ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS

Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais

São Paulo

2020

ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS

Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Corrêa

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Anaeliza Figueiredo dos.

Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais / Anaeliza Figueiredo dos Santos; orientador Luciana Correa. -- São Paulo, 2020.

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

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Fotobiomodulação. 2. Irradiação simultânea. 3. Estresse oxidativo. 4. Fibroblastos gengivais. I. Correa, Luciana. II. Título.

Santos AF. Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 05 / 11 / 2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Luciane Hiramatsu Azevedo

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Martha Simões Ribeiro

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a). Cibeles Pelissari dos Santos

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho aos meus pais Maria dos Anjos e Luiz Carlos, e aos meus avós, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e ajudando em todos os momentos, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Dedico ao Rafael, companheiro de vida, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, ajudando a seguir em frente sem medo de ser quem eu sou. A vida de cada um de nós é um universo particular e eu sou muito feliz por fazer parte do seu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e meus avós por todo apoio, incentivo, paciência, confiança e amor durante toda a minha jornada. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, muitas vezes deixando de lado seus próprios sonhos para realizarem os meus!

Ao Rafael, companheiro de vida, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me apoiando e incentivando. Obrigada por todo carinho, amor e confiança durante esses anos.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Corrêa, por ter me dado a oportunidade de trilhar um lindo caminho até esse momento. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim, sempre me apoiando, ensinando e ajudando. Seus valiosos ensinamentos fizeram toda a diferença para o meu crescimento como pessoa e como profissional. Admiro-a como mulher, professora e pesquisadora.

À Prof^a. Dr^a. Marília Trierveiler Martins, por todo companheirismo e amizade durante todos esses anos. Sou muito grata pelos momentos de alegria compartilhados ao seu lado. Obrigada por sempre me mostrar que somos capazes de ser quem realmente queremos ser.

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Daumas, pela confiança e pelos ensinamentos durante o meu processo de aprendizado na rotina histopatológica. Sempre muito solícito e disposto a ensinar e a ajudar. Obrigada, sempre lembrarei de todos os ensinamentos.

À minha eterna professora, Marina Bello, pelo apoio, amizade, carinho e companheirismo durante este ciclo. Obrigada por fazer parte disto junto comigo, por me apoiar e acreditar em mim. Sou muito grata por toda sua dedicação, confiança e ajuda durante estes anos!

Agradeço à Flávia Prado, uma irmã que a vida me deu, por ser uma amiga incrível. Desde o primeiro momento em que cheguei no laboratório, você esteve disposta a me ensinar. Sou eternamente grata por ter sua amizade e poder fazer parte da sua vida pessoal e profissional. Admiro-a com todo meu coração e tenho o maior orgulho em te ver trilhando um caminho lindo. Obrigada por toda a ajuda, paciência, insistência, preocupação e amor. Sem a sua ajuda nada disso seria possível.

Agradeço também à minha querida amiga, Emília Aguiar, que em pouco tempo tornou a nossa amizade essencial, sempre me ajudando e me apoiando em todos os momentos. Espero que você floresça ainda mais na sua jornada e que eu possa estar

sempre ao lado te ajudando e te apoiando. Com toda certeza nossa amizade teve, e tem, um papel importantíssimo na minha jornada acadêmica.

À Aline Queiroz, por sempre estar disposta a me ajudar e me escutar mesmo nos momentos mais difíceis. Sempre é muito bom poder estar com você e poder compartilhar nossas conquistas e dividir nossas alegrias. Obrigada pela sua amizade e por estar ao meu lado.

Ao Marcos Custódio, querido amigo, pela amizade e companheirismo. Agradeço de coração todos os ensinamentos, obrigada por sempre estar disposto a me ajudar e me apoiar.

À todos os meus queridos amigos da pós-graduação que tive o prazer e a alegria de conviver durante todos estes anos: Cibele, Cristina, Heloisa, Thalita, Jefferson, Juliana Siqueira, Juliana Oliveira, Fabiola e Marcella. Obrigada por estarem sempre presentes.

Aos professores da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial: Profª Drª Karem Ortega, Profª Drª Marina Gallottini, Profª Drª Suzana Orsini, Prof. Dr. Décio Santos e Prof. Dr. Paulo Braz por todos os ensinamentos durante a minha jornada.

Agradeço à Profª. Drª Elisabeth Yoshimura e à Profª Drª Ana Carolina de Magalhães, do IFUSP, pela disponibilidade e pela ajuda durante as etapas experimentais deste trabalho.

Agradeço aos queridos biólogos, Elisa, Juvani e Adriana, por todo carinho, paciência e apoio durante as minhas atividades laboratoriais, sempre transformando em algo leve e alegre.

À Ivone e a Cida pela disponibilidade nos momentos difíceis e pela amizade e companheirismo.

À Adriana e à Marcelle por todo companheirismo, apoio e confiança durante estes anos. Obrigada por sempre estarem dispostas a me ajudar e por tornarem o nosso dia-a-dia mais alegre. Espero poder dividir muitas conquistas com vocês.

Agradeço à Nicole e à Thais, queridas amigas da graduação, pelo apoio e pela amizade, sempre me ajudando e me dando forças para continuar. Obrigada por estarem presentes nesse momento. Sou muito feliz por ter vocês ao meu lado.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado (Código de Financiamento 001) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. FAPESP n. 2018/19028-6) pelo suporte financeiro.

“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

Santos AF. Efeito da irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitido com laser de baixa intensidade, sobre o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

A utilização dos lasers de baixa intensidade, com seus diferentes parâmetros de aplicação, é ampla na Odontologia e em outras áreas da saúde. A fotobiomodulação (FBM) é caracterizada por induzir analgesia, reparo tecidual e modulação da inflamação. Há hipóteses de que a FBM apresenta um padrão de dose bifásica, ou seja, exposições radiantes mais fracas ou mais fortes podem apresentar efeito estimulatório ou inibitório, respectivamente. Não se sabe se essa hipótese se aplica à irradiação consecutiva ou simultânea com dois comprimentos de onda diferentes. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade celular, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atividade de enzimas antioxidantes de fibroblastos gengivais expostos a fotobiomodulação com emissão consecutiva e simultânea de luz nos comprimentos de onda de 660nm e 808nm. Foi utilizado um laser de diodo semiconductor de arseneto de gálio e alumínio e alumínio-gálio-índio-fósforo (GaAlAs/InGaAlP) operando nos comprimentos de onda vermelho (660nm) e infravermelho (808nm), com potência fixa em 100mW e uma área fixa do spot de 0,09 cm². Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: a) *Grupo controle* – sem tratamento; b) *Grupo 660nm* – fibroblastos irradiados com 660nm; c) *Grupo 808nm* – fibroblastos irradiados com 808nm; d) *Grupo Consecutivo* – fibroblastos irradiados com 660nm e, imediatamente após, com 808nm; e d) *Grupo Simultâneo* – fibroblastos irradiados com 660nm e 808nm emitidos pelo mesmo spot e ao mesmo tempo. Em todos os grupos, foi mantida fixa a potência em 100mW e variou-se o tempo de irradiação, adotando-se três subgrupos: 6s, 10s e 20s. Testou-se a viabilidade celular em todos os grupos experimentais por meio do ensaio MTS e a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) por ensaio de fluorescência. Também foi realizada a quantificação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em todos os grupos experimentais. O tempo de 20s acarretou inibição significativa da viabilidade celular quando 660nm e 808nm foram utilizados isoladamente. No entanto, quando a irradiação foi consecutiva ou simultânea, houve

certa tendência de maior crescimento celular no tempo de 20s, ainda que discreta e sem diferenças significativas. Em todas as situações experimentais, a produção de EROs foi menor do que o controle; exceção foi no tempo de 20s na irradiação simultânea, quando a produção de EROs foi significativamente maior. A atividade de enzimas antioxidantes também foi menor do que no controle na maioria das situações experimentais; somente o grupo simultâneo com 20s exibiu produção maior de SOD, mas sem diferenças significativas. A hipótese inicial de que maiores exposições radiantes gerariam efeito inibitório comprovou-se pela análise de viabilidade celular somente quando as irradiações foram realizadas isoladamente e no tempo de 20s, gerando uma exposição radiante maior. Contudo, quando os comprimentos de ondas foram entregues consecutiva ou simultaneamente, os tempos mais prolongados de irradiação não acarretaram efeito inibitório. A inibição da viabilidade celular não foi por excesso de estresse oxidativo nas irradiações isoladas; na irradiação simultânea, o maior estresse oxidativo não acarretou inibição da viabilidade celular. Concluiu-se que a fotobiomodulação exercida por 660nm e 808nm aplicados isoladamente é diferente quando ambos são utilizados de forma consecutiva e simultânea, tanto em termos de viabilidade celular quanto de estresse oxidativo. O estresse oxidativo induzido não foi suficiente para acarretar redução da viabilidade celular.

Palavras chaves: Fotobiomodulação. Irradiação simultânea. Estresse oxidativo. Fibroblastos gengivais.

ABSTRACT

Santos AF. Effect of consecutive and simultaneous irradiation with 660nm and 808nm wavelengths emitted with low level laser therapy on oxidative stress of human gingival fibroblasts [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

The use of low-power lasers, with their different application parameters, is widespread in dentistry and other areas of health. Photobiomodulation (PBM) is characterized by inducing analgesia, tissue repair and reduce inflammation. There are hypotheses that PBM presents a biphasic dose response, i.e., lower or higher fluences may have a stimulatory or inhibitory effect, respectively. It is not known whether this hypothesis applies to consecutive or simultaneous irradiation with two different wavelengths. The main objective of this study was to evaluate cell viability, the production of reactive oxygen species (ROSs) and the activity of gingival fibroblast antioxidant enzymes exposed to photobiomodulation with consecutive and simultaneous irradiation at 660nm and 808nm wavelengths. A semiconductor diode laser of gallium and aluminum and aluminum-gallium-indium-phosphorus (GaAlAs/InGaAlP) was used operating at red (660nm) and infrared (808nm) wavelengths, with fixed power at 100mW and a fixed spot area of 0.09 cm². The following experimental groups were established: a) Control group - without any treatment; b) Group 660nm - fibroblasts irradiated with 660nm; c) 808nm group - fibroblasts irradiated with 808nm; d) Consecutive Group - fibroblasts irradiated with 660nm and, immediately after, with 808nm; and e) Simultaneous Group - fibroblasts irradiated with 660nm and 808nm emitted by the same spot and at the same time. In all groups, the power was kept fixed at 100mW and the irradiation time varied, adopting three subgroups: 6s, 10s and 20s. Cell viability was tested in all experimental groups using the MTS assay. The production of reactive oxygen species (ROS) was measured by fluorescence assay. Quantification of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was also performed in all experimental groups. The 20s of exposure resulted in significant inhibition of cell viability when 660nm and 808nm were applied separately. However, when the irradiation was consecutive or simultaneous, there was a tendency towards greater cell growth with the same 20s of exposure, although discrete and without significant differences. In all experimental situations, the production of ROS was lower than the control group; The exception was for the application of 20s with simultaneous

irradiation, when the production of ROS was significantly higher. The activity of antioxidant enzymes was also lower than in the control group in most experimental situations. Only the group where application lasted 20s exhibited higher SOD production, but without significant differences. The initial hypothesis that higher doses would generate an inhibitory effect was confirmed by the analysis of cell viability only when the irradiations were performed separately and applied for 20s, generating a higher energy delivery. However, when the wavelengths were administered consecutively or simultaneously, the longer irradiation times did not have an inhibitory effect. The inhibition of cell viability was not due to excessive oxidative stress in isolated irradiations; in simultaneous irradiation, the greater oxidative stress did not cause inhibition of cell viability. It was concluded that the photobiomodulation performed by 660nm and 808nm applied separately is different then when both are used consecutively or simultaneously, both in terms of cell viability and oxidative stress. The oxidative stress induced was not enough to reduce cell viability.

Keywords: Photobiomodulation. Simultaneous irradiation. Oxidative stress. Gingival Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação gráfica da lei de Arndt-Schulz aplicada à FBM (adaptado de Huang et al., 2011 e Chung et al., 2012).....	23
Figura 2.2 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação da fotobiomodulação nos espectros vermelho e infravermelho.....	29
Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do efeito da fotobiomodulação na produção das EROs (adaptado de Zorov et al., 2014; Hamblin, 2017).....	32
Figura 5.1 - Intensidade de emissão laser em função dos comprimentos de onda variando de 200 a 1000nm.....	49
Figura 5.2 - Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® no comprimento de onda de 660nm durante irradiação de 10s.....	50
Figura 5.3 - Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® no comprimento de onda de 808nm durante irradiação de 10s.....	51
Figura 5.4 - Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® na emissão simultânea de 660nm e 808nm durante irradiação de 10s.....	51
Figura 5.5 - Média ($\pm$ desvio-padrão) dos valores de absorbância indicativos de viabilidade celular nos grupos 660nm (A), 808nm (B), consecutivo (C) e simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p < 0.05$; valor de p pelo teste de Tukey; os valores em porcentagem indicam a viabilidade celular normalizada pelo Controle).....	52
Figura 5.6 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da intensidade de fluorescência indicativa de espécies reativas de oxigênio em situações nas quais fibroblastos gengivais foram cultivados com 3% e 10% de soro; o controle positivo da reação foi realizado com exposição dos fibroblastos a peróxido de hidrogênio 3M (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ valor de p pelo teste de Tukey).....	53

- Figura 5.7 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da intensidade de fluorescência indicativa de espécies reativas de oxigênio nos grupos irradiados com 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D) segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ valor de p pelo teste de Tukey).....54
- Figura 5.8 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de inibição acarretada pela superóxido dismutase nos grupos irradiados com 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ valor de p pelo teste de Tukey).....56
- Figura 5.9 - Box plot para atividade da catalase nos grupos 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação. Linha central – mediana; + média; limites do retângulo – percentis 25º e 75º; *whiskers* – valores máximo e mínimo (* $p < 0.05$; valor de p pelo teste Dunn).....57
- Figura 5.10 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos celulares com várias concentrações de soro fetal bovino, expostas (Irradiada) e não expostas (Controle) à FBM (valores de p pelo teste t de Student).....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	adenosina trifostato
bFGF	do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>
CAT	catalase
CCO	citocromo c oxidase
CuZnSOD	do inglês <i>copper-zinc-superoxide dismutase</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's</i>
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
EGF	do inglês <i>epidermal growth factor</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
FBM	fotobiomodulação
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GaAlAs	arseneto de gálio-alúminio
GPx	glutathione peroxidase
HRP	do inglês <i>horseradish peroxidase</i>
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
IGF-1	do inglês <i>insulin-like growth factor-1</i>
IGFBP3	do inglês <i>insulin-like growth factor binding protein -3</i>
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
InGaAlP	alumínio-gálio-índio-fósforo
KGF	do inglês <i>keratinocyte growth factor</i>
LED	do inglês <i>light-emitting diode</i>
MDA	do inglês <i>malonaldehyde</i>
MnSOD	do inglês <i>manganese-dependent superoxide dismutase</i>
mRNA	do inglês <i>messenger RNA</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
pH	potencial hidrogeniônico
RIRR	do inglês <i>ROS induced ROS release</i>
RPM	rotações por minuto
SFB	soro fetal bovino

SOD	superóxido dismutase
TBARS	do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TGF- β	do inglês <i>transforming growth factor</i>
TNF- α	do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	nanometro
mW	milliwatts
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
mW/cm ²	milliwatts por centímetro quadrado
W	potência
CuA e CuB	centros de cobre
hemeA e hemeB	centros heme
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
Ca ²⁺	íons de cálcio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	bomba de sódio e potássio
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
¹ O ₂	oxigênio singleto
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO [•]	radical hidroxila
cm ²	centímetro quadrado
s	segundos
≅	aproximadamente igual a
%	porcentagem
mm	milímetros
mg/ml	miligramas por mililitro
°C	graus Celsius
h	hora
min	minuto
CO ₂	gás carbônico
μl	microlitro
M	mol/l
ml	mililitro
min	minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Laser de baixa intensidade e os efeitos biológicos dos espectros de luz vermelho e infravermelho	25
2.2	Fotobiomodulação e estresse oxidativo.....	29
2.3	Irradiação consecutiva e simultânea com dois comprimentos de onda	35
2.4	Estudos <i>in vitro</i> com fibroblastos que utilizaram os espectros vermelho e infravermelho	36
2.5	Hipótese	41
3	PROPOSIÇÃO	43
3.1	Geral.....	43
3.2	Específicas	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Cultivo celular	45
4.2	Grupos experimentais.....	46
4.3	Caracterização do comprimento de onda emitido pelo equipamento	47
4.4	Caracterização da potência do equipamento laser	47
4.5	Planejamento da dosimetria	48
4.6	Irradiação dos cultivos celulares.....	50
4.7	Ensaio de viabilidade celular	51
4.8	Quantificação das espécies reativas de oxigênio	51
4.9	Obtenção do lisado celular	52
4.10	Quantificação da superóxido dismutase	53
4.11	Quantificação da enzima antioxidante catalase.....	53
4.12	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Caracterização do aparelho laser	55
5.2	Análise da viabilidade celular	58
5.3	Quantificação de espécies reativas de oxigênio	59
5.5	Quantificação da atividade da catalase	63
5.6	Resumo das tendências de resultados de cultivo celular	65

6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

A luz ou radiação eletromagnética emitida por um laser possui características próprias por ser um feixe luminoso extremamente colimado, concentrado e monocromático. Os lasers podem variar de acordo com o meio ativo pelo qual sofrem estimulação. Atualmente, diferentes lasers estão disponíveis, sendo os lasers de diodo, de baixa ou alta potência, os mais utilizados dentro da Odontologia (Almeida-Lopes, 2003; Coluzzi, 2004; Cavalcanti et al., 2011).

Os lasers de baixa potência tem sido amplamente utilizados em diferentes áreas da saúde com a finalidade de aliviar a dor, estimular reparação tecidual e modular a inflamação, incluindo tecidos nervoso periférico e ósseo. Os comprimentos de onda na faixa do vermelho visível e do infravermelho (660-808nm) são os mais adotados na Odontologia, em função das suas propriedades de absorção, espalhamento e penetração nos tecidos irradiados (Almeida-Lopes, 2003; Cavalcanti et al., 2011).

A fotobiomodulação (FBM) é caracterizada pela capacidade de induzir processos fotobiológicos nas células, nos quais há absorção da luz por fotorreceptores (cromóforos) presentes, principalmente, nas mitocôndrias. Tal absorção resulta em efeitos clínicos de analgesia, reparação tecidual e modulação da inflamação (de Freitas; Hamblin, 2016; Musstaf et al., 2019).

A FBM altera as propriedades redox das células irradiadas. Tais alterações são decorrentes do metabolismo mitocondrial e da ativação da cadeia respiratória, levando a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs podem atuar como um sinal redox importante, afetando a atividade de diferentes funções celulares nas mitocôndrias, no citosol e até no núcleo (Hamblin, 2017). A produção exacerbada ou prolongada das EROs pode levar a uma situação conhecida como estresse oxidativo, além de ativar a produção de enzimas antioxidantes que atuam para controlar os danos intracelulares causados pelas EROs (Halliwell; Whiteman, 2004; Barbosa et al., 2010). O efeito da FBM diretamente nas EROs ainda é bastante desconhecido. A conclusão sobre os efeitos benéficos ou maléficos da produção de EROs durante a FBM está relacionada com a ativação do sistema antioxidante (Tafur; Mills, 2008; de Freitas; Hamblin, 2016). Há uma certa tendência de avaliar o papel da FBM no estresse oxidativo em células ou tecidos

injurados, porém esses estudos são mais voltados às células musculares (Silveira et al., 2011). No entanto, frente a irradiação consecutiva e simultânea, não encontramos nenhum estudo associando o efeito da FBM no estresse oxidativo em células da mucosa oral.

O efeito da luz em 660nm parece ser diferente daquele provocado pelo 808nm. Por exemplo, a emissão de luz no espectro de 660nm tende a ter uma menor penetração nos tecidos biológicos, ao passo que a de 808nm penetra em maior profundidade nos tecidos. Atualmente, está disponível no mercado equipamento laser com emissão simultânea de luz nos comprimentos de onda de 660nm e 808nm. Não se conhece, contudo, o efeito que a dupla irradiação simultânea acarreta as células, em especial em fibroblastos gengivais. Além disso, a emissão consecutiva dos dois comprimentos de onda também é pouco estudada. Assim, este estudo visa avaliar o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais expostos a FBM com emissão consecutiva e simultânea de luz nos espectros vermelho e infravermelho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Laser de baixa intensidade e os efeitos biológicos dos espectros de luz vermelho e infravermelho

A radiação laser é uma luz com características específicas, caracterizada por ser um fluxo luminoso altamente colimado e altamente concentrada, além de ser refletida, absorvida, espalhada e transmitida. A radiação laser difere da luz comum por ter monocromaticidade, coerência e colimação (Almeida-Lopes, 2003; Coluzzi, 2004; Cavalcanti et al., 2011). Monocromaticidade refere-se ao fato de que os fótons de uma mesma fonte serão emitidos sempre no mesmo comprimento de onda. Em relação à coerência, os fótons que compõem o feixe de luz estão na mesma amplitude, comprimento e fase. Além disso, a radiação laser é colimada, tornando os fótons menos divergentes, sendo praticamente paralelos entre si. Essas características tornam a radiação laser capaz de propagar-se em grandes distâncias sem perder sua potência (Almeida-Lopes, 2003, Coluzzi, 2004).

Os lasers de baixa intensidade mais utilizados na área da saúde são os de diodo, que possuem como meio ativo o composto de arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs). São empregados comprimentos de onda que variam entre 630nm e 840nm, sendo o 808nm o mais utilizado na Odontologia. Outro meio ativo muito utilizado na Odontologia é o composto de alumínio-gálio-índio-fósforo (InGaAlP), que produz luz nos comprimentos de onda entre 635 e 690 nm; o 660nm é o mais utilizado, localizado na região do vermelho visível (Almeida-Lopes, 2003).

A eficácia da fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente estudada por diferentes autores, principalmente em função da dosimetria. Sabe-se que a ação dos diferentes comprimentos é variável nos tecidos biológicos, principalmente porque a penetração em profundidade varia em função do espectro de luz, assim como a absorção e o espalhamento dos fótons (Almeida-Lopes, 2003; Coluzzi, 2004; Hamblin, 2017). Diferentes comprimentos de onda apresentam coeficientes de absorção distintos para o mesmo tecido; há uma janela óptica considerada ideal para os tecidos biológicos (de 650 a 1200nm), na qual a penetração da luz é mais acentuada. Em função disso, as aplicações na área de saúde do laser de baixa intensidade envolve

quase que exclusivamente a faixa de 600 a 950 nm (Hamblin; Demidova, 2006; de Freitas; Hamblin, 2016). Por conta da baixa potência, os equipamentos usados para fotobiomodulação (FBM) não provocam aumento de temperatura no tecido alvo (de Freitas; Hamblin, 2016; Musstaf et al., 2019).

Além do comprimento de onda, sabe-se que os parâmetros de irradiação, tais como exposição radiante (J/cm^2), irradiância (mW/cm^2), potência (W), assim como o número total e a frequência da aplicação, são extremamente importantes para a eficácia clínica (Coluzzi, 2004; de Freitas; Hamblin, 2016). Acredita-se que, se a luz entregue não tiver uma irradiância e tempo de exposição suficientes, provavelmente não haverá resposta, ou seja, modificações visíveis clinicamente. É provável que exista algum ponto intermediário em que a combinação ideal de irradiância e tempo de exposição gere o efeito desejado. Essa dose-resposta frequentemente é comparada à “Lei de Arndt-Schulz”, pela qual se admite que a FBM pode apresentar um padrão bifásico de resposta, envolvendo estimulação ou inibição, dependendo da exposição radiante: exposições radiantes menores entregues em um tempo maior gerariam efeitos estimulatórios e exposições radiantes maiores entregues abruptamente, efeitos inibitórios (Huang et al., 2011; Chung et al., 2012).

Figura 2.1 - Representação gráfica da lei de Arndt-Schulz aplicada à fotobiomodulação (adaptado de Huang et al., 2011, Chung et al., 2012)

Fonte: Adaptado de Huang et al., 2011, Chung et al., 2012

A ação do laser ocorre pela absorção da luz por biomoléculas conhecidas como cromóforos ou fotorreceptores. Em seguida, ocorrem reações secundárias que resultam na modulação das funções celulares (Hamblin, 2017; Musstaf et al., 2019).

Esse mecanismo de interação molecular foi descrito primeiramente por Tina Karu em 1989. A autora demonstrou que possíveis elementos da cadeia respiratória mitocondrial funcionavam como fotorreceptores primários. Ao realizarem absorção, a energia dos fótons seria transformada em energia bioquímica. A autora ainda postulou que o principal fotorreceptor da luz vermelha seria uma enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial, a citocromo c oxidase (CCO), ocorrendo então uma reação fotoquímica (Karu, 1989). Por outro lado, a luz infravermelha possuiria uma resposta primária distinta, sendo ela de natureza fotofísica, atuando através de mudanças vibracionais e rotacionais nos elétrons dos átomos que constituem as moléculas da membrana celular; ao vibrarem as membranas, as mitocôndrias seriam rapidamente ativadas pela luz infravermelha, em função da necessidade de aporte energético (Calderhead; Tanaka, 2017). Com o passar dos anos, estudos têm evidenciado que há diferenças nos mecanismos primários provocados pelos espectros vermelho e infravermelho, principalmente considerando-se a cadeia respiratória mitocondrial (Hamblin; Demidova, 2006; Mustaff et al., 2019).

As mitocôndrias desempenham um papel importante na geração de energia e no metabolismo celular, estando envolvidas em diferentes pesquisas sobre os efeitos biológicos do laser de baixa intensidade. A CCO atua como o principal fotorreceptor nas regiões do vermelho e infravermelho do espectro da luz e é a molécula mais importante nas células e nos tecidos que absorvem a luz entre 630 e 900nm. A CCO é um dos quatro complexos proteicos (complexo IV) que compõem a cadeia respiratória mitocondrial, sendo responsável pelo transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna, gerando um gradiente de prótons que leva à síntese de adenosina trifosfato (ATP). A FBM aumenta a atividade da CCO, facilitando o transporte de elétrons e, com isso, aumentando a produção de ATP (Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin, 2016; Hamblin, 2017).

A CCO apresenta dois centros de cobre, CuA e CuB, e dois centros heme com um átomo de ferro, hemeA e hemeB (também conhecidos como citocromo A e A3). Cada um desses centros metálicos pode estar em diferentes estados redox, os quais constituiriam fotorreceptores distintos. Por exemplo, o fotorreceptor do espectro do 820nm seria a forma oxidada do cromóforo CuA da CCO, e o do 680nm, a CuB oxidada (Chen et al., 2009; Hamblin; Demidova, 2006; Huang et al., 2011).

A absorção dos fótons na mitocôndria induz excitação na CCO e, conseqüentemente, leva a uma aceleração das reações de transferência de elétrons,

a uma redução do oxigênio no centro catalítico mitocondrial e a um aumento no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Com isso, quanto mais rápido for o transporte de elétrons, mais rápida é a produção de ATP. O aumento de ATP induzido pela luz leva a um aumento do $\Delta\Psi_m$, ocasionando mudanças nas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e do íon de cálcio (Ca^{2+}), além de aumentar a atividade, por exemplo, da bomba sódio potássio (Na^+/K^+ ATPase) (Karu, 2008; Hamblin, 2017; Tsai et al., 2017).

O ATP, em ação com a enzima adenilato ciclase (ligada a membrana), controla o nível de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O Ca^{2+} junto com o AMPc são considerados mensageiros importantes. O Ca^{2+} está presente na regulação de quase todos os processos biológicos como contração muscular e do citoesqueleto, coagulação sanguínea e expressão gênica; já o AMPc está ligado à diferenciação e crescimento celular (Hamblin; Demidova, 2006; Musttaf et al., 2019). Assim, um efeito clínico importante da FBM é a indução de proliferação e diferenciação celular, pelo aumento do aporte energético.

As alterações decorrentes do metabolismo mitocondrial e da ativação da cadeia respiratória pela CCO levam a um aumento na produção de EROs, especialmente do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Essa indução de estresse oxidativo depende principalmente do estado metabólico mitocondrial, do estado fisiológico do hospedeiro e dos parâmetros da irradiação (Hamblin; Demidova, 2006; Schroeder et al., 2007; Tsai et al., 2017). Além disso, certas moléculas possuem uma maior absorção no comprimento de onda vermelho, como porfirinas e algumas flavoproteínas. Essas moléculas podem sofrer alteração no seu estado fundamental após a absorção do fóton, levando à produção de EROs, no caso de $^1\text{O}_2$. (Karu, 1989; Hamblin; Demidova, 2006; de Freitas; Hamblin, 2016).

Várias vias de regulação são mediadas pelo estado redox da célula, muitas delas relacionadas à síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, ativação enzimática e regulação do ciclo celular. Nessas vias, há maior expressão de genes relacionados a sobrevivência, proliferação e migração celular (de Freitas; Hamblin 2016; Hamblin, 2017; Musttaf et al., 2019). Acredita-se que a FBM altera o potencial redox celular na direção de uma maior oxidação. Células distintas em condições variadas de crescimento têm apresentado diferentes estados redox; com isso, os efeitos da FBM podem variar. As células que estão frente a um estado reduzido, por exemplo, e com baixo pH intracelular, podem ter altos índices de resposta frente a FBM, enquanto as

células no seu estado redox ideal podem apresentar baixos índices de resposta ou não responderem ao tratamento com a radiação laser (Hamblin; Demidova, 2006; de Freitas; Hamblin, 2016; Hamblin, 2017).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação da fotobiomodulação nos espectros vermelho e infravermelho

Fonte: A autora (criado com BioRender.com)

2.2 Fotobiomodulação e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante. Esse estresse oxidativo pode ser resultado da redução dos níveis do sistema antioxidante ou pode estar ligado à maior produção das EROs pela exposição das células a níveis elevados de radicais livres (Halliwell; Whiteman, 2004; Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

As EROs são radicais livres derivados do oxigênio, normalmente produzidas durante a geração de energia e degradadas rapidamente pelo sistema antioxidante. O oxigênio metabolizado na mitocôndria é reduzido à forma univalente, dando origem aos radicais livres que incluem os radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$), tendo a participação de íons ferro e cobre em sua geração. Apesar do H_2O_2 não ser considerado um radical livre, por não possuir um elétron desemparelhado na sua última camada, é considerado de alto potencial reativo porque tem ação direta na geração do radical hidroxila. As EROs são capazes de causar fragmentação de proteínas e danos ou fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA); por outro lado, quando produzidas em menores quantidades, exercem funções fisiológicas essenciais no processo de reparo e na síntese proteica (Halliwell; Whiteman, 2004; Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

Doses elevadas de EROs podem ser geradas durante o processo inflamatório crônico e agudo, bem como durante a exposição de produtos químicos tóxicos, radiação e outros fatores ambientais citotóxicos. Consequentemente, essa produção excessiva de EROs leva a ativação do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático. O sistema antioxidante tem a função de inibir ou reduzir os danos causados pela ação das EROs, inibindo a ação ou formação destas, e inclui, dentre outras enzimas, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O sistema antioxidante não enzimático inclui os compostos antioxidantes dietéticos, entre os quais destacam-se as vitaminas (A, C e E), os minerais e os compostos fenólicos (Halliwell; Whiteman, 2004; Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

Existem duas formas de SOD presentes no organismo. A primeira é a SOD dependente de cobre e zinco (CuZnSOD), que contém cobre e zinco na mesma molécula como centros redox; sua ação ocorre no citosol e sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda forma é a SOD dependente do manganês (MnSOD), que contém manganês como centro redox, tendo sua atividade na mitocôndria e sua função aumentada pelo estresse oxidativo. Por meio da reação de dismutação, a MnSOD catalisa a geração de H_2O_2 , a partir do $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell; Whiteman, 2004; Barbosa et al., 2010).

A CAT se concentra principalmente nos peroxissomos e age com o mesmo propósito da GPx, atuando na dismutação do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Tal

ação integrada da CAT e da GPx é de grande importância, uma vez que o acúmulo de H_2O_2 , por meio das reações conhecidas como Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação do ferro e do cobre, leva a um aumento na produção do radical hidroxila, contra o qual não existe um sistema antioxidante especializado. O $HO^\bullet$ apresenta uma meia vida curta (10⁻⁹ segundos) dado a sua alta instabilidade e reatividade. Essas características favorecem a produção de danos oxidativos. É também o radical livre mais propício a iniciar o processo de peroxidação lipídica, levando, conseqüentemente, à alteração na membrana celular (Halliwell; Whiteman, 2004; Barreiros et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

Os danos oxidativos podem ser causados pelos ataques direto das EROs durante o processo de estresse oxidativo, causando alterações não compatíveis com a homeostase. As principais estruturas alvo dos radicais livres são lipídios, DNA, proteínas e carboidratos. A célula pode se recuperar após o dano oxidativo, processo no qual ocorrerá a substituição das moléculas danificadas, mantendo a viabilidade celular. Entretanto, o dano oxidativo, especialmente ao DNA, pode induzir a morte celular por necrose ou apoptose, derivadas de intensa peroxidação lipídica (Barbasa et al., 2010; Ayala et al., 2014).

As EROs são produzidas em uma menor quantidade quando o metabolismo mitocondrial está normalizado e estão envolvidas nas vias de sinalização das mitocôndrias para o núcleo. Porém, quando o potencial de membrana mitocondrial é alterado para mais ou menos, a quantidade de EROs é aumentada. Em células normais, é comum ocorrer um aumento do potencial de membrana mitocondrial e uma rápida liberação de EROs após a irradiação. No entanto, quando o potencial de membrana mitocondrial está baixo devido alguma alteração molecular, a absorção da luz leva um aumento do potencial de membrana mitocondrial aos níveis normais e com isso reduz a produção de EROs. Acredita-se que as mitocôndrias disfuncionais podem produzir EROs; esse processo pode ser chamado de “*ROS induced ROS release*” (RIRR). Em condições de estresse oxidativo prolongado, o aumento das EROs atinge um nível que desencadeia a abertura de um poro proteico não seletivo na membrana mitocondrial interna, conhecido como transição de permeabilidade mitocondrial. A ativação desse canal leva um colapso simultâneo no potencial de membrana mitocondrial. Essa explosão das EROs poderia funcionar como um mensageiro de ativação do RIRR nas mitocôndrias vizinhas, o que poderia agir de forma prejudicial e aumentar o dano celular (Zorov et al., 2014; Hamblin, 2017).

Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do efeito da fotobiomodulação na produção das EROs (adaptado de Zorov et al., 2014; Hamblin, 2017).

Fonte: A autora (adaptado de Zorov et al., 2014; Hamblin, 2017)

A produção da EROs pela FBM ainda não está muito clara. Estudos apontam que baixas exposições radiantes (em torno de $3\text{J}/\text{cm}^2$) levam a um efeito no potencial de membrana mitocondrial, no cálcio intracelular e no aumento da produção dessas espécies reativas; já as altas exposições radiantes (em torno de $30\text{J}/\text{cm}^2$) limitam o potencial de membrana, mas ainda continuam tendo uma maior produção das EROs. Entretanto, exposições radiantes intermediárias (em torno de $10\text{J}/\text{cm}^2$) não induzem muita produção de EROs quando o potencial de membrana mitocondrial está igual ao basal. Tais observações ocorrem de maneira distinta quando baixas exposições radiantes são entregues as células com altos níveis de EROs. Neste caso, a FBM leva a um aumento no potencial de membrana mitocondrial e uma diminuição das EROs. Aparentemente, a conclusão sobre o benefício ou malefício da produção das EROs depende da ativação do sistema antioxidante e do estado redox celular. Se as enzimas antioxidantes estão em funcionamento normal, vias de sinalização podem ser acionadas, sendo todo esse mecanismo benéfico para as células e os tecidos; por isso, é de extrema importância a manutenção do equilíbrio (Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin, 2016).

Figura 2.4 – Esquema ilustrativo da produção das EROS frente a diferentes exposições radiantes em células com estados redox distintos (adaptado de Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin, 2016)

Fonte: A autora (adaptado de Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin, 2016)

Essa sinalização de EROS pode atuar para a alterar a expressão gênica, influenciando fatores de transcrição sensíveis ao processo redox. Foi demonstrado que a FBM modula uma variedade de genes diretamente ligados à ativação do sistema antioxidante, à proliferação celular, à inibição de apoptose e ao reparo de DNA. Um estudo demonstrou que o laser no comprimento de onda do 628nm, com uma potência de 15 mW e exposições radiantes variando entre 0,44 a 8,6J/cm², foi capaz de modular 111 genes em cultivo celular de fibroblastos cutâneos (linhagem HS27). Dentre esses genes, dois eram ligados ao sistema antioxidante e estavam superexpressos. O primeiro deles era a selenoproteína W, um antioxidante dependente da glutathiona, cuja expressão reduz acentuadamente a sensibilidade das células à citotoxicidade do H₂O₂. O outro está relacionado a proteína ATX1. Quando superexpressa, a ATX1 substitui a CuZnSOD na prevenção de danos oxidativos, ativando vias das metalochaperonas ou consumindo diretamente os radicais superóxidos. Os autores concluíram que a expressão dos 111 genes condiz com efeitos estimulatórios sobre os fibroblastos, principalmente na questão da proliferação celular (Zhang et al., 2003).

Em experimentos envolvendo cultura primária de fibroblastos de pele, a FBM promoveu um aumento na geração das EROS quando utilizado no infravermelho. Ao comparar os comprimentos de onda 636nm e 825nm, com uma exposição radiante variando entre 5 e 25J/cm², os autores verificaram que, ao utilizar o 636nm, a quantidade de EROS foi menor quando comparado com as células que não receberam

nenhuma irradiação. No entanto, com 825nm, houve um aumento significativo na produção das EROs relativamente ao 636nm e ao controle. As EROs foram geradas em maior quantidade com a exposição radiante de 5J/cm² e com exposições riantes mais altas variando de 15 a 25J/cm². Portanto, sugere-se que o estado redox celular tem um padrão diferente no espectro vermelho e infravermelho (George et al., 2018).

Em outro estudo envolvendo a produção de EROs e dano ao DNA em células epiteliais orais (linhagem NOKSI), foi utilizado o laser com 660nm, exposição radiante de 4J/cm² e 20J/cm² e potência fixa em 40 mW. Foi demonstrado que a menor exposição radiante utilizada (4J/cm²) gerou níveis altos de EROs em comparação com as células que receberam uma exposição radiante mais alta (20J/cm²). Como o acúmulo das EROs está ligada ao aumento da instabilidade genômica, causando rearranjos cromossômicos, e ao dano ao DNA, os autores testaram a exposição radiante de 4J/cm² e observaram que essa produção excessiva das EROs não induziu a fragmentação do DNA, sugerindo que o laser ativou os níveis fisiológicos de EROs nas células epiteliais sem interferir na estabilidade genômica (Dillenburg et al., 2014).

A grande maioria dos trabalhos avalia diretamente nas células e nos tecidos injuriados o papel da FBM no estresse oxidativo. Um estudo verificou o papel da FBM em situações de inflamação causadas por lesões cutâneas. Para isso, os autores utilizaram dois equipamentos distintos: um deles foi o laser no modo pulsado com 940nm e 70W, e o outro foi o laser no modo contínuo com 660nm e 30mW. Para os dois equipamentos foram adotadas exposições riantes de 1 e 3J/cm². A partir da técnica TBARS (*TBARS* do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*), os autores observaram uma redução significativa de malonaldeído (MDA) nos dois grupos com 3J/cm². As enzimas antioxidantes SOD e CAT também foram analisadas; foi observada redução da atividade dessas enzimas no grupo contínuo com a exposição radiante de 1 e 3J/cm² e no grupo pulsado somente com 3J/cm². Os autores interpretaram que a redução das enzimas antioxidantes pode ser dada pela baixa exposição às EROs (Silveira et al., 2011).

Os trabalhos citados acima envolvem os temas FBM e estresse oxidativo, bem como os comprimentos de onda no espectro vermelho e infravermelho. Contudo, em nenhum deles foi analisado estresse oxidativo na irradiação consecutiva e simultânea dos dois comprimentos de onda, fato que constitui a proposta do presente trabalho.

2.3 Irradiação consecutiva e simultânea com dois comprimentos de onda

Quando falamos sobre irradiação consecutiva e simultânea, encontramos pouco embasamento científico, mas há uma certa tendência a se observar o efeito da combinação dos comprimentos de onda vermelhos e infravermelhos utilizando lasers e LEDs (LEDs do inglês *light-emitting diode*). No entanto, existem poucos trabalhos *in vitro* que utilizaram a irradiação simultânea apenas com laser (Lima et al., 2020).

Contudo, a irradiação simultânea mostrou-se benéfica quando utilizada em feridas infectadas em ratos Wistar. A combinação do laser no comprimento de onda 660nm (30mW, 424 mW/cm²) e 790nm (40mW, 566 mW/cm²) mostrou um efeito estimulatório quando a exposição radiante de 20J/cm² foi utilizada. Os autores notaram que as fibras de colágeno estavam maduras e bem organizadas, especialmente quando ambos os comprimentos de onda foram utilizados.

Alguns estudos analisaram a combinação do comprimento de onda vermelho e infravermelho com lasers em modelos experimentais de ferida cutâneas em ratos Wistar. Os autores verificaram que a combinação da irradiação com o comprimento de onda vermelho (635nm) e infravermelho (830nm) estimulou positivamente o reparo tecidual em níveis superficiais e profundos, bem como aumentou a produção e melhorou a organização de colágeno quando utilizada a exposição radiante de 20J/cm². Exposições radiantes mais altas, em torno de 50 J/cm², também resultaram em resultados benéficos. Isso pode ser consequência da atenuação da luz durante a penetração nos tecidos, ou seja, quando utilizamos uma maior quantidade de energia, ainda após a atenuação, restará uma quantidade significativa de energia que irá ser absorvida pelos fotorreceptores (Mendez et al., 2004).

Em outro estudo utilizando o mesmo modelo experimental com ratos Wistar exibindo quadro de diabetes, os autores notaram que, quando utilizada a combinação do comprimento de onda 670nm (500 mW, 10J/cm²) e 810nm (250mW, 1,33 J/cm²), não foi observado melhora no processo de reparo quando comparado ao grupo controle (Jahangiri Noudeh et al., 2010). Esse fato que pode ter sido causado pela alta potência, levando a uma exposição radiante mais alta.

A grande maioria dos trabalhos são pesquisas clínicas e estão restritos a área médica e fisioterapêutica (Lima e tal., 2020). No entanto, a falta de clareza quanto as irradiações dificultam o real entendimento sobre o benefício ou malefício da irradiação

consecutiva ou simultânea. Não encontramos nenhum trabalho, dentro da Odontologia, que avalie a irradiação simultânea dos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, especialmente em células da mucosa oral.

2.4 Estudos *in vitro* com fibroblastos que utilizaram os espectros vermelho e infravermelho

Há décadas que estudos laboratoriais estão sendo desenvolvidos para aprimorar a ação da FBM em nível celular. Para isso, o cultivo celular tem sido a metodologia mais utilizada. Para entender principalmente a dosimetria adotada nesses trabalhos, realizamos uma busca no PubMed com as palavras chaves “cell culture low level laser therapy”, pela qual foram listados 164 artigos. Desses artigos, selecionamos 30 que utilizaram a FBM em cultura celular de fibroblastos. Excluímos 15 artigos pois utilizavam células provenientes de animais diabéticos ou células tratadas com produtos bacterianos ou medicações antirreabsortivas.

O Quadro 2.1 mostra os 15 estudos com a FBM e seu efeito sobre os fibroblastos gengivais. A literatura contém uma ampla gama de estudos com resultados diversos, mas, de uma forma geral, demonstram certa tendência sobre o aumento da proliferação e migração celular em fibroblastos provenientes de linhagem celular ou cultura primária. Outro achado importante foi o fato de que potências e exposições radiantes mais baixas apresentarem um melhor resultado na proliferação e viabilidade celular, bem como na produção de fatores de crescimentos e colágeno tipo I.

Estudos envolvendo cultivo celular mostram que, de uma maneira geral, o comprimento de onda vermelho e infravermelho é capaz de influenciar a proliferação de fibroblastos, melhorando também a migração, proliferação e transcrição de genes envolvidos na reparação de feridas (Damante et al., 2009; Hakki; Bozkurt, 2012; Pellicoli et al., 2014). Além dessas alterações, observa-se que tanto o laser vermelho quanto o infravermelho demonstram efeitos estimulatórios em relação a síntese de colágeno tipo I, síntese proteica, síntese de DNA e RNA, bem como aumento na expressão de fatores de crescimentos e citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, a interleucina 6 (IL-6) (Saygun et al., 2008; Damante et al., 2009; Hakki;

Bozkurt, 2012). No entanto os efeitos da FBM foram determinados a partir dos parâmetros de irradiação, como exposição radiante, potência e irradiância.

Marques et al., 2014, notou que quando a FBM foi utilizada com uma exposição radiante variando de 5 - 30J/cm², as células apresentaram uma resposta estimulatória, diferente das exposições radiantes variando de 0.1 – 3J/cm² que se mostraram inibitórias. Tal achado pode ser explicado pela dose bifásica que a FBM apresenta, frente a baixas exposições radiantes, o efeito poderá ter sido nulo ou inibitório, podendo ter sofrido influência da condição de cultivo celular, bem como da dosimetria aplicada.

A maioria dos trabalhos notaram que a FBM, independentemente da dosimetria aplicada, apresentou um efeito estimulatório no cultivo celular de fibroblastos. No entanto, não há como notar uma tendência entre os resultados, visto que houve uma grande variação de potência e comprimento de onda entre todos os estudos, bem como a utilização de equipamentos distintos que apresentaram uma variação na irradiância.

Acredita-se que os resultados obtidos em estudos *in vitro* dependem do estado fisiológico em que as células se encontram no momento da irradiação, bem como dos parâmetros de irradiação (exposição radiante, irradiância e comprimento de onda), além do número de frequência de irradiação, já que parâmetros semelhantes podem ter diferentes efeitos nas células cultivadas (Azevedo et al., 2006; Pogrel et al., 1997).

Embora os trabalhos *in vitro* envolvam a fotobiomodulação em células provenientes da mucosa oral, nenhum dos trabalhos avaliou a irradiação consecutiva e simultânea dos comprimentos de onda 660 e 808nm em fibroblastos gengivais.

Além disso, não encontramos nenhum trabalho *in vitro* com fibroblastos gengivais frente a irradiação consecutiva e simultânea que avaliasse o estresse oxidativo, bem como as enzimas antioxidantes.

Quadro 2.1 - Exemplos de estudos *in vitro* com fibroblastos que utilizaram os espectros vermelho e infravermelho

Tipo de célula utilizada	Dosimetria	Objetivo	Conclusão	Ref.
Cultura primária de fibroblastos gengivais (FG)	Laser diodo (670 nm com 10 mW, 780 nm com 50 mW, 692 e 786 nm com 30 mW, 0,01 cm ² , 2 J/cm ²). Quatro sessões com 12 horas de intervalo.	Efeito da fotobiomodulação no espectro visível e infravermelho na proliferação de fibroblastos gengivais.	<ul style="list-style-type: none"> • Maior proliferação dos fibroblastos gengivais com irradiação infravermelha. • Efeito similares com a potência mantida em ambos os comprimentos de onda. 	Almeida-Lopes et al (2001)
Cultura primária de fibroblastos gengivais (FG)	Laser diodo (809 nm, 600 um, 10 mW, 1.96 J/cm ² e 75 s, 3.92 J/cm ² 150 s, 7.84 J/cm ² e 300 s). Três irradiações com intervalo de 24 horas cada.	Efeito da irradiação no espectro infravermelho sobre a proliferação de fibroblastos gengivais.	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito de estimulação da luz é limitado ao tempo de irradiação. • Efeito proliferativo duradouro de acordo com os ciclos de irradiação. 	Kreisler et al (2002)
Linhagem NIH-3T3 (fibroblastos)	Laser diodo (904 nm, 120 mW, 0,07 cm ² , 1 J/cm ² e 8 s, 3 J/cm ² e 24 s). Duas aplicações com intervalo de 6 horas.	Efeito da fotobiomodulação na proliferação e síntese de pro-colágeno e fibroblastos.	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento no número de células com 3 e 4 J/cm² em comparação com o controle. • Não foi observada diferença na quantidade de pro-colágeno entre os grupos. 	Pereira et al (2002)
Cultura primária de fibroblastos gengivais (FG)	Laser diodo (904 nm, 120 mW, 0,07 cm ² , 3 J/cm ² e 24 s).	Síntese proteica e morfologia de fibroblastos gengivais submetidos a fotobiomodulação.	<ul style="list-style-type: none"> • Não foi observada diferença na quantidade de pró-colágeno. • A quantidade de colágeno tipo I foi menor do que o controle. • Importantes alterações morfológicas (principalmente mitocôndrias e reticulo endoplasmático rugoso). 	Marques et al (2004)
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser diodo (660 nm, 0,07 cm ² , 10mW e 29mW, 2 J/cm ² , 14 s (2 J/cm ²), $\cong$ 4.8s). Duas sessões com intervalo de 12 horas.	Avaliação de diferentes exposições radiantes na bioestimulação de fibroblastos gengivais	<ul style="list-style-type: none"> • Maior taxa de crescimento nas células irradiadas. • Relação inversa entre a irradiância e o crescimento celular 	Azevedo et al (2006)

Quadro 2.1 - Exemplos de estudos *in vitro* com fibroblastos que utilizaram os espectros vermelho e infravermelho

Tipo de célula utilizada	Dosimetria	Objetivo	Conclusão	Ref.
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser Diodo (685 nm, 25 mW, 1 cm ² , 2 J/cm ² e 140 s)	Efeitos da irradiação na secreção de fatores de crescimento (IGF-1 e bFGF) em fibroblastos gengivais.	<ul style="list-style-type: none"> • Maior produção de fatores de crescimento (IGF-1, bFGF e IGFBP3). 	Saygun et al (2007)
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser Diodo (660nm e 780nm de 40 mW, 0.042 cm ² , 3 J/cm ² e 3 s, 5 J/cm ² e 5 s, 1 W/cm ²). Duas sessões de irradiação com 6 horas de intervalo.	Efeitos da fotobiomodulação, utilizando lasers vermelhos e infravermelhos, na liberação de bFGF e KGF por fibroblastos gengivais humanos.	<ul style="list-style-type: none"> • Efeito positivo na produção de bFGF. • Não houve alteração na liberação de KGF. 	Damante et al (2008)
Linhagem NIH-3T3 (fibroblastos) e cultura primária de fibroblasto	Laser Diodo (660 nm, 50 mW, 3 J e 60 s, 21 J e 420 s). Três irradiações, sendo cada sessão 24h, 48h e 72h.	Efeito da fotobiomodulação em células com diferentes metabolismos usando os mesmos parâmetros de irradiação.	<ul style="list-style-type: none"> • As células NIH-3T3 foram menos responsivas a fotobiomodulação comparada à cultura primária. • Os efeitos foram dependentes da exposição radiante utilizada; 3 J/cm² aumentou a proliferação celular e reduziu a apoptose 	Frigo et al (2010)
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser Diodo (780 nm, 0,025 W, 0.5, 1.5, 3, 5 e 7 J/cm ² , 40, 120, 240, 400 e 560 s). Três sessões com intervalo de 24 horas por 3 dias consecutivos.	Determinação de exposições radiantes adequadas utilizando parâmetros específicos do laser de baixa intensidade em fibroblastos gengivais.	<ul style="list-style-type: none"> • As exposições radiantes de 0,5J/cm² e 3J/cm² promoveram aumento no proliferação e na migração celular. 	Basso et al (2012)
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser Diodo (940 nm, 0,3 W, 6 J/cm ² e 20 s).	Efeito do laser de diodo (940 nm) sobre a proliferação celular, expressões de mRNA de colágeno tipo I e de fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento (IGF-I, VEGF, TGF-β).	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento na expressão de mRNA de colágeno tipo I nas células irradiadas • Aumento na proliferação das células e na liberação de bFGF, IGF-1. 	Hakki; Bozkurt (2012)
Linhagem L929 (fibroblastos)	Laser Diodo (685 nm e 830 nm, 30 mW, 0.5 cm ² , 60 mW/cm ² , 0.1 – 30 J/cm ² , 2 – 501 s).	Efeito da fotobiomodulação em fibroblastos cultivados com diferentes concentrações de soro fetal bovino.	<ul style="list-style-type: none"> • O laser de baixa intensidade possui efeitos proliferativos (5 – 30 J/cm²) e inibitórios (0.1 – 3 J/cm²). • A condição metabólica das células determina a resposta após a irradiação. 	Marques et al (2014)

Quadro 2.1 - Exemplos de estudos *in vitro* com fibroblastos que utilizaram os espectros vermelho e infravermelho

Tipo de célula utilizada	Dosimetria	Objetivo	Conclusão	Ref.
Linhagem L929 (fibroblastos)	Laser Diodo (904 nm, 50 mW, 0.01 cm ² , 2 e 3 J/cm ²). Dois ciclos de irradiações com intervalo de 24h.	Expressão de colágeno tipo I e VEGF em células de fibroblastos de camundongos.	<ul style="list-style-type: none"> Aumento na expressão de colágeno tipo I e VEGF nas células irradiadas com 2 J/cm² Aumento de VEGF nas células irradiadas com 3J /cm². A exposição radiante de 2 J/cm² foi mais eficaz do que de 3J/cm² na modulação da expressão de colágeno tipo I e VEGF. 	Martignago et al (2014)
Cultura 3D (fibroblastos + matriz de colágeno)	Laser Diodo (780 nm, 70 mW, 25 mW/cm ² , 2 cm ² , 0.5, 1.5 e 3 J/cm ² , 40, 120, 240 s). Três ciclos com intervalo de 24 horas.	Viabilidade de um modelo específico de cultura 3D em células da mucosa oral submetidas à fotobiomodulação.	<ul style="list-style-type: none"> O laser de baixa intensidade penetra na matriz de colágeno e estimula os fibroblastos gengivais semeados dentro dela. 	Basso et al (2016)
Cultura primária de fibroblastos gengivais	Laser Diodo (780 nm, 70 mW, 25 mW/cm ² , 2 cm ² , 0.5, 1.5 e 3 J/cm ² , 40, 120, 240 s). Três ciclos com intervalo de 24 horas.	Efeito do laser de baixa intensidade em fibroblastos gengivais previamente expostos a citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1b, IL-6 e IL-8). Expressão de fatores de crescimento (VEGF, EGF e colágeno tipo I) e análise da proliferação (BrdU) e migração celular (ensaio de fechamento de feridas).	<ul style="list-style-type: none"> A presença de citocinas inflamatórias diminuiu a atividade dos fibroblastos gengivais (colágeno tipo I e VEGF) o que resultou no retardo do fechamento da ferida. O laser de baixa intensidade estimulou a expressão de VEGF e EGF, bem como a migração celular mesmo nas presença das citocinas inflamatórias. 	Basso et al (2016)
Linhagem L929 (fibroblastos)	Laser Diodo (635 nm e 809 nm, 50 mW/cm ² , 2 cm ² , 1 J/cm ² e 3 J/cm ²).	Efeitos das irradiações com laser de 635 e 809 nm na proliferação celular 24, 48 e 72 horas após a irradiação (ensaio de MTT).	<ul style="list-style-type: none"> A irradiação com o laser de 635 nm estimulou a viabilidade celular nas primeiras 24 horas. O laser de 809 nm induziu a proliferação celular somente após 72 horas. 	Solmaz et al (2017)
Linhagem L929 (fibroblastos)	Laser Diodo (660 nm, 25 mW, 0.035 cm ² , 0.01 cm ² , 1 J/cm ² , 3.5 J/cm ²).	Efeito da fotobiomodulação na proliferação e expressão de genes envolvidos no processo de inflamação (VEGF e IL-6)	<ul style="list-style-type: none"> O laser de baixa intensidade com 5 J/cm² induziu a proliferação celular somente após 72h da irradiação. Esses parâmetros demonstraram maior eficácia na expressão do VEGF e na redução da IL-6. 	Szezerbaty et al (2017)

2.5 Hipótese

As exposições radiantes e as potências descritas na literatura (Quadro 2.1) são difíceis de serem reproduzidas pelos equipamentos ofertados atualmente no Brasil, pois estes possuem uma potência fixa de 100mW, o que dificulta a padronização de exposições radiantes mais baixas. Além disso, os recursos de customização do tempo de irradiação são limitados. Por outro lado, os equipamentos contêm os comprimentos de onda de 660nm e 808nm. Um equipamento recente, de marca nacional, permite a emissão simultânea dos dois comprimentos de onda. Com base nesses aspectos, resolvemos investigar os padrões de viabilidade celular e estresse oxidativo produzidos pelos parâmetros de entrega de energia dos equipamentos nacionais, combinando-se os dois comprimentos de onda. Como já comentado, não encontramos estudos *in vitro* que avaliassem o estresse oxidativo com a potência citada, nem tampouco com a irradiação tanto consecutiva quanto simultânea dos dois comprimentos de onda. Assim, as perguntas que norteiam o presente trabalho são:

- a) qual o padrão de viabilidade celular e de estresse oxidativo gerado pela potência de 100mW, com os tempos determinados pelo fabricante, nos comprimentos de onda de 660nm e 808nm, emitidos isoladamente?
- b) Esse padrão se modifica quando a irradiação dos dois comprimentos de onda for feita de forma consecutiva e simultânea, adotando-se os mesmos tempos de irradiação da emissão isolada?

Nossa hipótese é de que, com base na lei de Arndt-Schulz, haverá inibição da viabilidade celular nos maiores tempos de irradiação, bem como maior produção de EROs e de enzimas antioxidantes nos grupos em que houver dupla emissão, já que a potência e/ou a entrega de energia total serão aumentados nessa situação. Aventamos também a hipótese de que, uma vez que os efeitos primários são distintos entre os espectros vermelho e infravermelho, os padrões de viabilidade celular e de estresse oxidativo também serão diferentes entre esses dois comprimentos de onda.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

Avaliar a viabilidade celular e o estresse oxidativo de fibroblastos gengivais expostos a dupla irradiação laser nos comprimentos de onda no vermelho e infravermelho, emitidos consecutiva ou simultaneamente.

3.2 Específicas

- Verificar se a irradiação única com 660nm ou 808nm acarreta padrões diferentes de viabilidade celular e de expressão de EROs, SOD e CAT.
- Verificar se a irradiação com 660nm seguida de 808nm modifica os padrões observados nas irradiações únicas em relação à viabilidade celular e de expressão de EROs, SOD e CAT.
- Verificar se a irradiação com 660nm e 808nm simultaneamente modifica os padrões observados nas irradiações únicas e consecutivas em relação à viabilidade celular e de expressão de EROs, SOD e CAT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia descrita a seguir foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Parecer n. 3.311.348) (Anexo A).

4.1 Cultivo celular

Todos os experimentos do presente trabalho foram realizados com o cultivo primário de fibroblastos gengivais. Para isso, foram obtidos fragmentos de gengiva saudável de 20 pacientes normorreativos, com idade entre 20 e 45 anos, sem estar sob medicações por tempo prolongado, e com indicação de exodontia de terceiros molares inclusos e semi-inclusos na qual houve necessidade de retalho gengival. Não foram elegíveis os pacientes que exibiram inflamação e infecção gengival vinculadas ao sítio de extração, bem como aqueles fora da faixa etária citada e portadores de doenças crônicas. A seleção dos pacientes e a coleta da gengiva foi feita na Clínica de Cirurgia Oral Menor da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), com a contribuição da Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP.

Os fragmentos obtidos foram mantidos em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em um tubo cônico de 50ml contendo 2% de antibiótico/antimicótico (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, foram lavados com tampão de fosfato salino (PBS) (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) estéril contendo 2% de antibiótico/antimicótico e transferidos para placas de 100mm contendo PBS com 2% de antibiótico/antimicótico. Em seguida, foram seccionados em fragmentos de aproximadamente 3x3mm. Os fragmentos foram então transferidos para uma placa de 60mm contendo solução de dispase II (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (4mg/ml) e incubados overnight a 4°C. Com a ajuda de uma pinça estéril e bisturi, e mantendo os fragmentos em PBS estéril, foi feita a separação do epitélio do tecido conjuntivo subjacente. Para

confecção da cultura primária de fibroblastos, o tecido conjuntivo separado do epitélio foi submetido a incubação por 4h a 37°C, com solução de collagenase (Gibco – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (1 mg/ml), para separação dos fibroblastos. Em seguida, foi adicionado soro fetal bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) à suspensão celular, para inativação da collagenase, com posterior centrifugação a 2000 RPM por 3 min. As células foram então inseridas em frascos de cultivo contendo meio DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de antibiótico/antimicótico e foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Preconizamos utilizar, em todos os experimentos, os fibroblastos na passagem 5.

4.2 Grupos experimentais

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais:

- a) *Grupo controle* – fibroblastos gengivais sem nenhum tratamento;
- b) *Grupo 660nm* – fibroblastos gengivais irradiados com 660nm;
- c) *Grupo 808nm* – fibroblastos gengivais irradiados com 808nm;
- d) *Grupo Consecutivo* – fibroblastos gengivais irradiados primeiramente com 660nm e imediatamente após com 808nm;
- e) *Grupo Simultâneo* – fibroblastos gengivais irradiados com 660nm e 808nm emitidos pelo mesmo spot e ao mesmo tempo.

Em todos os grupos irradiados com laser, os tempos de irradiação foram padronizados em 6s, 10s e 20s.

4.3 Caracterização do comprimento de onda emitido pelo equipamento

O equipamento utilizado na presente pesquisa tinha como fonte o laser de diodo GaAlAs/InGaAlP (Therapy EC, DMC Importação e Exportação de Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil). O equipamento foi adquirido em Outubro de 2017. Como o fabricante não descrevia na descrição do equipamento os parâmetros da emissão simultânea, decidiu-se fazer uma caracterização do comprimento de onda e da potência (vide item 4.4.) quando o equipamento estava nesse modo de ativação, com tempo de irradiação de 10s. Previamente aos ensaios, o equipamento foi calibrado pelo fabricante. Foi realizada então a medição dos comprimentos de onda emitidos isoladamente e simultânea no Laboratório de Dosimetria das Radiações e Física Médica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP). As medições foram realizadas em uma sala desprovida de luz, onde o equipamento laser foi posicionado perpendicularmente ao sensor e apoiado neste. O sensor por sua vez, estava conectado a um espectrofotômetro (USB4000-UV-VIS-ES, Ocean Optics, Florida, EUA) responsável por transformar as informações captadas pelo sensor em sinais digitais para o computador, sendo interpretados por um programa específico do espectrofotômetro.

4.4 Caracterização da potência do equipamento laser

Após a medição do comprimento de onda, procedeu-se à medição da potência no mesmo laboratório, tanto no modo de emissão individual quanto de emissão simultânea dos comprimentos de onda, com tempo de irradiação de 10s. Para conferir tais medidas, as checagens foram feitas em uma sala desprovida de luz, onde o equipamento laser foi posicionado perpendicularmente ao sensor de um “power meter” (Newport, model 1918-C, California, EUA) e apoiado neste. Um sensor fotoelétrico emitia sinais elétricos quando da sensibilização pela luz do equipamento; esses sinais foram então convertidos em mW por programa acoplado ao equipamento.

4.5 Planejamento da dosimetria

Após os ensaios de caracterização do comprimento de onda e da potência do equipamento, foi possível planejar a dosimetria. O equipamento emite a luz no modo contínuo, pontual e com os seguintes comprimentos de onda: $660\text{nm} \pm 10\%$ e $808\text{nm} \pm 10\%$. A potência e a área de saída da luz são fixas: $100\text{ mW} \pm 20\%$ e $0,09\text{ cm}^2$ para ambos comprimentos de onda.

Com o intuito de simular mais de uma sessão de FBM, as células receberam duas aplicações de laser com intervalo de 4 horas entre elas. Para o grupo Consecutivo, foi emitido o comprimento de onda de 660nm primeiro e, imediatamente após (intervalo máximo de 10s), sem mexer na posição do spot, o 808nm , simulando situações clínicas em que se deseja irradiar tanto regiões mais superficiais do tecido quanto mais profundas. Nesse caso, o total de energia e de exposição radiante por ponto em cada sessão foi igual à soma das duas emissões individuais. Para o grupo Simultâneo, o equipamento permite que os dois comprimentos de onda sejam emitidos ao mesmo tempo, com a potência sendo dobrada, conforme detectado no ensaio de caracterização da potência do equipamento (vide Resultados, item 5.1). Nesse caso, também o total de energia e a exposição radiante em cada sessão são duplicados em relação à irradiação individual.

Como a potência do equipamento era fixa, decidiu-se variar o tempo de irradiação, para se estabelecer três conjuntos distintos de exposições radiantes:

- Exposição radiante próxima às mais baixas descritas na literatura, com irradiação com comprimento de onda único (vide Tabela 1); para isso, adotou-se um tempo de irradiação (6s) aquém do mínimo estipulado pelo fabricante do equipamento; esse tempo gerou $6,6\text{J}/\text{cm}^2$ na irradiação isolada e $13,2\text{J}/\text{cm}^2$ na irradiação consecutiva e simultânea;
- Exposição radiante intermediária segundo a literatura (vide Tabela 1); para isso, adotou-se um tempo de irradiação (10s) que é o mínimo estipulado pelo fabricante do equipamento; esse tempo gerou $11,1\text{J}/\text{cm}^2$ na irradiação isolada e $22,2\text{J}/\text{cm}^2$ na irradiação consecutiva e simultânea;
- Exposição radiante alta, também segundo o descrito na literatura (Tabela 1); para isso, adotou-se um tempo de irradiação (20s); esse tempo gerou

22,2J/cm² na irradiação isolada e 44,4J/cm² na irradiação consecutiva e simultânea.

Os parâmetros completos de irradiação de cada grupo encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Parâmetros de irradiação, por ponto, adotados para cada grupo experimental.

Grupos	Comprimento de onda (nm)	Potência (mW)	Exposição radiante (J/cm ²)	Tempo de exposição (s)	Irradiância (mW/cm ²)	Total de Energia (J)
Controle	-		-	-	-	-
			-	-	-	-
			-	-	-	-
660nm	660 ± 10	100** ± 20%	6,6	6	1100	0,6
			11,1	10	1100	1
			22,2	20	1100	2
808nm	808 ± 10	100** ± 20%	6,6	6	1100	0,6
			11,1	10	1100	1
			22,2	20	1100	2
Consecutivo*	660 ± 10 e 808 ± 10	100** ± 20%	6,6	6	1100	0,6
			11,1	10	1100	1
			22,2	20	1100	2
Simultâneo	660 ± 10 e 808 ± 10	200*** ± 20%	13,2	6	2200	1,2
			22,2	10	2200	2
			44,4	20	2200	4

* Valores descritos para cada irradiação individualmente. Considerando a emissão dos dois comprimentos de onda, o total de energia entregue e a exposição radiante total em cada sessão foi duplicada.

** Potência descrita pelo fabricante.

*** Potência obtida a partir dos ensaios de caracterização do equipamento (vide item 5.1 em Resultados).

Fonte: A autora

4.6 Irradiação dos cultivos celulares

Os fibroblastos gengivais foram cultivados em DMEM (com vermelho de fenol), com 10% de SFB. Após 24h, o meio foi trocado por outro DMEM (com vermelho de fenol) contendo menos soro, para que as células atingissem um estado de “starvation”. Há uma tendência na literatura de verificar que a FBM exerce um melhor efeito quando as células estão em situação de estresse ou com o metabolismo celular alterado. Uma das maneiras de estimular essa alteração nas células *in vitro* é reduzindo a concentração de SFB no meio de cultura. Realizou-se então uma análise preliminar (Anexo A) com o intuito de determinar a concentração do SFB. Para tal realização, o grupo 660nm com a exposição radiante de $11,1\text{J}/\text{cm}^2$ foi separado em diferentes subgrupos com as seguintes concentrações de SFB: 10%, 5%, 3% e 2% (Marques et al., 2014). Após 24h da última irradiação, foi realizado o ensaio de viabilidade celular. A concentração que gerou maior viabilidade celular foi a de 3% (Anexo A), sendo então a adotada para o presente estudo.

A irradiação foi realizada quando as células estavam com 24h de exposição a 3% de soro. Para realizar a irradiação, o laser foi posicionado perpendicularmente e abaixo das placas de cultivo, com o tempo de exposição programado diretamente no aparelho. As irradiações foram realizadas sempre com o mesmo equipamento e pelo mesmo operador, com a luz apagada do laboratório. Utilizou-se placa de Petri de 100 mm contendo adesivo preto no fundo (totalizando 52 pontos de aplicação), no qual foram feitos furos compatíveis com a área do spot do equipamento, visando padronizar o local e a área de irradiação, evitando o excesso ou a falta da energia entregue nas células. Essa metodologia foi adaptada de Sperandio (2012). Também foram utilizadas placas pretas com fundo transparente de 96 poços, com o intuito de manter a irradiação restrita às células presentes somente no poço no qual foi posicionada a ponta do equipamento laser. As irradiações ocorreram dentro do fluxo laminar, mantendo-se o grupo controle, que não recebeu irradiação, sob as mesmas condições experimentais.

4.7 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio MTS (sal tetrazolium) é um método colorimétrico de detecção do trifenilformazan, produto da redução do sal tetrazolium pela ação de desidrogenases mitocondriais. A identificação do trifenilformazan sugere que a atividade mitocondrial celular está preservada e, portanto, as células estão viáveis. A reação baseia-se no princípio de que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à absorbância obtida.

Para o ensaio de MTS, fibroblastos gengivais (2000 células por poço) foram cultivados em placas pretas com fundo transparente de 96 poços contendo 200µl de meio de cultura suplementado com 3% de soro fetal bovino. Após 24h da última irradiação, o teste de viabilidade celular foi realizado com o MTS KIT Cell Titer 96 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) após prévia substituição do meio de cultivo (90µl). Foram adicionados 20µl da solução Cell Titer 96, seguida por incubação por 4 horas em estufa CO₂ a 37°C. Após esse período, foi quantificada a formação do sal formazan em um espectrofotômetro (Ezread 400, Biochrom, Cambridge, UK), com filtro de 492 nm. Todos os experimentos de MTS foram realizados em sextuplicata.

4.8 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A quantificação de EROs intracelular foi mensurada através do kit comercial Fluorimetric Intracellular ROS (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Esse ensaio consiste na detecção das EROs através de um sensor fluorogênico permeável a membrana celular. Na presença de EROs, o sensor fluorogênico irá reagir com o montante proporcional de EROs presente nas amostras, resultando em uma reação fluorescente.

Os fibroblastos gengivais (2000 células por poço) foram cultivados em placas pretas com fundo transparente de 96 poços contendo 200µl de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24h. Após esse período as células foram cultivadas com meio de cultivo contendo 3% de soro fetal bovino. Após 24h,

foram realizadas as irradiações de todos os grupos experimentais. Finalizada a irradiação, o meio de cultivo celular foi substituído por 100µl da solução padrão do kit (ROS Detection Reagent Stock Solution e Assay Buffer), preparada previamente seguindo as instruções do fabricante. Seguiu-se incubação por 1h na estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Além do grupo controle do experimento (células sem irradiação), foi testado um grupo de controle positivo da reação; nesse grupo foram adicionados 20µl de H₂O₂ a 3M, seguindo-se incubação por 30min em estufa a 37°C. Após 30min, o meio de cultivo celular foi substituído por uma solução contendo os reagentes ROS Detection Reagent Stock Solution e Assay Buffer conforme as informações do fabricante. Após a incubação, foi feita a leitura da fluorescência no leitor de microplacas (Synergy HTX Multi-Mode Reader, Vermont, EUA) com filtro de excitação de 640nm e emissão de 675nm. A quantidade de EROs foi expressa em unidades de fluorescência relativa.

A quantificação de EROs foi realizada nos grupos irradiados e no controle. Inicialmente comparou-se a presença desses radicais livres nos fibroblastos com soro 10% e 3%, para ter certeza de que as EROs seriam produzidas pela irradiação e não pela indução de “starvation”.

4.9 Obtenção do lisado celular

Para a quantificação de enzimas antioxidantes, foi necessário realizar lisado das células dos diferentes grupos presentes. Para tanto, os fibroblastos gengivais foram cultivados (3X10⁵ células por poço) e submetidos às diferentes irradiações em placas de 100 mm de diâmetro devidamente apropriadas para a irradiação laser. Após 24h da última irradiação, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas três vezes com PBS. Para que as células se soltassem do fundo da placa de cultivo, foi adicionado 1ml de tampão RIPA (50nM Tris-HCL, 150nM cloreto de sódio, 1% Triton X, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 1nM de EDTA), acrescido de inibidor de protease (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, foram deslocadas gentilmente com o auxílio de “cell scraper” por 10 min. Após esse período, essa solução foi então coletada e submetida a centrifugação a 11000 RPM por 20min

a 4°C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas de 1000µl em freezer a -80°C, até o momento da sua utilização.

4.10 Quantificação da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi quantificada utilizando kit comercial (kit SOD Assay, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). A técnica é baseada em uma reação colorimétrica em que esta enzima inibe a redução do sal de tetrazólio WST-1 e gera formazan (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Uma alíquota (20µl) de cada amostra foi adicionada a 20µl de H₂O₂, seguida da adição dos reagentes pertencentes ao kit, solução de estoque (200µl) e da Enzyme Working Solution (20µl). Todos os poços foram homogeneizados e levados para a incubadora a 37°C por 20 min. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Ezread 400, Biochrom, Cambridge, UK), com filtro de 450 nm.

4.11 Quantificação da enzima antioxidante catalase

O princípio do ensaio é baseado na reação do H₂O₂ e da enzima “*horseradish peroxidase*” (HRP) com um substrato colorimétrico. Com base nisso, quanto mais catalase estiver presente na amostra, menos o H₂O₂ irá reagir com a enzima HRP, resultando na redução do produto colorimétrico. A catalase foi quantificada utilizando kit comercial (Catalase Colorimetric Activity Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Foram adicionadas alíquotas (25µl) de cada amostra a 25µl do reagente de H₂O₂ e incubação por 30min em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionadas às amostras 25µl do substrato colorimétrico e 25µl da enzima 1XHRP, seguidas de incubação por 15min. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (ELX 800 Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA), com filtro de 560 nm.

4.12 Análise estatística

Os dados numéricos foram expressos em média e mediana, desvio-padrão e valores mínimo e máximo. Foi realizado teste de Shapiro-Wilk, para verificação da normalidade dos dados. Para todas as variáveis, com exceção dos valores de atividade de CAT, os dados seguiram uma curva paramétrica. Os grupos então foram comparados pela análise de variância ANOVA, seguida do teste de Tukey. Os valores da atividade de CAT foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Os níveis de significância adotados foram de 5%. Os testes foram realizados por meio de pacote estatístico R.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do aparelho laser

Inicialmente, foi checado se o aparelho laser emitia no comprimento de 660nm e 808nm. A Figura 5.1 mostra dois picos claros de emissão compatíveis com os dois comprimentos de onda, estando de acordo com as especificações do fabricante.

Figura 5.1 – Intensidade de emissão laser em função dos comprimentos de onda variando de 200 a 1000nm

Fonte: A autora

Em seguida, foi analisada a potência média emitida pelo aparelho laser. As variações da potência média no comprimento de 660nm durante 10 segundos de irradiação são mostradas na figura 5.2. Nas configurações do aparelho fornecidas pelo fabricante, a variação da potência seria de 100 ± 20 mW. Seis medidas durante a irradiação foram compatíveis com essa variação. Três valores ficaram fora desse intervalo: 73,08mW em 3s, 194,48mW em 8s e 143,53mW em 9s. Pelo ensaio, a potência média e o desvio-padrão foram de $112,61 \pm 26,25$ mW.

Figura 5.2 – Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® no comprimento de onda de 660nm durante irradiação de 10s

Fonte: A autora

As variações da potência média emitida pelo equipamento laser no comprimento de 808nm durante irradiação de 10s encontram-se na figura 5.3. Diferentemente do que ocorreu no comprimento de onda de 660nm, em 808nm somente três medidas ficaram dentro da faixa de 100 ± 20 mW; os demais valores ficaram bem abaixo, chegando a 26,88mW em 7s. Pelo ensaio, a potência média e o desvio-padrão foram de $70,79 \pm 22,55$.

O mesmo ensaio foi realizado com a emissão simultânea de 660 e 808 nm, e os valores de potência média encontram-se na figura 5.4. O fabricante não fornece os valores de potência quando da emissão simultânea. Pelo ensaio, nota-se que as potências de ambos os comprimentos de onda se somam, atingindo um pico de 210,54mW. Pelo ensaio, a potência média e o desvio-padrão foram de $162,22 \pm 31,30$ mW.

Figura 5.3 – Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® no comprimento de onda de 808nm durante irradiação de 10s

Fonte: A autora

Figura 5.4 – Potência média (mW) emitida pelo aparelho laser Therapy EC® na emissão simultânea de 660nm e 808nm durante irradiação de 10s

Fonte: A autora

5.2 Análise da viabilidade celular

A análise de viabilidade celular foi realizada pelo método MTS para os comprimentos de onda 660nm e 808nm, emitidos isoladamente, simultaneamente e consecutivamente, nos tempos de 6s, 10s e 20s. A detecção da viabilidade celular foi feita após 24h da irradiação. Na figura 4.5, são mostrados os valores de médios de viabilidade celular (absorbância para o formazan) em cada um dos grupos, segundo o Controle e os tempos de irradiação testados. Na irradiação com 660nm, todas os tempos acarretaram média de viabilidade menor que a do Controle. Houve diferenças significativas entre o Controle e 20s ($p<0.05$); esse tempo acarretou 88,9% de média viabilidade celular quando normalizada pelo Controle. A mesma tendência foi observada para 808nm, havendo diferenças significativas também entre o Controle e 20s ($p<0.05$); a média de viabilidade celular acarretada por esse tempo de irradiação, quando normalizada pela do Controle, foi de 86,6%.

No Grupo Consecutivo (Figura 5.5), os tempos de 6s e 10s exibiram viabilidade celular menor do que a do Controle, o que não ocorreu com 20s. A menor viabilidade celular foi com 6s, diferindo estatisticamente do Controle ($p<0.05$) e de 10s ($p<0.05$); quando normalizado pelo Controle, 6s gerou média de viabilidade celular de 87,3%.

Já no Grupo Simultâneo (Figura 5.5), a viabilidade celular ficou próxima da do Controle, sem diferenças significativas. A maior média de viabilidade foi com 20s (108,6%).

Figura 5.5 – Média ($\pm$ desvio-padrão) dos valores de absorbância indicativos de viabilidade celular nos grupos 660nm (A), 808nm (B), consecutivo (C) e simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p<0.05$; valor de p pelo teste de Tukey; os valores em porcentagem indicam a viabilidade celular normalizada pelo Controle)

Fonte: A autora

Comparando-se os grupos entre si, os grupos Consecutivo e Simultâneo exibiram viabilidade celular significativamente maior do que os grupos 660nm e 808nm no tempo de 20s ($p<0.05$ para grupo Consecutivo em relação a 660nm e $p<0.001$ para as demais situações).

5.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

A quantificação das EROs foi realizada por intermédio de análise de fluorescência da cianina oxidada, a qual é diretamente proporcional à quantidade de EROs presente no citoplasma. Inicialmente, avaliou-se se a ausência de soro não estaria induzindo estresse oxidativo nos fibroblastos. A figura 5.7 ilustra a média de fluorescência nas situações com o meio contendo 3% de soro (“starvation”) e 10% de soro (normal) em comparação ao controle positivo do teste, no qual as células foram

expostas a peróxido de hidrogênio 3M. Nota-se que a menor produção de EROs foi com soro 3%, diferindo estatisticamente do soro 10% ($p<0.05$) e do controle positivo ($p<0.01$). Dessa forma, a indução de “starvation” não contribuiu significativamente para produção de EROs, sendo possível realizar os ensaios de irradiação com essa condição.

Figura 5.6 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da intensidade de fluorescência indicativa de espécies reativas de oxigênio em situações nas quais fibroblastos gengivais foram cultivados com 3% e 10% de soro; o controle positivo da reação foi realizado com exposição dos fibroblastos a peróxido de hidrogênio 3M (* $p<0.05$; ** $p<0.01$ valor de p pelo teste de Tukey)

Fonte: A autora

A figura 5.7 evidencia a média de intensidade de fluorescência indicativa de EROs nos grupos experimentais. Com exceção do Grupo Simultâneo com tempo de irradiação de 20s, a média de produção de EROs foi menor do que no Controle (sem irradiação) em todos os grupos. Os tempos de 6s e 10s exibiram diferenças significativas em relação ao Controle nos grupos 660nm ($p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente) e 808nm ($p<0.05$ para 6s) e Consecutivo ($p<0.05$ para os dois tempos). No grupo Simultâneo, 20s acarretou intensa produção de EROs, sendo significativamente maior do que o Controle ($p<0,01$) e os demais tempos de irradiação ($p<0.01$ para todos os tempos).

Comparando os valores de EROs entre os grupos 660nm e 808nm para cada tempo de irradiação, com 10s o grupo 808nm produziu significativamente menos EROs do que o grupo 660nm ($p=0.043$). Nos tempos de 6s e 20s, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. Comparando-se agora os grupos Consecutivo e Simultâneo, cujas exposições radiantes foram similares, com

20s o grupo Simultâneo exibiu quantidade de EROs significativamente maior ($p<0.001$).

Figura 5.7 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da intensidade de fluorescência indicativa de espécies reativas de oxigênio nos grupos irradiados com 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D) segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p<0.05$; ** $p<0.01$ valor de p pelo teste de Tukey)

Fonte: A autora

5.4 Quantificação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi avaliada por intermédio de sua inibição de ânions superóxido, apresentada em porcentagem. Quanto maior a porcentagem, maior atividade da SOD. A média dessa porcentagem em cada grupo é apresentada na figura 5.8. No Grupo 660nm, 6s ($p<0,01$), 10s ($p<0,05$) e 20s ($p<0,01$) exibiram menor porcentagem em relação ao Controle. Dentre esses tempos, 10s foi o que exibiu maior média de atividade da SOD, diferindo estatisticamente de 6s ($p<0,01$) e 10s ($p<0,01$).

A mesma tendência de todos os tempos terem menor atividade de SOD em relação ao Controle também foi observada no grupo 808nm (Figura 5.8), com diferenças significativas em relação 10s ($p<0,05$) e 20s ($p<0,05$). A menor atividade de SOD foi exibida com 20s, diferindo estatisticamente em relação a 6s ($p<0,05$).

Tendência diferente foi detectada no grupo Consecutivo (Figura 5.8). Nesse grupo, 6s exibiu maior atividade da SOD, sendo maior que o Controle, mas somente com diferenças significativas em relação a 10s ($p<0,05$) e 20s ($p<0,05$).

Já o grupo Simultâneo acarretou outro padrão de atividade da SOD (Figura 5.8). Nesse grupo, a menor atividade dessa enzima foi com 10s, diferindo estatisticamente do Controle ($p<0,05$) e de 20s ($p<0,05$). Esse último tempo foi o que exibiu maior atividade da SOD, sendo maior que a do Controle, porém sem diferenças estatísticas significativas.

Nota-se, assim, que quando foram utilizados comprimentos de onda isolados, a tendência foi haver menor atividade da SOD em todos os tempos, principalmente com 20s. Já com irradiação consecutiva ou simultânea, essa tendência modificou, com 6s e 20s exibindo maior atividade dessa enzima, respectivamente nos grupos Consecutivo e Simultâneo.

Figura 5.8 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de inibição acarretada pela superóxido dismutase nos grupos irradiados com 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ valor de p pelo teste de Tukey)

Fonte: A autora

5.5 Quantificação da atividade da catalase

A atividade da CAT em cada um dos grupos, segundo os tempos de irradiação, encontra-se na Figura 4.11. No grupo 660nm, todas os tempos geraram atividade menor dessa enzima em relação ao Controle. Os tempos de 10s e 20s exibiram diferenças estatisticamente significantes em relação ao Controle ($p < 0,05$ para as duas situações). Já no grupo 808nm, somente 6s e 10s exibiram menor atividade da CAT em relação ao Controle, com diferenças significativas para 10s ($p < 0,05$), que também diferiu de 20s ($p < 0,05$). No grupo Consecutivo, 10s e 20s exibiram menor atividade da CAT em relação ao Controle e a 6s ($p < 0,05$ para todas as situações). Já no grupo Simultâneo, houve novamente diminuição gradativa da

atividade dessa enzima segundo o tempo de irradiação, com 20s diferindo estatisticamente do Controle ($p<0.05$).

Figura 5.9 – Box plot para atividade da catalase nos grupos 660nm (A), 808nm (B), Consecutivo (C) e Simultâneo (D), segundo o controle e os tempos de irradiação. Linha central – mediana; + média; limites do retângulo – percentis 25º e 75º; *whiskers* – valores máximo e mínimo (* $p<0.05$; valor de p pelo teste de Dunn)

Fonte: A autora

5.6 Resumo das tendências de resultados de cultivo celular

A tabela 5.1 mostra um resumo das principais tendências de resultados referentes aos ensaios executados de cultivo celular, segundo os grupos e os tempos de irradiação e tomando como base o controle.

Tabela 5.1 – Tendências de resultados nos grupos irradiados em relação ao controle, obtidos no cultivo celular segundo os grupos e os tempos de irradiação

Grupos	VC	EROs	SOD	CAT
660nm				
6s	↓	↓*	↓	↓
10s	↓	↓*	↓*	↓*
20s	↓*	↓	↓*	↓*
808nm				
6s	↓	↓*	↓	↓
10s	↓	↓	↓*	↓*
20s	↓*	↓	↓*	↑
Consecutivo				
6s	↓*	↓*	↑	↑
10s	↓	↓*	↓	↓*
20s	↑	↓	↓	↓*
Simultâneo				
6s	↑	↓	↓	↓
10s	↑	↓	↓*	↓
20s	↑	↑*	↑	↓*

↓ - diminuição em relação ao controle; ↑ - aumento em relação ao controle; * - tendência estatisticamente significativa.

Fonte: A autora

6 DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi investigar se a irradiação consecutiva e simultânea do comprimento de onda vermelho e infravermelho modificava os padrões de viabilidade celular e de estresse oxidativo em relação às emissões isoladas de 660nm e 808nm. Como resultado geral, verificamos que sim, porém nossa hipótese inicial não foi totalmente confirmada, conforme discutimos a seguir.

Há uma tendência na literatura que aponta para a ideia de que exposições radiantes mais baixas podem ter um efeito estimulatório, diferente das exposições radiantes mais altas que podem ter um efeito inibitório (Huang et al., 2011; de Freitas; Hamblin., 2016). Com base nisso, formulamos a hipótese de que a FBM poderia estimular a viabilidade celular com exposições radiantes baixas e inibir com exposições radiantes mais altas. Nesse sentido, as irradiações simultânea e consecutiva gerariam efeito inibitório, considerando-se a grande quantidade de energia total entregue, principalmente nos tempos de irradiação maiores. Além disso, as exposições radiantes mais altas iriam, principalmente na irradiação simultânea, gerar mais EROs do que as exposições radiantes mais baixas e intermediárias.

Essa hipótese foi formulada porque acreditamos que a suposta inibição da irradiação simultânea poderia acarretar inúmeras vantagens no dia-a-dia odontológico. Um exemplo de aplicação dessa propriedade inibitória seria nas situações de mucosite oral exibindo intensa sintomatologia dolorosa, a qual pode interferir diretamente na qualidade de vida (Kusiak et al., 2020). Esse efeito seria benéfico, considerando a necessidade de redução de mediadores químicos da inflamação, causadores da dor no exemplo citado.

Decidimos utilizar, então, um equipamento laser, disponível no mercado odontológico, que emite, de forma simultânea, o comprimento de onda vermelho e infravermelho. Para isso, previamente aos experimentos, foi feita a caracterização das potências quando os comprimentos de onda eram emitidos isoladamente ou simultaneamente. Notamos que houve uma variação considerável das potências que foram emitidas pelo equipamento, o que pode influenciar, de maneira positiva ou negativa, nos resultados que encontramos, bem como dificultar a comparação com os achados científicos.

Vale dizer que, durante os experimentos do presente trabalho, o equipamento utilizado foi aperfeiçoado pelo fabricante e, no modo simultâneo, o tempo de entrega da luz foi diminuído pela metade, já que a potência está duplicada. Dessa forma, foi mantida a quantidade total de energia especificada nos botões do equipamento, os quais, antes da mudança, informavam de forma errônea a energia total.

Inicialmente, foi realizado o ensaio de MTS com o intuito de verificar se, após a irradiação simultânea, as células mantinham sua viabilidade considerando a suposta inibição que poderia ocorrer. Quando os comprimentos de onda foram utilizados isoladamente, verificamos que o tempo de 20s, com exposição radiante de $22,2\text{J}/\text{cm}^2$, acarretou inibição significativa da viabilidade celular, confirmando a nossa hipótese de que altas exposições riantes podem ter um efeito inibitório. Assim, podemos dizer que, em nosso experimento, com as emissões isoladas de 660nm e 808nm, nossa hipótese se confirmou. Ressalvas devem ser feitas com relação a essa afirmação, já que, apesar de não haver diferença significativa, os demais tempos de 6s e 10s, com exposições riantes de $6,6\text{J}/\text{cm}^2$ e $11,1\text{J}/\text{cm}^2$, também geraram viabilidade menor do que a do controle. Acreditamos que essa inibição possa ter origem na alta potência empregada (100mW), gerando alta irradiância e, portanto, efeito inibitório. Acredita-se que, uma irradiância muito alta ou um tempo de exposição muito longo podem desencadear uma resposta biológica inibitória (Huang et al., 2011). De fato, há uma tendência na literatura, demonstrada pela Tabela 1, de que exposições riantes mais altas, variando entre 7 e $12\text{J}/\text{cm}^2$, podem apresentar um efeito inibitório na viabilidade celular, e exposições riantes mais baixas, variando de 0,5 a $6\text{J}/\text{cm}^2$, ambos com potências entre 10 e 120mW, podem estimular positivamente a viabilidade celular, levando a proliferação. Vale dizer que esses efeitos estão atrelados ao estado fisiológico das células e ao número de ciclos realizado (Azevedo et al., 2006; Pogrel et al., 1997).

Por outro lado, nossa hipótese foi negada observando-se os resultados das irradiações consecutiva e simultânea. Na irradiação consecutiva, observamos que houve uma certa tendência de maior viabilidade celular no tempo de 20s (exposição radiante total foi de $44,4\text{J}/\text{cm}^2$ e irradiância total de $2200\text{mW}/\text{cm}^2$) em relação aos grupos 660nm e 808nm. O espectro do vermelho tende a provocar efeitos fotoquímicos nas células, principalmente nas mitocôndrias, enquanto o infravermelho provoca efeitos fotofísicos, principalmente nas membranas (Karu, 1989; Evans; Abrahamse, 2008; Calderhead; Tanaka, 2017). Provavelmente esses dois

mecanismos de ação, quando aplicados consecutivamente, tiveram efeito sinérgico nas células, perceptível a partir de maior tempo de exposição à luz, levando a maior viabilidade celular. Esse fato comprova que ambos os comprimentos de onda podem ter efeito complementar, não só em termos de penetração em profundidade nos tecidos, mas também no interior das células. Esse efeito merece ser mais bem explorado, percorrendo-se protocolos de aplicação clínica, nos quais sejam aplicados esses princípios de sinergismo entre os dois comprimentos de onda.

O sinergismo entre os dois comprimentos de onda também se fez notar na irradiação simultânea, quando alta exposição radiante e irradiância foram entregues no mesmo tempo. Tal qual no Consecutivo, nesse grupo também foi detectado aumento da viabilidade celular, principalmente no tempo de 20s ($44,4\text{J}/\text{cm}^2$, $2200\text{mW}/\text{cm}^2$). É possível que essa resposta ocorra por conta dos distintos sítios de absorção dos fotorreceptores, pelos diferentes estados redox da CCO, ou até mesmo pela ativação de moléculas sinalizadoras que conectam os fotorreceptores entre si (Hamblin; Demidova, 2006; Huang et al., 2011; Lima et al., 2020). Mesmo com alta exposição radiante entregue no mesmo tempo, não houve inibição da viabilidade celular, contrariando nossa hipótese inicial.

Além da viabilidade celular, resolvemos verificar se, tanto as irradiações isoladas quanto as consecutivas e simultâneas, poderiam ter uma influência na produção das EROs. Em geral, a grande maioria dos estudos relacionando a FBM com o estresse oxidativo estão ligados a situações de injúria celular ou tecidual. (Huang et al., 2011; Hamblin, 2017). Assim, a comparação desses estudos com os nossos resultados se torna limitada, já que foram utilizadas células em situações experimentais distintas, bem como tipo de equipamento, comprimento de onda e potência/exposição radiante diferentes. Contudo, nossos resultados corroboraram, em parte, com a nossa hipótese inicial de que a irradiação simultânea acarretaria uma maior produção de EROs. A irradiação simultânea gerou grande quantidade de estresse oxidativo, principalmente na situação de uma alta exposição radiante (20s, $44,4\text{J}/\text{cm}^2$).

Outra pergunta do estudo foi se havia diferença no padrão de estresse oxidativo considerando-se os comprimentos de onda 660nm e 808nm. Em nosso experimento, detectamos que 808nm produziu mais EROs em 10s ($11,1\text{J}/\text{cm}^2$) do que 660nm no mesmo tempo. Com base nesse resultado, podemos inferir que o padrão de produção de estresse oxidativo depende, além da exposição radiante, da irradiância e do tempo

de irradiação, também do comprimento de onda. Outro estudo também detectou tendência semelhante, no qual a FBM na faixa do 825nm promoveu um aumento na geração das EROs, em comparação a 625nm. As EROs foram geradas em maior quantidade frente a exposições radiantes mais baixas, em torno de $5\text{J}/\text{cm}^2$, e mais altas, variando de 15 a $25\text{J}/\text{cm}^2$ (George et al., 2018).

Apesar de termos detectado diferenças no padrão de produção de EROs entre 660nm e 808nm, em ambos os grupos a produção de EROs foi menor do que no controle. Uma hipótese que poderia explicar esse achado é que em células normais, porém em “starvation”, como as usadas no nosso experimento, é comum ocorrer um aumento do potencial de membrana mitocondrial e uma rápida liberação de EROs após a irradiação; mas se, por algum motivo, o potencial de membrana mitocondrial estiver baixo, a FBM eleva o potencial de membrana mitocondrial para níveis normais, bem como reduz a produção de EROs (Zorov et al., 2014; de Freitas; Hamblin, 2016; Hamblin, 2017). Provavelmente nossas células poderiam estar com o potencial de membrana reduzido, levando à redução de EROs.

Além de avaliar o efeito da irradiação simultânea na produção da EROs, decidimos analisar a produção das enzimas antioxidantes SOD e CAT. Isso porque o benefício ou malefício desse aumento na produção de EROs pode estar ligado a ativação do sistema antioxidante (Tafur; Mills, 2008; de Freitas; Hamblin, 2016). O aumento na produção das enzimas antioxidantes em geral vem acompanhado da redução de EROs em tecidos ou células injuriados (Hamblin, 2017). No entanto, nossos resultados não corroboraram com essa hipótese; a menor produção de EROs não foi acompanhada por um aumento da atividade de enzimas antioxidantes. Os tempos de 6s ($6,6\text{J}/\text{cm}^2$) e 10s ($11,1\text{J}/\text{cm}^2$) nas irradiações isoladas tiveram uma tendência de produzir menos SOD e CAT do que o controle, provavelmente porque a indução de EROs também foi menor. O aumento de EROs no tempo de 20s ($44,4\text{J}/\text{cm}^2$) no grupo Simultâneo também não acarretou aumento na atividade antioxidante; ao contrário, observou-se redução da atividade da CAT, sugerindo certa inibição também do sistema antioxidante. A SOD também foi inibida, principalmente no tempo de 10s. Em trabalho que envolveu lesão induzida em pele, também foi notada uma diminuição da produção de SOD e CAT frente a uma irradiação com 660nm e $1\text{J}/\text{cm}^2$ e $3\text{J}/\text{cm}^2$, fato explicado pelos autores pela baixa exposição às EROs (Silveira et al., 2011). Já em outro estudo houve aumento na produção de EROs e de enzimas antioxidantes quando utilizado $210\text{mW}/\text{cm}^2$ e uma exposição radiante de

12,86J/cm² (Silva et al., 2016). Por essas duas evidências, o natural seria haver uma relação diretamente proporcional entre EROs e enzimas antioxidantes, para manutenção da homeostase. Não conseguimos detectar essa relação no grupo Simultâneo. Uma possível explicação seria que a irradiância, ou seja, a quantidade de fótons entregue inibiu a CAT e a SOD e induziu maior quantidade de EROs. De forma inesperada, o resultado disso pode ter favorecido a viabilidade celular, já que nesse grupo e com esse tempo de irradiação a viabilidade foi maior do que o controle.

Este estudo contém várias limitações. Uma delas é o fato de termos analisado os fibroblastos em monocamada, não sendo possível uma avaliação do efeito da luz em profundidade ou em uma relação tridimensional, considerando-se inclusive mais variáveis relacionadas aos coeficientes de absorção dos diferentes comprimentos de onda. Outra limitação foi o fato de termos explorado poucos elementos do complexo processo de estresse oxidativo, o que não permite maiores extrapolações com relação aos mecanismos possíveis. Além disso, no planejamento da dosimetria não se levou em consideração a padronização da exposição radiante, que poderia ter sido ajustada em todos os grupos variando-se o tempo de irradiação. Contudo, priorizamos as condições que são utilizadas no cotidiano da clínica odontológica, na qual os protocolos clínicos são criados muito em função dos recursos do equipamento e das facilidades de manuseio do mesmo.

Em suma, apesar das limitações do estudo, foi possível detectar que o comprimento de onda de 660nm gerou um padrão de estresse oxidativo diferente do 808nm, e que a irradiação consecutiva e simultânea dos dois comprimentos de onda, apesar de ter gerado um aumento da exposição radiante e da irradiância, não acarretou inibição da viabilidade celular, mesmo diante da alta produção de EROs. Essas duas propriedades podem ser melhor exploradas em protocolos clínicos futuros, principalmente nas situações em que se deseja um efeito sinérgico entre os dois comprimentos de onda.

7 CONCLUSÕES

- A viabilidade celular foi similar entre os comprimentos de onda 660nm e 808nm nas irradiações isoladas, com tendência a inibição em situações de maior tempo de irradiação e maior exposição radiante.
- O padrão de produção de EROs foi diferente nas irradiações isoladas de 660nm ou 808nm, com tendência a 808nm produzir mais estresse oxidativo do que 660nm no tempo de 10s de irradiação. A atividade das enzimas antioxidantes foi similar entre os dois comprimentos de onda.
- A irradiação consecutiva de 660nm e 808nm acarretou maior viabilidade celular e menor estresse oxidativo, diferindo do padrão encontrado nas irradiações isoladas.
- A irradiação simultânea de 660nm e 808nm acarretou maior viabilidade celular a despeito de maior produção de EROs e inibição do sistema antioxidante.

REFERÊNCIAS¹

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

Almeida-Lopes, L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação: [tese]. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos. 2003.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolismo, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy 2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. Doi: 10.1155/2014/360438.

Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006 Jul;21(2):86-9. Epub 2006 May 13. doi:10.1007/s10103-006-0379-9.

Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, de Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Ver. Nutri., Campinas.* 2010 jul/ago 23(4):629-43. doi:10.1590/S1415-52732010000400013.

Barreiros ALS, David JM, David AP. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim Nova.* 2006; 29(1):113-23. doi: 10.1590/S0100-40422006000100021.

Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012:719452. doi: 10.1155/2012/719452.

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb;28(2):367-74. doi:10.1007/s10103-012-1057-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Cardoso LM, Scheffel DL, de Souza Costa CA, et al. Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. *Lasers Surg Med*. 2016 Dec;48(10):1006-1014. doi: 10.1002/lsm.22553.

Basso FG, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2016 Jul;31(5):973-8. doi: 10.1007/s10103-016-1945-4.

Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Citta M, Soares DG, Scheffel DS, et al. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. *Lasers Med Sci*. 2018 Feb;33(2):445-449. doi:10.1007/s10103-017-2176-z.

Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. LLLT Effects on Oral Keratinocytes in an Organotypic 3D Model. *Photochem Photobiol*. 2018 Jan;94(1):190-194. doi: 10.1111/php.12845.

Calderhead RG, Tanaka, Y. Photobiological Basics and Clinical Indications of Phototherapy for Skin Rejuvenation. *Photomedicine – Adv in Clinical Practice*. 2017. Doi: 10.5772/intechopen.68723.

Cavalcanti TM, Catão MHCV, Lins RDAU, Almeida-Barros RQ, Feitosa APA. Knowledge of the physical properties and interaction of laser with biological tissue in dentistry. *An Bras Dermatol*. 2011;86(5):955-60. doi: 10.1590/S0365-05962011000500014.

Chen ACH, Huang YY, Arany PR, Hamblin MR. Role of Reactive Oxygen Species in Low Level Light Therapy. *Proc. of SPIE*. 2009 Vol. 7165 716502-1. doi: 10.1117/12.814890.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012;40(2):516-533. doi:10.1007/s10439-011-0454-7.

Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am*. 2004;48(4):751-v. doi:10.1016/j.cden.2004.05.003.

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

Dillenburg CS, Almeida LO, Martins MD, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy triggers the production of reactive oxygen species in oral epithelial cells without inducing DNA damage. *J Biomed Opt.* 2014 Apr;19(4):048002. doi: 10.1117/1.JBO.19.4.048002.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016 May-Jun;22(3). doi: 10.1109/JSTQE.2016.2561201.

Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008 Aug;24(4):199-210. doi: 10.1111/j.1600-0781.2008.00362.

Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, et al. Low-level laser irradiation(InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg.* 2010 Aug;28 Suppl 1:S151-6. doi:10.1089/pho.2008.2475.

George S, Hamblin MR, Abrahamse H. Effect of red light and near infrared laser on the generation of reactive oxygen species in primary dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B.* 2018 Nov;188:60-68. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.09.004.

Hakki SS, Bozkurt SB. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):325-31. doi: 10.1007/s10103-010-0879-5.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.

Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2017 Mar;94(2):199-212. doi: 10.1111/php.12864.

Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of Low Level Light Therapy. *Proc. of SPIE Vol. 6140, 614001, (2006) · 1605-7422/06/\$15 · doi: 10.1117/12.646294.*

Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011;9(4):602-18. doi: 10.2203/dose-response.11-009.

Jahangiri Noudeh Y, Shabani M, Vatankhah N, Hashemian SJ, Akbari K. A combination of 670 nm and 810 nm diode lasers for wound healing acceleration in diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(5):621-627. doi:10.1089/pho.2009.2634.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989;56(5):691-704. doi:10.1097/00004032-198905000-00015.

Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.* 2008 Sep-Oct;84(5):1091-9. doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00394.

Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;30(5):365-369. doi:10.1002/lsm.10060.

Kusiak A, Jereczek-Fossa BA, Cichońska D, Alterio D. Oncological-Therapy Related Oral Mucositis as an Interdisciplinary Problem-Literature Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(7):2464. Published 2020 Apr 3. doi:10.3390/ijerph17072464.

Lima AMCT, da Silva Sergio LP, de Souza da Fonseca A. Photobiomodulation via multiple-wavelength radiations. *Lasers Med Sci.* 2020;35(2):307-316. doi:10.1007/s10103-019-02879-1.

Marques JM, Pacheco-Soares C, Da Silva NS. Evaluation of the photobiomodulation in L929 cell culture. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014 Dec;239(12):1638-43. doi: 10.1177/1535370214542070.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-265. doi:10.1002/lsm.20008.

Martignago CC, Oliveira RF, Pires-Oliveira DA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, et al. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci.* 2015 Jan;30(1):203-8. doi:10.1007/s10103-014-1644-y.

Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento PM, Ramalho LM. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(1):19-25. doi:10.1089/104454704773660930.

Musstaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low-level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *Int J Radiat Biol.* 2019 Feb;95(2):120-143. doi: 10.1080/09553002.2019.1524944.

Pelliccioli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt.* 2014 Feb;19(2):028002. doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028002.

Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;31(4):263-267. doi:10.1002/lsm.10107.

Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med.* 1997;20(4):426-432. doi:10.1002/(sici)1096-9101(1997)20.

Santos NR, de M Sobrinho JB, Almeida PF, Ribeiro AA, Cangussú MC, dos Santos JN, et al. Influence of the combination of infrared and red laser light on the healing of cutaneous wounds infected by *Staphylococcus aureus*. *Photomed Laser Surg.* 2011;29(3):177-182. doi:10.1089/pho.2009.2749.

Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008;23(2):211-215. doi:10.1007/s10103-007-0477-3.

Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jul 1;43(1):128-35. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.002.

Silva MR, Peres LM, Braga TT, Barioni ED, de Oliveira Duro S, Ratto T, Horliana AC, et al. Photobiomodulation Therapy Decreases Oxidative Stress in the Lung Tissue after Formaldehyde Exposure: Role of Oxidant/Antioxidant Enzymes. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:9303126. doi:10.1155/2016/9303126.

Silveira PC, Silva LA, Freitas TP, Latini A, Pinho RA. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):125-131. doi: 10.1007/s10103-010-0839-0.

Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2017 May;32(4):903-910. doi: 10.1007/s10103-017-2191-0.

Sperandio FF. Análise da expressão e mecanismos de ação das proteínas Akt, Hsp90, mTOP e ciclina D1 em cultura de células de carcinoma epidermóide humano e células displásicas após irradiação com laser em baixa intensidade. [Tese] Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. 2012.

Szezerbaty SKF, de Oliveira RF, Pires-Oliveira DAA, Soares CP, Sartori D, Poli-Frederico RC. The effect of low-level laser therapy (660 nm) on the gene expression involved in tissue repair. *Lasers Med Sci.* 2018 Feb;33(2):315-321. doi: 10.1007/s10103-017-2375-7.

Tafur J, Mills PJ. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):323-8. doi:10.1089/pho.2007.2184.

Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2017 May; 170:197-207. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.04.014.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014 Jul;94(3):909-50. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* 2003 May;120(5):84. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12133.x.

ANEXO A – Padronização da viabilidade celular em cultivos celulares com várias concentrações de SFB

Comparou-se a viabilidade celular em cultivos celulares com restrição de soro. Foi analisado o efeito do soro a 2%, 3% e 5% em relação a 10%, concentração comumente utilizada no cultivo de fibroblastos. Inicialmente os fibroblastos cresceram em meio com soro bovino 10% e, em seguida, permaneceram 24h com soro nas concentrações descritas. Em seguida, uma placa de cada concentração de soro foi irradiada utilizando o comprimento de onda vermelho (660nm) com uma potência fixa de 100mW, 11,1 J/cm², 1100 mW/cm² e 1 J, entregue em 10 segundos, conforme descrito no item 4.5, e outra foi mantida sob as mesmas condições, porém não foi irradiada. Após 24h da irradiação, foi realizado ensaio de MTS, para análise da viabilidade celular, com a mesma metodologia descrita no item 4.7. O ensaio foi feito em triplicata.

A Figura 5.10 mostra média e o desvio-padrão da viabilidade celular no grupo controle (sem irradiação) e irradiado. Tanto no grupo controle quanto no irradiado, não houve diferenças na viabilidade celular comparando-se as diferentes concentrações de SFB (teste ANOVA, $p=0,076$ para o controle e $p=0.069$ para o irradiado). Comparando-se o grupo controle com o irradiado, houve viabilidade celular significativamente maior no grupo irradiado nas concentrações de 3% ($p<0.001$), 5% ($p=0.045$), 10% ($p=0.023$). A maior viabilidade, normalizando-se com o controle, foi na concentração de 3% (147,0%) (Figura XX). Decidiu-se, assim, adotar a concentração de 3% como a mais indicada para análise de viabilidade celular, expondo os fibroblastos a “starvation”.

Figura 5.10 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da viabilidade celular em cultivos celulares com várias concentrações de soro bovino, expostas (Irradiada) e não expostas (Controle) à FBM (valores de p pelo teste t de Student)

Fonte: A autora

ANEXO B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise da irradiação simultânea do laser de baixa intensidade nos espectros vermelho e infravermelho sobre a viabilidade e a densidade mitocondrial de fibroblastos e queratinócitos

Pesquisador: Luciana Corrêa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08341019.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.311.748

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo é avaliar a estimulação mitocondrial e a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos expostos a dupla irradiação laser nos comprimentos de onda no vermelho e infravermelho, emitidos ao mesmo tempo. Serão obtidos fragmentos de gengiva saudável de 20 pacientes normorreativos, com idade entre 20 e 45 anos, sem estar sob medicações por tempo prolongado, e com indicação de exodontia de terceiros molares inclusos e semi-inclusos na qual há necessidade de retalho gengival. As células serão tratadas com o laser de diodo GaAlAs/GaAs, com emissão de luz no modo contínuo, pontual e com os seguintes comprimentos de onda: 660 nm e 808 nm. A potência e a área de saída da luz serão fixadas: 100 Mw $\pm$ 20% e 0,09 cm² para ambos comprimentos de onda. Três doses de energia serão utilizadas: 6,6 J/cm², 11,1 J/cm², 22,2 J/cm², com uma energia total de 0,6, 1 e 2 J que serão entregues após 6, 10 e 20 segundos, respectivamente. Serão realizados três ciclos de laserterapia, com intervalo de 2h entre eles. Os demais testes de avaliação do efeito da laserterapia, serão realizados após 24h de finalizada a última sessão de FBM. Serão realizados os ensaios de MTS, TUNEL, ensaio de migração celular, imunofluorescência e análise de densidade mitocondrial. Serão utilizadas também 20 lâminas de mucosa com aspecto de normalidade do Acervo do Serviço de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para mensuração dos comprimentos do epitélio e conjuntivo com a finalidade de avaliar a penetração do feixe de luz utilizado.

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.311.748

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a estimulação mitocondrial e a viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos expostos a dupla irradiação laser nos comprimentos de onda no vermelho e infravermelho, emitidos ao mesmo tempo.

Objetivo Secundário:

Estabelecer a dosimetria ideal para utilização da irradiação laser com emissão simultânea dos espectros de luz no vermelho e infravermelho, utilizando cultura de fibroblastos e queratinócitos. Verificar se a dupla irradiação acarreta melhores efeitos sobre a viabilidade celular em relação a irradiação simples com cada comprimento de onda, ou então a irradiação dupla com amplos os comprimentos de onda realizados consecutivamente. Avaliar se a dupla irradiação incrementa a migração de fibroblastos e queratinócitos em relação as irradiações únicas de luz em cada espectro. Verificar se a irradiação dupla modifica a densidade mitocondrial em relação as irradiações simples. Verificar a penetração do feixe de luz em laminae de mucosa oral com aspecto de normalidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos ao paciente são mínimos pois os fragmentos de gengiva serão removidos durante a exodontia dos 3º molares e a irradiação laser será feita em laboratório. Os benefícios não serão diretos aos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto proposto se mostra relevante para elucidar o efeito que a dupla irradiação simultânea acarreta nas células.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos pela Resolução CNS 466/12 foram anexados corretamente (Projeto Detalhado, Folha de Rosto, TCLE, Autorização do Biobanco, Autorização da Clínica Odontológica e Autorização de Uso de Acervo).

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.311.748

superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1289897.pdf	12/04/2019 15:23:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	12/04/2019 15:22:56	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	Untitled_20022019_104357.pdf	20/02/2019 10:50:24	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito
Outros	acervopaato.pdf	18/02/2019 16:22:16	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetopb.docx	18/02/2019 14:23:14	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ccirugia.pdf	18/02/2019 14:09:19	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biobanco.pdf	18/02/2019 14:08:43	ANAELIZA FIGUEIREDO DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.311.748

SAO PAULO, 08 de Maio de 2019

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br