

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica

Karla Andressa Ruiz Lopes

Isolamento, caracterização e biomodulação com laser de baixa intensidade em
cultura de neoplastos isolados de *Girardia tigrina*

São José dos Campos, SP
2016

Karla Andressa Ruiz Lopes

Isolamento, caracterização e biomodulação com laser de baixa intensidade em cultura de neoplastos isolados de *Girardia tigrina*

Tese de doutorado defendida no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco-Soares

Co-orientadora: Profa. Dra. Nádia M. R. de Campos Velho

São José dos Campos, SP
2016

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Lopes, Karla Andressa Ruiz

Isolamento, caracterização e biomodulação com laser de baixa intensidade em cultura de neoplastos isolados de *Girardia tigrina* / Karla Andressa Ruiz Lopes; orientadora, Cristina Pacheco-Soares; co-orientadora Nádia Maria Rodrigues de Campos-Velho. - São José dos Campos, SP, 2016.

1 CD-ROM, 58 p.

Tese (Doutorado) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Terapia Laser de Baixa Intensidade. 3. Planárias. 4. Células-tronco. I. Pacheco-Soares, Cristina, orient. II. Campos-Velho, Nádia Maria Rodrigues de, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Karla Andressa Ruiz Lopes, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 24 de Novembro de 2016.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 15 / 12 / 2016

KARLA ANDRESSA RUIZ LOPES

**“ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E BIOMODULAÇÃO COM
LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CULTURA DE NEOBLASTOS
ISOLADOS DE *Girardia tigrina*.”**

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a **RENATA AMADEI NICOLAU** _____

Prof.^a Dr.^a **CRISTINA PACHECO SOARES** _____

Prof.^a Dr.^a **NÁDIA MARIA RODRIGUES DE CAMPOS VELHO** _____

Prof. Dr. **LUIZ ALBERTO VIEIRA DIAS (ITA)** _____

Prof.^a Dr.^a **TATIANA DE SOUSA DA CUNHA UCHIYAMA (Unifesp)** _____

Prof. Dr. Leandro José Raniero

Diretor do IP&D – Univap

São José dos Campos, 15 de Dezembro de 2016.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Manoel Carlos (*in memoriam*) e à minha mãe Marisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me oportunizou nessa jornada o amparo necessário para superação dos obstáculos da vida.

A minha mãe que esteve ao meu lado incansável, com seu amor incondicional e companheirismo em todos os momentos. O seu célebre pensamento: Sempre em frente, sem desânimo!

A Univap que proporcionou meu aprendizado. A FVE que me concedeu uma bolsa para a realização deste doutorado.

A Coordenadora do Programa de Doutorado em Engenharia Biomédica Profa. Dra. Lúcia Vieira pela atenção, disponibilidade e incentivo para o término de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

A minha orientadora Profa. Dra. Cristina Pacheco.

A minha eterna orientadora e grande amiga Profa. Dra. Nádia de Campos Velho por acompanhar a minha trajetória desde o início da vida acadêmica. Nossa amizade já tem 23 primaveras e quantas conquistas!

A minha amiga Profa. Dra. Flávia Vilaça Morais por comemorarmos as vitórias e as conversas que tantas vezes me acalmaram.

A Priscila Leite da Central de Laboratórios Multiusuários por sua disponibilidade, atenção e amizade.

A Rubia Gravito de Carvalho Gomes pela atenção, amizade e imprescindível ajuda na formatação do trabalho.

Aos colegas do Tudo Aqui da Univap pelo atendimento na pessoa da Sra. Diva Maris Borelli.

Aos amigos do Centro de Estudos da Natureza/Centro de Reabilitação de Animais Silvestres: Edvana, Thiago Lima, Toninho, Narciso, Caio, Marcellus e Maiara.

Aos amigos do Laboratório de Planárias: Roberta, Bárbara, Tabatha, Regiane, Matheus Salgado, Yasmim e Fernando.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” Chico Xavier

Isolamento, caracterização e biomodulação com laser de baixa intensidade em cultura de neoblastos isolados de *Girardia tigrina*

Resumo: Planárias pertencem ao filo Platyhelminthes, classe Turbellaria, Ordem Tricladida, são modelos bem estabelecidos de regeneração, consideradas excelente modelo *in vivo* para estudo da biologia de células tronco. A laserterapia de baixa intensidade (LLLT) tem papel importante na modulação celular e diferenciação, devido a essas características tal terapia é uma valiosa ferramenta para estudo de células tronco. Células-tronco têm apresentado aplicações importantes na engenharia de tecidos; entretanto é necessária uma melhor compreensão do comportamento dessas células após LLLT. Este estudo levanta a hipótese da ação da irradiação com laser de baixa intensidade na ativação ou inibição da diferenciação em neoblastos de *Girardia tigrina* e de humano, assim foram estabelecidos os seguintes objetivos: (a) obter cultura de neoblastos de *G. tigrina*; (b) realizar o fracionamento da cultura de células; (c) caracterizar os neoblastos e avaliar a fotobiomodulação e (d) comparar a ação do laser de baixa intensidade em neoblastos e em células-tronco humanas. Para obtenção de neoblastos, espécimes de *G. tigrina* foram desintegrados por digestão enzimática e isolados com centrifugação em gradiente de sacarose. Dois gradientes de neoblastos foram obtidos e irradiados com um laser diodo de 685 nm, com fluência de 1,2 J/cm² usando densidade de potência de 13 mW. Três irradiações foram realizadas com intervalos de 24 horas. Os neoblastos foram caracterizados pela marcação DAPI e Calceína AM para verificar a influência da ação do laser de baixa intensidade em neoblastos e nas células-tronco humanas (MEL-1). Para o cultivo das células MEL-1, cultura de células HFF-1, derivadas do tecido conjuntivo do prepúcio humano, foram utilizadas como uma monocamada alimentadora. As células MEL-1 foram irradiadas com InGaAlP 685 nm, potência de 30 mW e área de 0,5 cm² local. Os neoblastos foram irradiados com os mesmos parâmetros usados anteriormente. Foram realizadas três sessões de irradiação com intervalo de 24 horas cada. Para verificar a viabilidade celular optou-se pelo método de exclusão de azul de Trypan. Após a irradiação realizou-se a avaliação do potencial pluripotente da linhagem MEL-1 e dos neoblastos, por meio da marcação com anticorpo Oct-4 e Clone 9E 3.2. Os resultados indicaram que a desintegração na solução de tripsina e antibiótico foi eficiente na temperatura de 18°C, o meio IMDM suplementado com soro fetal bovino foi adequado para o estabelecimento de cultura primária de células. A irradiação favoreceu proliferação acentuada de neoblastos do grupo experimental quando comparado ao grupo controle. Os resultados também demonstraram o anticorpo Oct-4 é um bom marcador para neoblastos, evidenciando pluripotência conservada evolutivamente. A biomodulação resultou no aumento das populações de neoblastos e de outros tipos celulares. A LLLT favoreceu a proliferação e manutenção do estado indiferenciado dos neoblastos, e ainda, sugere a possível influência da irradiação de baixa intensidade na sinalização de células-tronco por meio de diferentes vias.

Palavras-chave: Terapia Laser de Baixa Intensidade; Planárias; Cultura Primária de Células; Células-tronco.

Isolation, characterization and biomodulation with low intensity laser in culture of neoblasts isolated from *Girardia tigrina*

Abstract: Planarians belong to the phylum Platyhelminthes, Turbellaria class, Tricladida order, are well established models of regeneration, considered excellent model *in vivo* for study of stem cell biology. Low intensity laser therapy (LLLT) plays an important role in cell modulation and differentiation, because of these characteristics such therapy is a valuable tool for stem cell study. Stem cells have presented important applications in tissue engineering however, a better understanding of the behavior of these cells after LLLT is necessary. This study raises the hypothesis of the action of low intensity laser irradiation on the activation or inhibition of differentiation in *Girardia tigrina* and human neoblast, thus the following objectives were established: (a) to obtain culture of *G. tigrina* neoblasts; (b) performing fractionation of the cell culture; (c) characterize the neoblast and evaluate the photobiomodulation and (d) compare the action of the low intensity laser in neoblast and human stem cells. To obtain neoblast, specimens of *G. tigrina* were disintegrated by enzymatic digestion and isolated with sucrose gradient centrifugation. Two gradients of neoblast were obtained and irradiated with a diode laser of 685 nm, with creep of 1.2 J/cm^2 using power density of 13 mW. Three irradiations were performed at 24 hour intervals. Neoblasts were characterized by the DAPI and Calcein AM marking to verify the influence of low intensity laser action on neoblast and human stem cells (MEL-1). For cultivation of MEL-1 cells, culture of HFF-1 cells, derived from the connective tissue of the human foreskin, were used as a feeder monolayer. MEL-1 cells were irradiated with 685nm InGaAlP, 30mW potency and 0.5cm^2 local area. The neoblasts were irradiated with the same parameters used previously. Three irradiation sessions were performed with each 24 hour interval. To verify cell viability, we opted for the Trypan blue exclusion method. After irradiation, the pluripotent potential of the MEL-1 and neoblast lineage was evaluated by means of Oct-4 and Clone 9E 3.2 antibody labeling. The results indicated that the disintegration in the trypsin and antibiotic solution was efficient at the temperature of 18°C , the IMDM medium supplemented with fetal bovine serum was suitable for the establishment of primary cell culture. The irradiation favored a marked proliferation of neoblasts of the experimental group when compared to the control group. The results also demonstrated that the antibody Oct-4 is a good marker for neoblasts, evidencing evolutionarily conserved pluripotency. Biomodulation resulted in increased populations of neoblasts and other cell types. LLLT favored the proliferation and maintenance of the undifferentiated state of the neoblasts, and also suggests the possible influence of low intensity irradiation on the signaling of stem cells through different pathways.

Keywords: Low-intensity laser therapy; Planaria; Primary Cell Culture; Stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição das potencialidades regenerativas no reino animal. Árvore filogenética de espécies que exibem um potencial regenerativo após a lesão.	16
Figura 2 - Exemplar de <i>Girardia tigrina</i>	19
Figura 3 - Dois grupos de vermes de corpo mole, os Platelminhos e os Acoelos.	20
Figura 4 - Características dos neoblastos.	21
Figura 6 - Fases do desenvolvimento humano e o respectivo tipo de célula-tronco.	26
Figura 6 - Gradientes formados em ambas metodologias de purificação.	42
Figura 7 - Modelo proposto dos efeitos da biomodulação com laser de baixa intensidade (LBI) sobre os neoblastos de <i>Girardia tigrina</i>	44

LISTA DE ABREVIACES

ADP – Adenosina difosfato
AMP cíclico – Adenosina monofosfato cíclico
AsGa – Arseneto de Gálio
AsGaAl – Arseneto de Gálio e Alumínio
ATP – Adenosina trifosfato
BMP – Proteínas morfogenéticas do osso
BSA – Albumina de soro bovino
CO₂ – Dióxido de carbono
CT – Célula-tronco
CTA – Célula-tronco adulta
CTE – Célula-tronco embrionária
CTH – Célula-tronco humana
CTi – Célula-tronco induzida
DNA – cido desoxirribonucleico
ER:YAG – rbio dopado com rio alumínio granada
ERK 1 – Quinase relacionada com o sinal extracelular 1
ERK 2 – Quinase relacionada com o sinal extracelular 2
FACS – Separação de células ativadas por fluorescência
FH – Fracionamento Histopaque
FS – Fracionamento Sacarose
G1 – Gradiente 1
G2 – Gradiente 2
G3 – Gradiente 3
He-Ne – Hélio-Neônio
ISCOVE-IMDM – Meio de Dulbecco modificado de Iscove
LBI – Laser de baixa intensidade
LIF – Fator inibitório da leucemia
mi-RNA – micro RNA
MMP – Potencial da membrana mitocondrial
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
PBS – Tampão fosfato salina
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase
RNA – cido ribonucleico
SRM – Sinalização retrógrada da mitocôndria
TLBI – Terapia laser de baixa intensidade

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 REGENERAÇÃO.....	16
2.1.1 <i>Planárias</i>	18
2.1.2 <i>Células-tronco humanas</i>	24
2.1.3 <i>Histórico</i>	24
2.1.4 <i>Classificação das CTH</i>	26
2.2 LASER E A BIOMODULAÇÃO	28
2.2.1 <i>Estado da Arte</i>	28
2.2.2 <i>Características do laser e laserterapia de baixa intensidade</i>	29
3 METODOLOGIA.....	35
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A - ARTIGO 1	54
ANEXO B - ARTIGO 2	55
ANEXO C - ARTIGO 3	56

APRESENTAÇÃO

Esta tese, apresentada na forma de artigos científicos, teve como objetivos: (a) estabelecer uma cultura de células de *Girardia tigrina*; (b) avaliar o efeito da biomodulação em cultura de neoblastos de *G. tigrina* e (c) realizar um estudo comparativo da laserterapia de baixa intensidade em células-tronco de planárias e humanas.

Capítulo 1 – Method of isolation and characterization of *Girardia tigrina* stem cells
Girardia tigrina neoblast culture.

Capítulo 2 – Low-intensity laser biomodulation in neoblast culture isolated of *Girardia tigrina*.

Capítulo 3 – Comparative study of Low Level Laser Therapy in human and planarian stem cells.

1 INTRODUÇÃO

A regeneração é um processo baseado na reconstrução de partes perdidas ou autotomizadas (GOSS, 1969), presente em vários animais metazoários, desde cnidários até vertebrados. Apresenta diferenças marcantes entre os taxa, evidenciando nuances dos aspectos evolutivos (WENEMOSER; REDDIEN, 2010) e a conservação desse processo, a qual é observada em nível gênico, como por exemplo: *Pou*, *Piwi* e *Pax* (SHI; JIN, 2010; ÖNAL et al., 2012; CALLAERTS et al., 1999). Assim, o gene *POU5f1* codifica o fator de transcrição Oct-4, o qual pertence à família de fatores de transcrição POU. Os papéis desempenhados pelo Oct-4 são: controle da manutenção do estado indiferenciado e proliferação das células-tronco. Dentre os taxa pertencentes ao grupo dos metazoários, ressalta-se que tanto as planárias quanto os mamíferos possuem este fator de transcrição (ÖNAL et al., 2012).

As planárias são organismos amplamente estudados por apresentarem um reservatório de células indiferenciadas durante toda a vida, sendo que essas células-tronco são denominadas neoblastos, que conferem capacidade regenerativa às planárias. Os neoblastos possuem diversas características que os diferenciam de outros tipos celulares, quais sejam: elevada relação núcleo citoplasma, ribossomos livres, nucléolo grande, cromatina dispersa e corpo cromatóide (BELY;SIKES, 2010; PELLETIERI; ALVARADO, 2007; ROSSI; IACOPETTI; SALVETTI, 2012).

As células-tronco realizam mitose em alta escala. Portanto, uma alternativa para potencializar esse processo poderia ser a utilização da terapia laser de baixa intensidade (TLBI), que promove a estimulação do metabolismo celular por meio da ativação da cadeia respiratória mitocondrial, assim elevando a velocidade da cadeia transportadora de elétrons. A ação do laser de baixa intensidade (LBI) vem sendo estudada na neoformação óssea, cicatrização de ferimentos e em linhagens celulares separadamente, como queratinócitos, células-tronco, células endoteliais entre outras.

Dessa forma, devido à relevância do entendimento da biologia das células-tronco e à utilização do LBI como uma estratégia para propiciar o aumento da população celular, ressalta-se a importância do desenvolvimento de estudos em que sejam utilizados modelos experimentais. Tais modelos geralmente são organismos que pertencem a espécies mais simples, no que se diz respeito à escala evolutiva.

Contudo, faz-se necessário que invariavelmente possuam a conservação de domínios gênicos responsáveis pelo estado indiferenciado. Assim, há um caminho para o entendimento das cascatas de sinalização envolvidas. No presente estudo propôs-se utilizar a planária da espécie *Girardia tigrina* como modelo experimental para averiguar o efeito da fotobiomodulação sobre os neoblastos.

1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito da fotobiomodulação em cultura de neoblastos de *Girardia tigrina*.

1.2 Objetivos específicos

Estabelecer cultura primária de células de *Girardia tigrina*.

Realizar o fracionamento da cultura primária de células totais de *G. tigrina* para obtenção do gradiente rico em neoblastos.

Caracterizar os neoblastos presentes na cultura de *G. tigrina*.

Verificar a influência do laser na proliferação e diferenciação de neoblastos.

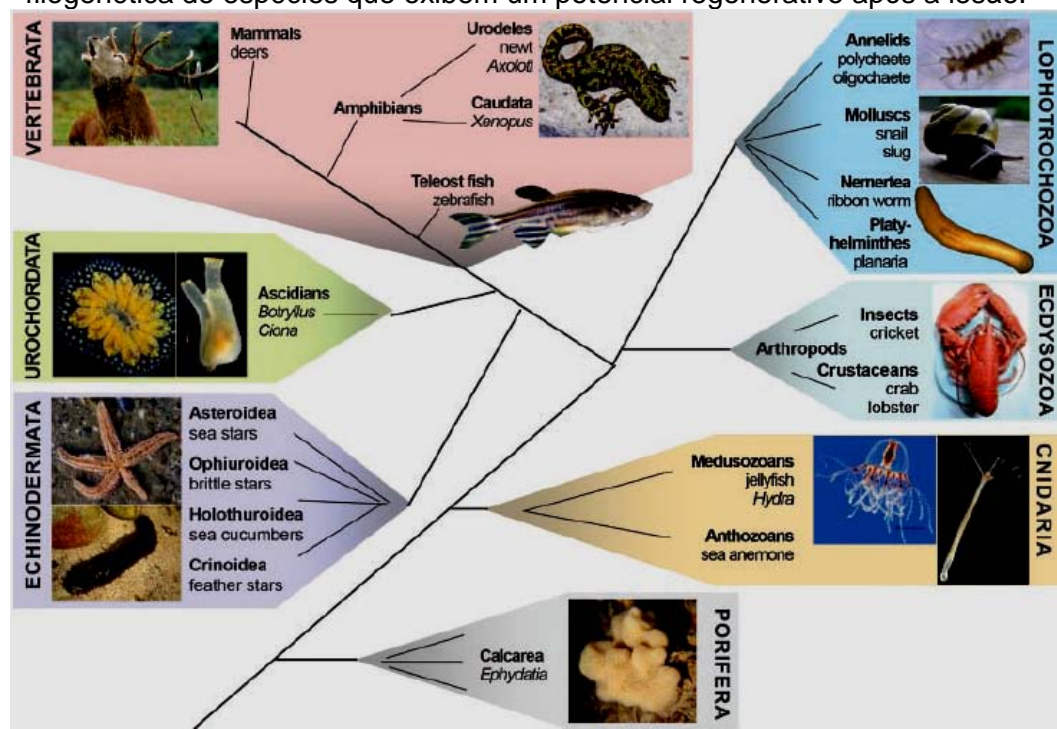
Comparar a ação do laser de baixa intensidade em neoblastos e nas células-tronco humanas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Regeneração

O processo regenerativo, por definição, é a reconstrução de uma parte do corpo perdida ou autotomizada (GOSS, 1969). A regeneração ocorre em várias taxa dentre eles: platelmintos (invertebrados), peixe zebra e mamíferos (vertebrados) (fig. 1) (NACHTRAB; POSS, 2012; SILVA, 2011; ISAEVA et al., 2009), sendo tal capacidade variável em relação à posição ocupada na escala evolutiva, envolvendo a complexidade organizacional ou filogenética de cada grupo, por exemplo: nos metazoários basais é mais frequente se comparada aos mamíferos (WENEMOSER; REDDIEN, 2010; TASAKI et al., 2011).

Figura 1 - Distribuição das potencialidades regenerativas no reino animal. Árvore filogenética de espécies que exibem um potencial regenerativo após a lesão.



Fonte: Galliot e Ghila (2010).

Além da dependência relacionada à posição evolutiva, é possível verificar uma relação com o período de desenvolvimento, como observado no anuro do gênero *Xenopus*. O ciclo de vida do *Xenopus laevis* é constituído de 66 estágios, que compreendem desde o zigoto até o adulto (JAMES-ZORN et al., 2013; BOWES

et al., 2008). Alguns estágios podem ser caracterizados: no estágio 48, por exemplo, verifica-se o surgimento dos brotos dos membros anteriores; do estágio 54 ao 57, observa-se a ossificação do crânio, diferenciação dos primeiros elementos do esqueleto apendicular anterior, carpo, metacarpo, e formação da cintura peitoral (TRUEB; HANKEN, 1992). Os girinos nos estágios de 50 a 54, submetidos à lesão da coluna vertebral, conseguem regenerá-la. Para que esse processo aconteça é necessário que o espécime metamorfoseie-se, resultando em alterações compensatórias iniciadas por meio dos axônios relacionados com os apêndices locomotores (GIBBS; SZARO, 2006; ROURKE, 2007). Entretanto, nos estágios de desenvolvimento mais adiantados esta capacidade é perdida (NACHTRAB; POSS, 2012).

A regeneração é compreendida desde a cicatrização até a expressão do padrão das estruturas perdidas. Para a sua realização, ocorrem a sinalização e proliferação celular (WENEMOSER; REDDIEN, 2010; TASAKI et al., 2011). A dinâmica da regeneração apresenta muitas lacunas relacionadas à biologia das células-tronco e aspectos da biologia celular e molecular envolvidos nesse processo. A fim de sanar esses hiatos, atualmente inúmeros estudos evidenciam a manutenção da capacidade regenerativa multifilética distribuída entre os metazoários, baseada em um ancestral comum, com regulação das vias moleculares. Geralmente a expressão gênica norteia a rota a ser seguida nas vias de sinalização e, a julgar pela especificação celular e o processo regenerativo, é relevante citar os genes *Pax* e *Hox*.

O *Pax-6* é um gene que controla a morfogênese e a evolução dos olhos, desde cnidários até vários animais bilaterais em diferentes níveis de complexidade, além de possuir organização genômica e função bem conservadas. Há expressão do *Pax-6* em diferentes filos de metazoários (cnidários, artrópodes – insetos, equinodermos, cordados - cefalocordados, mamíferos), indicando que a conservação está no sistema nervoso central, no desenvolvimento dos olhos e outros órgãos cefálicos. No início da morfogênese dos olhos de alguns animais invertebrados (cefalópodes, turbelários, poliquetos e nemertíneos) acontece a expressão do *Pax-6* e existe uma possibilidade de que os olhos dos animais sejam derivados de um olho ancestral dependente de *Pax-6* (CALLAERTS et al., 1999; ERCLIK et al., 2009; KOZMIK, 2008; SALÓ, 2006).

Os genes *Hox* fazem parte de um subgrupo de genes homeobox, os quais são genes reguladores que atuam no desenvolvimento embrionário e determinam o padrão do eixo corporal. Os genes *Hox* codificam uma família de fatores de transcrição que regulam o padrão anterior/posterior em muitos filos de animais bilaterais. Participam também da morfogênese reparadora em planárias, peixes zebra, salamandra entre outros (NOVIKOVA et al., 2013; SALÓ, 2006).

Ambos os genes, *Pax* e *Hox*, são conservados nos metazoários, indicando a possibilidade de estes genes serem preservados a partir de um ancestral comum dos protostômios e deuterostômios. Sabe-se que as mudanças ambientais e ecológicas, de certa forma, interagem com os organismos, acarretando-lhes alterações ao longo do tempo. Tais alterações acontecem em diferentes níveis de organização, resultando em mudanças nos módulos moleculares, por meio de substituições, adições, e colaborando para interações que podem resultar em aspectos evolutivos (ALVARADO, 2004).

Atualmente são utilizados modelos experimentais para viabilizar o estudo das células-tronco. O uso de modelos experimentais para o estudo do processo regenerativo deve atender primordialmente dois aspectos: animal metazoário deve possuir baixa complexidade e que seja de fácil manejo experimental (ALVARADO, 2004).

Nesta perspectiva os animais invertebrados apresentam potencial como modelos experimentais, principalmente os representantes dos acoelos e platelmintos. Salienta-se a existência do reservatório de células-tronco adultas durante toda a vida nestes animais, favorecendo o estudo sobre a biologia celular e molecular dessa linhagem celular (BELY; SIKES, 2010). Para os platelmintos (planárias), salienta-se a facilidade de manutenção em laboratório, simplicidade no que diz respeito à complexidade organizacional e elevada capacidade regenerativa, e sucesso reprodutivo de *Girardia tigrina* em condições controladas (CARVALHO, 2013).

2.1.1 Planárias

Para situar as planárias na imensa diversidade de espécies encontrada entre os animais triblásticos, podemos iniciar pela categoria taxonômica de filo. Os animais em questão pertencem ao grupo dos Platyhelminthes. Esse filo possui

representantes que são endoparasitas, ectoparasitas e os de vida-livre. Salienta-se que as planárias são de vida-livre, encontradas em diferentes ambientes, sendo terrestre, dulcícola ou marinho. As planárias de água doce pertencem à classe Turbellaria, ordem Seriata, infraordem Paludicola. As planárias que fazem parte do presente estudo fazem parte da família Dugesiidae, gênero *Girardia*, espécie *Girardia tigrina*, conforme observado na figura 2 (SALÓ; AGATA, 2012; NEWMARK; ALVARADO, 2002; MUÑOZ; VÉLEZ, 2007, KENK, 1974).

Figura 2 - Exemplo de *Girardia tigrina*.

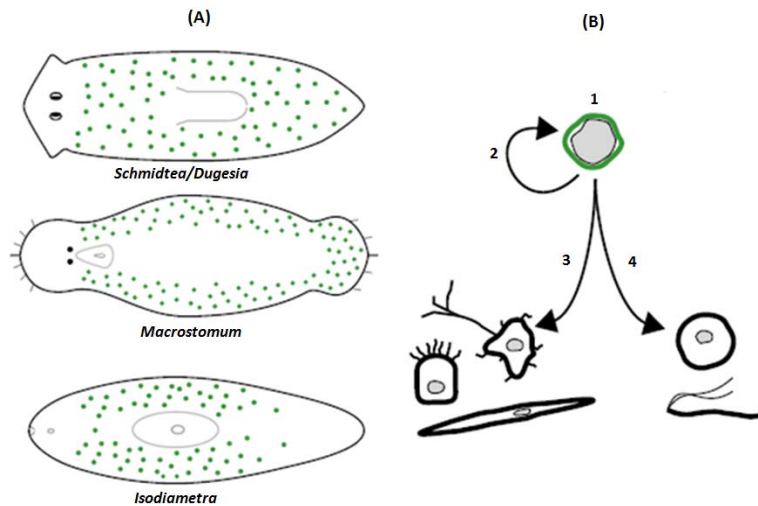


Fonte: Carvalho (2013).

Existem muitos estudos acerca do processo regenerativo e da biologia das células-tronco utilizando as planárias como modelo experimental. Isto se deve à presença das populações de células-tronco em compartimentos. No que concerne à organização de compartimentos celulares, as planárias apresentam dois compartimentos celulares bem estabelecidos, conhecidos como: proliferativo e funcional. No compartimento proliferativo encontram-se as células indiferenciadas (células-tronco), denominadas neoblastos, que variam em função da necessidade de regeneração e do estado nutricional. No compartimento funcional estão os tipos celulares diferenciados (ALVARADO, 2004; ISAEVA, 2011; ABOOBAKER, 2011; BEHESNSKY; SCHÜRMAN; PETER, 2001; HAYASHI et al., 2006; SCHÜRMAN; PETER, 2001; ROSSI; IACOPETTI; SALVETTI, 2012; FERNÁNDEZ-TABOADA et al., 2011). A localização exata dos neoblastos no interior do corpo das planárias

apresenta variações nos diferentes gêneros de platelmintos (*Schmidtea*, *Dugesia* e *Macrostomum*) e acoelos (*Isodiametra*) (BELY; SIKES, 2010) (figura 3).

Figura 3 - Dois grupos de vermes de corpo mole, os Platelmintos e os Acoelos.



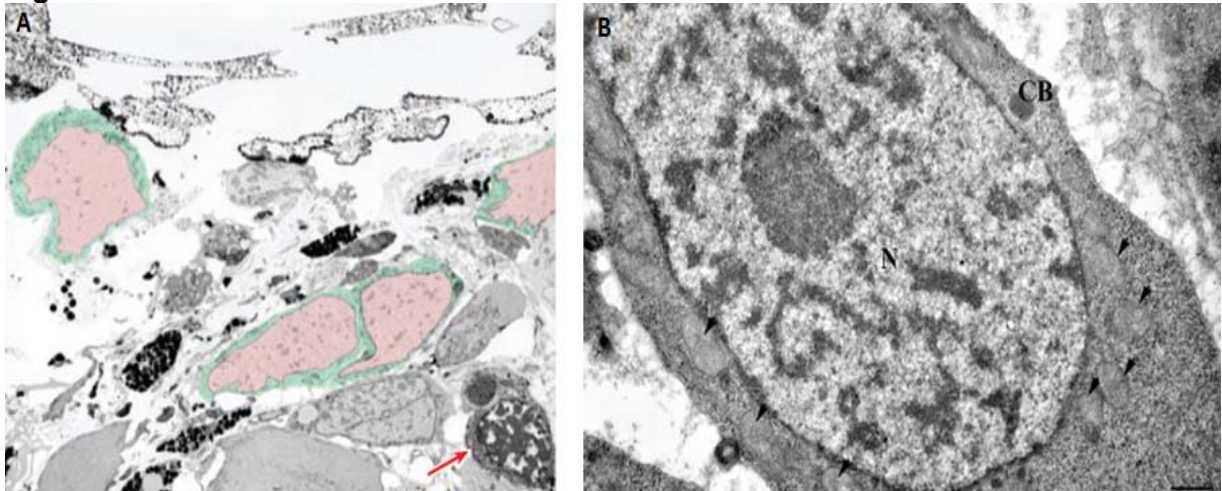
Nota: (A) As células-tronco somáticas, chamadas neoblastos (pontos verdes), são distribuídas no parênquima em grande parte do corpo de planárias, macrostomídeos e acoelos. (B) neoblastos (1) podem se autorrenovar, (2) produzir tipos de células somáticas diferenciadas (3) e produzir células germinativas (4). Neoblastos são morfologicamente caracterizados por uma grande proporção núcleo-citoplasma (núcleos representados por tons de cinza).

Fonte: Bely e Sikes (2010).

Os neoblastos realizam a renovação celular, desempenhando importante papel na manutenção da homeostase do corpo das planárias, além de colaborar no crescimento e regeneração. A contribuição na homeostase é possível, pois os neoblastos são mitoticamente ativos e ofertam uma progênie que supre este processo de renovação (BELY; SIKES, 2010; EISENHOFFER; KANG; ALVARADO, 2008). A homeostase é regulada por três processos competitivos, que são morte, proliferação e diferenciação celulares (GALLIOT; GHILA, 2010).

Os neoblastos perfazem cerca de 20 a 30% do total de células e podem ser caracterizados por apresentarem: núcleo grande, pouco citoplasma, 5 a 8 μm de diâmetro e presença de corpo cromatóide (figura 4).

Figura 4 - Características dos neoblastos.



Nota: (A) Micrografia eletrônica de transmissão de neoblastos de *Schmidtea mediterranea*, próxima ao local da ferida. Os núcleos e citoplasmas de três neoblastos estão pseudocoloridos em vermelho e verde, respectivamente, e uma célula morta (seta vermelha). (B) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando um neoblasto. As setas indicam mitocôndrias. CB: corpo cromatóide, N: núcleo. Barra de escala: 100 nm.

Fonte: Figura a, Pelletieri e Alvarado (2007), e figura b, Rossi, Iacopetti e Salvetti (2012).

Os corpos cromatóides são constituídos por grandes ribonucleoproteínas citoplasmáticas que apresentam reguladores pós-transcricionais, como o DEAD box RNA helicase CBC-1 (ROUHANA et al., 2010; ROUHANA et al., 2012). A presença do corpo cromatóide sugere sua relação com a capacidade de totipotência, sendo observada a diminuição de tamanho e a quantidade de corpos cromatóide durante a diferenciação celular. Nas células diferenciadas estão ausentes. Existem evidências que apontam para uma forte regulação pós-transcricional nos neoblastos (ROUHANA et al., 2010), indicando uma relação entre a autorrenovação de neoblastos e a proliferação celular (REDDIEN; ALVARADO, 2004; ROSSI; IACOPETTI; SALVETTI, 2012; PELLETIERI; ALVARADO, 2007).

Para que os neoblastos participem do processo regenerativo a manutenção de suas características está interligada à expressão de vários genes descritos como: *DJPUM* (ROSSI et al., 2006; SALVETTI et al., 2005), *PIWI* (REDDIEN et al., 2005) e *Smed-bruli* e *SpolTud-1* (GUO; PETERS; NEWMARK, 2006; ROUHANA et al., 2010). A via de sinalização *wnt*/catenina, que, acredita-se, seja conservada em planárias, regula a homeostase do tecido através da proliferação das células-tronco e diferenciação em organismos adultos (ADELL; CEBRIÁ; SALÓ, 2010).

O controle da conservação do estado indiferenciado e a proliferação das células-tronco e posterior diferenciação acontece por meio da expressão gênica

(FRITSCH et al., 2007), tendo como mediadores os fatores de transcrição (Oct-4, Nanog e Sox-2), controle epigenético (modificações na cromatina) e micro-RNAs (miRNA), os quais regulam a expressão gênica por inibição do RNA mensageiro (RNAm) (CHOI; CHOI; HWANG, 2013). Estes fatores de transcrição são conhecidos como: Oct4, Sox2 e Nanog. Oct4 e Sox2 podem funcionar juntos, sendo encontrados sítios de ligação Oct-Sox em vários genes relacionados com a renovação celular e diferenciação (CHEW et al., 2005).

Oct4 é codificado pelo gene *POU5f1*, pertencente à família de fatores de transcrição POU, que controla a expressão dos genes-alvo através da ligação de uma sequência AGTCAAAT (SHI; JIN, 2010), além de ser fundamental para a transcrição da pluripotência nos vertebrados (ÖNAL et al., 2012). Em células-tronco pluripotentes de ratos, verificou-se que Nanog é um gene que precisa ser identificado como um gene-alvo da interação Sox2-Oct4 (RODDA et al., 2005).

Alguns miRNAs podem atuar como promotores da manutenção do estado indiferenciado e outros, como promotores da diferenciação, assim possuindo ativações diferentes. O miRNA let-7, por exemplo, pode realizar o bloqueio da autorrenovação de células-tronco embrionárias (THATCHER; PATTON, 2010). Cerca de 50 a 60 miRNA foram altamente expressos em neoblastos de *Schmidtea mediterranea*, sendo de suma importância no processo regenerativo e na diferenciação das células nervosas (GONZÁLEZ-ESTÉVEZ et al., 2009).

Os miRNAs específicos participam como mediadores na expressão gênica em células-tronco, combinados com OCT4, SOX2 e NANOG, os quais atuam na regulação dessas células, envolvendo mecanismos de promoção ou repressão no processo de diferenciação (CHOI; CHOI; HWANG, 2013). Comparando os genes relacionados à manutenção da pluripotência de células-tronco de ratos aos genes homólogos de planárias, foi observado que a fração enriquecida com neoblastos em proliferação e reduzida quantidade de células diferenciadas (sensível à irradiação) apresentou uma regulação maior se comparada à fração com células diferenciadas somente (insensível a irradiação). Assim, há sinais de conservação da expressão do gene entre os neoblastos e as células-tronco embrionárias de mamíferos (ÖNAL et al., 2012), reforçando a ideia de se utilizar planárias como modelo experimental para a compreensão da biologia de células indiferenciadas, devido aos indícios de semelhança na expressão gênica conservada.

Para o estabelecimento de cultura primária é necessária a desintegração tecidual, que pode ser mecânica, enzimática ou uma combinação de ambas. Geralmente utilizam-se as culturas primárias para o acompanhamento de uma linhagem celular *in vitro* (ALVES; GUIMARÃES, 2010). No estabelecimento de cultura primária de células de planárias devem ser considerados diferentes fatores, como: (a) período de preparação à desintegração dos espécimes; (b) período de estabelecimento e (c) fracionamento por meio de gradiente, após desintegração dos animais.

- a) Período de preparação: a supressão alimentar é realizada em um período variável, dependendo da espécie de planária, em geral, de sete a quinze dias (FUKUSHIMA; MATSUDA, 1991; HAYASHI et al., 2006; SCHÜRMAN; PETER, 2001; MUÑOZ-MÁRMOL et al., 1998; ASAMI et al., 2002; SATO et al., 2006; HIGUCHI et al., 2007; TASAKI et al., 2011; BENDER et al., 2012). Os exemplares são incubados em sulfato de neomicina a 0,02% por 24 horas (BEHENSKY; SCHÜRMAN; PETER, 2001; SCHÜRMAN; PETER, 2001; SCHÜRMAN; BETZ; PETER, 1998).
- b) Período de estabelecimento: tanto para as soluções de desintegração quanto para os meios de cultura é importante a osmolaridade. Para a desintegração diferentes metodologias são utilizadas, como: maceração (SALÓ; BAGUÑÁ, 1989; BEHENSKY; SCHÜRMAN; PETER, 2001); desintegração mecânica e enzimática, combinadas (SCHÜRMAN; BETZ; PETER, 1998); incubação de fragmentos em solução de Holtfreter 5/8 e tripsina, com posterior pipetagem suave (HAYASHI et al., 2006; HIGUCHI et al., 2007). Quando se opta pela desintegração enzimática, em geral, utilizam-se enzimas digestivas, como: pronase e tripsina (FUKUSHIMA; MATSUDA, 1991), embora a incubação em tripsina possa acarretar danos à membrana das células, podendo estar relacionada com a temperatura de incubação, isto é, as enzimas possuem uma temperatura ótima para que reajam com o substrato. Baseados nessa dinâmica, Terraciano et al. (2004) verificaram a ação da tripsina a 4°C em células testiculares e observaram uma redução nos danos à membrana celular. Importante ressaltar que a temperatura ótima para a ação da tripsina está em torno de 37°C.
- c) Para a separação das populações de neoblastos das populações celulares diferenciadas são utilizadas diversas metodologias, dentre elas: (1) a

irradiação com raio X (SHIBATA et al., 1999), (2) a combinação de radiação X e separação de células ativadas por fluorescência (FACS) (HAYASHI et al., 2006; HIGUCHI et al., 2007; ÖNAL et al., 2012; MORITZ et al., 2012), (3) radiação gama (GONZÁLEZ-ESTEVEZ et al., 2007; ROUHANA et al., 2012), (4) radiação gama combinada com FACS (FERNANDEZ-TABOADA et al., 2010) e (5) fracionamento em gradientes com diferentes densidades (SCHÜRMANN; BETZ; PETER, 1998).

2.1.2 Células-tronco humanas

As células-tronco humanas (CTH) possibilitaram o surgimento de várias conquistas científicas que ocasionaram o progresso na medicina regenerativa e nas terapias clínicas. Tais avanços estão relacionados aos papéis desempenhados pelas CTH, os quais estão interligados a renovação dos tecidos e manutenção/reparação ao longo da vida (MARTELLO; SMITH, 2014; DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009). Desta forma, propicia-se uma alternativa para aumentar as chances de tratamento de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, osteogênese imperfeita, lúpus eritematoso, cirrose hepática, isquemia de membros, traumas medulares entre outras. De modo geral, os estudos com células-tronco geraram informações relevantes para o tratamento de doenças decorrentes da extirpação e/ou disfunção de uma determinada população celular (PEREIRA, 2009; KARAMZADEH; ESLAMINEJAD, 2013; PASSOS et al., 2007).

A aplicação das células-tronco na medicina está apoiada basicamente nas suas características relacionadas ao estado indiferenciado, potenciais diversos de diferenciação, autorreplicação e autorrenovação. Quando se trata de autorrenovação, vale ressaltar que a população celular em questão não deixa de possuir o potencial de diferenciação, além de resistir ao envelhecimento biológico (FRITSCH et al., 2007; SHIHADDEH, 2015).

2.1.3 Histórico

Segundo Grecco (2008), o estudo das células-tronco (CE) iniciou com o experimento de Trembley em 1740, descobrindo-as em hidras que, cortadas

inúmeras vezes, tinham a capacidade de refazer as partes perdidas, isto é, de cada fragmento gerado após o corte originava-se um novo indivíduo.

No final década de 1940, os médicos canadenses Ernest McCulloch e James Till, do Instituto de Câncer de Ontário, incentivados por inúmeros casos de leucemia, decorrentes da radiação liberada devido ao acidente com a bomba atômica de Hiroshima, realizaram experimentos e obtiveram a informação que as células-tronco adultas (CTA) da medula óssea têm a capacidade de produzir eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Estes experimentos consistiam em expor camundongos a elevadas doses de radiação e, posteriormente, as células da medula óssea de animais íntegros, não submetidos à radiação, eram injetadas nos animais receptores da radiação.

Edward Conall Thomas e sua equipe da Escola de Medicina da Universidade de Washington, em 1969, conquistaram êxito no primeiro transplante de medula óssea entre pessoas não gêmeas, baseado no conceito de que células que possuem um tipo similar de antígeno leucocitário humano não apresentam rejeição.

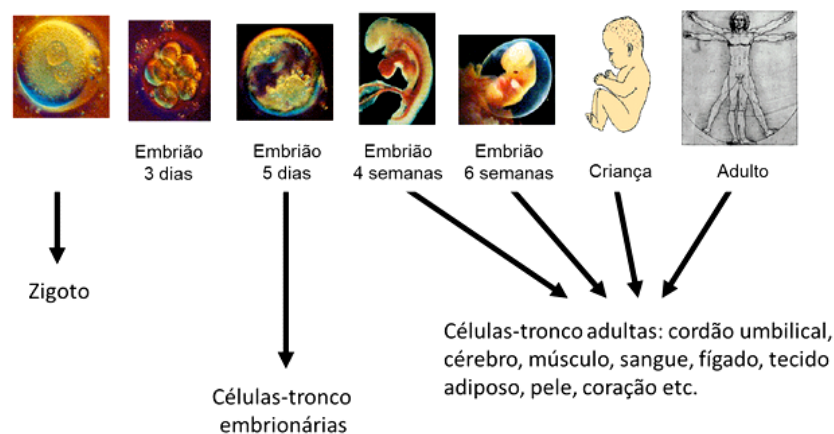
Na década de 1980, Martin Evans e Mario Capecchi, da Universidade de Cambridge, e Oliver Smithies, da Universidade da Carolina do Norte, realizaram estudos em que chegaram à conclusão de que existe a possibilidade de remover células de um embrião em período recente à fertilização e, posteriormente, inseri-las novamente com as modificações genéticas. Porém, foi somente a partir de 1986 que Bradley e Robertson atingiram o resultado de colocar DNA de um retrovírus no DNA de célula, contudo ainda não foi possível inserir no local escolhido. De outro lado, Cappechi e Smithies, em 1987, obtiveram um avanço no que se diz respeito aos genes, à colocação ou deleção de genes específicos em CTE de camundongos. Os indícios de células-tronco da medula com potencialidade de reconstituir tecidos e órgãos apareceram no final da década de 1990. Já em 1995, James Thomson, da Universidade de Wisconsin-Madison, pela primeira vez realizou o cultivo de CTE isoladas de primatas e a manutenção dessas em tecido de camundongos. Além de isolar, Thomson, com sua metodologia, viabilizou para que fossem mantidas as CT de humanos, em 1998 (GRECCO, 2008; PEREIRA, 2009).

2.1.4 Classificação das CTH

As CTH podem ser embrionárias, adultas (fig. 5) ou induzidas (DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009), sendo que as embrionárias são provenientes de embriões com aproximadamente sete a dez dias após a fertilização da pré-implantação do blastocisto (SHIHADDEH, 2015).

As CT somáticas ou adultas (CTA) podem ser caracterizadas por serem indiferenciadas, têm a capacidade de autorrenovação por período não determinado e geram populações celulares diferenciadas morfológica e fisiologicamente. Podem ser encontrados em diferentes localidades, como cérebro, medula óssea, vasos sanguíneos, coração e fígado. Aspecto importante recentemente descoberto acerca das CT adultas é que algumas possuem a competência de gerar tecidos que diferem de sua origem embrionária, como as CT mesenquimais (DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009; PEREIRA, 2009; ESTRELA et al., 2011).

Figura 5 - Fases do desenvolvimento humano e o respectivo tipo de célula-tronco.



Fonte: Instituto (2013).

A reprogramação de células somáticas e a respectiva modificação genética geram CT induzidas (CTi) por meio de transfecção celular, que fornece uma equivalência funcional semelhante à CTE (MARTELLO; SMITH, 2014; SHIHADDEH, 2015; DEL CARLO; MONTEIRO; NETO, 2009).

De outro lado, existe outra forma de classificar as CT, que é baseada nos diferentes potenciais celulares, geralmente relacionados à habilidade de

diferenciação, sendo consideradas: totipotentes ou onipotentes, pluripotentes ou multipotentes, oligopotentes ou unipotentes (FRITSCH et al., 2007; SHIHADDEH, 2015; KARAMZADEH; ESLAMINEJAD, 2013). Pode-se caracterizá-las da seguinte forma:

- (a) totipotentes – diferenciam-se em todos os tipos celulares que compõem o indivíduo, inclusive placenta e anexos embrionários. Presentes até o quarto dia após a fertilização em humanos, estágio de mórula;
- (b) pluripotentes - diferenciam em todos os tipos celulares, com exceção da placenta e anexos embrionários, encontradas a partir do quinto dia após a fertilização, estágio de blastocisto. O blastocisto apresenta duas populações celulares, sendo as células da massa interna responsáveis por formar os três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma) e as células do trofoblasto (membrana externa do blastocisto), que efetuam a produção das membranas embrionárias e da placenta;
- (c) oligopotentes – diferenciam-se em poucas linhagens celulares;
- (d) unipotentes – diferenciam-se em um tipo específico de célula.

As CTE podem ser determinadas por apresentarem algumas qualidades distintas, que as diferem das CTA e das CTi, como já citado anteriormente. Para as CTE existem peculiaridades (FRITSCH et al., 2007) como:

- (a) ser clonogênica, formando uma colônia de células que possuem as mesmas particularidades da célula que lhe deu origem;
- (b) expressar o fator de transcrição Oct4, que faz parte da família das proteínas POU codificada pelo gene *Pou5f1*;
- (c) expressar o fator de transcrição Sox2, membro da família de fatores de transcrição Sox;
- (d) responder positivamente quando induzida a proliferar continuamente ou a diferenciar;
- (e) bloquear a diferenciação mediada pelo fator inibitório da leucemia (LIF) e das proteínas morfogenéticas do osso (BMP);
- (f) possuir o fator de transcrição Nanog como um dos responsáveis pela manutenção da pluripotencialidade. A sobre-expressão de Nanog mantém a pluripotência e a autorrenovação sob condições em que ocorreria diferenciação (RODDA et al., 2005).

2.2 Laser e a biomodulação

2.2.1 Estado da Arte

O termo LASER é o acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* ou amplificação da luz por emissão estimulada da radiação (LINS et al., 2010). Quando se fala dos primórdios do laser é preciso comentar que Theodoro Maiman (1960) produziu laser utilizando como meio ativo o cristal de rubi, baseando-se nos princípios básicos da teoria da Emissão Estimulada postulada por Einstein (1917).

Segundo Genovese (2000), no período compreendido entre 1961 e 1968, ocorreram várias aplicações, como: a primeira cirurgia no Hospital Presbiteriano em Nova York, utilizando laser (PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008), visando à retirada de um tumor de retina. A seguir foram desenvolvidos lasers com diferentes meios ativos, tais como: Hélio-Neônio (He-Ne) e o Neodímio-Ítrio-Alumínio-Granada (Nd-YAG), laser semicondutor e a substituição do laser pulsado de rubi por laser contínuo de Argônio.

Entre 1970 a 1980, observam-se grandes avanços no que se diz respeito à aplicação médica do laser na oftalmologia, gastroenterologia e pneumologia. Além de surgirem os lasers de baixa intensidade (LBI), que apresentam o espectro de emissão no vermelho ou infravermelho, como por exemplo: HeNe ($\lambda = 632,8\text{nm}$) e o Arseneto de Gálio (AsGa) ($\lambda = 850\text{nm}$ ou 903nm). Inicialmente os LBI foram aplicados na reflexoterapia e acupuntura (GENOVESE, 2000; MAILLET, 1987).

No período entre 1983 a 1991, foram verificados alguns progressos, como: a elevação nos níveis de ATP e o efeito de analgesia demonstrado com o aumento da β -endorfina no líquido cefalorraquidiano; utilização dos lasers He-Ne e diodo (IR) para tratar patologias da cavidade oral; LBI utilizada para o aumento da circulação periférica com êxito; a ação do laser de arseniato de gálio (AsGaAl) 904nm, causando elevação da circulação periférica, bioestimulação celular e aceleração do processo de ossificação alveolar (GENOVESE, 2000).

A aplicação da laserterapia na dermatologia e cosmetologia auxiliaram a alavancar a utilização do laser, como o laser de CO_2 ou o Er:YAG, os quais são empregados para a retirada de rugas com o desgaste da pele. Neste enredo foram

pesquisados os mecanismos de reparo da pele e produção de colágeno, visando à preservação dos pacientes com a redução de efeitos colaterais. Estudou-se uma maneira de depositar calor na região inferior à superfície da pele e posterior acompanhamento do reparo da região tratada (STEINER, 2006).

A laserterapia de baixa intensidade despertou muito interesse devido aos efeitos biológicos propiciados e, conseqüentemente, inúmeras pesquisas voltadas para o entendimento das alterações causadas no nível celular foram iniciadas, objetivando a aplicação médica dessa ferramenta. Modelos celulares foram propostos para compreender os mecanismos de ação do laser. Visando essa meta, efetuaram-se experimentos baseados em cultivo de linhagens celulares para constatar proliferação celular, síntese de colágeno e migração celular (LINS et al., 2010; KARU, 1998). Existem atualmente aplicações do laser como ferramenta para o diagnóstico e, no futuro, pode estar aliado à terapia, indicando uma possibilidade rentável (STEINER, 2006).

2.2.2 Características do laser e laserterapia de baixa intensidade

O laser apresenta propriedades como: monocromaticidade, coerência e colimação (feixes de luz paralelos, a transmissão de energia é precisa), tornando-o uma ferramenta útil com diversas aplicações, sejam médicas (tratamento ou diagnóstico), industriais (corte, microusinagem, alinhamento), pesquisas científicas (pinças ópticas) e comerciais (leitores de códigos de barras), entre outras.

Para a utilização com a finalidade médica é necessário entender a dinâmica da transformação da energia contida nos fótons que constituem o laser, o qual é entregue ao tecido. Essa interação promove diferentes efeitos, resultantes da absorção da luz. Os efeitos estão organizados em: primários (diretos), secundários (indiretos) e terapêuticos (DIAS et al., 2009; ROSA, 2004; ENGEL et al., 2016).

Os efeitos primários promovidos pelo laser são: bioenergéticos, bioelétricos e bioquímicos. Os bioenergéticos estão baseados na transferência de energia do laser, que resulta em estímulo do trofismo celular e restitui a homeostase celular. Os bioelétricos beneficiam a homeostase, promovendo a normalização das cargas elétricas, e elevam a quantidade de ATP indiretamente. A elevação da quantidade de ATP está diretamente ligada às alterações que ocorrem na cadeia respiratória, devido à energia do laser (fóton) interagir com os complexos envolvidos na cadeia

transportadora de elétrons, que ocorre no interior da mitocôndria (PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008; KARU, 2002). A irradiação com laser, dependendo do comprimento de onda utilizado, pode ativar alguns componentes celulares, desse modo interferindo nas reações bioquímicas específicas e, por conseguinte, toda a dinâmica celular. Exemplificando: as mitocôndrias de fígado de um mamífero, submetidas à irradiação, apresentaram elevação na síntese de ATP e consumo de O₂. Notou-se que, nos experimentos com os comprimentos de onda de 415nm, 602nm, 632,8nm, 650nm e 725nm, mostraram aumento na síntese de ATP, se comparados aos que utilizaram os comprimentos de onda 477nm e 554nm, nos quais não foram constatadas alterações nesse processo (KARU, 2002).

Os efeitos bioquímicos estão relacionados a modificações nas reações enzimáticas, podendo acelerá-las ou inibi-las. Assim é possível verificar geralmente um efeito em cascata, como por exemplo: elevação da produção de ATP e consequente aceleração da mitose, resultando em alterações no índice enzimático mitocondrial e na proliferação celular. Portanto a elevação de produção de ATP permeia os efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos (GENOVESE, 2000; KARU, 2002).

Os efeitos primários podem colaborar, de certa forma, para que os secundários aconteçam. O estímulo à microcirculação e o trofismo celular são alguns exemplos. O laser age sobre o esfíncter pré-capilar, alterando sua dinâmica de funcionamento, fazendo com que fique aberto constantemente. Esta ação é resultado da mediação química que possui como um de seus intermediários a histamina. De outro lado, o trofismo celular é decorrente do aumento da mitose e da produção de ATP, que leva à aceleração do processo de reparação tecidual (GENOVESE, 2000; LINS et al., 2010).

Além dos efeitos diretos e indiretos, ainda são observados os efeitos terapêuticos, como analgesia, anti-inflamatório, bioestimulação, trófico tecidual e antiedematoso. Cabe salientar que a ação do laser, no caso da analgesia e redução da dor, é uma consequência da inibição da ação da cicloxigenase, que tem relação com o alívio da dor e redução da sintomatologia da inflamação. Essa relação é intrínseca ao ciclo do ácido araquidônico (LINS et al., 2010; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008; GENOVESE, 2000; ENGEL et al., 2016).

Os parâmetros (comprimento de onda e dose) do laser utilizado podem resultar em efeitos favoráveis ou desfavoráveis no processo de proliferação celular.

Sendo assim, existe uma relação entre dose e a especificidade do tecido irradiado (HENRIQUES; CAZAL; CASTRO, 2010; PROCKT; TAKAHASHI; PAGNONCELLI, 2008). Porém, existe uma conhecida dose resposta bifásica, que compreende o intervalo de energia em que está localizado o limiar terapêutico e o limiar tóxico. Dessa forma é importante adequar a dosimetria ao efeito desejado (PRINDEZE; MOFFATT; SHUPP, 2012). A interação do laser de baixa potência com tecido geralmente não provoca elevação rápida e expressiva na temperatura tecidual (EBRAHIMI et al., 2012).

A ação do laser de baixa intensidade acontece por meio da indução de reação fotoquímica na célula. O mecanismo de ação dessa terapia é proposto por meio de uma teoria segundo a qual o laser pode influenciar os receptores das células, mecanismo denominado fotoestímulo. A energia contida nos fótons (fotônica) é absorvida pelos cromóforos de celulares que, uma vez excitados, podem passar de um nível de energia inferior para um superior. Essa energia é transformada em energia metabólica, que entrará na cadeia respiratória da mitocôndria (BARBOZA et al., 2014). A energia fotônica é convertida energia química. O ATP, que possui funções relevantes no metabolismo celular, como a regulação da síntese de proteínas e de DNA, favorece a ativação das proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK 1 e 2) em fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A cascata de sinalização celular regulada pela ERK desempenha um importante papel na proliferação celular em várias linhagens de células.

Na laserterapia de baixa intensidade o efeito fisiológico da proliferação das células é relevante para as práticas de cultivo celular e clínicas. Esse efeito é consequência da ativação da cadeia respiratória mitocondrial e da cascata de sinalização. As alterações relativas aos fotorreceptores são consideradas reações primárias e as reações secundárias são as modificações na sinalização celular, funções celulares e sinalização retrógrada da mitocôndria (SRM). A SRM baseia-se em enviar informações sobre as alterações do funcionamento mitocondrial ao núcleo, justamente o inverso do caminho comum (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; KARU, 2010). Para ilustrar esta situação, pode-se mencionar Karu (1998), que cita a irradiação da linhagem de células HeLa *in vitro*. A constatação da proliferação foi realizada pela análise quantitativa por meio de incorporação de precursores radioativos em RNA e DNA, e observou-se que estes variam sua quantidade em consonância da fluência do laser utilizado.

Existem relatos indicando que a fotobioestimulação é efetuada através da cadeia de transporte de elétrons, fazendo com que resulte na elevação da taxa de respiração celular. Após a laserterapia de baixa intensidade, obtém-se: aumento da microcirculação, elevação da produção de adenosina trifosfato (ATP), síntese de DNA e RNA. Consequentemente acontece uma melhora na oxigenação, nutrição e regeneração, bem como em um eficiente sistema de transporte de elétrons mitocondriais (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012). A elevação na concentração do íon cálcio pode acarretar o aumento do potencial da membrana mitocondrial (MMP), do ATP e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico), tendo como consequência o restabelecimento da homeostase das células que anteriormente haviam sofrido danos (ZUNGU; EVANS; ABRAHMSE, 2009; KUSHIBIKI et al., 2013). A irradiação com laser em 633nm (em fígado de ratos) eleva o MMP e o gradiente de prótons, fomentando alterações nas propriedades ópticas das mitocôndrias, relacionadas a NADH desidrogenase, síntese de RNA, aumento de troca ADP/ATP e proteínas mitocondriais.

A citocromo c oxidase, ou complexo IV da cadeia respiratória, é um complexo de proteína transmembranar que apresenta dois centros heme e o íon ferro (CHUNG et al., 2012). O complexo IV transfere um elétron da citocromo c e transfere para o oxigênio e, no final desse processo, forma água. A citocromo c é considerada uma hemoproteína, devido ao fato de possuir um grupamento heme interligado a um íon ferro. Essa hemoproteína pode ser encontrada na forma oxidada ou reduzida. A citocromo c oxidase apresenta a capacidade de absorver a luz irradiada de um comprimento de onda definido, posterior à irradiação com laser de baixa intensidade, e também uma elevação na atividade enzimática. Cabe salientar que os componentes de cobre do complexo IV da cadeia respiratória (Cu_A e Cu_B) são fotoceptores tendo a possibilidade de ser oxidados ou reduzidos, favorecendo a sinalização celular e a sinalização retrógrada mitocondrial (KARU, 1998).

A laserterapia de baixa intensidade oferece uma grande variedade de alterações fotoquímicas, fotofísicas e/ou fotobiológicas em seus possíveis alvos, modificações em diferentes níveis, sendo molecular, celular e tecidual (CHUNG et al., 2012; LINS et al., 2010). A fotobiomodulação proporcionada pelo laser de baixa intensidade é uma alternativa para a ativação ou inibição de processos fisiológicos, bioquímicos e fotoquímicos, tendo como consequência: proliferação celular, morfodiferenciação, neoformação tecidual, redução de edema e reparação tecidual.

A regulação do ciclo celular pode aumentar a taxa de transferência de elétrons da citocromo c oxidase, acelerando, conseqüentemente, o metabolismo celular através das cascatas de ser, um dos efeitos da irradiação com laser Hélio-Neônio (He-Ne) sobre as populações celulares (KARU, 2003). Para ocorrer a proliferação celular como uma das conseqüências da interação do laser de baixa intensidade com as células, é necessário que a irradiação esteja em doses de $2\text{J}/\text{cm}^2$, porém em doses de $16\text{J}/\text{cm}^2$, a laserterapia causa supressão, desta forma evidenciando uma dependência dose-resposta biológica (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

Atualmente estão sendo realizados inúmeros estudos a respeito da ação do laser de baixa intensidade sobre diferentes linhagens celulares, entre elas células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, mioblastos, células-tronco, células esqueléticas, mastócitos e células mesenquimais (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; KUSHIBIKI et al., 2013; CHUNG et al., 2012).

Silva et al. (2016) utilizaram cultura de fibroblastos e cultura de células tumorais expostas a duas doses de radiação ionizante 2,5 Gy e 10 Gy. Após 24h as duas populações celulares foram irradiadas com laser GaAIs (660 nm) com as fluências $30\text{ J}/\text{cm}^2$, $90\text{ J}/\text{cm}^2$ e $150\text{ J}/\text{cm}^2$, sendo a potência de saída 40 mW. Os experimentos demonstraram que obteve-se um aumento da viabilidade celular dos fibroblastos submetidos a 2,5 Gy e 10 Gy de radiação ionizante e tratadas com TLBI nas fluências de $90\text{ J}/\text{cm}^2$ e $150\text{ J}/\text{cm}^2$.

Zungu, Evans e Abrahmse (2009) simularam situações de hipóxia e acidose (pH=6,7) em cultura de fibroblastos da pele humana, o grupo controle correspondia às condições de uma ferida. O laser utilizado foi He-Ne (632,8 nm, 3 mW), em 5 ou $16\text{ J}/\text{cm}^2$. Avaliou-se o potencial da membrana mitocondrial. A hipóxia e a acidose foram reduzidas nos grupos tratados com laser He-Ne $5\text{ J}/\text{cm}^2$ e foi possível notar uma elevação na resposta mitocondrial.

Silveira (2013) avaliou a ação da terapia laser de baixa intensidade (TLBI) sob vários aspectos: processo de cicatrização de ferimentos dérmicos, modelos de lesão muscular e cadeia respiratória em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético. Foram utilizados dois laseres: He-Ne (632 nm) e Arseneto de Gálio (AsGa) (911 nm), nas doses de 1 e $3\text{ J}/\text{cm}^2$. Obtiveram-se os melhores resultados acerca do fechamento de feridas nessas doses. A irradiação com doses de 30 e $60\text{ J}/\text{cm}^2$, após 5 minutos, aconteceu uma elevação das atividades dos complexos I (NADH-Ubiquinona Redutase) e IV (Citocromo c Oxidase) das mitocôndrias saudáveis.

Decorrida uma hora da irradiação nas doses de 10, 30 e 60 J/cm², observou-se o aumento na atividade do complexo IV. Também se verificou uma aceleração no processo inflamatório agudo da lesão muscular e um acréscimo na velocidade de cicatrização do ferimento, que pode ter relação com o aumento da energia mitocondrial.

Alguns estudos apontam para benefícios na relação da TLBI e as células do tecido ósseo. Pinheiro e Gerbi (2006) mencionam que no osso irradiado, especialmente nos comprimentos de onda do infravermelho, é possível notar um aumento na proliferação de osteoblastos, deposição de colágeno, neoformação do osso, se comparado ao osso não irradiado.

Em diferentes estudos foram observados aspectos positivos relacionados com a utilização do laser de baixa intensidade, como: aumento na proliferação celular (MEDRADO et al., 2003); aumento da mobilidade e proliferação de neoblastos de *Girardia tigrina* em fragmentos regenerantes irradiados com laser diodo (880nm), se comparados com os tratados com ausência de luz, luz ambiente, luz branca, luz vermelha (WU; PERSINGER, 2011); fragmentos regenerantes pré e pós-auriculares de *Girardia tigrina* foram submetidos a 14 sessões de irradiação com laser 660 nm, $3,3 \pm 0,3$ mW de potência, usando $0,94\text{mW/mm}^2$ de densidade de energia, utilizando 1 e 3 minutos de irradiação. Os fragmentos pós-auriculares, irradiados por 3 minutos, apresentaram aspectos histológicos semelhantes a fragmentos não regenerantes (LOPES; CAMPOS VELHO; MUNIN, 2009).

Para o estudo da biologia das células-tronco, uma das alternativas é o cultivo e manutenção destas. Mas tendo em vista o alto custo para o cultivo das células-tronco humanas, a utilização de modelos experimentais, como planárias, que apresentam um reservatório de células-tronco adultas durante toda a vida, tornam-se necessários a viabilização e o estabelecimento de cultura de neoblastos de planárias da espécie *Girardia tigrina* para o estudo da biologia celular das células-tronco.

3 METODOLOGIA

Neste item descreveremos a metodologia que guiou cada um dos trabalhos ora apresentados.

Artigo 1: LOPES, K.A.R.; CAMPOS VELHO, N.M.R.; PACHECO-SOARES, C. Method of isolation and characterization of *Girardia tigrina* stem cells. BIOMEDICAL REPORTS, v. 3, p. 163-166, 2015. (Anexo A).

Estabelecimento e caracterização da cultura de neoblastos de *Girardia tigrina*.

Foram selecionados 24 espécimes de *Girardia tigrina* submetidos a supressão alimentar. Inicialmente as planárias passaram por dois banhos em uma solução de água ultrapura e antibiótico, posteriormente incubadas por 48 horas, em solução de tripsina e antibiótico. Em seguida, homogeneizadas, centrifugadas e o sedimento celular obtido foi ressuspensão em meio Dulbecco modificado de Iscove – IMDM, suplementado com soro fetal bovino.

As amostras foram incubadas em três temperaturas (4, 18 e 37 ° C) durante 48 horas para verificar a influência da temperatura sobre a integridade da membrana. A viabilidade celular foi avaliada com azul de tripan (Sigma, Co. St. Louis, MO). Realizou-se a contagem das células para determinar a percentagem de dano da membrana nas diferentes temperaturas.

Para a purificação dos neoblastos, 6 ml de células foram ressuspensas em meio Dulbecco modificado de Iscove - IMDM e adicionou-se 6 ml de Histopaque 1077. Esta suspensão foi centrifugada. Logo após, foram colhidas a partir de cada uma das interfases e monitorou-se a cultura durante dez semanas. Para a análise da cultura total de células e gradientes utilizou-se a microscopia óptica e de fluorescência.

Artigo 2: LOPES, K.A.R; CAMPOS VELHO, N.M.R.; PACHECO-SOARES, C. Biostimulation of stem cells in *Girardia tigrina* (Tricladida: Dugesiidae). Zoology (submetido aguardando avaliação). (Anexo B)

Bioestimulação de células-tronco em *Girardia tigrina* (Tricladida: Dugesiidae).

Trinta espécimes de *Girardia tigrina* foram submetidos a supressão alimentar. Inicialmente as planárias passaram por dois banhos em uma solução de água ultrapura e antibiótico, posteriormente incubadas por 48 horas, em solução de tripsina e antibiótico. Em seguida, foram homogeneizadas, centrifugadas e o sedimento celular obtido foi ressuspensão em 2 ml de PBS estéril e montou-se um gradiente de sacarose: solução a 35% (1 ml), 30% (1 ml), 27,5% (2 ml), 25% (3 ml), 20% (3 ml), 15% (1 ml) e 2 ml de amostra. Em seguida, centrifugou-se. Logo após a centrifugação, foram lavados com PBS e novamente centrifugados. O sedimento celular obtido foi ressuspensão em meio Dulbecco modificado de Iscove – IMDM, suplementado com soro fetal bovino.

Posteriormente realizou-se o teste de viabilidade celular das células totais do grupo controle (não irradiado) e dos gradientes irradiados (1 e 2), utilizou-se o azul de Trypan pelo método padrão de Reeb (1992) e, para a contagem das células, considerou-se como não viáveis apenas as marcadas em azul.

Para a realização da irradiação dos gradientes 1 e 2, ambos foram acondicionados em placas de 24 poços e submetidos a três sessões de irradiação com intervalos de 24 horas. O laser de baixa intensidade utilizado possuía os seguintes parâmetros: 685 nm de comprimento de onda, fluência de 1,2 J/cm² e 13 mW de potência. Importante ressaltar que o grupo controle não foi irradiado.

As ferramentas empregadas para a caracterização e análise dos gradientes 1 e 2 foram as seguintes: microscopia óptica e de fluorescência, imunofluorescência do Oct 4 e microscopia eletrônica de varredura.

Artigo 3: LOPES, K. A. R.; MANGOLIN, J. M.; SALLES, G. N.; SILVA, N. S. da; CAMPOS VELHO, N. M. R. de; PACHECO-SOARES, C. Comparative study of Low Level Laser Therapy in human and planarian stem cells.

Estudo comparativo da terapia laser de baixa intensidade em células-tronco humanas e de planárias (Anexo C).

Cultura de células

As linhagens celulares derivadas a partir do tecido conjuntivo do prepúcio humano (HFF-1) foram cultivadas em meio Dulbecco modificado de Eagle, enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico.

As células estaminais humanas embrionárias (MEL-1) foram cultivadas em meio DMEM-Knockout suplementado com Pen Strep, Gluta-MAX, NEAA (Aminoácidos não essenciais), 2-mecaptoetanol, substituição de soro, bFGF (fator de crescimento de fibroblastos, recombinante humano), LIF (fator inibidor de leucemia) e L-glutamina. Para o cultivo da linhagem celular MEL-1, as células HFF-1 foram utilizadas como uma monocamada alimentadora na concentração de 105 células/ml. Para inativação das células HFF-1, utilizou-se a mitomicina C.

Os neoblastos foram obtidos a partir de espécimes de *Girardia tigrina*, de acordo com Lopes et al. (2015). As células eram cultivadas em meio Dulbecco modificado de Iscove – IMDM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antimicótico.

Laserterapia de baixa intensidade (LBI)

Anteriormente à irradiação, o meio foi retirado e adicionou-se a solução salina de Hank. As células da linhagem MEL-1 foram irradiadas com um dispositivo laser fosfeto de índio gálio-alumínio (InGaAlP) semiconductor clínico portátil operando de modo contínuo, comprimento de onda 685nm, potência de saída de 30mW e área de 0,5 cm² local. Os neoblastos foram irradiados com o mesmo dispositivo laser, comprimento de onda 685nm, potência de saída de 13mW e dose de 1,2 J/cm². A sonda foi posicionada na perpendicular a cada poço, a uma distância de 0,5 cm para a irradiação laser. Foram realizadas três sessões de irradiação com intervalo de 24 horas cada.

Viabilidade celular

O método de exclusão do corante azul de tripan foi utilizado para determinar a viabilidade celular. Para cada experimento independente foram contadas as células viáveis e não-viáveis (acúmulo de corante). A contagem foi realizada a partir de duas réplicas de poços por condição experimental. A porcentagem de morte celular nos poços de repetição foi calculada como média. Além disso também foram contadas as células viáveis.

Fluorescência

Para avaliar o potencial celular pluripotente dos neoblastos, a suspensão e as células MEL-1 foram incubadas após irradiação com o anticorpo Oct-4 e Clone 9E 3.2, por 60 minutos a 37°C, antes de serem lavados com tampão fosfato salina (PBS) contendo 2% de albumina de soro bovino (BSA). Posteriormente, as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com Fluoresceína (FITC) durante 60 minutos. A suspensão celular foi lavada com PBS e distribuída em placas de 24 poços para a realização da leitura de fluorescência e microscopia de fluorescência. A fluorescência foi determinada por meio de um leitor de intensidade fluorescente em espectrofotômetro e em microscopia de epeifluorescência para obtenção de fotomicrografias.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma 6,01. Os dados foram comparados por análise de variância, seguidos pelo teste de Tukey, com configuração do nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os experimentos foram realizados em quadruplicata, com dois experimentos independentes.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão descritos em três artigos, os quais dois serão publicados. E um aceito e publicado na Biomedical Reports.

4.1 Artigo 1 - LOPES, K.A.; DE CAMPOS VELHO, N.M.; PACHECO-SOARES, C. Method of isolation and characterization of *Girardia tigrina* stem cells. *Biomed Rep.* v. 3, n.2, p. 163-166, Mar. 2015. Descrição dos resultados do artigo 1 (Anexo A).

4.2 Artigo 2 - LOPES, K.A.R.; CAMPOS VELHO, N.M.R.; PACHECO-SOARES, C. Biostimulation of stem cells in *Girardia tigrina* (Tricladida: Dugesiidae). Descrição dos resultados do artigo 2 (Anexo B).

4.3 Artigo 3 - LOPES, K. A. R.; MANGOLIN, J. M.; SALLES, G. N.; SILVA, N. S.; CAMPOS VELHO, N. M. R. de; PACHECO-SOARES, C. Estudo comparativo da terapia laser de baixa intensidade em células-tronco humanas e de planárias (Anexo C).

5 DISCUSSÃO

As células-tronco têm sido amplamente estudadas com a finalidade de entender sua biologia para posterior utilização como uma alternativa denominada terapia celular, que visa o tratamento de várias doenças como: cardíacas, hepáticas, neurológicas, auto-imunes, ósseas entre outras. A capacidade das células-tronco de diferenciar-se é variável, podendo ser denominadas: (a) embrionárias totipotentes, diferenciam-se em qualquer tipo de célula; (b) adultas pluripotentes, diferenciam-se em células pertencentes aos folhetos germinativos; (c) ou multipotentes, diferenciam-se em células de seu folheto germinativo de origem; e as induzidas em que é realizada a reprogramação celular e é obtida uma célula-tronco pluripotente (FRITSCH et al., 2007).

Outra ferramenta alternativa utilizada na medicina é a laserterapia de baixa intensidade, com o propósito de bioestimulação celular, atuando diretamente na proliferação celular a fim de acelerar o processo. Dessa forma, o uso da laserterapia de baixa intensidade, aliada às células-tronco, pode ser uma chance para aumentar a população de células indiferenciadas, sendo ferramenta importante nos processos de cicatrização. Dependendo do comprimento de onda utilizado, da dose e da linhagem de célula-tronco, é possível obter a proliferação e diferenciação celular. Salienta-se que é necessária a padronização dos parâmetros do laser para que seja possível inferir com segurança os efeitos sobre a população celular.

Para o estudo da biologia das células-tronco e dos efeitos da fotobiomodulação sobre essa linhagem celular, podem ser empregados modelos experimentais que apresentem características como: organismos mais simples filogeneticamente e células-tronco com os domínios gênicos e fatores de transcrição conservados em organismos mais complexos (p. ex.: mamíferos), apesar das derivações. Nesse enredo, podem-se salientar os inúmeros atributos das planárias como modelos experimentais que atendem os requisitos citados anteriormente. As planárias apresentam um reservatório de células-tronco adultas denominadas neoblastos, durante toda a vida, que perfazem cerca de 20 a 30% das células que constituem seu organismo. Esse é mais um fator que favorece a utilização das planárias como modelo experimental no estudo da biologia das células-tronco e do efeito da fotobiomodulação das células-tronco.

Um caminho para estudar o efeito da fotobiomodulação sobre os neoblastos de *Girardia tigrina* é, primeiramente, o estabelecimento da cultura de células totais. Posteriormente, o fracionamento para obtenção do gradiente rico em neoblastos, a caracterização dos gradientes visando principalmente a presença dos neoblastos para a escolha do gradiente a ser irradiado com o laser de baixa intensidade. Nesse sentido, o presente estudo percorreu essas etapas como discutido a seguir.

Para o estabelecimento da cultura de neoblastos de *G. tigrina*, utilizando exemplares intactos, é relevante levar em consideração alguns aspectos como:

(a) supressão de alimentação, importante para a redução da contaminação. A preparação dos espécimes para o pré-estabelecimento da cultura no presente estudo foi de sete dias, mas para os autores Stuart et al. (1995), Bender et al. (2012), Fukushima e Matsuda (1991), Behensky, Schürmann e Peter (2001), Schürmann e Peter (2001), Muñoz-Marmol et al. (1998), Orii, Sakurai e Watanabe (2005), Hwang et al. (2004), Higuchi et al. (2007), Sato et al. (2006), Hayashi et al. (2006), Conte et al. (2009, 2010), Fernández-Taboada et al. (2010) e Asami et al. (2002), este período variou de sete a quinze dias. Também é relevante salientar a duração dos banhos na solução de antibiótico e água ultrapura estéril por 30 minutos, se comparado a outros experimentos em que a duração do banho foi de 24 horas, como em Behensky, Schürmann e Peter (2001), Schürmann e Peter (2001) e Schürmann, Betz e Peter (1998).

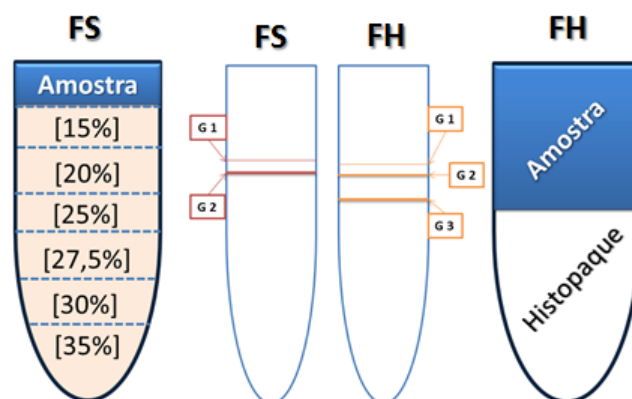
(b) a desintegração dos exemplares. Para estabelecer a cultura primária utilizou-se uma solução na proporção de 1:1 de antibiótico e tripsina incubados durante 48 horas, diferindo de: Asami et al. (2002), Hayashi et al. (2006), Higuchi et al. (2007) e Bender et al. (2012), que incubaram os espécimes em uma solução de Holtfreter 5/8, tripsina e posterior pipetagem; Schürmann, Betz e Peter (1998) utilizaram desintegração enzimática e mecânica; Saló e Baguñà (1989) e Behensky, Schürmann e Peter (2001) realizaram a desintegração mecânica somente.

(c) a viabilidade das células está relacionada à temperatura utilizada no cultivo e à ação da enzima digestiva tripsina. A tripsina possui um ótimo desempenho a 37°C, porém podendo afetar a integridade da membrana. Por esta razão, foram realizados ensaios com três temperaturas para o cultivo das células de *G. tigrina*, sendo 4°C, 18°C e 37°C. Observou-se que nas temperaturas de 4°C e 18°C ocorreram os menores índices de danos à integridade da membrana, confirmando os dados obtidos por Terraciano et al. (2004), que testaram em células

testiculares. Em relação à tolerância térmica de *G. tigrina*, Campos Velho (2011) efetuou experimentos em diferentes temperaturas e constatou que, depois de 96 horas submetidos à temperatura de 33°C, foi observada a mortalidade acima de 50% dos espécimes.

A purificação em gradiente de Histopaque (GH) e no gradiente de sacarose (GS) foram metodologias eficazes para obtenção de um gradiente rico em neoblastos. Com o uso de GH, foram obtidas três bandas que correspondiam respectivamente aos gradientes (1, 2 e 3) e, para GS, apenas duas bandas, indicando a formação de dois gradientes (1 e 2) (figura 5). Para as duas metodologias de purificação, o gradiente que exibiu o predomínio de neoblastos correspondia ao gradiente 1, que apresentava menor densidade. Os gradientes 2 e 3 demonstraram um domínio de outros tipos celulares. Salienta-se que os gradientes formados no GS eram mais puros se comparados ao GH. No gradiente 2 do GS foram encontrados muito agregados de células, podendo indicar a ação do muco liberado durante a desagregação das células para a obtenção da amostra, que foi submetida às duas metodologias de fracionamento. Nesses agregados celulares é possível que houvesse a presença de neoblastos, embora não tenha sido possível sua identificação. Como já foi mencionado anteriormente, para a identificação dos neoblastos utilizou-se a morfologia e a relação núcleo citoplasma.

Figura 6 - Gradientes formados em ambas metodologias de purificação.



Nota: Fracionamento de sacarose (FS) e fracionamento de Histopaque (FH). G1: gradiente 1, G2: gradiente 2 e G3: gradiente 3.

A utilização da centrifugação das amostras de tecidos desagregados em gradientes de diferentes densidades, objetivando a separação de diferentes tipos

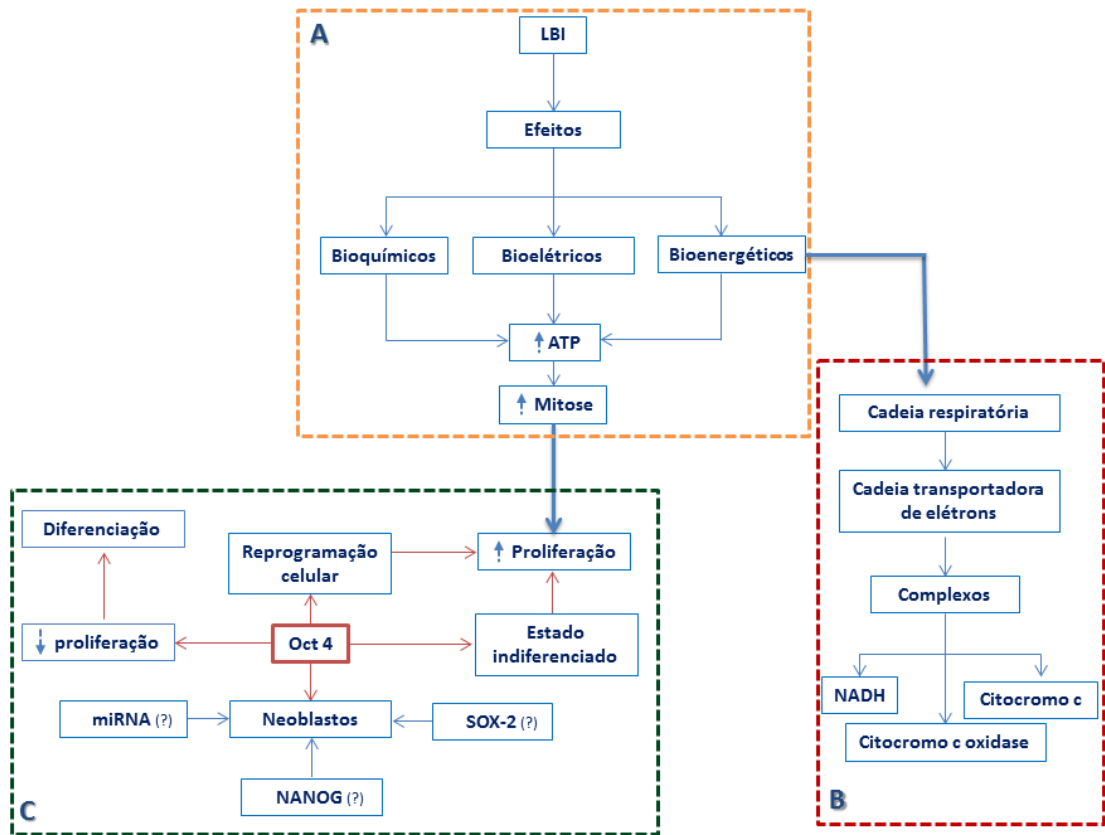
celulares, é uma alternativa, pois são formados os diferentes gradientes, constituídos por tipos de células que têm densidade similar. Com esse intuito, os resultados obtidos no presente estudo corroboram Schürmann, Betz e Peter (1998), embora tenham realizado esta metodologia para a separação dos diferentes subtipos de neoblastos, com sucesso para a diferenciação dos subtipos.

Embora sejam utilizadas outras metodologias para separar os neoblastos de outros tipos celulares, Fernández-Taboada et al. (2010) diferenciaram populações celulares por meio da análise da separação de células ativadas por fluorescência (FACS), levando-se em consideração aspectos como: tamanho e relação núcleo citoplasma, estando de acordo com a caracterização empregada no presente estudo, embora não tenha sido realizado FACS, apenas a caracterização morfológica e marcação com corantes com Dapi e Calceína AM. Em alguns estudos são usadas combinações de radiação X e FACS para a separação das populações de células sensíveis e insensíveis à radiação X, pois os neoblastos são sensíveis a esse tipo de radiação. Posterior à irradiação, são obtidas três populações, sendo duas sensíveis (X1 e X2), constituídas por neoblastos, e uma insensível, composta por células diferenciadas (XINS) (ÖNAL et al., 2012; MORITZ et al., 2012; HAYASHI et al., 2006; HIGUCHI et al., 2007).

Após a caracterização dos gradientes obtidos nos fracionamentos, realizou-se o cultivo de cada um deles em meio Dulbecco modificado de Iscove – IMDM, suplementado com soro fetal bovino. Posteriormente ao estabelecimento da cultura dos gradientes, realizou-se a biomodulação por meio do laser de baixa intensidade, o que promoveu um aumento nas populações celulares, dos neoblastos e de outros tipos de células.

A viabilidade celular não ficou comprometida. Sabe-se que os neoblastos têm a capacidade de diferenciar-se e podem ter sua origem de um processo de desdiferenciação, mas não foi possível identificar a ocorrência da desdiferenciação, diferenciação ou a manutenção do estado indiferenciado dos neoblastos, pois não foram utilizadas ferramentas de biologia molecular suficientes para esta análise. Dessa forma, sugere-se que a interação entre o laser de baixa intensidade e os neoblastos pode resultar em modificações na cascata de sinalização celular (figura 6). A presença do fator de transcrição OCT 4 é característico em células indiferenciadas e foi possível constatar por meio da imunofluorescência.

Figura 7 - Modelo proposto dos efeitos da biomodulação com laser de baixa intensidade (LBI) sobre os neoblastos de *Girardia tigrina*.



Nota: (A) Efeitos da biomodulação. (B) Ação sobre a cadeia respiratória e cadeia transportadora de elétrons. (C) Ação da biomodulação sobre o estado diferenciado e indiferenciado dos neoblastos de *G. tigrina*. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Para o estabelecimento da cultura de células de *Girardia tigrina* é imprescindível a desintegração dos exemplares. Com esta finalidade, a incubação na solução de tripsina e antibiótico (1:1) durante 48 horas a 18°C foi eficiente. O cultivo e a manutenção da cultura de células primárias de *G. tigrina* em meio IMDM, suplementado com soro fetal bovino (10%), obteve sucesso.

O gradiente de sacarose foi mais efetivo favorecendo a obtenção de uma cultura mais rica de neoblastos, se comparado ao gradiente de Histopaque.

O laser de baixa intensidade utilizado atuou positivamente na proliferação celular, tanto nas populações de células diferenciadas quanto nas indiferenciadas.

A viabilidade celular não ficou comprometida nas metodologias de purificação celular e na posterior irradiação dos gradientes obtidos.

A utilização da imunofluorescência com anti-Oct4 foi eficaz para identificação complementar dos neoblastos.

A utilização de planárias como modelos experimentais para o entendimento da interação laser de baixa potência e os neoblastos pode ser uma alternativa para a obtenção de informações a respeito das possíveis interferências nas vias de sinalização celular com enfoque na proliferação, diferenciação, renovação para a manutenção da homeostase e reprogramação. Assim, há uma possibilidade de futura aplicação para o tratamento de patologias e ressalta-se que as planárias possuem vários genes conservados encontrados em mamíferos, sendo mais um aspecto de elevada importância para elucidação de inúmeras variáveis nesta interação.

REFERÊNCIAS

ABOUBAKER, A. A. Planarian stem cells: a simple paradigm for regeneration. *Trends in Cell Biology*, v. 21, n. 5, p. 304-311, 2011.

Acesso em: 12 nov. 2016.

ADELL, T.; CEBRIÁ, F.; SALÓ, E. Gradients in planarian regeneration and hoemostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v.2, n.1, p.a 000505, 2010.

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

ALVARADO, A. A. Regeneration and the need for simpler model organisms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, v. 359, n. 1445, p. 759-763, 2004.

ALVES, E. A. et al. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Volume 2. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV), Instituto Oswaldo Cruz (IOC), 2010. p. 215-252. Disponível em: [http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2\[1\].pdf](http://www.fiocruz.br/ioc/media/vol_2[1].pdf) Acesso em: 25/03/14.

ASAMI, M. Et al. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by Fluorescence active cell sorting (FACS). *Zoological Science*, v. 19, p. 1257-1265, 2002.

BARBOZA, C. A. G. et al. Laser de baixa intensidade induz à proliferação in vitro de células-tronco mesenquimais. *Einstein*, v. 12, n. 1, p. 75-81, 2014.

BEHENSKY C.; SCHÜRMAN, W.; PETER, R. Quantitative analysis of turbellarian cell suspensions by fluorescent staining with acridine orange and video microscopy. *Belgian Journal of Zoology*, v.131, suppl., p.131-136, 2001.

BELY, A. E.; SIKES, J. M. Acoel and platyhelminth models for stem-cell research. *Journal of Biology*, v. 9, p. 14, 2010.

BENDER, C. E. et al. Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 13, p. 4904-4909, 2012.

BOWNES, J. B. et al. Xenbase: a Xenopus biology and genomics resource. *Nucleic Acids Research*, v. 36 (suppl 1), pp. D761- D767, 2008.

CALLAERTS, P. et al. Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact planarian *Dugesia (G) tigrina*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, pp. 558-563, 1999.

CAMPOS VELHO, N. M. R. de *Planárias límnicas (Tricladida: Dugesiidae) como modelos em experimentos de regeneração em ambientes de microgravidade e*

hipergravidade. 2011. Tese (Doutorado em Biologia) – Programa de Pós-graduação em Biologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2011.

CARVALHO, R. D. S. *Obtenção de DNA genômico de Girardia tigrina e estabelecimento de progênie para a extração de RNA total a partir de blastemas regenerantes submetidos à hipergravidade*. 2013. 1 disco laser. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013.

CHEW, J. L. et al. Reciprocal transcriptional regulation of *POU5f1* and *Sox2* via Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, n. 14, p. 6031-6046, 2005

CHOI, E.; CHOI, E.; HWANG, K. C. Micro RNAs as novel regulators of stem cell fate. *World Journal of Stem Cell*, v. 5, n. 4, p. 172-187, 2013.

CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low level laser (light) therapy. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 40, n. 2, 2012.

CONTE, M. et al. A mortalin-like gene is crucial for planarian stem cell viability. *Development Biology*, v. 334, p. 109-118, 2009.

CONTE, M. et al. Characterization of hsp genes in planarian stem cells. *Belgian Journal of Zoology*, v.140, Suppl, p. 137-143, 2010.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A. Avanços no estudo das células-tronco no Brasil e suas implicações. *Revista Ceres*, v. 56, n. 4, p. 446-450, 2009.

DIAS, I. F. L. et al. Effects of light on biological systems. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 30, n. 1, p. 33-40, 2009.

EBRAHIMI, T. et al. influence of low-intensity laser therapy on bone healing. *Journal of Dentistry*, v. 9, n. 4, p. 238-248, 2012.

EISENHOFFER, G.T.; KANG H.; ALVARADO, A. S. Molecular analysis of stem cells and their descendents during cell turnover and regeneration in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Cell Stem Cell*, v. 3, p. 327-339, 2008.

ENGEL, K.W.; KHAN, I.; ARANY, P. R. Cell lineage responses to photobiomodulation therapy. *Journal of Biophotonics*, p.1-9, 2016.

ERCLIK, T. et al. Eye evolution at high resolution: the neuron as a unit of homology. *Developmental Biology*, v. 332, p. 70-79, 2009.

ESTRELA, C et al. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, v. 22, n. 2, p. 91-98, 2011.

FERNÁNDEZ-TABOADA, E. A proteomics approach to decipher the molecular nature of planarian stem cells. *BioMed Central Genomics*, v.12, p.1471-2164, 2011.

FERNANDEZ-TABOADA, E. et al. Smed-SmB, a member of the LSm protein superfamily, is essential for chromatoid body organization and planarian stem cell proliferation. *Development*, v. 137, p. 1055-1065, 2010.

FRITSCH, M. et al. *Células-tronco: uma visão do especialista*. Caxias do Sul (RS): Educs. 2007. p. 19-82.

FUKUSHIMA, T.; MATSUDA, R. Experiments with culture media for planarians cells. *Hydrobiologia*, v. 227, p. 187-192, 1991.

GALLIOT, B.; GHILA, L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular Reproduction & Development*, v. 77, p. 837-855, 2010.

GENOVESE, W. J. *Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia*. São Paulo: Editora Lovise Ltda, 2000, 175p.

GIBBS, K. M.; SZARO, B. G. Regeneration of descending projections in *Xenopus laevis* tadpole spinal cord demonstrated by retrograde double labeling. *Brain Research*, v. 1088, p. 68-72, 2006.

GONZÁLEZ-ESTÉVEZ, C. et al. Diverse miRNA spatial expression patterns suggest important roles in homeostasis and regeneration in planarians. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 53, n. 4, p. 493-505, 2009.

GONZÁLEZ-ESTÉVEZ, C. et al. *Gtdap-1* promotes autophagy and is required for planarian remodeling during regeneration and starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 33, p. 13373-13378, 2007.

GOSS, R. J. *Principles of Regeneration*. New York, NJ: Academic Press; Brown University, 1969.

GRECCO, A. *Células-tronco, uma revolução científica*. São Paulo: Oirã, 94 p., 2008.

GUO, T.; PETERS, A.H. F. M.; NEWMARK, P. A. A *bruno-like* gene is required for stem cell maintenance in planarians. *Developmental Cell*, v. 11, p. 159-169, 2006.

HAYASHI, T. et al.. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cell by fluorescence-activated cell sorting. *Development Growth and Differentiation*, v. 48, p. 371-380, 2006.

HENRIQUES, A. C. G.; CAZAL, C.; CASTRO, J. F. L. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, v. 37, n. 4, p. 295-302, 2010.

HIGUCHI, S. et al. Characterization and categorization of fluorescence activated cell sorted planarian stem cells by ultrastructural analysis. *Development Growth and Differentiation*, v. 49, p. 571-581, 2007.

HWANG, J.S. et al. Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay. *Gene*, v. 333, p.15-25, 2004.

INSTITUTO de Pesquisa Com Célula Tronco. *Células-tronco*. 2013. Disponível em: <http://celulastroncors.org.br/celulas-tronco-2/> Acesso em: 05 Jan. 2017.

ISAEVA, V. V. et al. Morphofunctional organization of reserve stem cells providing for asexual and sexual reproduction of invertebrates. *Ontogenez*, v. 40, n. 2, p. 83-96, 2009.

ISAEVA, V. V. Pluripotent gametogenic stem cells of asexually reproducing invertebrates. In: KALLOS, M. (ed.). *Embryonic stem cells: basic biology to bioengineering*. Croatia: InTech, 2011. Cap. 23, p. 449-478. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/embryonic-stem-cells-basic-biology-to-bioengineering> Acesso em: 15/05/ 2012.

JAMES-ZORN, C. et al. Xenbase: expansion and updates of the *Xenopus* model organism database, *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, p. D865-D870, 2013.

KARAMZADEH, R.; ESLAMINEJAD, M. B. Dental-Related Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine, *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. In: ANDRADES, Jose A. (Ed.). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. USA: InTech, 2013. DOI: 10.5772/55927. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/dental-related-stem-cells-and-their-potential-in-regenerative-medicine>

KARU, T. Cellular mechanisms of low power laser therapy: new questions. In: SIMUNOVIC, Z. *Lasers in Medicine and Dentistry*. Rieka: Vitgraf, 2003. vol. 3, p. 79-100.

KARU, T. Low power laser effects. In: WAINANT, R. W. *Lasers in medicine*. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 171-209.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context of new data about multiple roles ATP. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 28, n. 2, p. 159-160, 2010.

KARU, Tiina. *The science of low-power laser therapy*. North Ryde, NSW: Gordon and Breach, 1998.

KENK, R. *Index of the genera and species of the freshwater Triclad (Turbellaria) of the world*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1974. 90p.

KOZMIK, Z. The role of Pax genes in eye evolution. *Brain Research Bulletin*, v. 75, p. 335-339, 2008.

KUSHIBIKI, T. et al. Regulation of miRNA expression by low-level laser therapy (LLLT) and photodynamic therapy (PDT). *International journal of molecular sciences*, v. 14, p.13542-13558, 2013.

LINS, R. D. A. U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 6, p. 849-855, 2010.

LOPES, K. A. R.; CAMPOS VELHO, N. M. R.; MUNIN, E. A study of low power laser on the regenerative processo of *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Turbellaria; Tricladida; Dugesiiidae). *Brazilian journal of biology*, v. 69, n. 2, p. 327-332, 2009.

MAILLET, H. *O laser: princípios e técnicas de aplicação*. São Paulo: Manole, 1987. 538 p.

MARTELLO, G.; SMITH, A. The nature of embryonic stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 30, p. 647-675, 2014. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/eprint/5hmsy3tREGs9bxcuklbR/full/10.1146/annur-ev-cellbio-100913-013116> Acesso em: 08/10/2016.

MEDRADO, A. R. P. et al. A. Influence of low laser therapy on wound healing and its biological action upon miofibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 32, p. 239-244, 2003.

MORITZ, S. et al. Heterogenity of planarian stem cells in the S/G2/M phase. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 56, p. 117-125, 2012.

MUÑOZ, M. A.; VÉLEZ, I. Redescrición y algunos aspectos ecológicos de *Girardia tigrina*, *G. cameliae* y *G. paramensis* (Dugesiiidae, Tricaldida) en Antioquia, Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 78, p. 291-301, 2007.

MUÑOZ-MÁRMOL, A. M. et al. Characterization of Platyhelminth POU domain genes: ubiquitous and specific anterior nerve cell expression of different epitopes of *GtPOU-1*. *Mechanisms of Development*, v. 76, p.127-140, 1998.

NACHTRAB, G.; POSS, K. D. Toward a blueprint for regeneration. *Development*, v. 139, p. 2639-2642, 2012.

NEWMARK, P. A.; ALVARADO, A. S. Not your father's planarian: A classical model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 3, p. 210-219, 2002.

NOVIKOVA, E. L. et al. Expression of Hox genes during regeneration of Nereid polychaete *Alitta (Nereis) virens* (Annelida, Lophotrochozoa). *EvoDevo*, v. 4, p.14, 2013.

ÖNAL, P. et al. Gene expression of pluripotency determinants is conserved between mammalian and planarian stem cells. *European Molecular Biology Organization*, v. 31, p. 2755-2769, 2012.

ORII, H.; SAKURAI, T.; WATANABE, K. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Development Genes and Evolution*, 215, p. 143-157, 2005.

PASSOS, E. P. et al. Célula-tronco adulta: visão do especialista em medicina reprodutiva. In: PASQUALOTTO, F. F. *Células-tronco: uma visão do especialista*. Caxias do Sul (RS): Educs. 2007. p. 95-99.

PELLETIERI, J.; ALVARADO, A. S. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annual Review of Genetics*, v.41, p.83-105, 2007.

- PEREIRA, L. V. Células tronco: promessas e realidades da terapia celular. *Cadernos de História da Ciência*, São Paulo, v. 5, n. 2, Dez. 2009. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-76342009000200005&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 16 out. 2016.
- PINHEIRO, A. L.; GERBI, M. E. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 24, p. 166-178, 2006.
- PRINDEZE, N. J.; MOFFAT, L. T.; SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Experimental Biology and Medicine*, v. 237, n. 11, p. 1241-1248, 2012.
- PROCKT, A. P.; TAKAHASHI, A.; PAGNOCELLI, R. M. Uso de terapia com laser de baixa intensidade na cirurgia bucomaxilofacial. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 49, n. 4, p. 247-255, 2008.
- REDDIEN, P. W. et al. S. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein regulates planarians stem cells. *Science*, v. 310, n. 5752, pp. 1327-1330, 2005.
- REDDIEN, P. W.; ALVARADO, A. S. Fundamentals of planarian regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 20, p. 725-757, 2004.
- RODDA, D. J. et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *Journal Biology Chemistry*, v. 280, n. 26, p. 24731-24737, 2005.
- ROSA, Z. M. A. *Isolamento, cultivo, caracterização citoquímica e resposta de células osteoblásticas à irradiação com laser de baixa potência*. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2004.
- ROSSI, L. et al. DjPiwi-1, a member of the PAZ-PIWI gene family, defines a subpopulation of planarian stem cells. *Development Genes and Evolution*, v. 216, p. 335–346, 2006.
- ROSSI, L.; IACOPETTI, P.; SALVETTI, A. Stem cells and neural signaling: the case of neoblast recruitment and plasticity in low dose X-ray treated planarians. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 56, p. 135-142, 2012.
- ROUHANA, L. et al. Different requirements for conserved post-transcriptional regulators in planarian regeneration and stem cell maintenance. *Developmental Biology*, v. 341, n. 2, p. 429-443, 2010.
- ROUHANA, L. et al. PRMT5 and the role of symmetrical dimethylarginine in chromatoid bodies of planarian stem cells. *Development and Stem Cells*, v. 139, p. 1083-1094, 2012.
- ROURKE, D. P. Amphibian used in research and teaching. *ILAR Journal*, v.48, n.3, p. 183-187, 2007.
- SALÓ, E. The power of regeneration and the stem cell kingdom: freshwater planarian Platyhelminthes). *BioEssays*, v.28, p. 546-559, 2006.

- SALÓ, E.; AGATA, K. Planarian regeneration: a classic topic claiming new attention. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 56, n.1-3, p. 1-4, 2012.
- SALÓ, E.; BAGUÑÁ, J. Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cells movements in blastema formation. *Development*, v. 107, p. 69-76, 1989.
- SALVETTI, A. et al. *DJPUM*, a homologue of *Drosophila Pumilio*, is essential to planarian stem cell maintenance. *Development*, v. 132, p.1863-1874, 2005.
- SATO, K. et al. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of nanos-related gene in planarians. *Development Growth and Differentiation*, v. 48, p. 615-628, 2006.
- SCHÜRMAN, W.; BETZ, S.; PETER, R. Separation and subtyping of planarian neoblasts by density-gradient centrifugation and staining. *Hydrobiologia*, v. 383, p. 117-124, 1998.
- SCHÜRMAN, W.; PETER, R. Planarian cell culture: a comparative review of methods and an improved protocol for primary culture of neoblasts. *Belgian Journal Zoology*, v. 131, p. 123-130, 2001.
- SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 1, p.39, 2010.
- SHIBATA, N. et al. Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. *Developmental Biology*, v. 206, p. 73-87, 1999.
- SHIHADDEH, H. *History and recent advances of stem biology and the implications for human health*. Rhode Island: University of Rhode Island, 2015. (Senior Honors Projects. Paper 421). Disponível em:
<<http://digitalcommons.uri.edu/srhonorsprog>>Acesso em: 06 out. 2016.
- SILVA, C. R. Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblastos and tumor cells following gamma radiation exposure. *Journal of Biophotonics*, v. 9, n. 11-12, p. 1157-1166, 2016.
- SILVA, P. L. *Mecanismos celulares e teciduais da regeneração em holotúrias (Echinodermata: Holoturoidea)*. 2011. Dissertação (mestrado em Fisiologia) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- SILVEIRA, P. C. L. *Investigação do efeito do laser de baixa potência na recuperação de lesões epidérmicas e musculares em roedores*. 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- STEINER, R. New laser technology and future applications. *Medical Laser Application*, v. 21, p.131-140, 2006.
- TASAKI, J. et al. ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development and Stem Cell*, v. 138, p. 2417-2427, 2011.

TERRACIANO, P. B. et al. Isolamento de células testiculares de ratos a partir de digestão enzimática utilizando tripsina a 4°C. In: CONGRESSO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM SAÚDE DO MERCOSUL, 11.; 2004. *Anais...* Porto Alegre. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), 2004. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10183/909>> Acesso em: 24 nov. 2016.

THATCHER, E. J.; PATTON, J. G. Small RNAs have a big impact on regeneration. *RNA Biology*, v. 7, p.3, p. 333-338, 2010.

TRUEB, L.; HANKEN, J. Skeletal development in *Xenopus laevis* (Anura:Pipidae). *Journal of Morphology*, v. 214, p. 1-41, 1992.

WENEMOSER, D., REDDIEN, P. W. Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue absence. *Development Biology*, v. 344, p. 979-991, 2010.

WU, H. P.; PERSINGER, M. A. Increased mobility and stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* induced by 880 nm light emitting diode. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102, p. 156-160, 2011.

ZUNGU, I. L.; EVANS, D. H.; ABRAHMSE, H. Mitochondrial responses of normal and injured human skin fibroblasts following low level laser irradiation: an in vitro study. *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, n. 4, p. 987-996, 2009.

ANEXO A - ARTIGO 1

BIOMEDICAL REPORTS 3: 163-166, 2015

Method of isolation and characterization of *Girardia tigrina* stem cells

K.A.R. LOPES^{1,2}, N.M.R. de CAMPOS VELHO² and C. PACHECO-SOARES²¹Laboratory Planarians, Nature Study Center, University of Vale do Paraiba;²Laboratory of Dynamics of Cellular Compartments, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraiba, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil

Received December 4, 2014; Accepted December 10, 2014

DOI: 10.3892/br.2014.408

Abstract. Tissue regeneration is widely studied due to its importance for understanding the biology of stem cells, aiming at their application in medicine for therapeutic and various other purposes. The establishment of experimental models is necessary, as certain invertebrates and vertebrates have different regeneration abilities depending on their taxon position on the evolutionary scale. Planarians are an efficacious *in vivo* model for stem cell biology, but the correlation between planarian cellular and molecular neoblast pluripotency mechanisms and those of mammalian stem cells is unknown. The present study had the following objectives: i) Establish *Girardia tigrina* cell culture, ii) determine the time required for complete cell disintegration and iii) obtain neoblasts by cell subdivision. Twenty-four specimens were deprived of food for seven days. After this time, disintegration was performed by incubation protected at three temperatures for 48 h in an antibiotic, antimycotic and trypsin solution, after which the suspension was homogenized and centrifuged. Histopaque® 1077 was used for cell separation and interphases were collected and monitored by optical and fluorescence microscopy. Optical microscopy analysis informed the nucleus-to-cytoplasm ratio, cell morphology and cell size. Under fluorescence microscopy, interphase I (I1) was subdivided into two groups and neoblasts were marked for characterization; one group was stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and the other was immunolabeled with octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) and isolated and observed after 10 days of cultivation. Neoblasts predominated in I1 with a small amount of other cell types. In conclusion, sample disintegration with a trypsin and antibiotic solution was effective at 18°C and Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with fetal bovine serum was adequate for the establishment of primary cell cultures after 48-h

incubation and centrifugation. Antibody anti-OCT4 was used for the characterization of stem cells and was successfully labeled with concentrated neoblasts on interphase I.

Introduction

Regeneration is a complex event that occurs in several vertebrates and invertebrates (1). For regeneration to occur, one of the earliest signaling events following a lesion is the production of cells that are capable of rebuilding lost structures. The way that these events occur and the types of cells involved differ between animal groups (2).

The choice of planarians as a regeneration study model is based on their plasticity, regeneration ability, rapid response and adult stem cell reservoir (3). Cell and molecular characterization of planarian stem cells has been achieved with various tools, such as inhibition of the function of genes involved in regeneration via RNA interference, western blotting, *in situ* hybridization and cell isolation by flow cytometry (4-8). These tools are extremely important alternatives for understanding the mechanisms associated with the maintenance and role of stem cells *in vivo* (9).

Stem cells, also known as neoblasts, are located in the parenchyma and account for ~20-30% of the whole cells of an individual and may present morphological subtypes (10-13). Neoblasts are characterized by i) the absence of morphological cytodifferentiation signs; ii) chromatoid body or large cytoplasmic ribonucleoprotein granules; iii) large nuclei with dispersed chromatin, or large nucleoli; iv) reduced cytoplasm containing numerous ribosomes; v) little endoplasmic reticulum; vi) perinuclear germ granules; and vii) X-ray sensitivity (8,9,11,14).

The evolutionary conservation and expression of neoblasts in mammalian genes is associated with the maintenance and expression of pluripotency (15). Pluripotency transcription factors in mammalian stem cells are regulated by key genes, such as *OCT4*, *SOX2* and *NANOG*. *OCT4* is a member of the octamer-binding subgroup of the Pit-Oct-Unc transcription factor family (16,17).

Due to a lack of information on the establishment of planarian primary neoblast cultures, particularly of *Girardia tigrina*, the present study proposed a methodology for cell culture establishment and characterization of neoblasts.

Correspondence to: Dr Cristina Pacheco-Soares, Laboratory of Dynamics of Cellular Compartments, Institute of Research and Development, University of Vale do Paraiba, 2911 Av Shishima Hifumi, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil
E-mail: cpsoares@univap.br

Key words: stem cells, primary cell culture, Dugesidae

ANEXO B - ARTIGO 2

Zoologia



**Biostimulation of stem cells in *Girardia tigrina* (Tricladida:
Dugesidae)**

Journal:	<i>Zoologia</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Manuscripts
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lopes, Karla; Universidade do Vale do Paraiba Campos Velho, Nádia; Universidade do Vale do Paraiba, CEN Soares, Cristina; Universidade do Vale do Paraiba

SCHOLARONE™
Manuscripts

View Only

<https://mc04.manuscriptcentral.com/zool-scielo>

ANEXO C - ARTIGO 3

Please do not adjust margins



Journal Name

ARTICLE

Comparative study of Low Level Laser Therapy in human and planarian stem cells

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Karla Andreassa Ruiz Lopes^{1,4}, Juliana Marques Mangolin², Geisa Nogueira Salles^{3,4}, Newton Soares da Silva², Nadia Maria Rodrigues de Campos Velho¹, Cristina Pacheco-Soares⁴

Low level laser therapy (LLLT) has great potential in the modulation of cell differentiation and regeneration, and this therapy is considered a valuable tool for stem cell culture. Recent studies have demonstrated the importance of stem cells and their applications for tissue engineering; however, better comprehension of the epigenetic mechanisms is required to elucidate if cell differentiation is activated or inhibited by LLLT. This study was designed to evaluate LLLT biomodulation in humans and planarian stem cells. 30 mW and 13 mW InGaAlP (635 nm) lasers were used to irradiate cultured human and planarian (neoblast) stem cells. Cell viability was evaluated after irradiation, and the cells were stained with anti-Oct4 antibody, in order to stimulate and differentiate them. The results obtained indicated a significant increase in neoblast population and viability after LLLT. We concluded that neoblast cells are important candidates for an *in vitro* model for the effects of LLLT on stem cell proliferation, which may represent an important achievement for biological studies.

Introduction

Low-level laser therapy (LLLT) using the spectral range of 630–1000 nm play an important role in the modulation of biological processes, as seen in both cell cultures and animal models^{1, 2}. LLLT stimulates important biological effects, including cell proliferation, collagen synthesis and the release of cell growth factors³.

The application of LLLT on human mesenchymal stem cells cultivated under nutritional privative conditions using different doses of irradiation led to changes in cellular adhesion processes⁴. Several studies have shown the direct effects of low-level laser (LLL) irradiation on stem cells, including the stimulation of satellite cell proliferation, inhibition of cell differentiation⁵ and the *in vitro* expansion of umbilical cord stem cells⁶. However, further studies of the effects of LLLT on embryonic stem cells are needed in order to further explore LLLT as a therapeutic tool for cell proliferation, confirming that it does not cause molecular damage improving the clinical application of these cells.

It is known that there are a range of obstacles to culturing human stem cells, and for this reason alternative cellular cultivation methods have been suggested. One such method is the use of feeder layer, for example using human embryonic fibroblasts and

adult fallopian tube cells for the prolonged culture of undifferentiated human embryonic stem cells (hESCs); which is a great step for stem cell maintenance^{7, 8}. Also, another novel culture model for stem cells is based on the inclusion of human placenta derivative conditioned media on coated gelatine dishes, without additional exogenous supplementation or synthetic substrates specific for human pluripotent stem cell-hPSC⁹.

Although there is some research involving human stem cell proliferation, the ideal conditions for culture and maintenance of these cells has not yet been completely elucidated. So, it is important to overcome obstacles to the cultivation of human stem cells, and alternative techniques that contribute to understanding the cellular and molecular pathways involved in the maintenance and differentiation of stem cells may provide evidence for understanding the mechanisms *in vitro*.

In parallel, studies of flatworms demonstrate their great potential as experimental models¹⁰. The regenerative capacity of planarians has awakened the interest of researchers¹¹, and it is known that flatworms develop an exceptional stem cell system giving rise to all cell types during development and regeneration¹². The use of planarians as a regenerative study model is based on their plasticity, regeneration ability, rapid response and adult stem cell reservoir¹³. Lopes et al., (2015)¹⁴ describe a method for the isolation and cultivation of flatworm neoblast stem cells. These neoblast cells are very similar to the human stem cells, especially due to their expression of the Oct-4 gene, one of the key markers of human embryonic stem cells.

Universidade do Vale do Paraíba, Av. Sítio Juvêncio, 2911 – Urbanova – São José das Campos/ São Paulo - Brasil, ¹ Laboratory Planarians, ² Laboratory of Cell Biology and Tissue, ³ Laboratory of Biomedical Nanotechnology, ⁴ Laboratory of Dynamic of Cellular Compartments

Please do not adjust margins