imunoreatividade} = \frac{\text{Células Positivas}}{\text{Células Positivas} + \text{Células Negativas}} \times 100$$

O ensaio foi repetido em linhagens isoladas de quatro pacientes distintos. Para cada anticorpo, eram separados dois grupos de células de cada paciente, um grupo controle não tratado (CNT) e um grupo irradiado com laser vermelho (6J). Os % de imunoreatividade de cada grupo de células foram registrados em planilha e posteriormente submetidos a análise estatística.

3.6 Análise da Progressão do Ciclo Celular

As células foram dispostas em placas de 6 poços, sendo utilizados apenas 3 poços por placa, intercalados. Cada poço representou um grupo de intervenção, como disposto no Quadro 4. O grupo CNM representou o parâmetro da fluorescência natural de cada célula, já o grupo CNT, a progressão do ciclo celular das células sem tratamento e parâmetro de comparação com o grupo tratado.

Quadro 4. Distribuição dos grupos, para citometria de fluxo, de acordo com o tipo de intervenção

GRUPO	INTERVENÇÃO
Controle não marcado (CNM)	Sem irradiação e sem Iodeto de Propídeo
Controle não tratado (CNT)	Sem irradiação e com marcação do Iodeto de Propídeo
Irradiado (GIr)	Irradiado com laser vermelho e marcado com Iodeto de Propídeo

Após plaqueamento, as células foram incubadas por 24h para completa adesão. Posteriormente, retirou-se o meio de cultura e as células foram novamente incubadas por 24h em DMEM 1%penicilina/estreptomicina. A retirada do SFB implica em ausência de fatores de crescimento disponíveis à célula, deixando-as em um período de Starving (sem fatores tróficos) que induz as células a entrarem em latência no ciclo celular, resultando em maior homogeneidade entre os grupos.

Seguido ao período de Starving, as células foram irradiadas com laser vermelho (Quadro 1) e incubadas com DMEM+ 10%SFB por 8 horas. O protocolo para fixação e leitura para citometria foi utilizado nos seguintes passos:

- 1) Remoção do meio de cultura e lavagem com 1 ml de PBS;
- 2) Remoção do PBS e adição de 200µl de tripsina por 1 min;
- 3) Neutralização da tripsina com meio de cultura enriquecido de SFB;
- 4) Transferir 1ml de suspensão celular para cada tubo de citometria identificado;
- 5) Centrifugar os tubos por 5min na velocidade de 1500rpm;
- 6) Descartar o sobrenadante e resuspender o pallet em 2ml de PBS;
- 7) Centrifugar novamente, utilizando os mesmo parâmetros;
- 8) Desprezar o sobrenadante e resuspender o pallet de células em 1ml de álcool 70% gelado;
- 9) Armazenar os tubos em refrigerador, mantendo-os entre a temperatura entre 2°C e 4°C por 24h;
- 10) Após incubação, centrifugar os tubos por 5 min a 1500 rpm;
- 11) Descartar o sobrenadante e resuspender em 2ml PBS gelado;
- 12) Repetir a centrifugação e descartar novamente o sobrenadante, mantendo o pallet aderido ao tubo;

13) As células do tubo foram, então, resuspendidas em 300µl de solução de RNase (200µg/ml) e Iodeto de Propídeo (50µl/ml) em PBS, apenas o grupo CNM foi resuspenso apenas em PBS gelado;

14) As células foram incubadas por 1h em temperatura ambiente e protegidas de luz. Por fim, realizou-se leitura em Citômetro.

Por meio da leitura das diferenças de fluorescência apresentadas pelas células em fases distintas do ciclo celular, é possível obter, através de um software, a quantificação de células em cada uma dessas fases. Desta forma, é possível comparar a progressão no ciclo celular nos grupos tratados e não tratados.

3.7 Análise dos Dados

A análise estatística foi empregada para os dados obtidos no ensaio da imunocitoquímica e no ensaio de análise de progressão do ciclo celular. Inicialmente foi realizada a análise descritiva com obtenção de mediana e desvio padrão de todos os grupos estudados. A normalidade de distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de *Kolmogov-Sminorv*. Apesar de a distribuição ter sido dada como normal, só foi possível a análise por meio de testes não paramétricos. Desta forma, para verificar se houve diferença estatística na imunoreatividade ao Ki-67 e à Ciclina B1, entre os grupos de células irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e para verificar se houve diferença estatística entre a progressão do ciclo celular dos grupos irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste T não paramétrico. Em ambos os casos, foi adotada significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO

Períodico: Laser in Medical Science *

ISSN online: 1435-604X

Qualis: A2

Fator de Impacto: 2.41

A LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE INFLUENCIA A ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO DA PAPILA APICAL HUMANA

H.C.M., Medeiros¹; A.C.G., Silva²; M.C., Valadares³; A.C., Batista⁴; E.G, Castro⁵; D.Q.C., Gomes⁶

Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás

³ Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, PhD pela Universidade Johns Hopkins, Boston, E.U.A.

⁴ Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Doutorado em Odontologia pela Universidade de São Paulo

⁵ Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, PhD pela Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

⁶ Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Doutorado em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba

Palavras-chave: Células tronco; Laserterapia de baixa intensidade; Proliferação Celular

.Hianne Cristinne de Moraes Medeiros

R. Baraúnas, 351 - Universitário, Campina Grande - PB, 58429-500

55 83 996541738

hcomm@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste trabalho consistiu na análise dos efeitos biológicos da laserterapia de baixa intensidade (LBI) sobre as células-tronco isoladas da papila apical (SCAPs). Para irradiação, foi utilizado laser semiconductor diodo (660 nm, 100mW, 6J, 200J/cm²). A intensidade do metabolismo mitocondrial foi avaliada por meio de imunofluorescência, utilizando Mitotraker Red. Em seguida, foi realizada imunocitoquímica, empregando os marcadores Ki-67, p53, Bcl-2, Ciclina B1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Para análise da progressão do ciclo celular, foi utilizada citometria de fluxo. Foram comparados os resultados obtidos nos grupos irradiados e não irradiados. As diferenças nos percentuais de imunoreatividade foram analisadas por meio do teste de *Mann-Whitney* e as diferenças quanto a progressão do ciclo celular, por meio do teste T não paramétrico. Em ambos os casos, foi adotada significância de 5%. O aumento da atividade mitocondrial foi evidente desde o momento imediato após a irradiação, sendo ainda mais evidente após 24h de exposição ao LBI. As células irradiadas também apresentaram maiores medianas de percentuais de imunopositividade ao Ki-67 e a Ciclina B1, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa. Não houve divergências quanto à cronologia da progressão do ciclo celular, bem como, não houve diferença quanto à expressão de TGF- β , p53 e Bcl-2. Desta forma, é possível concluir que a LBI foi capaz de aumentar o metabolismo mitocondrial das SCAPs, bem como pode estar associada à modulação da proliferação destas células, sem envolvimento de aceleração do ciclo celular. Além disso, a irradiação não resulta em nenhum dano às funções vitais de proliferação celular e apoptose.

INTRODUÇÃO

As propriedades do Laser (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), foram inicialmente descritas em 1960 [1]. Porém, o interesse de estudar a sua relação com tecidos biológicos surgiu após a evidência de que menores comprimentos de onda não causavam danos térmicos aos tecidos irradiados [2]. Este tipo de Laser foi denominado Laser de Baixa intensidade (LBI) e, posteriormente, passou a ser estudado em larga escala com finalidades terapêuticas, inclusive, na Odontologia [3].

A interação do LBI com os tecidos ocorre devido à presença de cromóforos no interior das células, estas estruturas são responsáveis pela absorção dos fótons pelos tecidos [4]. Os comprimentos de onda no espectro vermelho são absorvidos por cromóforos concentrados na membrana mitocondrial, principalmente pela CytC (Citocromo C oxidase), resultando em excitação de elétrons [5], e, conseqüentemente, em uma maior produção de ATP, de forma a acelerar o metabolismo celular em uma tentativa de retorno ao estado homeostático [6].

Diversos estudos evidenciaram a aplicação clínica do LBI na inflamação e regeneração tecidual. Desta forma, o uso do laser com finalidade terapêutica no tratamento da dor e da cicatrização tecidual tornou-se uma alternativa segura e cientificamente embasada. Em contrapartida, pouco se conhece quanto ao mecanismo de ação do LBI a nível biomolecular [3,7,8,9,10].

A engenharia tecidual utilizando células-tronco também vem avançando como possibilidade terapêutica no reparo tecidual. O caráter proliferativo e o amplo potencial de diferenciação destas células podem permitir uma vasta aplicabilidade [11]. As células isoladas de tecidos dentários apresentam-se como boas alternativas pela possibilidade de serem isoladas de indivíduos adultos e pelas propriedades de diferenciação em tecidos de diversas origens, incluindo tecidos mineralizados [12,13].

Destacam-se as células isoladas da região apical na fase de desenvolvimento da polpa dentária, denominadas células-tronco da papila apical (SCAPs, do inglês, *Stem Cells from Apical Papilla*). As SCAPs possuem alto índice de proliferação celular comparada a outras células isoladas de tecidos dentários, além da capacidade de diferenciação em tecido mineralizado semelhante à dentina [14,15,16]. Diferente das demais células isoladas do órgão dentário, as SCAPs

possuem expressão reduzida de Stro-1 e maior expressão de marcadores neuronais como o CD90 e p75, mesmo na ausência de estímulos neurogênicos. Este fato reforça a hipótese de origem ectomesenquimal para este tipo de célula-tronco [15, 17].

Visando uma otimização quanto ao tempo de proliferação e diferenciação das células-tronco, vários pesquisadores iniciaram estudos utilizando o LBI e células-tronco mesenquimais [18]. Foi demonstrado que a irradiação de células-tronco mesenquimais com LBI em comprimentos de onda de espectro vermelho resultou em efeitos positivos na viabilidade e proliferação celular [19]. Acredita-se que a interação da luz com as células interfira diretamente na regulação de funções celulares vitais, estimulando a produção de proteínas como a Ciclina D1 e de fatores tróficos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento neural (NGF) [20,21].

Outros estudos experimentais demonstraram os efeitos da irradiação com LBI vermelho na proliferação de diferentes tipos células-tronco de origem mesenquimal [18]. Efeitos positivos foram observados na proliferação de células originadas da medula óssea [21], bem como, em células de origem adiposa [22] e periodontal [23]. Em contrapartida, a atuação do LBI na proliferação de células isoladas da polpa dentária demonstra resultados variáveis [23, 24].

Apesar dos avanços, não se sabe exatamente qual o mecanismo de ação do LBI na fisiologia das células-tronco. Além do mais, não há evidências na literatura sobre o efeito do LBI em SCAPs. Baseado nisto, o objetivo deste trabalho consiste na análise do LBI na atividade biológica de SCAPs.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizadas células da papila apical humanas previamente caracterizadas, doadas pelo biorrepositório de células do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos/UFG. Todos os procedimentos antecedentes a estocagem das células seguiram os princípios éticos regidos pelo Código de Helsinque e foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa da UFG, aprovado sob o número CAAE: 44993015.8.0000.5083

Cultura Celular

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada a 5% de CO₂. Para cada garrafa, foram utilizados 10 ml de meio de cultura padrão composto por Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 (DMEM/F12), soro fetal bovino a 10%, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Para todos os experimentos, foram utilizadas apenas células entre a primeira e a quinta passagem.

Laserterapia De Baixa Intensidade

As células foram irradiadas, utilizando-se o laser semiconductor DUO MMOPTICS® (São Carlos, SP, Brasil) no comprimento de onda de 660 nm (InGaAlP), potência de 100mW, energia de 6J, tempo de irradiação de 60 segundos e dose de 200J/cm². A irradiação das células foi realizada em cabine de fluxo desprovida de luz, com o laser posicionado perpendicular às placas de cultivo celular e a distância entre a ponteira e as células foi de 0,5cm. As células foram depositadas em poços intercalados para evitar dispersão da luz.

Imunofluorescência

Foram utilizadas placas petri 35mm (Thermo Scientific®- 130180), sendo a densidade de células de 5x10⁵ por poço. Para aplicação do LBI, cada poço foi posicionado sobre um molde que seccionou o poço em pequenos quadrados, delimitando cada 1cm² da área total. O laser vermelho foi aplicado no ponto central de cada quadrado, desta forma, toda a superfície do poço foi irradiada uma única vez. Para fixação das células à placa, foi utilizada solução de paraformaldeído 4%. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência e as imagens foram adquiridas e editadas com o auxílio do software LAS AF 4.1 (Leica®). As imagens foram analisadas de forma qualitativa, de acordo com a intensidade de marcação em cada grupo.

Utilizou-se Mitotraker Red (Molecular Probes®, MP-07512, Invitrogen®) na concentração de 100mM. Este fluorocromo de coloração vermelha, permeabiliza a célula e, por meio de um radical clorometilo, fixa-se na superfície de mitocôndrias

ativas. Quanto maior o metabolismo mitocondrial, maior a fixação do fluorocromo a sua superfície.

Foram analisados quatro grupos distintos de células. O grupo CNM foi usado como parâmetro da fluorescência natural de cada célula. O grupo CNT representa a atividade mitocondrial da célula sem tratamento e serviu como parâmetro de comparação com os grupos tratados. O grupo 6JT0 e 6J24h representaram os grupos tratados, por meio dos quais pode-se observar a resposta mitocondrial imediata e após 24h das células irradiadas

Imunocitoquímica

Para cada anticorpo empregado, foram analisados dois grupos distintos de células: um não irradiado (CNT) e outro irradiado (G6J). Para cada grupo, foram fotografados 3 campos. Com o auxílio da ferramenta cell counter do software Image J[®], as células foram quantificadas em dois tipos distintos: tipo 1- negativas ou tipo 2- positivas. O percentual de imunoreatividade de cada grupo foi calculado por meio do somatório de células positivas em todos os campos, dividido pelo número total de células quantificadas nos mesmos campos.

Para realização da técnica, utilizou-se lamínulas circulares (13mm, Glasscyto[®]) posicionadas em placas de 12 poços(Falcon[®], 35-3504). A densidade de células utilizada foi de 1×10^5 células por poço. O tempo estabelecido para completa adesão celular foi de 24h. Após este período, as células foram irradiadas e incubadas por mais 24h, seguindo-se então pra a reação de imunocitoquímica. Utilizou-se acetona P.A. para fixação das células à lamínula. As células fixadas foram mantidas sob refrigeração durante todo o procedimento. Foram utilizados os marcadores Ki-67, p53, Bcl-2, Ciclina B1, TGF- β 2 e TGF- β 3 de acordo com as especificações expostas no Quadro 1. O tempo de exposição ao anticorpo primário foi de 2h, seguido de 30 min de incubação em anticorpo secundário biotinilado (LSAB[®]) e 30 min em solução estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB[®]). Após a montagem em lamínulas, foi realizada leitura em microscópio óptico.

Progressão Do Ciclo Celular

As células foram dispostas em placas de seis poços (EasyPath[®], EP-5125241), sendo que apenas três poços por placas foram preenchidos, de forma intercalada, para evitar dispersão da luz durante a irradiação. Foram analisados três grupos distintos. O grupo CNM foi utilizado como parâmetro da fluorescência natural de cada célula e não foi realizada a marcação com o fluorocromo, nem irradiação com laser. O grupo CNT representou a progressão do ciclo celular das células sem irradiação, porém marcadas com o fluorocromo, sendo o parâmetro de comparação com o grupo tratado. O Glr foi irradiado com laser vermelho e marcado com fluorocromo.

Antes de iniciar o experimento, as células foram submetidas a 12h de Starving, sendo privadas de SFB com o intuito de homogeneizar e padronizar a fase do ciclo celular de todos os grupos. Foi analisada a progressão do ciclo celular com 8h de incubação, o fluorocromo utilizado para a marcação foi uma solução contendo solução de RNase (200µg/ml) e Iodeto de Propídeo (50µl/ml). A leitura foi realizada por meio da Citometria de fluxo, onde ocorreu a distinção de qual fase do ciclo celular cada célula se encontrava.

Análise Estatística

A análise estatística foi empregada para os dados obtidos no ensaio da imunocitoquímica e no ensaio de análise de progressão do ciclo celular. Inicialmente foi realizada a análise descritiva com obtenção de mediana e desvio padrão de todos os grupos estudados. A normalidade de distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de *Kolmogov-Sminorv*. A distribuição dos dados **apenas** permitiu análise por meio de testes não paramétricos. Desta forma, para verificar se houve diferença estatística na imunoreatividade ao Ki-67 e à Ciclina B1, entre os grupos de células irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e para verificar se houve diferença estatística entre a progressão do ciclo celular dos grupos irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste T não paramétrico. Em ambos os casos, foi adotada significância de 5%.

RESULTADOS

LBI e Atividade mitocondrial das SCAPs

O aumento da atividade mitocondrial, evidenciado pela intensidade de fluorescência, foi evidente desde o momento imediato da irradiação, sendo este aumento metabólico ainda maior após 24h de exposição ao LBI (Figura 1).

LBI na proliferação de SCAPs

As células irradiadas com LBI vermelho apresentaram maior imunopositividade ao Ki-67 e a Ciclina B1, como elucidado nas Figuras 2 e 3. As medianas dos percentuais de imunexpressão também foram superiores nos grupos irradiados para ambos os marcadores (Figura 1). Porém, em ambos os casos, não houve significância estatística quando comparadas aos grupos controle.

Não houve diferença quanto à expressão de TGF- β , tanto as células irradiadas quanto as não irradiadas, obtiveram 100% de imunopositividade. Da mesma forma, também não foi obtida diferença quanto à imunexpressão do p53 e Bcl-2 nos grupos irradiados e não irradiados, sendo 100% das células imunonegativas em ambos os grupos.

A progressão do ciclo celular não parece ser alterada em SCAPs irradiadas quando comparadas ao grupo controle. A análise de fluorescência, por meio da citometria de fluxo, demonstrou que a progressão do ciclo se deu na mesma cronologia para ambos os grupos (Figura 5).

DISCUSSÃO

O aumento da atividade mitocondrial e as maiores medianas de imunopositividade apresentadas pelos marcadores de proliferação sugerem a possibilidade de alteração do metabolismo celular pela absorção da luz vermelha, porém essas alterações foram insuficientes para ocasionar diferenças na progressão do ciclo celular quando comparadas as SCAPs não irradiadas. Estes achados também foram observados em células-tronco da polpa dental [24]. Em contrapartida, Eduardo et al [25] demonstraram efeitos positivos da irradiação com LBI na

proliferação de células-tronco da polpa dental, fato que também foi observado em células isoladas do ligamento periodontal [26]. Além disso, a utilização do LBI em outras células-tronco mesenquimais isoladas de outros tecidos, também demonstrou influenciar a proliferação celular de células indiferenciadas [20,23,27].

A irradiação de SCAPs demonstrou influenciar positivamente a atividade metabólica mitocondrial. Com base nos resultados expostos neste trabalho, o aumento da intensidade de fluorescência foi perceptível desde o momento imediato após a aplicação do LBI, fato que corrobora com a afirmação de Karu e Kolyacov [28] de que a mitocôndria representa a via primária da fotobiomodulação promovida pelo LBI. De maneira geral, o mecanismo de ação do LBI na proliferação celular se dá pelo acúmulo energético provocado pela luz no interior da célula [5]. A enzima Citocromo C Oxidase (CytC), encontrada nas mitocôndrias, representa a primeira via de absorção intracelular da luz vermelha. Este processo resulta em alteração do transporte transmembrana dos elétrons e em consequente aumento do metabolismo mitocondrial [28].

O aumento metabólico mitocondrial resulta diretamente em aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP). Esta molécula desempenha um importante papel no transporte de íons como o Ca^{2+} , além de regular os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), ambos desempenham função de mensageiros secundários em diversas funções vitais da célula, inclusive na expressão gênica. Um dos possíveis efeitos resultantes destas cascatas de reações intracelulares desencadeadas pelo LBI é a proliferação celular [6,28].

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que os grupos de SCAPs irradiadas com LBI apresentaram aumento na mediana dos percentuais de imunopositividade ao marcador anti-Ki-67, quando comparadas às não irradiadas ($p=0,08$). Recentemente, foi elucidado que a Ki-67, proteína utilizada na imunomarcagem de células proliferativas, está intimamente relacionada à compartimentalização de estruturas nucleares durante a divisão celular, desempenhando um papel de surfactante de superfície [29]. Desta forma, o aumento da expressão da Ki-67 está diretamente relacionado com o avanço da progressão do ciclo celular para a mitose.

A associação do aumento das medianas de imunopositividade ao ki-67 à maior intensidade metabólica mitocondrial pode sugerir que a irradiação com luz vermelha pode estimular a proliferação das SCAPs. Pereira et al [24] também

observaram aumento das medianas de proliferação em células tronco da polpa dentária irradiadas, no entanto, os autores também não obtiveram significância estatística quando comparadas aos grupos controle, semelhante ao encontrado neste estudo. Estes resultados podem ser justificados pois em ambos os casos, foram utilizadas linhagens isoladas de pacientes distintos, o que pode resultar em maior variação da resposta metabólica das células frente à irradiação.

Com relação ao efeito direto da LBI no ciclo celular, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a mediana dos percentuais de imunopositividade ao anti-Ciclina B1 foram superiores em SCAPs após irradiação com o laser vermelho ($p=0,3$). Tsi et al [30] também relataram aumento na expressão de Ciclina B1 em tenócitos após irradiação com LBI. Esta proteína desempenha função na regulação do ciclo celular durante a transição entre as fases G2/M [31]. Porém, o aumento da imunopositividade à Ciclina B1 não foi significativo, fato que também pode ser observado na análise da progressão do ciclo celular, em que os percentuais representativos das células na fase G2 do ciclo celular foram os mesmos para os grupos irradiados e controle ($p= 0,99$).

Em um estudo realizado por Zaccara et al [32], foi demonstrado que a irradiação de células-tronco da polpa dentária com o LBI resultou em significativo aumento da proliferação celular, sem que houvesse alterações na cronologia do ciclo celular, no tempo de 24h pós-irradiação. Isto pode indicar que apesar dos estímulos imediatos provocados pela absorção da luz nas células-tronco, é possível que as respostas biológicas sejam provenientes de uma biomodulação e possam apresentar-se de forma mais tardia às alterações metabólicas.

Em divergência a estes resultados, Cavalcanti et al [19] demonstraram que o LBI influenciou positivamente na velocidade de progressão do ciclo celular em células-tronco isoladas da medula óssea. Os autores observaram ainda, que doses mais altas do laser, resultavam em maiores percentuais de células nas fases G2/M, comparadas a células não irradiadas. Porém, as células isoladas da medula óssea possuíam naturezas distintas, tendo em vista que as SCAPs representam células isoladas ainda durante o desenvolvimento do órgão dentário, desta forma, apresentam um potencial proliferativo muito elevado [11,15,16,33]. Tal fato pode ter influência direta sobre a menor amplitude do efeito do LBI nestas células.

A imunoreatividade foi observada no tempo de 24h após a irradiação das SCAPS, para ambos os marcadores. As imagens de fluorescência obtidas por meio

da marcação com Mitotraker Red demonstraram maior intensidade no metabolismo mitocondrial também após 24h da aplicação do LBI. Sendo assim, é possível que a maior expressão das proteínas esteja diretamente ligada ao aumento da atividade mitocondrial intracelular nos grupos tratados com laser, mesmo que a amplitude desta atividade não tenha sido suficiente para alterar a progressão do ciclo celular.

Além de não ter sido observada diferenças quanto à imunoexpressão do TGF- β , também não foram constatadas alterações nos percentuais de imunoexpressão da p53, proteína reguladora da proliferação celular [34] e da Bcl-2, proteína reguladora da apoptose [35], nas SCAPs irradiadas com luz vermelha. Desta forma, é possível ponderar que a irradiação destas células por meio do LBI não provoca desregulação em suas funções vitais, proliferação e apoptose.

CONCLUSÃO

A LBI foi capaz de aumentar o metabolismo mitocondrial das células-tronco isoladas da papila e pode estar associada positivamente à proliferação destas células, mesmo na ausência de alterações na cronologia da progressão do ciclo celular. Além disso, irradiação das SCAPs não resultou em nenhum dano às funções vitais de proliferação celular e apoptose.

REFERÊNCIAS

1. Maiman TH. (1960) Stimulated optical radiation in Ruby. **Nature**;187:493-9.
2. Mester E, Szende B, Tora JG (1967). Effect of laser on hair growth of mice. **Kiserl Orvostud** ; 19:628-31.
3. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK (2012). Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. **Natl J Maxillofac Surg**;3(2):124-32
4. Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light(2002). **Photochem Photobiol** ; 76(2):164-70.
5. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K,Lanzafame RJ(1997). Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria, **Photochem Photobiol** ;66(6): 866-71.
6. Passarella S. He-Ne laser irradiation of isolated mitochondria(1989). **J Photochem Photobiol** ; 3(4): 642-3.
7. Ren C, McGrath C, Yang Y (2015). The effectiveness of low-level diode laser therapy on orthodontic pain management: a systematic review and meta-analysis. **Lasers Med Sci**; 30(7):1881-93
8. Yang H, Wu Y, Ma H¹, Jiang L, Zeng X, Dan H, Zhou Y, Chen Q. (2016). Possible alternative therapies for oral lichen planus cases refractory to steroid therapies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.**; (5):496-509

9. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE (2016). Could the biological robustness of lowlevel lasertherapy (Photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. **Oral Oncol**; 54:7-14.
10. Arany PR. Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy: New Insights and Current Challenges. **J Dent. Res.**; 95(5): 1-5.
11. Mayo, M ; Sawatari, Y.; Charles Huang, C. ; Garcia-Godoy, F (2014). Neural crest-derived dental stem cells—Where we are and where we are going. **J. Dent.**; 42:1043-51.
12. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K (2012). Stem cells in dentistry--part I: stem cell sources. **J Prosthodont Res.** 56(3):151-65.
13. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K (2012). Stem cells in dentistry--part II: clinical applications. **J Prosthodont Res.** 56(4):229-48.
14. Sonoyama, W, Liu, Y, Fang, D et al(2006). Mesenchymal stem cell-mediated functionaltooth regeneration in swine. **PLoS ONE** ; 1: 79.
15. Sonoyama, W , Liu, Y, Takayoshi,Y, et al (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **J. Endod.**; 34:166–171.
16. Bakopolou, A.; Leyhausen , G.; Volk J.; Tsiftoglou, A. et al (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). **Arch. Oral. Biol.**;56:709-721.
17. Abe, S.; Yamaguchi, S.; Amaga, T (2007).Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature **Apex. Oral Sci. Int.**; 4:45-48.
18. Ginani, F, Soares, DM, Barreto, MP, Barboza, CA (2015). Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review . **Lasers Med Sci**; 30: 2189-94 .
19. Cavalcanti, M, Durvanei, A, Isla, N et al (2015). Evaluation of the proliferative effects induced by low-level laser therapy in bone marrow stem cell culture. **Photomed. Laser. Surg.**; 33:1-7.
20. Hou, JF, Zhang,H, Yuan,X, et al (2008). In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers. Surg. Med.** 40:726–733.
21. Wu, Jw. et al (2012) Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. **Lasers Med. Sci.**, 27:509-519.
22. Chen K, Xiong H, Huang Y, Liu C.(2013). Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Arch. Oral. Biol.**, 58:997 –1006
23. Lipovsky A et al. (2013) Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymalstem cells. **Lasers Med Sci** 28:1113-1117.
24. Pereira LO, Longo JPF, Azevedo RB (2012) Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. **Arch Oral Biol** 57(8):1079-1085
25. Eduardo FP et al (2008). Stem cell proliferation under low- intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med** 40:433-438
26. Soares DM, Ginani F, Henriques AH, Barboza CAG (2013) Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. **Lasers Med Sci.** 30:1171-4
27. De Villiers JA, Houreld NN, Abrahamse H (2011) 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** 7:869-882.
28. Karu TI, Kolyakov SF(2005). Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed Laser Surg.** ;23(4):355–61.
 29. Cuylen S et al (2016) Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature.** 535: 308–312
 30. Tsi WC et al(2014). Low-level laser irradiation stimulates tenocyte proliferation in association with increased NO synthesis and upregulation of PCNA and cyclins. **Lasers Med Sci.** 29:1377–1384.
 31. Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M, Hunt T (1989) The role of cyclin synthesis, modification and destruction in the control of cell division. **J Cell Sci Suppl** 12:77–97.
 32. Zaccara, I.M. et al.(2015). Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers Med Sci**, v15:1803-9.
 33. Ruparel NB et al (2013). Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. **J Endod.** 39:357-63.
 34. Vousden, K.H., and Ryan, K.M. (2009). p53 and metabolism. **Nat. Rev. Cancer.** 9: 691–700.
 35. Vaux DL, Cory S, Adams JM(1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature.** ;335:440–442

Quadro 1. Especificações dos anticorpos utilizados na reação de imunocitoquímica.

Anticorpo	Especificações	Diluição	Sistema	DAB
Ki-67	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Ki-67 humano , MIB1 Dako (NCL-Ki-67-MIB1)	1:100	LSAB	5min
Ciclina B1	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti Ciclina B1 humana, clone 7A9 Novocastra (NCL- Cyclin B1)	1:40	LSAB	7min
TGF- β 2	Anticorpo policlonal de coelho, anti TGF β -2 humano, Santa Cruz (SC-90)	1:100	LSAB	5min
TGF- β 3	Anticorpo policlonal de coelho, anti TGF β -3 humano, Santa Cruz (SC-83)	1:50	LSAB	5min
p53	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-p53 humano, clone DO-7, Dako (NCL-p53-DO-7)	1:200	LSAB	5min
Bcl-2	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Bcl-2 humano , especificação 124, Dako (NCL-Bc-l2-124)	1:100	LSAB	5min

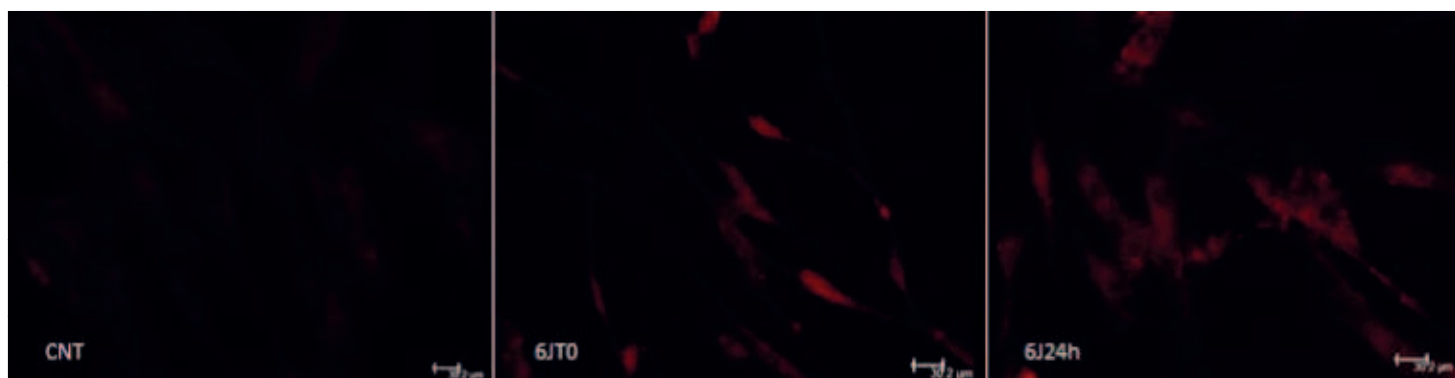


Fig 1. Atividade mitocondrial antes da irradiação, imediatamente após a irradiação e 24 após irradiação com LBI.

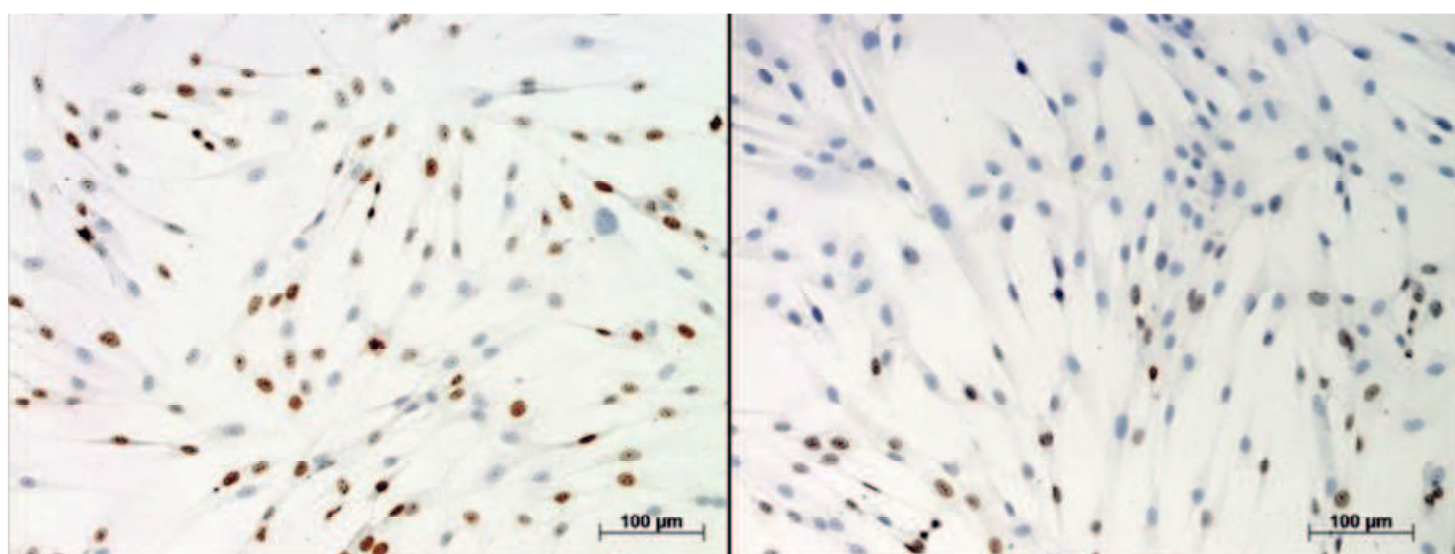


Fig. 2 À esquerda, imunoexpressão do Ki-67 no grupo G6J. À direita, imunoexpressão do Ki-67 no grupo CNT

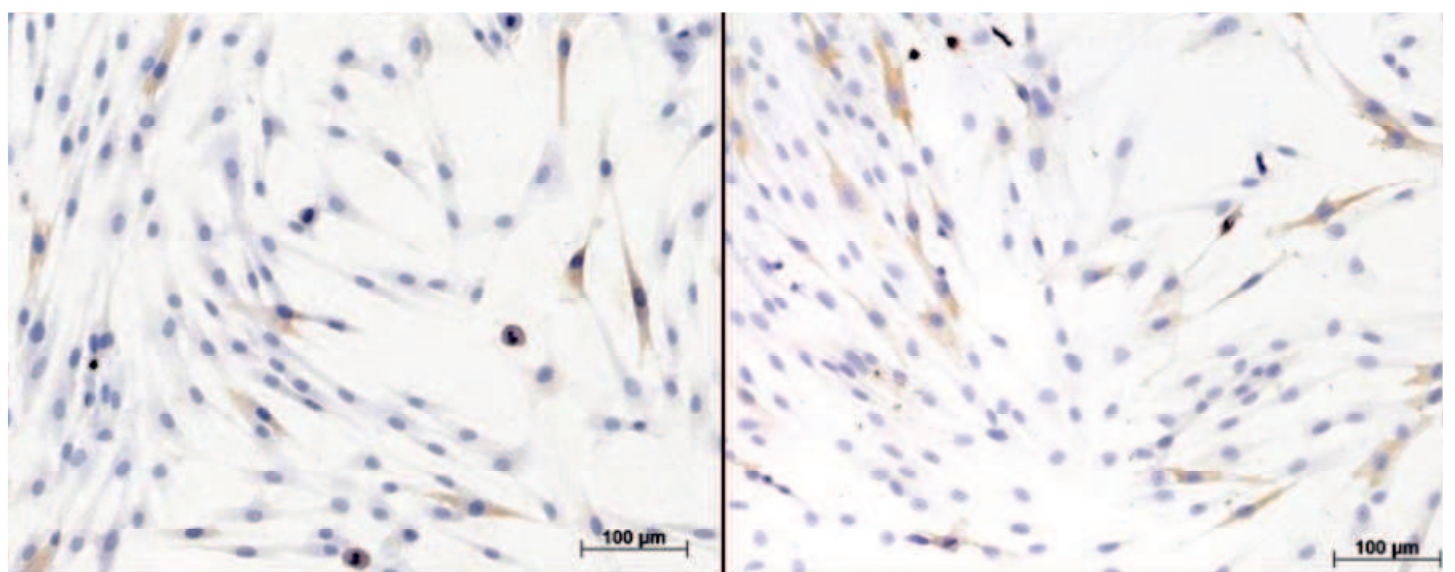


Fig. 3 À esquerda, imunoexpressão da Ciclina B1 no grupo CNT. À direita, imunoexpressão da Ciclina B1 no grupo G6J.

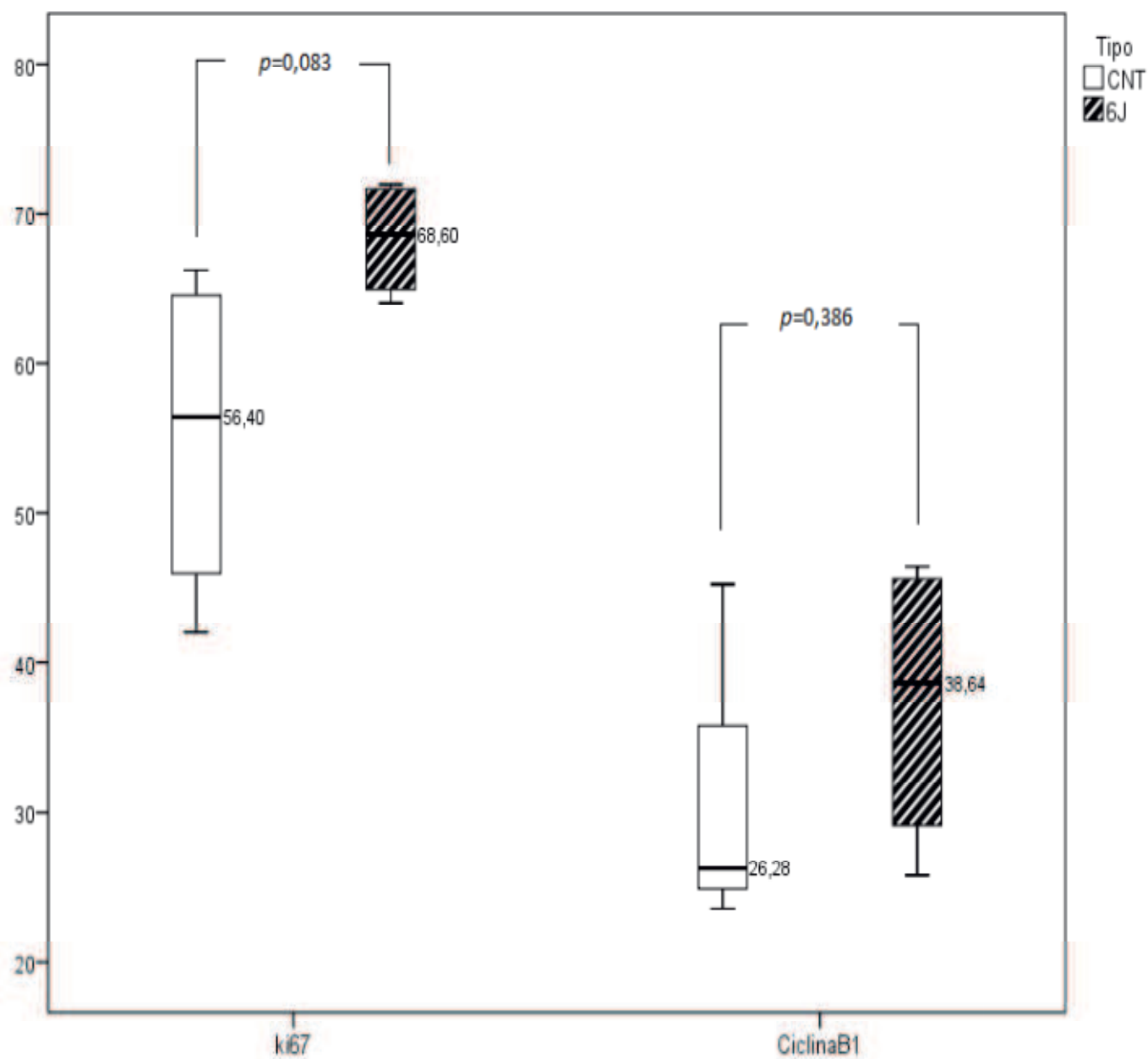


Fig. 4 Distribuição dos percentuais de imunopositividade ao Ki-67 e à Ciclina B1 de acordo com os grupos de intervenção.

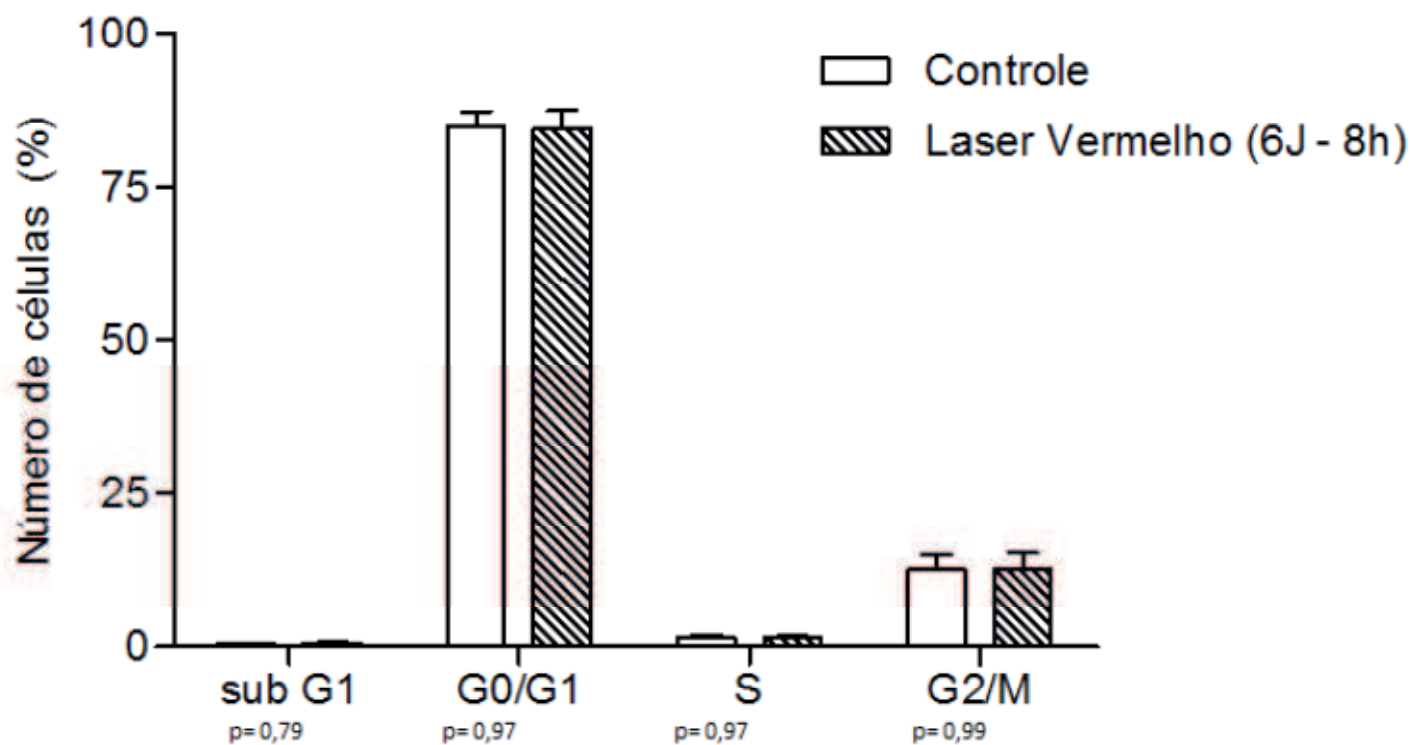


Fig. 5 Distribuição dos percentuais de células de acordo com a fase do ciclo celular nos grupos irradiados e não irradiados.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A irradiação de células-tronco da papila apical humana com laser de baixa intensidade no espectro vermelho resulta em aumento do metabolismo mitocondrial imediato. A influência da luz sobre a maior atividade energética intracelular persiste em maior intensidade após 24h. Este fenômeno pode estar relacionado à maior imunexpressão da proteína envolvida na proliferação celular pelas SCAPs irradiadas. Porém, a diferença de expressão desta proteína não está associada a um aumento na velocidade da progressão do ciclo celular. Além disso, a interação da luz vermelha com as células não resultou em nenhum dano à regulação das atividades vitais e sobrevivência celular, como proliferação e apoptose.

O alto potencial proliferativo apresentado pelas SCAPs cultivadas em condições padrão e na ausência de outros estímulos externos pode estar diretamente relacionado à menor amplitude de efeitos resultantes da irradiação com LBI neste tipo de célula-tronco. A caracterização do processo proliferativo das SCAPs ainda não foi completamente elucidada, desta forma, é necessária uma maior investigação a respeito das características fisiológicas destas células, bem como dos verdadeiros potenciais de proliferação e diferenciação, com o intuito de amplificar e direcionar a sua aplicabilidade às terapias de regeneração tecidual.

REFERÊNCIAS

ABE, S.; YAMAGUCHI, S.; AMAGA, T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature. **Apex. Oral Sci. Int.**, v.4, p. 45-48, 2007.

BAKOPOLOU, A. et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). **Arch. Oral. Biol.**, v.56, p.709-721, 2011.

CAVALCANTI, M. et al. Evaluation of the proliferative effects induced by low-level laser therapy in bone marrow stem cell culture. **Photomed. Laser. Surg.**, v. 33, p. 1-7, 2015.

CHEN, Y.J.et al. The effects of acellular amniotic membrane matrix on osteogenic differentiation and ERK1/2 signaling in human dental apical papilla cells. **Biomaterials**, v.33, p.455-463, 2012.

CHEN, G.et al. Comparison of the odontogenic differentiation potential of dental follicle, dental papilla, and cranial neural crest cells. **J. Endod.**, v.41, p.1091-99, 2015.

CHEN K, XIONG H, HUANG Y, LIU C. Comparative analysis of in vitro periodontal characteristics of stem cells from apical papilla (SCAP) and periodontal ligament stem cells (PDLSCs). **Arch. Oral. Biol.**, v.58, p.997 –1006, 2013.

FRIEDENSTEIN, A.; KURALESOVA, A.I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. **Transplant.** v.12, p.99–108, 1971.

GOVINDASAMY V. et al. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. **J. Dent. Res.** v.90, p. 646–5, 2011.

GINANI, F. et al.. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review . **Lasers Med Sci**, v.30, p.2189-94, 2015.

GOSAU, M. et al. Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. **Arch. Oral. Biol.**, v.58, p.699-706, 2013.

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

KARU, T. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **J Photochem Photobiol B** v.3, p.638–640, 1989.

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

IBARRETXE, G. et al. Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. **Stem Cells Int.** p.1-12, 2012.

KOUSSOULAKOU, D.S.; MARGARITI, L.H.; KOUSSOULAKOU, S.L. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. **Int. J. Biol. Sci.**, v.5, p. 226-243, 2009.

MAYO, M ; SAWATARI, Y.; CHARLES HUANG, C. ; GARCIA-GODOY, F. Neural crest-derived dental stem cells—Where we are and where we are going. **J. Dent.** v.42, p.1043-51; 2014.

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

MORSCZECK, C. et al. Isolation of precursor cells (pcs) from human dental follicle of wisdom teeth. **Matrix Biol** v.24, p.155-165, 2005.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. **Stem Cells** v.25, p.2896–2902, 2007.

PITTINGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143–7, 1999.

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

SONOYAMA, W. et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PLoS ONE** v.1, p.79, 2006.

SONOYAMA, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **J. Endod.**, v.34, p.166–171, 2008.

WU, J. W. et al. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. **Lasers Med. Sci.**, v.27, p.509-519, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [NEWS AND SOCIETIES](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#)

[INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

Original Article – limited to 4000 words, 45 references, no more than 5 figures

Review Article – limited to 5000 words, 50 references, no more than 5 figures

Brief Report - limited to 2000 words, 25 references, no more than 4 figures - Case Reports will not be accepted!

Letter to the Editor – up to 600 words

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published

16/07/2016

Lasers in Medical Science – incl. option to publish open access

elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

Units and abbreviations

Please adhere to internationally agreed standards such as those adopted by the commission of the International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP) or defined by the International Organization of Standardization (ISO). Metric SI units should be used throughout except where non-SI units are more common [e.g. litre (l) for volume].

Abbreviations (not standardized) should be defined at first mention in the abstract and again in the main body of the text and used consistently thereafter.

Drugs

When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in Materials and methods.

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long

author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

• Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

• Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

• Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230–257

• Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

• Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

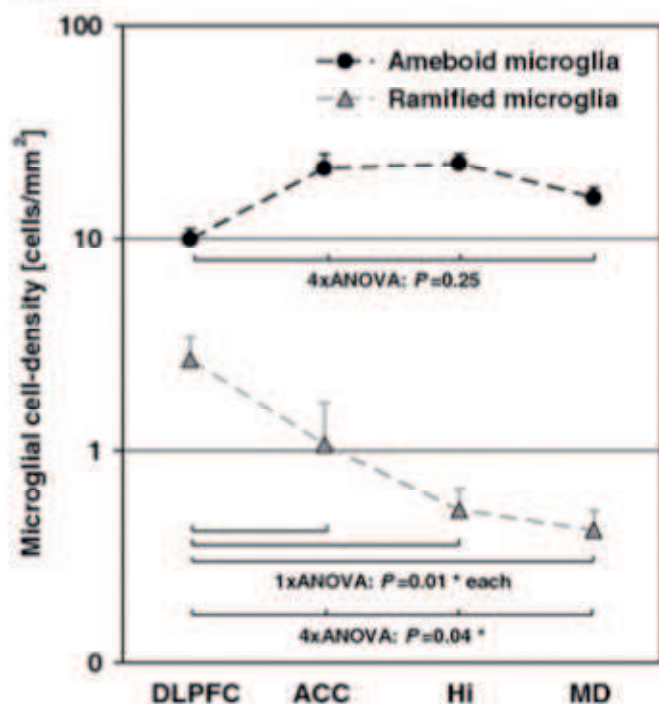
ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



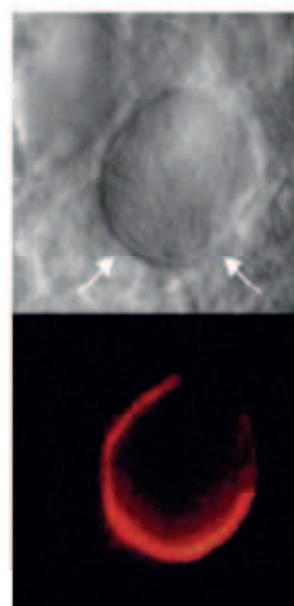
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

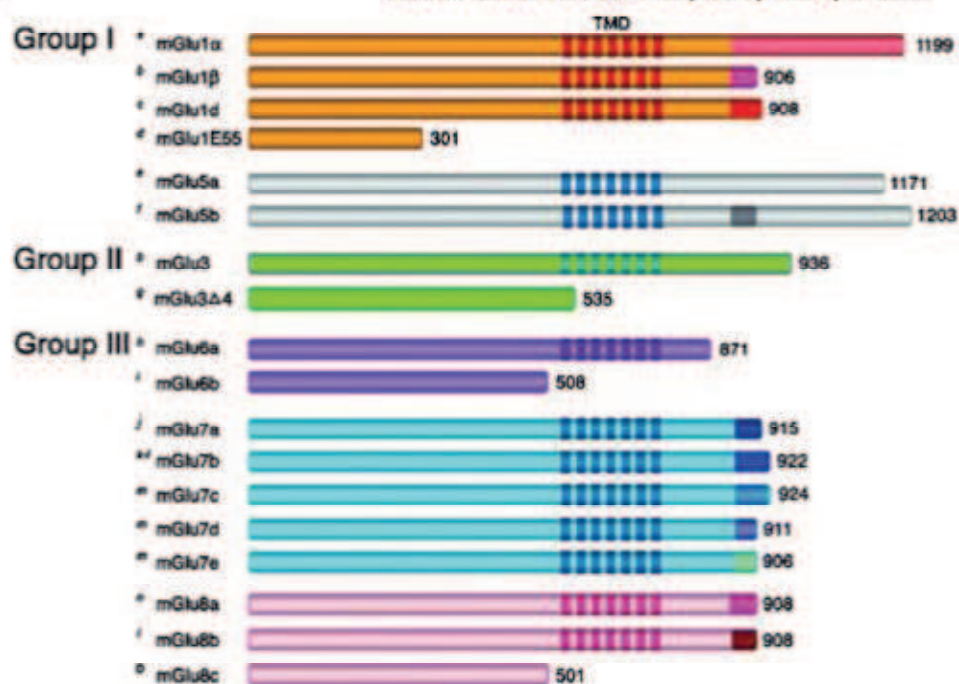
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art

05/07/2016

Lasers in Medical Science – incl. option to publish open access



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ▶ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ▶ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ▶ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ▶ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ▶ Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ▶ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure

depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

05/07/2016

Lasers in Medical Science – incl. option to publish open access

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific

endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before the work is submitted**.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms

can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

For retrospective studies, please add the following sentence:

"For this type of study formal consent is not required."

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted."

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

"This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

"Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

05/07/2016

Lasers in Medical Science – incl. option to publish open access

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proofreading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)

ANEXO B

Elisandra Gouveia de Castro - Pesquisador | V3.0
Sua sessão expira em: 33min 53

Cadastros

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

← DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PAPEL DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EM CÉLULAS-TRONCO DA PAPILA APICAL DENTARIA
Pesquisador Responsável: Larissa Matuda Macedo
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 44993015.8.0000.5083
Submetido em: 27/08/2015
Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biológicas
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Receção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_464978

← DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- ✦ Versão em Tramitação (E1) - Versão 3
 - ✦ Emenda (E1) - Versão 3
 - ✦ Currículo dos Assistentes
 - ✦ Documentos do Projeto
 - ✦ Folha de Rosto - Submissão 1
 - ✦ Outros - Submissão 1
 - ✦ Projeto Detalhado / Brochura Investigativa
 - ✦ TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa
 - ✦ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
 - ✦ Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

← LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

Apreciação ¹	Pesquisador Responsável ²	Versão ³	Submissão ⁴	Modificação ⁵	Situação ⁶	Exclusiva do Centro Coord. ⁷	Ações
E1	Larissa Matuda Macedo	3			Em Edição		
PO	Larissa Matuda Macedo	2	27/08/2015	18/08/2015	Aprovado	Não	

← HISTÓRICO DE TRÂMITES

Apreciação	Data/Hora	Tipo Trâmite	Versão	Perfil	Origem	Destino	Informações
PO	18/09/2015 12:15:07	Parecer liberado	2	Coordenador	Universidade Federal de Goiás - UFG	PESQUISADOR	
PO	18/08/2015 12:12:27	Parecer do colegiado emitido	2	Coordenador	Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	17/05/2015 15:24:34	Parecer do relator emitido			Universidade Federal de Goiás - UFG		
PO	14/05/2015 15:05:28	Aceitação de Elaboração de Relatoria			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	03/07/2015 10:33:58	Confirmação de Indicação de Relatoria			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	03/07/2015 10:30:19	Indicação de Relatoria			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	29/06/2015 15:57:03	Aceitação do PP			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	27/06/2015 13:15:03	Submetido para avaliação do CEP		Pesquisador Principal	PESQUISADOR RESPONSÁVEL	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	28/05/2015 08:53:15	Parecer liberado			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	
PO	20/05/2015 08:52:15	Parecer do colegiado emitido			Universidade Federal de Goiás - UFG	Universidade Federal de Goiás - UFG	

« « « « « **Página 1 a 18 de 18 registros** » » » » »