USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

NÁDIA CAROLINA TEIXEIRA MARQUES

**Influência de diferentes densidades de energia do Laser de
Baixa Intensidade em fibroblastos derivados da polpa de dentes
decíduos**

BAURU

2016

NÁDIA CAROLINA TEIXEIRA MARQUES

**Influência de diferentes densidades de energia do Laser de
Baixa Intensidade em fibroblastos derivados da polpa de dentes
decíduos**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira

Versão Corrigida

BAURU

2016

M348i Marques, Nádia Carolina Teixeira
Influência de diferentes densidades de energia do
Laser de Baixa Intensidade em fibroblastos derivados
da polpa de dentes decíduos/ Nádia Carolina Teixeira
Marques. – Bauru, 2016.
133 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE 21032913.0.0000.5417
Data: 26/02/2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

NÁDIA CAROLINA TEIXEIRA MARQUES

Nascimento	20 de agosto de 1988
Naturalidade	Buritama – SP
Filiação	Reinaldo César Marques Neiva Maria Teixeira Marques
2006 - 2010	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG
2011 - 2013	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Mestrado, Área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
2013 - 2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível de Doutorado, Área de Odontopediatria, pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
2016	Professora substituta, Departamento de Clínica e Cirurgia, Disciplina de Odontopediatria na Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG

"Nós sonhamos grande, nos aventuramos em mares desconhecidos, perdemos a terra de vista e encontramos estrelas para nos guiar nessa jornada... ampliamos nossos horizontes e aprendemos lições."

Tom Milner

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com muito carinho...

Aos meus pais, **Neiva e Reinaldo**

Aos meus irmãos, **Luiz Henrique e Luiza**

Ao meu querido **Neo**

À minha orientadora, **Thais Marchini**

Vocês foram fundamentais para esta conquista!

*"Existem pessoas que tornam nossa caminhada mais significativa...
pelo amor... pelo carinho...
pela companhia... pelo apoio...
e, sobretudo, por nos tornarem melhores..."*
Autor desconhecido

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira**, pela orientação em todos esses anos e por contribuir intensamente para o meu crescimento profissional. Tantos obstáculos foram superados, trajetos alterados, objetivos alcançados e novas metas sempre traçadas... em momento algum você permitiu que houvesse desânimo, isto não faz parte da sua essência! E é a combinação do seu foco e objetividade com a sua vocação e amor pelo que faz, que eu mais admiro em você. Obrigada por cada oportunidade, pela confiança, apoio, conselhos, paciência, e disponibilidade. Agradeço também por nos corrigir com o intuito de nos colocar para frente. Você me ensinou a dar o meu melhor, a nunca desistir, a saber filtrar opiniões e críticas, e sobretudo a ter GRATIDÃO!!! Muita gratidão!

À **Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai**, por ter me acolhido na UNIFAL-MG com tanta generosidade. Agradeço por todo incentivo, pelas colaborações, por confiar no meu trabalho, e pela convivência tranquila! Você acrescentou tanto na minha vida em tão pouco tempo... seu apoio me estimula a querer crescer cada vez mais.

Muito obrigada!!!

Aprendo com vocês todos os dias!

*"Se enxerguei mais longe,
foi porque me apoiei nos ombros de gigantes."
(Isaac Newton)*

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por toda luz e proteção na minha caminhada. Agradeço pelas oportunidades, bênçãos, saúde, força e capacitação proporcionadas a mim para que este objetivo fosse alcançado.

*"Confie no Senhor de todo o seu coração
e não se apoie em seu próprio entendimento;
reconheça o Senhor em todos os seus caminhos,
e ele endireitará as suas veredas."
Sl 3:5-6*

Aos meus pais, **Neiva** e **Reinaldo** pelo amor incondicional, por me proporcionarem uma educação excelente, acreditarem na minha capacidade, e nunca medirem esforços para que eu alcance os meus objetivos. Agradeço pelo apoio em todas as decisões da minha vida! Obrigada pelo exemplo de fé e pelo incentivo de lutar até o final... enfim conquistamos esta grande etapa!

Aos meus irmãos, **Luiz Henrique Teixeira Marques** e **Luiza Carolina Teixeira Marques** pelo amor, amizade e confiança. Obrigada por torcerem por mim a todo momento. Tenho muito orgulho de vocês, meus exemplos de simplicidade e compreensão!

Ao meu noivo **Nelson**, obrigada por me acompanhar nesta jornada! Não foi fácil, mas ter você ao meu lado tornou tudo mais leve. Agradeço por cuidar de mim, me animar nos momentos de cansaço, e sempre entender as renúncias necessárias. Tenho muita sorte por poder dividir os desafios da vida com você. Obrigada por me mostrar todos os dias que *"não há limites para sonhar, nem limites para concretizar seus sonhos, porque tudo é possível para aquele que em si próprio confia"*.

Obrigada por tudo! Amo muito vocês!!!

Aos meus avós, **Nadyr e Vilo**, tios, **Nilson, Cildete, Nilton, Nelci** e familiares, agradeço por todo amor, proteção, carinho, incentivo e torcida.

À grande família que me recebeu com tanto respeito e amor: **Suzana, Nelson, Dani, Miro, Nan, Zuzu, Lulis, Biel, Guga, Enzo, Lucas e Luquinhas...** obrigada por me proporcionarem tantas alegrias e me apoiarem nos momentos de trabalho.

Aos colegas da pós-graduação, **Fran, Maisa, Fer, Mari Calderan, Fabrício, Tati, Bianca, Dani, Fabiana, Bella, Agnes, Chris, Teresa, Catarina e Juliherme, Gabriel e Ana**, agradeço pela companhia e pelas experiências compartilhadas ao longo desses anos. Levo comigo um pouco de cada um de vocês!

Paulinha, Tássia, Eloá, Adriana, Gabi Rando e Letícia, agradeço pela convivência sempre agradável e pela integração nos momentos de superação! Tenho muito orgulho e satisfação por ter trabalhado com vocês.

Aninha e Fernanda, pelo empenho em iniciarem a prática dos experimentos de cultura celular, com muito estudo e dedicação. Obrigada pela parceria, e por transmitirem com paciência tudo que aprenderam.

Natalino, Luciana e Mariel, me faltam palavras para descrever a gratidão que tenho por este grupo de pesquisa... obrigada pela amizade e por me mostrarem o valor de uma equipe! A todo momento vocês foram pacientes, atenciosos, e muito prestativos... e isto se intensificou no período que estive longe. Que vocês possam encontrar anjos por onde passarem, assim como eu encontrei vocês! Muito obrigada... este trabalho é nosso! Contem sempre comigo!

À equipe do Laboratório de Farmacologia da FOB-USP, **Ana Carolina Morandini, Thiago Dionísio, e Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pela contribuição neste trabalho e conhecimento transmitido.

Aos colegas do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), **Flavia, Gabi, Nathália, Pepe, Oscar, Mariana, David, Karen, Helinton e Talita**, obrigada pela receptividade e disponibilidade em ajudar sempre com entusiasmo!

Cintia Tokuhara, por todo auxílio, paciência e ensinamentos no CIP... sua responsabilidade com o trabalho e solicitude com as pessoas são admiráveis. Agradeço pelo seu empenho em dividir tanto conhecimento como nosso grupo de pesquisa!

Aos técnicos do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), **Rafaela Alavarce, Marcelo Lopes, e Márcia Graeff**, pela amizade, experiências transmitidas, e prontidão em ajudar.

Pri, agradeço pela sua amizade, carinho e cuidado que sempre teve comigo. Fico feliz por termos crescido tanto! Você tem um coração grande e humilde... tenho certeza que Deus prepara um caminho próspero para sua vida, ao lado de alguém iluminado como o **Marlos**! Obrigada por tudo!

Gabi, Paulinha Karam, Aninha, e Camila Perfeito pela amizade, companhia, sinceridade, e disponibilidade em ajudar. Muito obrigada!

Vanessa e Annie, agradeço a Deus por ter preparado nossos encontro em Bauru... pela amizade que se fortaleceu, pela confiança, conversas, e conselhos. Nossa convivência foi inesquecível!

Às minhas amigas, **Cíntia, Marina, Taiane, Dani e Mayra**, pela amizade sincera e duradoura! Aos amigos da faculdade, **Bruno, Tide, Gra, Heloisa, Rodrigo, Andressa, e Taido** e demais amigos da turma **2006/2**, que mesmo distantes, sei o quanto torceram por mim. Àqueles que chegaram há pouco tempo, mas que já significam muito, **Camila e Ricardo Fonseca**, por se tornarem tão presentes. **Maurício, Valéria, Jú, Natália, Léo, Andressa, Rafael Pomarola, Rapha, Amanda, Iolanda, Mariana, Marina, Paulão, Bruna, Simoneti, Jeffinho e Gaúcho**, pelas boas lembranças divididas em Bauru. Muito obrigada, vocês são especiais!

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da FOB – USP, agradeço muito pelas oportunidades, e contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. Tenho convicção do quanto evolui, em todos os sentidos, desde que cheguei na pós-graduação. Saibam que em cada avanço tem um pouco da essência de cada um de vocês: o entusiasmo, criatividade e ideal de superação da **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**. A entrega à docência, didática, disponibilidade, e zelo da **Profa. Dra. Daniela Rios**. A responsabilidade, minuciosidade, e dedicação à pesquisa do **Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva**. Da **Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva**, do **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, e **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, levo o empenho, conhecimento técnico, conselhos, e a convicção no trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria, **D. Lia, Lilian, Estela, Cléo, Lou, Alexandre e Evandro**, agradeço pela convivência agradável, dedicação e grande solicitude. Muito obrigada!

Às professoras do setor de Odontopediatria do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC – USP, **Profas. Dras. Beatriz Costa, Cleide Felício de Carvalho Carrara, Gisele da Silva Dalben, e Márcia Ribeiro Gomide**, agradeço por ter tido a oportunidade de conhecer este trabalho inspirador.

À **Profa. Dra. Vivian de Agostino Biella Passos**, da Universidade Sagrado Coração – USC, pela competência, alegria, e gentileza com que sempre me atendeu.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira** da disciplina de Bioquímica, FOB – USP, pelos ensinamentos na disciplina “Técnicas de Cultivo Celular” e posteriormente, por acolher este grupo de pesquisa com tanta consideração e disponibilidade. Obrigada por enriquecer nosso entendimento na área de biologia molecular, que inicialmente era distante da nossa rotina.

À **Profa. Dra. Camila de Oliveira Rodini** da disciplina de Histologia, FOB – USP, pela receptividade, atenção e colaboração em vários trabalhos. Obrigada por todo aprendizado!

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da UNIFAL-MG. Foi uma honra e de grande aprendizado poder compartilhar a experiência da docência com alguns de vocês, na faculdade que me proporcionou uma base sólida e despertou em mim o desejo de buscar sempre mais conhecimento. **Prof. Dr. Edmer Silvestre Pereira Júnior**, você sempre transmitiu serenidade aos alunos, mas trabalhar com você me fez enxergar que é mais do que isso... você leva luz a todos com quem convive! E fico muito feliz pela oportunidade de poder aprender ainda mais com a sua vivência e dedicação à carreira acadêmica. **Profa. Dra. Tiza Moretti**, você faz parte do caminho que segui para chegar até a minha orientadora, e serei eternamente grata por este presente. Agradeço também pelo auxílio no meu crescimento profissional ao dividir comigo suas experiências de maneira tão gentil. **Profa. Dra. Dani Barroso**, exemplo de força e superação, você que me orientou na graduação, participou das minhas escolhas e do meu desenvolvimento... obrigada por todo incentivo e carinho!!! É gratificante sentir o quanto você acredita no meu potencial e torce para que os meus sonhos se realizem. **Prof. Dr. Heitor Marques Honório**, pela inspiração nos meus primeiros contatos com a Odontopediatria, e desde então, por toda contribuição e estímulo para que eu pudesse alcançar este objetivo. Obrigada! Tudo que me ensinaram é para a vida toda.

Ao **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, pelo exemplo de dedicação na busca pelo bem-estar dos pacientes, pela disponibilidade em compartilhar tantos ensinamentos, e pelo incentivo na pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior** e sua esposa **Maria Clara**, pelo apoio, e por serem exemplos de generosidade, alegria e humildade.

Aos professores da UNIFAL-MG, **Daniela Coelho de Lima, Carlos Eduardo Gomes do Couto Filho, Victor Orbegoso Flores, Maira Forestti Munhoz, Alessandro Antônio Costa Pereira, Valéria Totti e Heloísa Helena Vieira Zanetti**, agradeço pela torcida, gentileza e lições transmitidas.

Às funcionárias da Faculdade de Odontologia, **Sônia, Luzia, Paloma, Mônica, Patrícia, e Neusa**, e aos colegas dos laboratórios de Bioquímica e de Biologia molecular da UNIFAL-MG, **George, Gabriel, Fábio Colombo, Daniela Vieira**, e **Prof. Marcos José**, agradeço pelo carinho com que me receberam, pelo convívio alegre, e por estarem sempre dispostos a ajudar e a ensinar.

Aos colegas, **pós-graduandos da UNIFAL-MG**, obrigada pelo companheirismo e por dividirem comigo diferentes experiências. **Leopoldo, Paulinha, Letícia, Tati, Ugo, e Lidiany**, transmitir conceitos e discutir sobre pesquisa científica com vocês é uma atividade engrandecedora.

Aos **alunos da UNIFAL-MG**, obrigada pelo respeito e cordialidade para que eu pudesse dividir com vocês, de maneira tranquila, conhecimentos de Odontopediatria, de pós-graduação, e de vida.

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris** pelo empenho e dedicação na realização das análises estatísticas dessa pesquisa. Obrigada pela atenção e paciência no esclarecimento de cada dúvida.

Aos **Funcionários da Biblioteca** e do **Serviço de Documentação da FOB – USP**, pelo auxílio e atenção durante esses anos.

Aos **Funcionários da Pós-Graduação FOB – USP**, pela disponibilidade e atenção prestada em cada atendimento.

Ao **Daniel Bonné** por todo cuidado com a formatação e impressão dessa tese.

Aos **pacientes** dessa pesquisa pela participação e colaboração, sem os quais a concretização desse projeto não seria possível.

À **banca examinadora** pelo aceite do convite, presença e contribuição para correção e finalização dessa tese.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, FOB – USP, representada pela diretora **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, FOB – USP, representada pelo presidente **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

À Faculdade de Odontologia de Alfenas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, representada pelo diretor **Prof. Dr. Edmer Silvestre Pereira Júnior**.

Às instituições de fomento **FAPESP (Processo 2013/16156-0)** e **CAPES** pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original."*

Albert Einstein

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos de diferentes densidades de energia e irradiâncias do Laser de Baixa Intensidade (LBI), variando em função do tempo de irradiação e potência, na viabilidade e proliferação de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos (HPF). HPF foram cultivados em DMEM e usados entre a 4ª e 8ª passagem. Os grupos foram divididos de acordo com diferentes densidades de energia, variando: Tempo de irradiação - Grupo I – Ia (1,2 J/cm² - 5 mW - 10 s), Ib (2,5 J/cm² - 5 mW - 20 s), Ic (3,7 J/cm² - 5 mW - 30 s), Id (5,0 J/cm² - 5 mW - 40 s), e Ie (6,2 J/cm² - 5 mW - 50 s); ou potência - Grupo II – IIa (1,2 J/cm² - 5 mW - 10 s), IIb (2,5 J/cm² - 10 mW - 10 s), IIc (3,7 J/cm² - 15 mW - 10 s), IId (5,0 J/cm² - 20 mW - 10 s), e IIe (6,2 J/cm² - 25 mW - 10 s). Células não irradiadas - cultivadas em condições nutricionais regulares - 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (If e IIf) e células não irradiadas - cultivadas em déficit nutricional - 1% SFB (Ig e IIg), foram consideradas controles positivos e negativos, respectivamente. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas, respectivamente, pelas técnicas MTT e Cristal violeta (CV), nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por ANOVA 2 critérios, seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). No ensaio MTT, os controles negativos, Ig e IIg, apresentaram significativamente menor viabilidade em relação aos correspondentes grupos experimentais: IIa e IIb, 24 horas após a irradiação; Ia, Ib, Ie, If e IIf no período de 48 horas; e Ib-If, assim como, IIa-IIf após 72 horas. Nos diferentes períodos de avaliação do ensaio CV, todos os grupos, exceto Ie, IIe e If, exibiram significativamente maior proliferação em comparação aos respectivos controles negativos. Dentro de um mesmo grupo nos diferentes períodos, os grupos If e IIe apresentaram menor viabilidade durante o período de 24 horas em comparação ao período de 72 horas pelo ensaio MTT. Na avaliação intragrupos, o ensaio CV revelou menor proliferação no período de 24 horas em comparação aos períodos de 48 e 72 horas, independente do grupo avaliado. Os diferentes protocolos de irradiação, grupos I e II, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na viabilidade e proliferação celular entre densidades de energia iguais com irradiâncias diferentes durante os períodos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, as diferentes densidades de energia e irradiâncias propostas não prejudicaram a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulpare de dentes decíduos humanos. A variação do protocolo de irradiação LBI, em função do tempo ou da potência, não interferiram nas respostas celulares após a aplicação da mesma densidade de energia com irradiâncias diferentes.

Palavras-chave: Dente Decíduo. Polpa Dentária. Técnicas de Cultura de Células. Terapia com Luz de Baixa Intensidade.

ABSTRACT

Influence of Low-level laser with different energy densities on pulp fibroblasts from human primary teeth

The aim of this study was to compare the effects of Low-level laser (LLL) with different energy densities and irradiances, varying according to the irradiation time and power, on cell viability and proliferation of pulp fibroblasts from human primary teeth (HPF). HPF were culture in DMEM and used between 4th and 8th passages. Groups were divided according to different energy densities, varying: Time of irradiation – Ia (1.2 J/cm² - 5 mW - 10 s), Ib (2.5 J/cm² - 5 mW - 20 s), Ic (3.7 J/cm² - 5 mW - 30 s), Id (5.0 J/cm² - 5 mW - 40 s), and Ie (6.2 J/cm² - 5 mW - 50 s); or output power - Grupo II – IIa (1.2 J/cm² - 5 mW - 10 s), IIb (2.5 J/cm² - 10 mW - 10 s), IIc (3.7 J/cm² - 15 mW - 10 s), IId (5.0 J/cm² - 20 mW - 10 s), e IIe (6.2 J/cm² - 25 mW - 10 s). Non-irradiated cells - grown in regular nutritional conditions - 10% Fetal Bovine Serum (FSB) (If and IIf) and non-irradiated cells - grown in nutritional deficit - 1% FBS (Ig and IIg) were considered positive and negative controls, respectively. Cell viability and proliferation were respectively assessed through MTT and Crystal violet (CV) assays at 24, 48 and 72h after irradiation. Data were submitted to statistical analysis by ANOVA 2 criteria, followed by Tukey test ($P<0.05$). In the MTT assay, the negative controls, Ig and IIg, showed significantly lower viability in relation to the corresponding groups: IIa and IIb 24 hours after irradiation; Ia, Ib, Ie, If and IIf at 48 hours period; and Ib-If, as IIa-IIf, after 72 hours. At different periods of evaluation of CV assay, all groups, except Ie, IIe and If, exhibited significantly higher proliferation compared to the respective negative controls. Within the same group at different periods, groups If and IIe showed lower viability during 24 hours compared to 72 hours period by MTT assay. In the intragroup evaluation, CV assay revealed lower proliferation at 24 hours compared to 48 and 72 hours periods, regardless of the evaluated group. Different irradiation protocols, groups I and II, showed no statistically significant differences on cell viability and proliferation among equals energy densities with different irradiances at the evaluated periods. According to these findings, different LLL energy densities and irradiances proposed did not impair viability and proliferation of pulp fibroblasts from human primary teeth. The variation of the LLL irradiation protocol, by the time or power, did not interfere in cellular responses after the application of the same energy density with different irradiances.

Keywords: Tooth, Deciduous. Dental Pulp. Cell Culture Techniques. Low-Level Light Therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Fluxograma dos procedimentos da etapa inicial para cultura primária de fibroblastos pulpares de dentes decíduos humanos: A – Dente extraído por indicação ortodôntica; B-C – Fragmentos de tecidos picotados em pedaços menores; D – Adição de antibiótico/antifúngicos ao meio de cultura; E-G – Coleta e centrifugação da suspensão; H – Formação do “pellet”; I – Ressuspensão com novo meio de cultura; J-K – Armazenamento em garrafas para cultura de células; L – Manutenção em estufa a 37°C e 5% de CO₂; M – Expansão celular..... **71**
- Figura 2 -** A – Leitura dos fibroblastos caracterizados no microscópio confocal; B – Fibroblastos marcados pelo anticorpo Anti-FSP; C – Núcleos marcados pelo anticorpo secundário (controle negativo)..... **73**
- Figura 3 -** A – Bancada preparada previamente ao procedimento de irradiação (aparelho Twin Flex Evolution MMOptics®); B – Posicionamento da placa dentro da máscara negra; C – Portinholas e orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais; D – Posicionamento da placa no suporte para Irradiação; E – Aplicação do laser pelo orifício da máscara negra em contato com o fundo da placa..... **78**
- Figura 4 -** Dispositivo radiômetro (Laser Check MMOptics®) utilizado para aferir a potência da irradiação laser..... **79**
- Figura 5 -** A – Poços contendo solução de MTT; B – Cristais de formazan dissolvidos após adicionar DMSO (Dimetil Sulfóxido)..... **80**
- Figura 6 -** A – Aparelho espectrofotômetro; B – Posicionamento da placa no espectrofotômetro..... **81**

Figura 7 -	Protocolo do ensaio Cristal violeta (CV): A – Lavagem com PBS 1x; B – Solução de metanol 100%; C – Solução de Cristal violeta; D – Lavagem com PBS 1x por 2 vezes; E – Citrato de sódio 0,05 mol.L; F – Proteção da placa da luminosidade para leitura no espectrofotômetro a 540 nm.....	82
Figura 8 -	A-I – Análise da morfologia celular de fibroblastos de dentes decíduos com diferentes densidades celulares (DC) na região central dos poços através de microscópio óptico invertido (Aumento de 10x), previamente aos ensaios de MTT nos diferentes períodos.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Variação da Densidade de Energia em Função do Tempo de Irradiação (Grupo I) e em Função da Potência (Grupo II).....	75
Tabela 2 -	Valores médios de absorbância das diferentes concentrações de SFB nos diferentes períodos.....	85
Tabela 3 -	Médias de absorbância das diferentes densidades celulares após o ensaio MTT nos grupos I e II.....	87
Tabela 4 -	Avaliação da viabilidade celular entre as diferentes densidades de energia do LBI pelo ensaio MTT 24, 48 e 72 horas após as irradiações (Média e desvio padrão).....	89
Tabela 5 -	Avaliação da proliferação celular entre as diferentes densidades de energia do LBI pelo ensaio CV 24, 48 e 72 horas após as irradiações (Média e desvio padrão).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
CIP	Centro Integrado de Pesquisa
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Cristal violeta/ Crystal violet
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPSC	Células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes permanentes
Er,Cr:YSGG	Erbium,Chromium:Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet
Er:YAG	Erbium:Yttrium-Aluminun-Garnet
FBS	Fetal Bovine Serum
FSP	Fibroblast Surface Protein
h	Hora(s)
He-Ne	Hélio-neônio
HPF	Human pulp fibroblasts
InGaAlP	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
J	Joules
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LDH	Desidrogenase láctica
LLL	Low-level laser
LLLT	Low-level laser therapy
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mol.L	Concentração molar (Molaridade)
MSCs	Células-tronco mesenquimais
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
mW	Miliwatts
nm	Nanômetro
nº	Número

°C	Graus Celsius
<i>P</i>	Nível de Significância
PBS	Phosphate Buffered Saline / Tampão fosfato-salino
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	Potencial Hidrogênico
s	Segundo(s)
SFB	Soro fetal bovino
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR 2	Receptor 2 para VEGF
W	Watts
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	49
1.1	TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE	51
1.2	HISTÓRICO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	54
1.3	MECANISMOS DE AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE	55
1.4	PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO	56
2	PROPOSIÇÃO	63
2.1	OBJETIVO	65
2.2	HIPÓTESES.....	65
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	69
3.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA	69
3.3	COLETA DO TECIDO PULPAR	70
3.4	CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS.....	70
3.5	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS	72
3.6	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS.....	75
3.7	DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ESTRESSE CELULAR POR DÉFICIT NUTRICIONAL	76
3.8	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR	76
3.9	IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE	77
3.10	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	80
3.11	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA.	81
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	82
4	RESULTADOS	83
4.1	AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ESTRESSE CELULAR POR DÉFICIT NUTRICIONAL	85
4.2	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR	86
4.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	88
4.3.1	Comparação intragrupos	88
4.3.2	Comparação intergrupos.....	88

5	DISCUSSÃO	91
5.1	AMOSTRA.....	93
5.2	METODOLOGIA.....	94
5.3	RESULTADOS.....	99
5.3.1	Comparação da viabilidade e proliferação celular intragrupos.....	99
5.3.2	Comparação da viabilidade e proliferação celular intergrupos.....	100
5.4	IMPLICAÇÕES CLÍNICAS	102
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICES	121
	ANEXOS	127

1 INTRODUÇÃO e SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A tecnologia laser tem sido indicada para uma variedade de aplicações biomédicas (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; BECKMANN; MEYER-HAMME; SCHRÖDER, 2014; PANDESHWAR et al., 2016). Esta radiação eletromagnética não ionizante apresenta características específicas, como monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade, e possui propriedades terapêuticas importantes (MARTENS, 2011; RAMAZANI; AHMADI; DARYAEIAN, 2012; PANDESHWAR et al., 2016). De acordo com a interação com o tecido alvo os lasers são classificados em “Laser de diagnóstico”, “Laser de baixa intensidade de energia” ou “Laser de baixa densidade de potência”, e “Laser de alta intensidade de energia” ou “Laser de alta densidade de potência”. No “Laser de diagnóstico” o nível de energia é tão baixo, que não ocorre o estímulo de organelas ou membranas celulares, assim sua finalidade clínica é para o diagnóstico de cáries incipientes e outras lesões. O “Laser de Baixa Intensidade” (LBI) oferece densidade de energia baixa de modo que estimula membranas ou organelas, induzindo uma biomodulação a fim de restabelecer o estado de normalidade da região afetada. O “Laser de alta intensidade” ultrapassa o limiar de sobrevivência da célula e induz a morte celular, logo apresenta finalidade clínica cirúrgica para incisões, excisões e vaporizações (ALMEIDA-LOPES, 2003; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009). As radiações ópticas produzidas pelos diversos tipos de lasers têm basicamente as mesmas características, porém, de acordo com as diferentes dosimetrias e comprimento de onda podem levar a resultados clínicos diferentes (KOTLOW, 2008; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009; GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016).

Em Odontologia a terapia com LBI tem sido usada com o objetivo principal de acelerar o processo de reparo, promover analgesia e regressão de edema em consequência da ação antiinflamatória (KIMURA et al., 2002; KIMURA et al., 2003; STABHOLZ; SAHAR-HELFT; MOSHONOV, 2004; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009; MARTENS, 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; BASSO et al., 2012;

PASCHOAL; SANTOS-PINTO, 2012; VERMA et al., 2012; DE COSTER et al., 2013; ELBAY et al., 2016; PANDESHWAR et al., 2016). O LBI pode promover acelerada epitelização, maior grau de vascularização, e aumento da síntese de colágeno devido à bioestimulação do metabolismo celular (BASSO et al., 2012; WAGNER et al., 2013).

A procura por soluções e materiais ideais para qualquer área de conhecimento dentro da odontologia deve ser direcionada para o conhecimento e indicação de medicamentos e terapias biocompatíveis, visando à ocorrência do processo de reparo e proporcionando regeneração natural e biológica dos tecidos pulpare (MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009; MARQUES et al., 2015; FERNANDES et al., 2016). O progresso científico tem colaborado para avaliar biologicamente as diferentes estratégias de terapia pulpar. O avanço na área celular e molecular tem ampliado a compreensão sobre os fatores envolvidos no processo de reparo tecidual após a aplicação de diferentes terapias, como o uso do LBI, através dos estudos laboratoriais (LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013; MARQUES et al., 2015).

Pereira et al. (2002) avaliaram o crescimento celular e a síntese de pró-colágeno após a irradiação fracionada com laser diodo (λ : 904 nm) em fibroblastos de linhagem celular imortalizada (NIH 3T3 - American Type Culture Collection, ATCC® CRL-1658™, Virgínia, EUA) com densidades de energia entre 3 a 5 J/cm² durante 6 dias. Os resultados mostraram que densidades de energia de 3 e 4 J/cm² estimularam a proliferação celular, enquanto que 5 J/cm² não induziu o aumento da quantidade de células. Todas as densidades de energia preconizadas não favoreceram a síntese de pró-colágeno.

Marques et al. (2004) analisaram os efeitos do laser infravermelho (λ : 905 nm; densidade de energia: 3 J/cm²) na síntese de pró-colágeno e na morfologia estrutural de fibroblastos gengivais humanos (linhagem celular FMM1). As células irradiadas apresentaram redução da quantidade de pró-colágeno e alterações morfológicas em comparação ao grupo controle. Sugerindo que a irradiação utilizada possa influenciar no metabolismo do colágeno.

Damante et al. (2009) investigaram os efeitos de lasers vermelho (λ : 660 nm) e infravermelho (λ : 780 nm) na liberação de fatores de crescimento por fibroblastos gengivais humanos (FGH) irradiados duas vezes com densidades de energia 3 J/cm² e

5 J/cm². A produção de Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF) foi maior após a irradiação com ambas densidades de energia do laser infravermelho, enquanto que o Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF) detectado foi semelhante em todos os grupos.

Oliveira et al. (2015) avaliaram os efeitos do LBI na adesão, proliferação, e expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor VEGFR 2 em células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas do tecido adiposo humano (hMSCs) e de ratos (rMSCs), cultivadas sob condição de deficiência nutricional (5% SFB). As células foram irradiadas com laser diodo (λ : 660 nm) que operou com energia entre 0,7-9 J. Ambas células-tronco mesenquimais cultivadas em deficiência nutricional apresentaram diminuição significativa na adesão e proliferação. Para as células mesenquimais humanas (hMSCs) a adesão foi maior nos grupos de células cultivadas em condições nutricionais regulares e irradiadas entre 3 e 9 J. No entanto, estas células mostraram maior proliferação 24 horas após serem irradiadas com a menor dose 0,7 J. As células derivadas de tecido de rato (rMSCs) em déficit nutricional mostram menor adesão quando irradiadas entre 1,5-9 J. Além disso, rMSCs sob condições normais ou déficit nutricional revelaram menor proliferação quando irradiadas com energia igual ou superior a 1,5 J. Após a irradiação com LBI observou-se um aumento na expressão de VEGF e VEGFR 2 em ambos os tipos celulares. No entanto, a expressão deste fator de crescimento e seu receptor após a irradiação foi maior em células mesenquimais humanas (hMSCs) cultivadas sob deficiência nutricional. Este estudo concluiu que o uso do LBI em células mesenquimais, derivadas de tecido humano ou de rato, podem regular a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para VEGF e modular a adesão e proliferação celular de diferentes maneiras.

A polpa dentária pode ser acometida por situações clínicas inflamatórias, e nestes casos, especialmente em dentes decíduos, a oportunidade de se evitar o tratamento endodôntico convencional é de grande importância, pois alterações clínicas como a aceleração da rizólise e perda precoce do elemento dentário podem acontecer (FUKS, 2008; MORETTI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). A literatura tem buscado alternativas terapêuticas aos tratamentos convencionais para o restabelecimento da saúde do órgão pulpar (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000). Uma destas terapias alternativas baseia-se na aplicação do LBI de forma direta (UTSUNOMIYA, 1998;

FERNANDES et al., 2015; MARQUES et al., 2015; LOURENÇO NETO et al., 2016) ou indireta sobre o tecido pulpar (FERREIRA et al., 2006). Na polpa de dentes permanentes, os estudos demonstram que o LBI, quando usado em situações de exposição pulpar diminui o processo inflamatório (UTSUNOMIYA, 1998) e acelera a reparação do tecido pulpar por auxiliar na formação de uma matriz fibrosa e de ponte de dentina, e na produção de proteínas colagênicas. Da mesma forma, quando aplicados indiretamente em cavidades preparadas sem exposição pulpar, o LBI também se mostrou capaz de causar uma biomodulação da atividade das células pulpares com redução da inflamação e bioestimulação da dentinogênese reacional (FERREIRA et al., 2006).

Em odontopediatria, o LBI pode ser sugerido como uma técnica alternativa para o tratamento pulpar por não causar danos na região de furca ou necrose pulpar, apresentar penetração auto limitante e favorecer a redução ou ausência de sangramento (KIMURA et al., 2003; HUTH et al., 2005; Liu, 2006; ODABAS et al., 2007; KOTLOW, 2008; TOOMARIAN et al., 2008; GOLPAYEGANI; ANSARI; TADAYON, 2010; HUTH et al., 2012; RAMAZANI; AHMADI; DARYAEIAN, 2012; FERNANDES et al., 2015; MARQUES et al., 2015; LOURENÇO NETO et al., 2016). A ação anti-inflamatória do laser auxilia na resposta positiva à materiais convencionais para o reparo pulpar (MARQUES et al., 2015). Ressalta-se que a terapia LBI é um procedimento indolor, não invasivo e não farmacológico. Porém, poucas evidências demonstram que o LBI influencie diretamente na recuperação do tecido pulpar de dentes decíduos humanos (DE COSTER et al., 2013).

1.2 HISTÓRICO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

LASER é um acrônimo que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). A emissão estimulada de radiação foi proposta por Einsten em 1917. Seguindo os princípios propostos por Einstein, Theodore Maiman, em 1960, desenvolveu o laser de rubi ao demonstrar a emissão de luz visível no espectro vermelho através da excitação do rubi. Ainda na década de 60, Javan, Bennett e Herriott criaram o primeiro Laser de Baixa

Intensidade (He-Ne) (VERMA et al., 2012). Em seguida, Mester et al. (1971) foram pioneiros em relatar os efeitos do LBI na reparação tecidual. A partir de tais fatos, pesquisadores tem continuamente investigado as aplicações do laser na área da saúde (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; BECKMANN; MEYER-HAMME; SCHRÖDER, 2014; GINANI et al., 2015).

1.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Os efeitos da ação do laser sobre os tecidos ainda não estão completamente esclarecidos, no entanto algumas hipóteses tem sido debatidas. Esta interação com a luz promove reações celulares primárias e secundárias (KARU, 1999). Sendo que diferentes mecanismos podem ocorrer simultaneamente e contribuir para a recuperação dos tecidos irradiados (SCHINDL et al., 2000; WAGNER et al., 2013; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

As reações primárias são induzidas pela luz e indicam o mecanismo do laser sobre as células, sendo que várias teorias tem sido propostas. Olso, Schimmerling e Tobias (1981) sugerem que a absorção da luz por enzimas mitocondriais promove aquecimento localizado com aumento de vibração molecular. Breitbart et al. (1996), mostra que o laser promove ativação dos canais de cálcio, elevando os níveis de cálcio intracelular e induzindo a proliferação celular. Outros autores propuseram que o laser estimula a produção de oxigênio singleto por excitação de porfirinas endógenas (GROSSMAN et al., 1998; POLO et al., 1999; PARSONS; PARSONS, 2004; ZHANG; XING; GAO, 2008). Enquanto que, segundo Karu (1989), a absorção de fótons por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial afetam a transferência de elétrons, resultando em efeitos estimulatórios ou inibitórios no metabolismo celular. Flavinas e citocromos são cromóforos, ou seja, elementos capazes de absorver fótons e transformar a energia luminosa em energia fotoquímica. Esta reação ocorre a nível atômico, uma vez que os elétrons constituintes dos átomos dos cromóforos captam a energia do laser, deslocando-se para uma órbita mais energética. Após um período, os elétrons retornam naturalmente ao estado fundamental, liberando a energia

absorvida. Assim, a energia liberada é utilizada nas atividades celulares. Além disso, a irradiação laser pode estimular o crescimento celular através da regulação de genes funcionais relacionados com a proliferação, migração e remodelação celular, síntese de DNA, e metabolismo celular (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; PEPLOW; BAXTER, 2012; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; GINANI et al., 2015).

Reações secundárias são aquelas que ocorrem na ausência de luz e sinalizam as consequências da absorção do laser pelas células, como aumento do metabolismo celular, aumento da síntese de proteínas, liberação de fatores de crescimento, aumento da síntese e proliferação de colágeno, estímulo da formação de RNA e DNA, formação de capilares, ativação de linfócitos e aumento da atividade leucocitária (KIPSHIDZE et al., 2001; WAGNER et al., 2013; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; OLIVEIRA et al., 2015; PANDESHWAR et al., 2016). O laser pode estimular ou inibir as atividades celulares, dependendo da dosagem aplicada (KARU, 1989; OSHIRO; CALDERHEAD, 1991; PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016).

1.4 PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO

Os efeitos do LBI dependem dos parâmetros de irradiação utilizados, como: meio ativo, comprimento de onda, frequência, potência, energia, densidade de energia (fluência), densidade de potência (irradiância), tempo de aplicação, e área de saída do feixe de laser. Diferentes lasers de Baixa Intensidade, com diferentes comprimentos de onda e dosimetrias, tem sido utilizados para a biomodulação de tipos celulares variados (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016).

Almeida-Lopes et al. (2001) compararam os efeitos de diferentes densidades de potência (irradiâncias) na capacidade proliferativa de uma linhagem contínua de

fibroblastos gengivais humanos (LMF). As células sob déficit nutricional (5% SFB) foram irradiadas com lasers vermelho e infravermelho, programados com densidades de potência diferentes (Grupos L1 e L2) ou iguais (Grupos L3 e L4), a densidade de energia foi a mesma para todos os grupos (2 J/cm^2). No grupo com irradiâncias diferentes, os parâmetros potência e tempo foram, respectivamente, aumentados e diminuídos para se estabelecer a irradiância mais elevada (Grupo L2). A proliferação foi avaliada por técnica de contagem celular (azul de tripan) 2, 4 e 6 dias após as irradiações. Os resultados mostraram que o crescimento celular foi maior em células irradiadas com laser infravermelho na condição de maior irradiância (Grupo L2). Não houve diferença na proliferação celular entre os tipos de lasers quando as densidades de potência foram mantidas constantes (Grupos L3 e L4). Concluindo que pela metodologia aplicada, o LBI infravermelho aplicado com maior potência pelo menor tempo favoreceu a proliferação celular de fibroblastos gengivais.

Moore et al. (2005) avaliaram a influência dos comprimentos de onda de lasers de baixa intensidade vermelho (λ : 625-675 nm) e infravermelho (λ : 810 nm) na proliferação de fibroblastos e células endoteliais provenientes de uma linhagem celular contínua de ratos. A irradiação foi realizada com 5 mW/cm^2 de densidade de potência e 10 J/cm^2 de densidade de energia e as taxas de proliferação foram avaliadas após 72 horas por teste colorimétrico. A proliferação dos fibroblastos foi estimulada pelos lasers vermelhos, com taxa máxima nos comprimentos de onda 665 e 675 nm, enquanto que o comprimento de onda 810 nm inibiu a atividade proliferativa dos fibroblastos. Todos os comprimentos de onda avaliados aumentaram a proliferação das células endoteliais, sendo que a proliferação máxima ocorreu pela ação do laser vermelho com comprimento de onda 665 nm e a mínima após a irradiação com laser infravermelho de 810 nm. No entanto, após a irradiação com laser vermelho a taxa de proliferação dos fibroblastos foi mais elevada em comparação às células endoteliais. Estas observações sugeriram que o comprimento de onda e o tipo de célula influenciam na resposta de proliferação celular à irradiação com LBI.

Pourzarandian et al. (2005) avaliaram fibroblastos gengivais humanos (HGF) após a irradiação com laser Er:YAG pulsado (λ : 2940 nm) com diferentes densidades de energia: 1,68; 2,35; 3,37; ou $5,0 \text{ J/cm}^2$. Células não irradiadas foram consideradas como grupo controle. As células irradiadas foram submetidas às análises de viabilidade

e proliferação celular pela contagem celular com azul de tripan (24 e 72 horas), dos níveis de lactato desidrogenase pelo ensaio LDH (24 horas), e da morfologia celular através de microscópio óptico e microscópio eletrônico de transmissão (imediate, 24 e 72 horas). A proliferação celular foi maior nas células irradiadas com as densidades de energia 1,68; 2,35; 3,37 J/cm² em comparação ao grupo controle após 72 horas. A densidade de energia 5,0 J/cm² revelou as menores taxas de viabilidade e proliferação celular, assim como níveis de LDH mais elevados. Em fibroblastos irradiados à 3,37 J/cm² a microscopia óptica mostrou alteração da morfologia celular na análise imediata que foi reversível após 24 horas, e aumento da quantidade de células na análise de 72 horas. Assim como, a estimulação de organelas, revelando fibroblastos metabolicamente ativos, foi observada pela análise microscópica eletrônica de transmissão após 72 horas de irradiação.

Azevedo et al. (2006) mostraram a influência de diferentes densidades de potência do LBI em fibroblastos gengivais humanos (LMF). As células mantidas em déficit nutricional (5% SFB) foram irradiadas com laser vermelho (λ : 660 nm), densidade de energia 2 J/cm², e densidades de potência 142,85 mW/cm² (GII) e 428,57 mW/cm² (GIII). Células não irradiadas constituíram o grupo controle (GI). A contagem celular (azul de tripan) foi realizada 2, 6 e 9 dias após as irradiações. A proliferação celular foi maior nos grupos irradiados. A quantidade de células após irradiação com densidade de potência 142,85 mW/cm² foi maior em todos os períodos do avaliados, sendo que a densidade de potência 428,57 mW/cm² mostrou índices de proliferação celular significativamente menores na avaliação de 9 dias. Sugerindo que, a densidade de potência influencia a proliferação celular de forma inversamente proporcional.

Eduardo et al. (2008) revelaram os efeitos do LBI na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas de polpa dentária humana. As células foram irradiadas duas vezes no mesmo dia com laser vermelho (λ : 660 nm), densidade de energia 3 J/cm², potência 40 mW associada ao tempo de 3 segundos ou 20 mW por 6 segundos, de acordo com o grupo experimental. Células não irradiadas foram consideradas como controle. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas pela análise da atividade mitocondrial através do ensaio MTT após 20, 24, 48, e 72 horas da irradiação. As células irradiadas apresentaram maior índice de crescimento do que o grupo controle.

Células irradiadas com 20 mW de potência mostraram proliferação significativamente maior em comparação aos demais grupos na avaliação de 72 horas. Nas condições do referido estudo foi possível concluir que a terapia laser estimula a proliferação de células-tronco derivadas de polpa dentária humana.

Meneguzzo et al. (2008) investigaram a influência da aplicação única ou múltipla da energia do LBI na proliferação de fibroblastos pulpaes derivados de dentes terceiros molares. As células foram irradiadas com laser vermelho (λ : 685 nm). A densidade de energia foi programada de acordo com o grupo experimental: única aplicação a 6,3 J/cm² (G1), 12,6 J/cm² (G2) e 18,9 J/cm² (G3); duas aplicações a 6,3 J/cm² (G4); três aplicações a 6,3 J/cm² (G5). Células mantidas em condição nutricional regular (10% SFB) e déficit nutricional (5% SFB) não irradiadas foram consideradas controle positivo (G6) e negativo (G7), respectivamente. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT 24 horas após a última irradiação. As células submetidas a múltiplas irradiações (G4 e G5) apresentaram maior proliferação celular, semelhante ao grupo controle positivo (G6). Enquanto que os grupos G1 e G3 apresentaram valores de proliferação celular similares aos obtidos no grupo controle negativo (G7). Os resultados sugerem que irradiações múltiplas sejam mais favoráveis na indução da proliferação celular.

Ferreira et al. (2009) investigaram a viabilidade de uma linhagem celular de mioblastos (C2C12) após a irradiação com LBI programado com diferentes comprimentos de onda e densidades de energia. C2C12 cultivadas em condição nutricional regular (10% SFB) e déficit nutricional (5% SFB) foram irradiadas com laser vermelho (λ : 660 nm; densidades de energia: 3,8, 6,3 e 10 J/cm²) e infravermelho (λ : 780 nm; densidades de energia: 3,8, 10 e 17,5 J/cm²). A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas respectivamente pelas técnicas MTT e Cristal violeta 24 horas após as irradiações. Os parâmetros aplicados não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na avaliação da viabilidade celular após 24 horas. As células mantidas em condição nutricional regular (10% SFB) exibiram taxas de crescimento mais elevadas do que células, irradiadas ou não, mantidas sob déficit nutricional (5% SFB). Na metodologia proposta, o LBI não favoreceu a viabilidade da linhagem celular estudada, independente da condição nutricional, comprimento de onda e densidades de energia.

Zaccara et al. (2015) investigaram os efeitos da irradiação LBI sobre a proliferação e viabilidade de células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs). As células receberam duas irradiações, uma a cada 24 horas, com laser vermelho (λ : 660 nm) em diferentes densidades de energia: 0,5 e 1,0 J/cm². Células que não receberam irradiação laser foram consideradas controle. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas pelo MTT 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira aplicação do laser. As fases do ciclo celular e a apoptose foram analisadas por citometria de fluxo 24 horas após cada irradiação. As células irradiadas mostraram significativamente maior capacidade proliferativa do que as células não irradiadas no período de 72 horas. A densidade de energia 1,0 J/cm² provocou maior proliferação celular em comparação ao grupo controle na avaliação de 96 horas. A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi consistente com células em proliferação em todos os grupos avaliados. Os dados obtidos sugerem que a irradiação do LBI com densidade de energia 1,0 J/cm² pode contribuir para a proliferação celular de células-tronco DPSC.

Talebi-Ardakani et al. (2016) analisaram os efeitos da aplicação de diferentes dosimetrias dos lasers Er:YAG (λ : 2940 nm) e Er,Cr:YSGG (λ : 2790 nm) sobre fibroblastos gengivais humanos. Células não irradiadas foram consideradas como grupo controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT nos períodos de 24 e 48 horas. Os resultados mostraram que todas as dosagens experimentais de ambos os lasers aumentaram significativamente a viabilidade celular em comparação com as células não irradiadas. O laser Er:YAG com menor irradiância apresentou proporcionalmente maior viabilidade em todos os períodos em comparação aos demais grupos. Embora tenha ocorrido um aumento significativo da viabilidade celular entre 24 e 48 horas de irradiação com laser Er,Cr:YSGG com diferentes irradiâncias.

Recentemente, os efeitos da irradiação LBI (λ : 660 nm) com densidades de energia entre 1,2-6,2 J/cm² foram investigados na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através dos ensaios MTT e Cristal violeta 6 e 24 horas após as irradiações, enquanto que, o ensaio SRB (Sulforodamina B) evidenciou a proliferação celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas. SHED irradiadas com as densidades de energia 1,2 e 5,0 J/cm² apresentaram maior viabilidade em comparação

ao grupo controle 24 horas após as irradiações, pelo ensaio MTT. No ensaio Cristal violeta, células irradiadas com tais densidades de energia apresentaram menor proliferação neste período. O ensaio SRB revelou maior proliferação em células que receberam densidades de energia mais baixas, como 1,2 e 2,5 J/cm², até 48 horas após as irradiações (FERNANDES et al., 2016).

Considerando a escassez de trabalhos na literatura acerca da influência de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade sobre o tecido pulpar de dentes decíduos, e principalmente, com o intuito de averiguar novas opções terapêuticas para a odontologia, os efeitos da aplicação direta do LBI sobre fibroblastos pulpares de dentes decíduos foram investigados neste trabalho.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO

Comparar os efeitos de diferentes densidades de energia e irradiâncias do Laser de Baixa Intensidade (LBI), variando em função do tempo de irradiação e potência, na viabilidade e proliferação de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos (HPF).

2.2 HIPÓTESES

- H0 - A hipótese nula é que não há diferença na viabilidade e proliferação de HPF após a aplicação de diferentes densidades de energia e irradiâncias do LBI.
- H1 - A hipótese alternativa é que há diferença na viabilidade e proliferação de HPF após a aplicação de diferentes densidades de energia e irradiâncias do LBI.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

Seguindo princípios éticos e jurídicos, este estudo foi submetido e considerado aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CAAE 21032913.0.0000.5417) (Anexo A). Os pais/responsáveis pelas crianças foram consultados e esclarecidos a respeito da pesquisa, e em seguida, orientados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Após a assinatura do termo, a criança foi questionada se gostaria ou não de fazer parte do estudo. Previamente à realização das exodontias um termo de doação dos dentes foi assinado pelos pais/responsáveis pelas crianças (Apêndice B).

3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados pacientes da Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como potenciais doadores para a coleta da polpa dental dos referidos elementos extraídos. Para os critérios de inclusão foram selecionados pacientes que apresentavam bom estado de saúde, sem comprometimentos sistêmicos, com idades entre 5 e 9 anos. Com relação aos dentes, deveriam ser dentes decíduos anteriores hígidos e apresentar indicação ortodôntica para a realização da exodontia (SIPERT et al., 2013). Como critérios de exclusão foram considerados pacientes com dentes cariados, e aqueles que estavam sob algum tipo de tratamento medicamentoso.

3.3 COLETA DO TECIDO PULPAR

Após a exodontia os dentes foram limpos com gaze embebida em soro fisiológico e, em seguida, depositados em tubo falcon contendo meio para cultura de células – *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) suplementado a 20% com Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA). O tubo foi armazenado em um isopor com gelo para o transporte imediato do dente da clínica de Odontopediatria (Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, FOB-USP) até a câmara de fluxo laminar do laboratório de Cultura celular (CIP - Centro Integrado de Pesquisa, FOB-USP), com a finalidade de posterior remoção do tecido pulpar.

O tecido pulpar dos dentes foi removido pela região apical ou após clivagem na região cervical, com o auxílio de cureta e limas endodônticas estéreis, dentro da câmara de fluxo do laboratório. O tecido coletado foi imediatamente colocado em uma placa de Petri 100x10 mm (diâmetro x altura) contendo DMEM 20% SFB para início do procedimento de cultura primária das células.

3.4 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS

Os fragmentos de tecido depositados na placa de Petri 100x10 mm (diâmetro x altura) foram imediatamente picotados em pedaços menores com lâmina de bisturi 15c, permanecendo imersos em meio de cultura DMEM 20% SFB, e antibióticos/antifúngico: 100 µg/mL de penicilina, 100µg/mL de gentamicina e 0,5 mg/mL de anfotericina B (Gibco, Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) – DMEM completo 20% SFB. Em seguida, foram mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 40 minutos. Posteriormente a este período, novamente dentro do fluxo, todo conteúdo foi coletado em um tubo falcon para centrifugação (1200 rpm; 5min; 20°C). Após este processo, os fragmentos foram ressuspensos com novo meio de cultura (DMEM 20% SFB) e armazenados em garrafas para cultura de células 25cm², sendo mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (Figura 1A-M).

Figura 1 - Fluxograma dos procedimentos da etapa inicial para cultura primária de fibroblastos pulpares de dentes decíduos humanos: A – Dente extraído por indicação ortodôntica; B-C – Fragmentos de tecidos picotados em pedaços menores; D – Adição de antibiótico/antifúngicos ao meio de cultura; E-G – Coleta e centrifugação da suspensão; H – Formação do “pellet”; I – Ressuspensão com novo meio de cultura; J-K – Armazenamento em garrafas para cultura de células; L – Manutenção em estufa a 37°C e 5% de CO₂; M – Expansão celular.

As culturas foram mantidas até as células alcançarem subconfluência, sendo que durante este período foram realizadas trocas do meio de cultura periódicas a cada 2-3 dias (DMEM 20% SFB). Após atingirem subconfluência as células foram repicadas e transferidas para outras garrafas de cultura 75 cm² (1ª passagem) até atingirem nova subconfluência. Para tanto foi realizada a contagem de células e as mesmas então, divididas em garrafas para cultura de células de 75 cm², contendo 9mL de meio DMEM 10% SFB e 1mL de meio com células na quantidade de 2×10^5 células, com o objetivo de obter novas expansões de células e acumular maior quantidade das mesmas para posterior utilização nos experimentos. Após a 1ª passagem, as trocas periódicas do meio de cultura, a cada 2-3 dias, foram realizadas com DMEM 10% SFB. A cada etapa de repique celular (tripsinização), as células aumentavam uma passagem. As células não utilizadas para experimentos imediatos foram estabilizadas em

determinadas passagens por meio do processo de congelamento, sendo descongeladas à medida que os experimentos foram programados. Os experimentos deste estudo foram realizados com células entre a 4ª e 8ª passagem (SIPERT et al., 2010; SIPERT et al., 2013; MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; MORANDINI et al., 2013).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS

A fim de garantir que as células isoladas eram fibroblastos foi realizada a caracterização por meio da técnica de imunofluorescência. Para tanto, realizou-se a marcação das células com anticorpo monoclonal primário feito em camundongo (1:100), concentração final de 2µg/mL, anti-proteína humana de superfície de fibroblastos (Anti-FSP, fibroblast surface protein – ABCAM, Cambridge, Reino Unido).

Células em 5ª passagem provenientes da cultura, foram cultivadas em lâminas com câmara de oito poços, a uma densidade de 1×10^4 células/poço, e deixadas *overnight* para aderirem aos poços. Para realização da técnica da imunofluorescência as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos, em seguida incubadas com PBS 3% de albumina de soro bovino durante 30 minutos em temperatura ambiente, e então seguindo as recomendações do fabricante do anticorpo primário selecionado, foram realizadas as reações com o anticorpo secundário e a preparação e montagem das lâminas. Após a montagem e secagem das lâminas, foi realizada a análise por microscopia confocal a laser (Leica TCS SPE, Mannheim, Alemanha) (Figura 2A-C).

Figura 2 - A – Leitura dos fibroblastos caracterizados no microscópio confocal; B – Fibroblastos marcados pelo anticorpo Anti-FSP; C – Núcleos marcados pelo anticorpo secundário (controle negativo)

3.6 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS

Os grupos foram divididos de acordo com a irradiação com o Laser de Baixa Intensidade em relação à variação da Densidade de Energia, em função do Tempo de Irradiação e em função da Potência, para cada grupo experimental, conforme descrição a seguir (Tabela 1):

Tabela 1 - Variação da Densidade de Energia em Função do Tempo de Irradiação (Grupo I) e em Função da Potência (Grupo II)

Grupo	Subgrupo	Densidade de energia (J/cm ²)	Potência (mW)	Densidade de potência (mW/cm ²)	Tempo (s)	Energia (J)
I	a	1,25 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	10 s	0,05 J
	b	2,50 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	20 s	0,10 J
	c	3,75 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	30 s	0,15 J
	d	5,00 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	40 s	0,20 J
	e	6,25 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	50 s	0,25 J
	f	não irradiados (DMEM 10% SFB)	—	—	—	—
	g	não irradiados (DMEM 1% SFB)	—	—	—	—
II	a	1,25 J/cm²	5 mW	125 mW/cm ²	10 s	0,05 J
	b	2,50 J/cm²	10 mW	250 mW/cm ²	10 s	0,10 J
	c	3,75 J/cm²	15 mW	375 mW/cm ²	10 s	0,15 J
	d	5,00 J/cm²	20 mW	500 mW/cm ²	10 s	0,20 J
	e	6,25 J/cm²	25 mW	625 mW/cm ²	10 s	0,25 J
	f	não irradiados (DMEM 10% SFB)	—	—	—	—
	g	não irradiados (DMEM 1% SFB)	—	—	—	—

3.7 DETERMINAÇÃO DO ESTADO DE ESTRESSE CELULAR POR DÉFICIT NUTRICIONAL

A luz laser não apresenta efeitos moduladores em condições de homeostasia celular (KARU, 1989; DAMANTE et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011), portanto o déficit nutricional ideal para atingir o estado de estresse celular, previamente à irradiação, foi estabelecido através de experimento piloto. Para tanto, 1×10^3 células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços em 5ª passagem e mantidas em DMEM 10% SFB por 24 horas na incubadora para adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS 1x. Então, meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de SFB (1%; 5%; 10%; 12%; e 20%) foi adicionado, e as placas mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os ensaios de viabilidade foram realizados pelo método do MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a suplementação.

3.8 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR

Por se tratar de uma linhagem celular pouco estudada, experimentos pilotos foram realizados a fim de determinar a densidade celular ideal. Para tanto, foram plaqueadas 1×10^3 , 2×10^3 e 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços para os ensaios de viabilidade celular pelo método MTT, após irradiação LBI. Previamente aos ensaios de viabilidade das diferentes densidades celulares, a morfologia celular foi analisada por fotografias da região central dos poços, obtidas através de microscópio óptico invertido (Olympus, Waltham, MA, EUA).

3.9 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Após a 4ª passagem, as células foram distribuídas em placas de 96 poços com densidade celular de 1×10^4 células/poço e mantidas em DMEM 10% SFB por 24 horas na estufa 37°C e 5% de CO₂ para adesão. Após este período, todos os grupos experimentais foram suplementados com DMEM 1% SFB, para que as células estivessem em estado de estresse celular no momento da irradiação (KARU, 1989; DAMANTE et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Após 24 horas, previamente à irradiação, o meio de cultura DMEM 1% SFB foi removido e as células lavadas com PBS 1x. Em seguida, meio de cultura incolor (DMEM, no phenol red – Gibco, Carlsbad, CA, EUA) foi adicionado aos poços, sendo suplementado a 1% SFB para os grupos controles negativos, e a 10% SFB para os demais grupos.

As placas de cultura foram posicionadas de modo que a ponta ativa do laser ficasse totalmente em contato com o fundo do poço a ser irradiado. Para evitar a influência de outras fontes de luz além do laser, durante o procedimento de irradiação as placas de cultura foram envolvidas por uma máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais. Cada orifício foi vedado individualmente por uma portinhola também em cartolina negra, permitindo que apenas o orifício do poço que estava sendo irradiado permanecesse aberto. Os orifícios da máscara apresentavam diâmetro compatível com a ponta ativa do dispositivo do laser. Além disso, sabendo-se que a distância entre a fonte de luz e a superfície de aplicação é crítica, a aplicação do LBI foi realizada por meio do fundo transparente da placa. Portanto, o raio laser foi aplicado diretamente sobre as células sem transpor o meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por Volpato et al. (2011) (Figura 3A-E).

Figura 3 - A – Bancada preparada previamente ao procedimento de irradiação (aparelho Twin Flex Evolution MMOptics®); B – Posicionamento da placa dentro da máscara negra; C – Portinholas e orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais; D – Posicionamento da placa no suporte para Irradiação; E – Aplicação do laser pelo orifício da máscara negra em contato com o fundo da placa

Para o procedimento de irradiação celular foi usado Laser de Baixa Intensidade – meio ativo: Índio gálio alumínio fósforo/ Aluminium-gallium-indium-phosphide (InGaAlP) (EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011) (Twin Flex Evolution MMOptics® – São Carlos/SP, Brasil); no comprimento de onda de 660 nm (vermelho); Área do feixe de saída - 0,04 cm², variando a Densidade de Energia em função do Tempo de Irradiação e da Potência empregada para cada grupo experimental (Tabela 1). Previamente às irradiações a potência foi aferida por um dispositivo radiômetro (Laser Check MMOptics® – São Carlos/SP, Brasil) (Figura 4). Os grupos controles (Controles positivos – grupos If e IIf; controles negativos – grupos Ig e IIg) foram tratados sob condições idênticas, exceto que o dispositivo laser foi mantido desligado durante os experimentos. Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições ambientais, como luz, umidade, temperatura e tempo fora da incubadora (DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; PACHECO et al., 2013). Os grupos foram plaqueados em triplicata e os experimentos repetidos três vezes (FRESHNEY, 2005; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 4 - Dispositivo radiômetro (Laser Check MMOptics®) utilizado para aferir a potência da irradiação laser

3.10 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

O ensaio MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificada pela redução deste sal a cristais de formazan (cor azul/púrpura), pela atividade metabólica celular de enzimas mitocondriais (desidrogenases mitocondriais) (MOSMANN, 1983). Os ensaios de viabilidade foram realizados nos períodos de 24, 48 e 72 horas após as irradiações (VOLPATO et al., 2011; SOARES et al., 2015). Ao final da incubação nos respectivos tempos, os sobrenadantes foram removidos, as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida, foi adicionado 110 μ L/poço da solução de MTT às células. A solução de MTT foi dissolvida em DMEM na proporção de 0,5 mg/mL. As placas foram envoltas por papel alumínio, sob o abrigo da luz, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas. Em seguida, foram retiradas da incubadora, e então, a solução de MTT foi aspirada e 200 μ L/poço de DMSO (Dimetil Sulfóxido - Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foi adicionado (Figura 5A-B). A absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, Vermont, USA) com comprimento de onda de 570 nm (Figura 6A-B).

Figura 5 - A – Poços contendo solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio); B – Cristais de formazan dissolvidos após adicionar DMSO

Figura 6 - A – Aparelho espectrofotômetro; B – Posicionamento da placa no espectrofotômetro

3.11 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA

O ensaio Cristal violeta (CV) avalia a proliferação celular por corar o DNA (GILLIES et al., 1986; KUENG, SILBER; EPPENBERGER, 1989). Após 24, 48 e 72 horas de irradiação, os sobrenadantes foram descartados e os poços foram lavados com solução PBS 1x. Em seguida, foi adicionado 200 μ L/poço de metanol 100% (Vetec – Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 10 minutos. Passado o tempo proposto, o metanol foi removido completamente e 200 μ L da solução de Cristal violeta, adicionada nos poços por 3 minutos. Após a remoção da solução de Cristal violeta, os poços foram novamente lavados com solução PBS 1x por 2 vezes. Então, após a remoção desta solução, 200 μ L de Citrato de sódio 0,05 mol.L foi adicionado aos poços por 10 minutos para leitura da absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 540 nm (Figura 7A-F).

Figura 7 - Protocolo do ensaio Cristal violeta (CV): A – Lavagem com PBS 1x; B – Solução de metanol 100%; C – Solução de Cristal violeta; D – Lavagem com PBS 1x por 2 vezes; E – Citrato de sódio 0,05 mol.L; F – Proteção da placa da luminosidade para leitura no espectrofotômetro a 540 nm

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica 5.1 (StatSoft). Os dados coletados foram submetidos a análise de variância ANOVA 2 critérios, seguido pelo teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância de 5% para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

As amostras de tecido pulpar para cultivo primário de fibroblastos foram obtidas de 3 dentes decíduos anteriores de 3 crianças. A idade dos pacientes variou de 7 a 8 anos, com uma média de 7 anos e 10 meses (Apêndice C).

4.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ESTRESSE CELULAR POR DÉFICIT NUTRICIONAL

As médias dos valores de absorbância das diferentes concentrações de SFB foram obtidas após a leitura das placas pelo espectrofotômetro. Houve diferença estatística entre o grupo A em relação aos grupos D ($P=0,004$), e E ($P=0,016$), no período de 48 horas. Na avaliação de 72 horas, houve diferença estatística entre os grupos B em comparação aos grupos C ($P=0,011$), D ($P<0,001$), e E ($P=0,001$). Da mesma maneira, o grupo A apresentou diferença estatisticamente significativa entre estes grupos no período de 72 horas ($P<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos suplementados a 1% e 5% SFB em nenhum período de avaliação ($P>0,05$) (Tabela 2). Para atingir o estado de estresse celular previamente às irradiações, as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com SFB a 1% por 24 horas, uma vez que esta concentração de suplementação revelou viabilidade reduzida ao longo dos diferentes períodos.

Tabela 2 - Valores médios de absorbância das diferentes concentrações de SFB nos diferentes períodos

SFB	1%	5%	10%	12%	20%
Período					
24 h	0,0267 ^A	0,0375 ^A	0,0400 ^A	0,0415 ^A	0,0437 ^A
48 h	0,0560 ^A	0,0860 ^{AB}	0,0875 ^{AB}	0,0993 ^B	0,0950 ^B
72 h	0,0610 ^A	0,0835 ^A	0,1208 ^B	0,1353 ^B	0,1317 ^B

*Grupos com letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre si (sentido horizontal da linha) ($P<0,05$)

4.2 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR

A análise da morfologia celular previamente aos ensaios de viabilidade revelou que as densidades celulares 1×10^3 e 2×10^3 mostraram fibroblastos morfologicamente heterogêneos dispersos pelo poço de maneira escassa, enquanto a densidade celular de 1×10^4 revelou células fusiformes distribuídas de maneira homogênea pelo poço (Figura 8A-I).

Figura 8 - A-I – Análise da morfologia celular de fibroblastos de dentes decíduos com diferentes densidades celulares (DC) na região central dos poços através de microscópio óptico invertido (Aumento de 10x), previamente aos ensaios de MTT nos diferentes períodos

As médias dos valores de absorbância obtidos após a leitura dos resultados do ensaio MTT foram mais elevadas para o plaqueamento com densidade de 1×10^4 células por poço do que para os experimentos realizados com as outras densidades celulares avaliadas (Tabela 3). Portanto, o protocolo de plaqueamento de fibroblastos pulpare de dentes decíduos humanos para os experimentos de avaliação da viabilidade celular após a irradiação com LBI foi estabelecido com a densidade de 1×10^4 células por poço.

Tabela 3 - Médias de absorvância das diferentes densidades celulares após o ensaio MTT nos grupos I e II

Densidade celular		1x10 ³			2x10 ³			1x10 ⁴		
Período		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Grupo	Subgrupo									
I	a	0,067	0,064	0,097	0,012	0,001	0,018	0,845	0,894	0,487
	b	0,051	0,072	0,052	0,011	0,001	0,020	0,795	0,813	0,576
	c	0,070	0,072	0,119	0,011	0,028	0,018	0,801	0,851	0,627
	d	0,101	0,114	0,079	0,008	0,001	0,023	0,751	0,893	0,546
	e	0,092	0,072	0,069	0,023	0,016	0,027	0,729	0,832	0,545
	f	0,037	0,062	0,076	0,013	0,004	0,018	0,641	0,732	0,581
	g	0,041	0,034	0,029	0,003	0,001	0,006	0,545	0,508	0,184
II	a	0,062	0,071	0,074	0	0,022	0,023	0,760	0,739	0,659
	b	0,079	0,110	0,018	0,002	0,012	0,030	0,632	0,823	0,630
	c	0,050	0,089	0,043	0	0,016	0,031	0,742	0,703	0,623
	d	0,023	0,050	0,053	0,005	0,019	0,025	0,617	0,830	0,536
	e	0,044	0,062	0,038	0,003	0,021	0,027	0,678	0,771	0,665
	f	0,059	0,094	0,044	0,004	0,028	0,028	0,513	0,832	0,577
	g	0,013	0,038	0,019	0	0,003	0,011	0,434	0,337	0,222

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

As médias dos valores de absorbância obtidas dos diferentes grupos do estudo através da leitura no espectrofotômetro, referentes aos ensaios MTT e Cristal violeta realizados com densidade celular de 1×10^4 células por poço, foram analisadas nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

4.3.1 Comparação intragrupos

No ensaio MTT, houve diferença estatisticamente significativa nos grupos If ($P=0,048$) e IIf ($P=0,032$) entre os períodos de 24 e 72 horas, sendo que ambos apresentaram menor viabilidade durante o período de 24 horas em comparação ao período de 72 horas.

O ensaio Cristal violeta revelou diferença estatisticamente significativa dentro de um mesmo grupo nos diferentes períodos, independente do grupo avaliado, sendo que o período de 24 horas apresentou menor proliferação em comparação aos períodos de 48 ($P=0,000$) e 72 horas ($P=0,000$).

4.3.2 Comparação intergrupos

O ensaio MTT apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos IIa ($P=0,029$) e IIb ($P=0,049$) em relação ao grupo IIg, sendo que o controle negativo mostrou menor viabilidade 24 horas após a irradiação. No período de 48 horas, os grupos Ia ($P=0,022$), Ib ($P=0,000$), Ic ($P=0,000$) e Id ($P=0,010$) revelaram maior viabilidade em comparação ao grupo Ig, da mesma maneira que o grupo IIf ($P=0,033$) em relação ao grupo IIg. Após 72 horas, os grupos Ib ($P=0,009$), Ic ($P=0,000$), Id ($P=0,000$), Ie ($P=0,033$), e If ($P=0,000$), assim como, IIa ($P=0,000$), IIb ($P=0,000$), IIc ($P=0,000$), IId ($P=0,000$), IIf ($P=0,000$), e IIg ($P=0,000$), apresentaram maior viabilidade em relação aos respectivos controles negativos, Ig e IIg (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da viabilidade celular entre as diferentes densidades de energia do LBI pelo ensaio MTT 24, 48 e 72 horas após as irradiações (Média e desvio padrão).

Período (h)		24 h		48 h		72 h	
Ensaio	Grupo Subgrupo	I	II	I	II	I	II
MTT	a	0,802 ^A ±0,062	0,992 ^A ±0,093	0,965 ^A ±0,167	0,977 ^{AB} ±0,141	0,915 ^{AB} ±0,177	1,189 ^A ±0,217
	b	0,929 ^A ±0,065	0,980 ^A ±0,127	1,042 ^A ±0,146	1,027 ^{AB} ±0,108	1,015 ^A ±0,143	1,231 ^A ±0,291
	c	0,819 ^A ±0,080	0,997 ^{AB} ±0,114	0,955 ^{AB} ±0,245	0,923 ^{AB} ±0,127	1,100 ^A ±0,284	1,161 ^A ±0,195
	d	0,875 ^A ±0,095	0,861 ^{AB} ±0,257	0,815 ^{AB} ±0,108	0,976 ^{AB} ±0,199	1,094 ^A ±0,261	1,072 ^A ±0,111
	e	0,851 ^A ±0,123	0,849 ^{AB} ±0,225	1,120 ^A ±0,132	0,926 ^{AB} ±0,152	0,987 ^A ±0,196	1,207 ^A ±0,212
	f	0,902 ^A ±0,066	0,935 ^{AB} ±0,151	0,983 ^A ±0,118	1,074 ^A ±0,135	1,234 ^A ±0,171	1,153 ^A ±0,279
	g	0,666 ^A ±0,114	0,633 ^B ±0,081	0,615 ^B ±0,117	0,744 ^B ±0,068	0,657 ^B ±0,147	0,565 ^B ±0,080

*Grupos com letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre si (sentido vertical da linha) ($P < 0,05$).

Nos diferentes períodos de avaliação do ensaio CV, todos os grupos irradiados, exceto os grupos Ie e IIf, exibiram diferença estatisticamente significativa por apresentarem maior proliferação, em comparação aos respectivos controles negativos ($P=0,000$; $P=0,008$). Assim como, o controle positivo IIf mostrou estatisticamente maior taxa de crescimento do que o controle negativo IIg ($P=0,000$). Entre os grupos If e Ig, esta diferença não foi observada (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação da proliferação celular entre as diferentes densidades de energia do LBI pelo ensaio CV 24, 48 e 72 horas após as irradiações (Média e desvio padrão)

Período (h)		24 h		48 h		72 h	
Ensaio	Grupo Subgrupo	I	II	I	II	I	II
CV	a	0,292 ^A ±0,158	0,313 ^A ±0,131	0,327 ^A ±0,205	0,301 ^A ±0,090	0,415 ^A ±0,246	0,458 ^A ±0,097
	b	0,240 ^A ±0,120	0,268 ^A ±0,094	0,405 ^A ±0,141	0,406 ^A ±0,100	0,370 ^A ±0,145	0,432 ^A ±0,218
	c	0,272 ^A ±0,065	0,308 ^A ±0,066	0,363 ^A ±0,190	0,373 ^A ±0,159	0,444 ^A ±0,271	0,436 ^A ±0,154
	d	0,217 ^A ±0,079	0,225 ^A ±0,086	0,295 ^A ±0,089	0,401 ^A ±0,138	0,354 ^A ±0,195	0,432 ^A ±0,161
	e	0,209 ^{AB} ±0,119	0,191 ^{AB} ±0,060	0,345 ^{AB} ±0,079	0,334 ^{AB} ±0,106	0,223 ^{AB} ±0,201	0,307 ^{AB} ±0,137
	f	0,169 ^{AB} ±0,057	0,405 ^A ±0,162	0,285 ^{AB} ±0,125	0,327 ^A ±0,104	0,326 ^{AB} ±0,127	0,420 ^A ±0,119
	g	0,079 ^B ±0,077	0,180 ^B ±0,045	0,212 ^B ±0,122	0,153 ^B ±0,098	0,078 ^B ±0,141	0,109 ^B ±0,045

*Grupos com letras diferentes indicam diferença estatisticamente entre si (sentido vertical da linha) ($P < 0,05$).

Os diferentes protocolos de irradiação, grupos I e II, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na viabilidade e proliferação celular entre densidades de energia iguais durante os períodos avaliados nos ensaios MTT e CV.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Visando proporcionar uma melhor interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos os aspectos referentes à metodologia aplicada para obtenção dos resultados. Assim como, considerações sobre os resultados alcançados serão realizadas mediante comparação com outros trabalhos existentes na literatura.

5.1 AMOSTRA

A efetividade da terapia LBI na biomodulação celular tem sido amplamente discutida na literatura (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PEPLOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; PEPLOW; BAXTER, 2012; GINANI et al., 2015). O grande desafio tem sido determinar os melhores parâmetros para alcançar resultados favoráveis em diversas situações e tipos celulares (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; BASSO et al., 2012). A influência direta desta opção terapêutica sobre células pulpares, especificamente fibroblastos de dentes decíduos, permanece inexplorada. Portanto, este estudo foi realizado com a finalidade de esclarecer os efeitos de diferentes densidades de energia e irradiâncias na viabilidade e proliferação de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos.

Dentes decíduos apresentam processo de desenvolvimento, morfologia, características histológicas e ciclo vital bastante específicos. Mesmo em comparação a dentes permanentes, há diferença quanto às expressões gênicas relacionadas com os processos de mineralização, inervação, formação de tecido vascular e resposta imune (KIM et al., 2014). Assim, o tecido pulpar de dentes decíduos reage de maneira peculiar à estímulos externos, como em testes de sensibilidade, traumatismos dentários e exposição a materiais capeadores pulpares (SHEKAR; RANGANATHAN, 2012; SIPERT et al., 2013). Portanto, deve ser esperado que as células provenientes de dentes decíduos e permanentes, quando isoladas em cultura, apresentem respostas diferentes a terapias pulpares regenerativas (KIM et al., 2014).

Visto que linhagens celulares variadas podem apresentar resultados divergentes após a irradiação com LBI devido às diferenças fenotípicas e genotípicas (GINANI et al., 2015), a investigação da correta combinação dos parâmetros de irradiação com os diferentes tipos celulares é fundamental para se alcançar os efeitos clínicos desejados (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; GINANI, 2015; HADIS et al., 2016). A maioria dos estudos avaliam os efeitos da fototerapia para aplicação odontológica sobre cultura primária de fibroblastos gengivais (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; POURZARANDIAN et al., 2005; DAMANTE et al., 2009), linhagens celulares imortalizadas ou contínuas (PEREIRA et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006; FERREIRA et al., 2009), células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes decíduos (EDUARDO et al., 2008; TURRIONI et al., 2015; FERNANDES et al., 2016) e permanentes (ZACCARA et al., 2015). Miyata et al. (2006), avaliaram os mecanismos envolvidos na proliferação celular de fibroblastos derivados de cultura primária de tecido pulpar de dentes terceiros molares. O presente estudo é pioneiro na investigação dos efeitos da aplicação de diferentes dosimetrias do laser vermelho sobre fibroblastos pulpares derivados de dentes decíduos humanos.

A linhagem celular utilizada neste estudo foi obtida do cultivo celular primário pela técnica do explante de tecido pulpar de dentes decíduos. A utilização das células caracterizadas como fibroblastos por reação de imunofluorescência foi preconizada entre a 4ª e 8ª passagem (SIPERT et al., 2010; SIPERT et al., 2013; MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011; MORANDINI et al., 2013). A partir da terceira passagem as linhagens celulares tendem a assumir uma constituição mais homogênea, estável e resistente. A caracterização de uma linhagem contínua de células visa não só determinar a funcionalidade, assim como provar a autenticidade do tipo celular analisado (FRESHNEY, 2005).

5.2 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho foi baseada em protocolos de cultura, envolvendo procedimentos de caracterização celular, contagem e plaqueamento, publicados previamente (SIPERT et al., 2010; MORANDINI et al., 2010; MORANDINI et al., 2011;

MORANDINI et al., 2013; SIPERT et al., 2013). O processo de irradiação foi executado conforme os trabalhos de Damante et al. (2009) e Volpato et al. (2011). Assim como, a avaliação da viabilidade e proliferação celular, respectivamente pelos métodos MTT e CV, após o uso do LBI foi proposta por Eduardo et al. (2008) e Ferreira et al. (2009).

Nos diversos estudos com laser e cultura de células, o processo de subcultivo envolve etapas que expõem as células a diversos estímulos, e podem sensibilizá-las de diferentes maneiras aos efeitos da irradiação (KARU, 1989). A falta de padronização das condições experimentais dificulta a comparação dos resultados da terapia laser em cultura de células (GINANI et al., 2015). É importante que estudos pilotos sejam realizados quando linhagens celulares pouco conhecidas são investigadas.

O LBI visa promover biomodulação das atividades celulares a fim de normalizar funções em situações de desequilíbrio, diante disso, em condições ideais a fototerapia tende a não promover benefícios (AZEVEDO et al., 2006; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011). A sensibilidade celular aos efeitos estimulatórios do laser são inversamente proporcionais ao pH celular (KARU, 1989; KARU, 1999). Segundo Karu (1989) as células devem encontrar-se fisiologicamente alteradas para que a luz seja absorvida de maneira satisfatória. O mecanismo de estresse celular ocorre devido a alterações desencadeadas por agentes oxidativos, temperatura, e deficiência nutricional do meio de cultura (TAGLIANI et al., 2010). A diminuição da concentração de soro fetal bovino (déficit nutricional) no meio de cultura do cultivo celular tem mostrado bastante eficácia para avaliar os efeitos da irradiação do LBI no metabolismo celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al. 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Tagliani et al. (2010) analisaram os efeitos do LBI na viabilidade de células odontoblásticas de linhagem imortalizada (MDPC-23 - American Type Culture Collection, ATCC® CRL-2537™, Virgínia, EUA) sob estresse nutricional. A concentração de SFB no meio de cultura determinou os grupos experimentais, para tanto, 24 horas antes das irradiações as células receberam meio de cultura suplementado com 2%, 5% ou 10% SFB. As células foram irradiadas com laser infravermelho (λ : 808 nm; densidade de energia: 1,5 J/cm²) a cada 24 horas totalizando três aplicações consecutivas. Células não irradiadas com meios de cultura suplementados a 2%, 5%, e 10% foram consideradas como controles. A viabilidade celular e morfologia foram avaliadas pelo MTT e por microscópio eletrônico de

varredura, respectivamente. Os grupos irradiados não mostraram diferenças significativas na viabilidade, independente da concentração de SFB. Embora o meio de cultura suplementado a 5% SFB tenha revelado discreto aumento no metabolismo celular nas células irradiadas. Sugerindo que a suplementação do meio de cultura a 5% SFB seja um método adequado para promover bioestimulação pelo LBI sobre o tipo celular avaliado.

A linhagem celular influencia na resposta ao déficit nutricional (FERREIRA et al., 2009). Portanto, por se tratar de um tipo celular pouco estudado, neste estudo um experimento piloto foi proposto, e mostrou que a suplementação do meio de cultura com 5% SFB não foi suficiente para induzir a condição de estresse celular em fibroblastos de dentes decíduos após 24 horas de déficit nutricional. Enquanto que, a suplementação do meio de cultura a 1% SFB, em comparação aos demais grupos, reduziu gradativamente a viabilidade celular ao longo dos períodos de avaliação, caracterizando alteração no estado de homeostasia. Logo, determinou-se o déficit nutricional ideal como 1% SFB para atingir o estado de estresse celular previamente às irradiações dos fibroblastos pulpares derivados de dentes decíduos, assim como descrito por Damante et al. (2009) que avaliou fibroblastos gengivais. Outros estudos consideraram como déficit nutricional adequado para desequilibrar a homeostasia celular a suplementação do meio de cultura com SFB em 0,5% (POURZARANDIAN et al., 2005), 2,5% (PEREIRA et al., 2002), 5% (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; MARQUES et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; FERREIRA et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010; VOLPATO et al., 2011) e até 10% (EDUARDO et al., 2008), dependendo do experimento proposto e tipo celular.

A avaliação da viabilidade e proliferação celular por determinados ensaio laboratoriais, como testes colorimétricos, depende da quantidade de células disponíveis, visto que a quantidade insuficiente de células não permite a leitura adequada dos resultados através de aparelhos espectrofotômetros (GILLIES et al., 1986; KUENG, SILBER; EPPENBERGER, 1989). Assim como, uma quantidade exagerada de células pode reduzir a taxa de crescimento ao atingir o estado de confluência, visto que fibroblastos apresentam inibição da proliferação por contato intercelular (AZEVEDO et al., 2006; MIYATA et al., 2006). Os estudos não apresentam uma densidade celular pré-estabelecida. Esta variável depende da metodologia

proposta e dos tipos de células analisadas. Portanto, neste estudo, a densidade celular foi outro parâmetro determinado por estudo piloto. Para este protocolo experimental a densidade de 1×10^4 células/poço apresentou células com morfologia uniforme, distribuição homogênea na região central dos poços e valores de absorbância mais elevados. Da mesma maneira, Ferreira et al. (2009) utilizaram esta densidade celular no cultivo de uma linhagem de células em placas de 96 poços a fim de realizar ensaios de viabilidade (MTT) e proliferação (CV) após a irradiação de células sob déficit nutricional. Assim, déficit nutricional e densidade celular adequados foram previamente determinados neste estudo.

Os testes colorimétricos utilizados neste estudo para avaliação da viabilidade e proliferação celular revelam absorbância proporcionalmente à taxa de viabilidade. No ensaio CV as células são fixadas previamente, enquanto que no ensaio MTT são mantidas viáveis (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). O fato de avaliarem reações diferentes pode justificar níveis de absorbância distintos. O ensaio MTT é utilizado para determinar a viabilidade celular pela redução deste sal a cristais de formazan, através da atividade metabólica de enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). Enquanto que, o ensaio Cristal violeta avalia a proliferação celular celular por corar o DNA (GILLIES et al., 1986; KUENG, SILBER; EPPENBERGER, 1989; FERREIRA et al., 2009). Visto que a terapia laser pode aumentar o metabolismo celular e a síntese de DNA (Karu, 1989), tais ensaios são considerados adequados para a metodologia proposta (EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; FERNANDES et al., 2016).

Com relação ao protocolo de irradiação, os lasers com diferentes comprimentos de onda e parâmetros têm sido utilizados no campo da Odontologia (OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009), os quais podem ser vermelhos, visíveis ao olho humano - comprimento de onda entre 625 a 750 nm; ou infravermelhos, não visíveis ao olho humano - comprimento de onda acima de 750 nm. O meio ativo dos Lasers de Baixa Intensidade podem ser sólidos semi-condutores (diodos de Arseneto de Gálio Alumínio, Arseneto de Gálio, Índio Gálio Alumínio Fósforo) ou gasosos (Hélio-Neônio). Os lasers de hélio-neônio eram mais utilizados inicialmente, mas foram sendo substituídos pelos lasers diodos semi-condutores (λ : 635 nm a 830nm) (CAPRIOGLIO; OLIVI; GENOVESE, 2011). O laser vermelho tem apresentado ação favorável na

viabilidade e proliferação de fibroblastos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; MOORE et al., 2005; VOLPATO et al., 2011), sendo preconizado para este estudo, em que as irradiações foram realizadas com laser diodo (InGaAlP; λ : 660 nm).

A luz do laser pode sofrer absorção, reflexão, transmissão ou espalhamento ao entrar em contato com o tecido alvo em função das suas propriedades ópticas (MARTENS, 2011; VERMA et al., 2012). A literatura sugere que determinadas táticas sejam seguidas a fim de aprimorar a absorção da luz pelas células, como utilização de meio de cultura incolor para eliminar possível interferência do indicador de pH vermelho de fenol (MOORE 2005, DAMANTE et al., 2009; SKOPIN; MOLITOR, 2009; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; DAVIES et al., 2014) e armazenamento da placa em máscara escura para proteção da luz durante a irradiação (PEREIRA et al., 2002; MOORE et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016), bem como aplicação da luz na parte inferior da placa (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016) e utilização de placas fabricadas em poliestireno de qualidade, que garantem perda mínima das propriedades da luz e apresentam características ópticas adequadas para medição precisa da absorbância (DAMANTE et al., 2014; DAVIES et al., 2014). Todas as estratégias descritas foram seguidas por este estudo a fim minimizar a perda de energia durante a execução dos experimentos.

Somada a tais precauções, verificar os parâmetros de irradiação e a calibração do aparelho laser é fundamental para garantir a confiabilidade dos resultados (HADIS et al., 2016). Neste estudo previamente às irradiações, a potência foi aferida por um radiômetro específico, conforme preconizado em estudos prévios (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; MOORE et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; FERREIRA et al; 2009; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011).

As investigações *in vitro* dos parâmetros ideais para a aplicação da fototerapia visando a viabilidade, proliferação celular, e a expressão de mediadores químicos envolvidos na inflamação e reparação tecidual, devem ser analisadas detalhadamente, visto que a diversidade de termos técnicos e protocolos estudados pode levar a conclusões inadequadas quanto a influência do LBI sobre as respostas obtidas (GINANI

et al., 2015 PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; HADIS et al., 2016). Hadis et al. (2016), realizaram uma revisão sistemática acerca das informações referentes à terapia LBI na literatura com o intuito de esclarecer dados incompletos, definições errôneas e termos inadequados. Os trabalhos publicados apresentaram de maneira geral deficiência nos parâmetros de irradiação e a maioria não afere o laser previamente, baseando-se apenas nas informações dos fabricantes. A falta de compreensão das especificidades da terapia laser é evidente na literatura, uma vez que muitos estudos distorcem conceitos fundamentais. Este fato promove controvérsias que podem afetar a confiabilidade das investigações sobre a eficácia dos tratamentos. Portanto, a qualificação dos pesquisadores, a verificação e indicação completa dos parâmetros de irradiação visa possibilitar a comparação dos resultados na literatura, assim como, a reprodutibilidade dos estudos.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Comparação da viabilidade e proliferação celular intragrupos

Neste estudo, a viabilidade e proliferação celular foram avaliadas entre os grupos 24, 48 e 72 horas após as irradiações, assim como, dentro de cada grupo nos diferentes períodos. Da mesma maneira que nos trabalhos de Eduardo et al. (2008), Damante et al. (2008) e Ferreira et al. (2009), a primeira avaliação ocorreu 24 horas após o tratamento. Neste tempo, ocorre adaptação das células ao meio de cultura, que é fundamental para obtenção das respostas celulares. No período de 48 horas após o estímulo, as células podem alcançar o auge de metabolismo, que tende a declinar nos dias consecutivos (FRESHNEY, 2005). Embora, neste estudo os resultados obtidos tenham revelado significativamente maior viabilidade no período de 72 horas em comparação à avaliação de 24 horas no grupo irradiado IIe e no controle positivo If, pelo ensaio MTT. O ensaio Cristal violeta, também revelou significativamente menor proliferação às 24 horas de avaliação em comparação aos demais períodos, independente do grupo avaliado. Embora não seja possível comparar de maneira fiel com este trabalho, por divergir quanto ao tipo de laser e linhagem celular analisada, a

investigação de Ferreira et al. (2009) também não demonstrou aumento da viabilidade e proliferação de células musculares, respectivamente pelos ensaios MTT e CV, após irradiação com diferentes densidades de energia do laser infravermelho no período de 24 horas.

5.3.2 Comparação da viabilidade e proliferação celular intergrupos

Os efeitos biológicos da estimulação laser sobre as células são dose-dependentes. A dose de energia e a irradiância ideal ainda geram muitas dúvidas na literatura (KARU, 1989; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; POURZARANDIAN et al., 2005; AZEVEDO et al., 2006; EDUADO et al., 2008; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; GINANI et al., 2015). Muitos estudos têm testado diferentes densidades de energia (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2003; MENEGUZZO ET AL., 2008; BASSO ET AL., 2012; FERNANDES et al., 2016), e, segundo alguns autores, densidades de energia que variam na faixa de 0,5 até 4 J/cm² tem mostrado maior efetividade em induzir o crescimento celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; VOLPATO et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; BASSO et al., 2012; ZACCARA et al., 2015; FERNANDES et al., 2016). A literatura sugere que densidades de energia mais elevadas possam danificar os fotorreceptores, com consequente redução no efeito biomodulador do laser (KARU, 1989). Na investigação de Pereira et al. (2002), culturas tratadas com 5 J/cm² não apresentaram aumento no crescimento celular, enquanto que a densidade de energia 3 J/cm² foi considerada ideal para o crescimento de fibroblastos derivados de linhagem imortalizada. Corroborando com Fernandes et al. (2016), que revelou maior proliferação de células-tronco, 24 e 48 horas, após irradiação LBI com densidade de energia 1,2 J/cm². Embora Kreisler et al. (2003) tenha mostrado efeitos estimulatórios de 2 J/cm² até aproximadamente 8 J/cm² em fibroblastos gengivais após aplicação de LBI. Assim como neste estudo, no qual os grupos irradiados entre 1,2 J/cm²-6,2 J/cm² não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si na viabilidade e proliferação celular.

Os grupos I e II, deste estudo, divergiram entre si quanto a irradiância. A irradiância, ou densidade de potência, é um parâmetro calculado pela potência sobre a área de saída do feixe de laser, muitas vezes omitido nos estudos. De acordo com a revisão de Peplow, Chung e Baxter (2010), há uma variedade de valores adequados para este parâmetro entre 0,14 e 1714 mW/cm², levando-se em consideração que muitos estudos não mostram este valor, de maneira explícita. Além disso, não há um consenso sobre a influência da potência, bem como, os efeitos de diferentes valores de irradiância, na estimulação ou inibição das atividades celulares (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008). De acordo com os resultados apresentados, a variação deste parâmetro entre 125-625 mW/cm², não induziu efeitos negativos na viabilidade e proliferação celular de fibroblastos pulpares de dentes decíduos humanos. Assim como, os grupos que receberam densidades de energia iguais e irradiâncias diferentes não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si.

A ausência da influência significativa das diferentes densidades de energia e irradiâncias aplicadas no presente estudo, na viabilidade e proliferação de fibroblastos pulpares de dentes decíduos humanos, é evidenciada através da interpretação dos resultados obtidos. O ensaio MTT mostrou, na avaliação de 24 horas, que os grupos irradiados com menores densidades de energia (1,2 e 2,5 J/cm²) foram significativamente mais viáveis do que o controle negativo, quando irradiados com maior potência (Grupo II). Enquanto que, no período de 48 horas, grupos que receberam a maior, assim como, as menores densidades de energia (1,2, 2,5 e 6,2 J/cm²), apresentaram maior viabilidade em comparação ao controle negativo, quando a potência foi menor durante a irradiação (Grupo I). Após 72 horas, todos os grupos irradiados revelaram significativamente maior viabilidade do que os respectivos controles negativos, independente da potência (Grupos I e II), exceto o grupo Ia. No ensaio Cristal violeta, em todos os períodos de avaliação, apenas os grupos irradiados com a maior densidade de energia (6,2 J/cm²) não apresentaram significativamente maior proliferação do que os respectivos controles negativos (Grupos I e II). Embora os diferentes parâmetros aplicados não tenham mostrado superioridade na estimulação da viabilidade e proliferação celular, em comparação aos controles positivos, nota-se que, em momento algum, a irradiação LBI provocou redução

significativa da viabilidade e proliferação celular nos diferentes grupos. Este trabalho esclareceu que a aplicação da mesma densidade de energia por diferentes protocolos (Grupos I e II), com variação do tempo de irradiação ou da potência, não influenciam na energia total absorvida e, conseqüentemente, na resposta de fibroblastos pulpaes de dentes decíduos humanos.

5.4 IMPLICAÇÕES CLÍNICAS

A interpretação dos resultados de estudos laboratoriais, bem como, a extrapolação para a prática clínica, devem ser feitas com cautela, uma vez que múltiplas interações do laser com os tecidos, e o organismo de maneira geral, podem não ser alcançadas laboratorialmente e ocultar respostas importantes (KREISLER et al., 2002; FRESHNEY, 2005; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008.; FERREIRA et al., 2009).

Com o intuito de poder superar esta limitação, Basso et al. (2016) avaliou os efeitos do LBI sobre um modelo de cultura celular tridimensional (3D). Para tanto, fibroblastos gengivais foram semeados em matriz de colágeno e irradiados com densidades de energia 0,5, 1,5, e 3 J/cm². A viabilidade, morfologia celular, e expressão gênica de fatores de crescimento foram avaliadas. A densidade de energia 3 J/cm² induziu maior viabilidade celular, em contradição com estudos anteriores que utilizaram cultivo celular em monocamada. Sugerindo que as doses mais elevadas são mais eficazes para aumentar a viabilidade de fibroblastos presentes nas áreas mais profundas de tecidos conjuntivos. Além disso, a expressão dos fatores de crescimento foi estimulada pela densidade de energia 0,5 J/cm², enquanto que nos estudos com células cultivadas em monocamada a expressão de colágeno tipo I não foi significativamente afetada por esta terapia. A expressão gênica ocorreu de maneira semelhante a observada em tecidos vivos. Logo a ausência de diferenças estatísticas na avaliação entre as densidades de energia utilizadas neste estudo, bem como em comparação aos controles positivos, pode ser justificada pela falta de interação entre o laser e fatores fisiológicos não reproduzidos na monocamada celular. Desta maneira,

o modelo de cultura celular 3D proposto, caracteriza-se um método laboratorial promissor para maiores investigações dos efeitos estimulatórios da terapia laser.

Estudos *in vitro* são essenciais para a orientar os parâmetros a serem aplicados de maneira segura em futuras pesquisas, empregando modelos *in vivo* e ensaios clínicos (PEREIRA et al., 2002; TAGLIANI, 2010). Portanto, mais estudos são necessários para que os parâmetros de irradiação ideais possam ser determinados para cada situação clínica de maneira específica, a fim de favorecer a cura do complexo dentina-polpa.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, as diferentes densidades de energia e irradiâncias propostas não prejudicaram a viabilidade e proliferação de fibroblastos pulpaes de dentes decíduos humanos. A variação do protocolo de irradiação LBI, em função do tempo ou da potência, não interferiram nas respostas celulares após a aplicação da mesma densidade de energia com irradiâncias diferentes.

Diante do exposto, aceita-se H_0 , e rejeita-se H_1 .

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(1):237-49.

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]. São Carlos (SP): Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo; 2003.

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

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.

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.

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.

Beckmann KH, Meyer-Hamme G, Schröder S. Low level laser therapy for the treatment of diabetic foot ulcers: a critical survey. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:626127.

Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). *J Photochem Photobiol B.* 1996 Jul;34(2-3):117-21.

Caprioglio C, Olivi G, Genovese MD. Lasers in dental traumatology and low level laser therapy (LLLT). *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011;12(2):79-84.

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.

Damante CA, Marques MM. Laser power loss through polystyrene plates for cell culture. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):373.

Davies LB, Kiernan MN, Bishop JC, Thornton CA, Morgan G. The impact of cell culture equipment on energy loss. *Lasers Med Sci*. 2014; 29:195–202.

De Coster P, Rajasekharan S, Martens L. Laser-assisted pulpotomy in primary teeth: a systematic review. *Int J Paediatr Dent*. 2013 Nov;23(6):389-99.

Eduardo FP, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med*. 2008;40(6):433-8.

Elbay ÜŞ, Tak Ö, Elbay M, Uğurluel C, Kaya C. Efficacy of Low-Level Laser Therapy in the Management of Postoperative Pain in Children After Primary Teeth Extraction: A Randomized Clinical Trial. *Photomed Laser Surg*. 2016;34(4):171-177.

Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014 Spring;5(2):58-62.

Fernandes AP, Junqueira MdeA, Marques NC, Machado MA, Santos CF, Oliveira TM, Sakai VT. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *J Appl Oral Sci*. 2016 Jul-Aug;24(4):332-7.

Fernandes AP, Lourenço Neto N, Marques NCT, Moretti ABS, Sakai VT, Silva TC, Machado MAAM, Oliveira TM. Clinical and radiographic outcomes of the use of Low Level Laser Therapy in vital pulp of primary teeth. *Int J Paediatr Dent*. 2015 Mar;25(2):144-50.

Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ, de Araújo VC, Frigo L, de Mesquita RA, Guedes E. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg*. 2006 Jun;24(3):358-65.

Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. Effect of low energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg*. 2009;27:901–906.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic techniques, 5th Ed. New York: Wiley-Liss; 2005.

Fuks AB. Vital pulp Therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Pediatr Dent*. 2008; 30(3): 211-219.

Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *Analytical Biochemistry*. 1986;159(1):109-13.

Ginani F, Soares DM, Portela M, Barreto V, Barboza CAG. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci*, 2015 Nov;30(8):2189-94.

Golpayegani MV, Ansari G, Tadayon N. Clinical and radiographic success of Low Level Laser Therapy (LLLT) on primary molars pulpotomy. *Research Journal of Biological Sciences*. 2010;5(1): 51-5.

Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998;22(4):212-8.

Hadis MA, Zainal SA, Holder MJ, Carroll JD, Cooper PR, Milward MR, et al. The dark art of light measurement: accurate radiometry for low-level light therapy. *Lasers Med Sci*. 2016;31(4):789-809.

Huth KC, Hajek-Al-Khatat N, Wolf P, Ilie N, Hickel R, Paschos E. Long-term effectiveness of four pulpotomy techniques: 3-year randomised controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1243-50.

Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatat N, Hollweck R, Crispin A, Hickel R, Folwaczny M. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques--randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2005;84(12):1144-8.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999;49(1):1-17.

Kim JH, Jeon M, Song JS, Lee JH, Choi BJ, Jung HS, Moon SJ, DenBesten PK, Kim SO. Distinctive genetic activity pattern of the human dental pulp between deciduous and permanent teeth. *PLoS One*. 2014; 21;9(7):e102893.

Kimura Y, Yonaga K, Yokoyama K, Kinoshita J, Ogata Y, Matsumoto K. Root surface temperature increase during Er:YAG laser irradiation of root canals. *J Endod*. 2002 Feb;28(2):76-8.

Kimura Y, Yonaga K, Yokoyama K, Watanabe H, Wang X, Matsumoto K. Histopathological changes in dental pulp irradiated by Er:YAG laser: a preliminary report on laser pulpotomy. *J Clin Laser Med Surg*. 2003;21(6):345-50.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 2001;28(4):355-64.

Kotlow L. Lasers and soft tissue treatments for the pediatric dental patient. *Alpha Omegan*. 2008;101(3):140-51.

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):365-9.

Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 1989 Oct;182(1):16-9.

Liu JF. Effects of Nd:YAG laser pulpotomy on human primary molars. *J Endod*. 2006;32(5):404-7.

Lourenço Neto N, Marques NCT, Fernandes AP, Rodini CO, Sakai VT, Abdo RCC, Machado MAAM, Santos CF, Oliveira TM. Immunolocalization of DMP-1 in human primary teeth treated with different capping materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2016;104(1):165-9.

Lourenço-Neto N, Fernandes AP, Marques NCT, Sakai VT, Moretti ABS, Machado MAAM, Abdo RCC, Oliveira TM. Terapia pulpar em dentes decíduos: Possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. *Rev Odontol UNESP*. 2013;41(2):1-8.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of lowpower laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2004;34(3):260-5.

Marques NCT, Lourenço Neto N, Rodini CO, Fernandes AP, Sakai VT, Machado MAAM, Oliveira TM. Low Level Laser Therapy as an Alternative for Pulpotomy in Human Primary Teeth. *Lasers in Medical Science.* 2015;30(7):1815-22.

Martens LC. Laser physics and a review of laser applications in dentistry for children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2011 Apr;12(2):61-7.

Meneguzzo DT, Eduardo, CP Ribeiro MS, Marques MM. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblastos. *Proc. of SPIE Vol.* 6846 68460A-1.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.* 1971;122(4):532-5.

Miyata H, Genma T, Ohshima M, Yamaguchi Y, Hayashi M, Takeichi O, et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int Endod J.* 2006;39(3):238-44.

Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005 Jan;36(1):8-12.

Morandini AC, Sipert CR, Gasparoto TH, Gregghi SL, Passanezi E, Rezende ML, Sant'ana AP, Campanelli AP, Garlet GP, Santos CF. Differential production of macrophage inflammatory protein-1 α , stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from *P. gingivalis*. *J Periodontol.* 2010 Feb;81(2):310-7.

Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res.* 2011 Mar-Apr;25(2):157-62.

Morandini AC, Souza PPC, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Sipert CR, Souza Costa CA, Santos CF. Toll-Like Receptor 2 Knockdown Modulates Interleukin (IL)-6 and IL-8 but not Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12) in Human Periodontal Ligament and Gingival Fibroblasts. *J. Periodontol.* 2013 Apr; 84(4):535-44.

Moretti AB, Sakai VT, Oliveira TM, Fornetti AP, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. *Int Endod J*. 2008 Jul;41(7):547-55.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Odabaş ME, Bodur H, Barış E, Demir C. Clinical, radiographic, and histopathologic evaluation of Nd:YAG laser pulpotomy on human primary teeth. *J Endod*. 2007 Apr;33(4):415-21.

Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, Souza Costa CA. In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys*. 2011; 8(2): 155-63.

Oliveira TM, Moretti AB, Sakai VT, Lourenço Neto N, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2013;14(2):65-71.

Oliveira TS, Serra AJ, Manchini MT, Bassaneze V, Krieger JE, Carvalho PTC, Antunes DE, Bocalini DS, Ferreira Tucci PJ, Silva JA Jr. Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation, and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. *Lasers Med Sci*. 2015;30:217–23.

Olivi G, Genovese MD, Caprioglio C. Evidence-based dentistry on laser paediatric dentistry: review and outlook. *Eur J Paediatr Dent*. 2009;10(1):29-40.

Olson JE, Schimmerling W, Tobias, CA. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Research* 1981; 204: 436 – 440.

Oshiro T, Calderhead RG. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. *J Clin Laser Med Surg*. 1991;9:267-75.

Pacheco PS, de Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'ana AC, de Rezende ML, Gregghi SL, Damante CA. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation. *Photomed Laser Surg*. 2013 May;31(5):225-9.

- Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastry SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(2):114-26.
- Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7906-9.
- Paschoal MA, Santos-Pinto L. Therapeutic effects of low-level laser therapy after premolar extraction in adolescents: a randomized double-blind clinical trial. *Photomed Laser Surg*. 2012 Sep;30(9):559-64.
- Peplow PV, Baxter GD. Gene expression and release of growth factors during delayed wound healing: a review of studies in diabetic animals and possible combined laser phototherapy and growth factor treatment to enhance healing. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(11):617-36.
- Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg*. 2010;28 Suppl 1:S3-40.
- Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(5):285-304.
- Pereira AN, Eduardo C de 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):263-7.
- Polo L, Presti F, Schindl A, Schindl L, Jori G, Bertoloni G. Role of ground and excited singlet state oxygen in the red light-induced stimulation of *Escherichia coli* cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 21;257(3):753-8.
- Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of lowlevel Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2005 Feb;76(2):187-93.
- Ramazani N, Ahmadi R, Daryaeian M. Oral and Dental Laser Treatments for Children: Applications, Advantages and Considerations. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2012;3(1):44-49.

Sakai VT, Moretti AB, Oliveira TM, Fornetti AP, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. *Brazilian Dental Journal*. 2009;207(3):E5.

Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J Investig Med*. 2000 Sep;48(5):312-26.

Shekar R, Ranganathan K. Phenotypic and growth characterization of human mesenchymal stem cells cultured from permanent and deciduous teeth. *Indian J Dent Res*. 2012 Nov-Dec;23(6):838-9.

Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, Figueira EA, Dionísio TJ, Campanelli AP, Oliveira SH, Cunha FQ, Santos CF. Heatkilled *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):91-4.

Sipert CR, Morandini AC, Modena KC, Dionísio TJ, Machado MA, Oliveira SH, Campanelli AP, Santos CF. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. *J Appl Oral Sci*. 2013;21(2):99-105.

Skopin MD, Molitor SC. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2009;25(2):75-80.

Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci*. 2015 Apr;30(3):1171-4.

Stabholz A, Sahar-Helft S, Moshonov J. Lasers in endodontics. *Dent Clin North Am*. 2004 Oct;48(4):809-32.

Tagliani MM, Oliveira CF, Lins EMM, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, Souza Costa CA. Nutritional stress enhances cell viability of odontoblastlike cells subjected to low level laser irradiation. *Laser Physics Letters*. 2010;7(3):247-251.

Talebi-Ardakani MR, Torshabi M, Karami E, Arbabi E, Rezaei Esfahrood Z. In Vitro Study of Er:YAG and Er, Cr:YSGG Laser Irradiation on Human Gingival Fibroblast Cell Line. *Acta Med Iran*. 2016 Apr;54(4):251-5.

- Toomarian L, Fekrazad R, Sharifi D, Baghaei M, Rahimi H, Eslami B. Histopathological evaluation of pulpotomy with Er,Cr:YSGG laser vs formocresol. *Lasers Med Sci.* 2008 Oct;23(4):443-50.
- Turrioni AP, Montoro LA, Basso FG, Almeida LFD, Costa CAS, Hebling JM. Dose-responses of Stem Cells from Human Exfoliated Teeth to Infrared LED Irradiation. *Brazilian Dental Journal.* 2015;26(4):409-415.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Desining new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28:77-92.
- Utsunomiya T. A histopathological study of the effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and colagens. *J Endod.* 1998; 24:187-193.
- Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK. Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *National Journal of Maxillofacial Surgery.* 2012;3(2):125-32.
- Volpato LE, de Oliveira RC, Espinosa MM, Bagnato VS, Machado MA. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. *J Biomed Opt.* 2011 Jul;16(7):075004.
- Wagner VP, Meurer L, Martins MA, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, Filho MS, Squarize CH, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013;18(12):128002.
- Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques AC, Barboza CA. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci.* 2015;30(9):2259-64.
- Zhang J, Xing D, Gao X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2008 Nov;217(2):518-28.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURUAl.Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 C.P. 73
PABX (0XX14) 3235-8000- FAX 3223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vimos por meio desta, dar informações e convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Influência de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade em células derivadas da polpa de dentes decíduos”**. Este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do Laser de baixa intensidade em células de dentes de leite. Para realização deste trabalho, serão utilizados dentes que tenham indicação de extração (remoção do dente), seja para colocação de aparelho ou por estarem no período de cair naturalmente. Após o consentimento dos responsáveis com o tratamento e com a doação dos dentes removidos para pesquisa, será feita a remoção do dente de leite e o encaminhamento do material ao laboratório, onde será feita a aplicação da terapia Laser de Baixa Intensidade no interior dos dentes. O Laser de Baixa Intensidade é uma “luz”, que não causa dor e não queima. Para escolher o dente que será selecionado para o estudo, a boca do paciente será examinada e será feita uma radiografia na clínica de Odontopediatria da FOB-USP. Para fazer a remoção do dente será realizada anestesia. O atendimento clínico poderá provocar certo desconforto perfeitamente suportável, principalmente porque ele será atendido por um profissional experiente no controle do comportamento da criança, e usando técnicas especiais de controle de dor que são próprias para crianças. A remoção do dente não provocará malefício à criança, pois só utilizaremos dentes que estejam INDICADOS À EXTRAÇÃO. Após o encerramento da pesquisa todo material biológico (células da polpa ou derivados) dos dentes removidos será devidamente descartado. O uso do Laser de Baixa intensidade tem mostrado respostas positivas no aumento do número de células na cura de feridas. Com a realização deste estudo, poderemos verificar opções de tratamento mais atuais na Odontologia, a fim de melhorá-las. Será mantido sigilo e privacidade do participante da pesquisa durante todas as fases da pesquisa. As despesas do deslocamento dos participantes da pesquisa até à Clínica de Odontopediatria da FOB-USP para realização do procedimento não serão cobertas pelo pesquisador, e sim pelo responsável pelo sujeito da pesquisa. O participante da pesquisa terá garantia de indenização diante eventuais danos decorrentes diretamente da pesquisa. O responsável pelo sujeito da pesquisa receberá uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinada ao seu término, tanto pelo responsável pelo participante da pesquisa como pelo pesquisador.

Em casos de dúvidas ou qualquer esclarecimento sobre os procedimentos realizados, o responsável deverá entrar em contato com a clínica de Odontopediatria da Universidade de São Paulo pelo telefone (14) 3235-8225, ou então, entrar em contato com a pesquisadora Nádia Carolina Teixeira Marques, através do telefone (14) 3245-0313.

A participação do paciente não é obrigatória e caso o responsável pela criança queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço Al Octávio Pinheiro Brisolla, nº 9-75 (Sala no prédio da pós-graduação, FOB/USP) ou pelo telefone (14) 3235-8356, e-mail: cep@fob.usp.br. Além disso, a qualquer momento o responsável pela criança poderá negar-se a continuar participando desta pesquisa, e retirar seu consentimento, sem quaisquer penalidades.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

_____,
portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o sujeito da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, comprometo-me a cumprir todas as exigências contidas no item IV.3 e IV.4 da resolução do CNS/MS n. 466 de Dezembro de 2012, publicada em 13 de junho de 2013.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Pai/Responsável pelo
menor

Nome/Assinatura do Pesquisador(a)

Nome do pesquisador Responsável: Nádia Carolina Teixeira Marques
Telefone: (014) 3235 8141/8224 e-mail: nadia@usp.br
Endereço Institucional: Alameda Otávio Pinheiro Brizola 9-70
Disciplina de Odontopediatria
Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17012-901

APÊNDICE B

INSTRUMENTO DE DOAÇÃO DE DENTES

Identificação do doador

Nome (Legível):.....

Data de nascimento:..... Local:..... UF:.....

Responsável pela criança

Nome:.....

RG:..... CPF:.....

Cidade:..... UF:.....

Endereço:.....

Telefones para contato:.....

E-mail:.....

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) dente(s).....(código) e concordo que os mesmos sejam utilizados para pesquisa desde que aprovada por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

Fui ainda esclarecido que a identidade do menor não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para pesquisa.

Bauru, de de 20....

Assinatura do responsável

APÊNDICE C**DADOS DOS PACIENTES DOADORES E DENTES EXTRAÍDOS PARA OBTENÇÃO DAS
AMOSTRAS DE TECIDO PULPAR**

Paciente	Sexo	Dente	Idade
1	Feminino	82	7a
2	Masculino	53	8a 5m
3	Feminino	81	8a 3m
	Média de Idade – 7a 10m

ANEXOS

Anexo A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade em células derivadas da polpa de dentes decíduos.

Pesquisador: Nádia Carolina Teixeira Marques

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21032913.0.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 553.716

Data da Relatoria: 26/02/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa intitulado: Influência de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade em células derivadas da polpa de dentes decíduos.

Pesquisador: Nádia Carolina Teixeira Marques

Objetivo da Pesquisa:

O presente projeto pretende avaliar o efeito de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade nas seguintes condições: 1. Na viabilidade celular em cultura de células de polpa de dentes decíduos humanos; 2. Na cinética de expressão de RNA para VEGF e FGF-2; e 3. Na cinética de expressão das proteínas VEGF e FGF-2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O atendimento clínico poderá provocar certo desconforto perfeitamente suportável, principalmente porque o paciente será atendido por um profissional experiente no controle do comportamento da criança, e usando técnicas especiais de controle de dor que são próprias para crianças. A remoção do dente não provocará malefício à criança, pois só utilizaremos dentes que estejam indicados à extração.

Benefícios:

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 553.716

O Laser de Baixa Intensidade poderá trazer contribuições importantes para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no tecido pulpar, os quais poderão ser úteis em terapias pulpares preventivas e curativas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com parecer pendente devido à:

Considera-se a pesquisa PENDENTE pois:

- 1- Correção no cronograma pois há divergências entre as etapas de envio ao CEP e coleta de dados.
- 2- O TCLE deve ser apresentado de acordo com as especificações da resolução 466, Item IV.3 alíneas A até H. Seguir as Instruções do site do CEP.
- 3- Esclarecer ao CEP qual a função das assistentes Bianca Zeponi Fernandes de Melo e Thais Marchini de Oliveira, se coautoras, deverá ser anexado o CV lattes das mesmas.
4. Remover as informações de contato da CONEP por não ser pertinente ao projeto.
5. O texto do TCLE deve deixar claro que os responsáveis concordam com a exodontia e a doação do dente para a pesquisa. Por ser pesquisa com material biológico o TCLE deve explicitar que as células oriundas da polpa ou derivados destas utilizadas na pesquisa serão descartadas após o encerramento da mesma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora atendeu a solicitação deste colegiado e apresentou as adequações da primeira análise

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 553.716

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 26.2.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 12 de Março de 2014

Assinador por:

Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: cep@fob.usp.br