UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIEL TAVARES DE OLIVEIRA PRADO BERGAMO

**Expressão de DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2 em células derivadas da
polpa de dentes decíduos após o uso do laser de baixa intensidade**

BAURU
2017

MARIEL TAVARES DE OLIVEIRA PRADO BERGAMO

Expressão de DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2 em células derivadas da polpa de dentes decíduos após o uso do laser de baixa intensidade

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Odontopediatria.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Marchini de Oliveira Valarelli.

BAURU
2017

B452e

Bergamo, Mariel Tavares de Oliveira Prado
Expressão de DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2 em células
derivadas da polpa de dentes decíduos após o uso do laser
de baixa intensidade/ Mariel Tavares de Oliveira Prado
Bergamo – Bauru, 2017.

81 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Marchini de Oliveira

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 53785716.6.0000.5417

Data: 16/03/2016

[Folha de aprovação da Dissertação]

DEDICATÓRIA

A Deus, que é o autor da vida. Obrigada Senhor por me guiar até aqui, por me capacitar e tornar a caminhada cheia de obstáculos, mas também cheia de conquistas. Obrigada pelas oportunidades e pelas pessoas que o Senhor me permitiu conhecer. Nada disso seria possível sem a sua presença para me guiar, me ajudar e me capacitar. Te amo.

Ao meu marido, Yuri. Obrigada por todos os momentos compartilhados, obrigada por ser forte quando eu estava fraca e por ser minha base, meu melhor amigo e companheiro. Você é parte de tudo isso. Você me incentiva a buscar sempre o melhor, você acredita em mim e sonha junto comigo. Ter você comigo é um grande presente de Deus. Te amo muito.

Aos meus queridos pais, Fátima e Pedro. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim. Obrigada por investirem e acreditarem em mim, sem medir esforços para que eu tivesse os melhores ensinamentos e as melhores oportunidades. Vocês são minha base e muito importantes para mim. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, muito obrigada Senhor por sua bondade e seu amor infinito. Obrigada por estar comigo, me guiando e me abençoando. Obrigada por mais essa vitória alcançada e por me permitir alcançar meus sonhos.

Ao **meu marido Yuri**, obrigada por todo amor e cuidado que você tem comigo. Obrigada por acreditar em mim e me dar todo o apoio e a melhor torcida para alcançar meus sonhos, que agora se tornaram seus também. Obrigada por estar em todos os momentos e por curtir cada etapa e cada vitória. Conte comigo para tudo. Você é muito importante para mim. Te amo muito.

Aos **meus pais Fátima e Pedro**, obrigada pelo carinho e amor dedicados a mim. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim. Essa família é um presente de Deus em minha vida. Vocês são minha base. Amo vocês.

A **minha irmã Julia**, muito obrigada por tudo. Obrigada por todas conversas e torcidas, você realmente mostra a cada dia como é essencial na minha vida. Você alegre e transmite amor por onde passa. Melhor irmã do mundo. Amo você.

A **minha irmã Luciana e minha sobrinha Rebeca**, obrigada Luciana por me permitir vivenciar as descobertas e o amor mais puro que a Rebequinha transmite. Amo vocês.

A **toda minha Família**, obrigada pelas conversas, pelos incentivos, pelo carinho, pelos elogios e pelo amor. Amo cada um de vocês.

A **meus sogros Renata e Heitor e minha cunhada Rafaella**. Obrigada por me permitirem entrar na família de vocês e ser tão bem recebida. Obrigada por entenderem os momentos que eram necessários nos ausentarmos. Amo vocês.

A minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Thais Marchini de Oliveira**, que com o tempo se tornou apenas a Thais, sem deixar de lado a hierarquia e todo o respeito e admiração que tenho por ela. Muito obrigada por me dar a oportunidade de trabalhar com você, aprender muito e ter você como uma amiga. Obrigada por acreditar em mim. Obrigada por sempre ter uma palavra, um abraço e um sorriso no rosto para oferecer a todos que estão próximos a você. Você é muito importante para mim.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva , Prof.^a Dr.^a Thaís Marchini de Oliveira e Prof.^a Dr.^a Daniela Rios**, muito obrigada por ter a oportunidade de trabalhar e aprender com vocês. Tenho um carinho e um respeito enorme por cada um de vocês.

A Faculdade de Odontologia de Bauru- FOB/USP, na pessoa da diretora **Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, e do vice-diretor **Prof. Carlos Ferreira dos Santos**, duas pessoas que admiro muito e agradeço a Deus por ter conhecido. Obrigada por tudo, para mim é uma honra ter feito minha graduação e agora realizar a pós-graduação em nível de Mestrado nesta grande instituição, que nos dá total suporte e tem uma estrutura indiscutível. Para sempre minha querida e amada FOB.

A minhas incríveis amigas queridas, **Fernanda Sandes, Alyssa Obeid, Ana Cláudia Scaraficci e Julia Tavares** vocês foram e são essenciais na minha caminhada pessoal e profissional. Ter vocês por perto torna tudo melhor e mais divertido. Vocês são pessoas incríveis que guardo em meu coração e sei que posso confiar em todos os momentos. A amizade de vocês é algo raro e que quero ter para sempre. Obrigada por tudo meninas. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos, **Rafael Ferreira, Lázara Joyce, Milena Palmas, Luiz Guilherme Stuchi, Célio e Bárbara Soares**, obrigada por todo companherismo, amor, orações e carinho. Vocês são muito importantes para mim. Amo vocês.

A todos os **funcionários da FOB-USP**, entre eles Maristela e Denise, que contribuíram para que a minha trajetória pelo mestrado se tornasse mais fácil e leve.

À **comissão de pós-graduação** desta instituição, da qual tive o prazer de fazer parte como representante discente. Obrigada a cada professor de diferentes departamentos e as funcionárias por todo o cuidado e dedicação com a pós- graduação.

Ao **Prof. Dr. Lauris**, agradeço pela disponibilidade em ajudar e pela contribuição com a realização da análise estatística desse trabalho.

Ao **grupo de Cultura Celular, Nádia, Natalino e Luciana**, obrigada por tudo. Fazer parte deste grupo com pessoas tão especiais e tão dispostas a aprender e ensinar todos os dias é algo incrível, uma oportunidade única. Adoro vocês.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Odontopediatria, **Evandro, Alexandre, Lílían, Estela, Dona Lia, Lourisvalda**, agradeço pela solicitude e disponibilidade em ajudar. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados, conversas e risadas. É muito bom ter vocês por perto.

Ao **Centro Integrado de Pesquisas**, nosso querido CIP, onde encontrei pessoas tão queridas e dispostas a ajudar. Agradeço com todo meu carinho ao **Prof. Rodrigo Cardoso de Oliveira, Profa. Camila de Oliveira Rodini, Cintia, Rafaela, Marcia, Marcelo, Adriana, Mariana, Priscila e Nathália**. Vocês foram e são pessoas maravilhosas que sempre contribuíram da maneira mais gentil para que todos os momentos no CIP fossem divertidos, menos cansativos e de muito aprendizado. Muito bom conhecer vocês.

Ao **Thiago Dionísio**, obrigada por toda atenção, colaboração e disponibilidade em ensinar. Você torna assuntos difíceis mais fáceis e bem interessantes. Obrigada por sempre me ajudar.

As minhas colegas de Pós-graduação, **Luciana, Natalino, Nádia, Bianca, Paulinha, Francine, Priscilla, Gabriela, Maisa, Eloá, Tássia, Daniela, Estefania, Nathália, Juliana, Kaliza, Mayara, Alexandre**. Obrigada por toda a parceria, pelas risadas, pelos cafés e conversas. Que sempre vocês encontrem pessoas boas por onde forem, assim como eu encontrei vocês.

As minhas amigas de mestrado **Eloá, Tássia e Daniela**. Vocês tornaram tudo mais leve, mais divertido e foi muito bom ter vocês por perto. Adoro vocês.

Ao **PET e a Profa. Linda**, nem preciso dizer o quanto esse programa é importante para mim. Sai do PET, mas ele não saiu de mim. Obrigada por confiarem em mim agora como aluna de pós-graduação podendo ajudar na orientação dos seminários desenvolvidos pelo programa. Tenho um carinho enorme por vocês.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da minha bolsa de Mestrado durante um ano, possibilitando minha manutenção no Programa e a realização desta pesquisa.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da minha bolsa de Mestrado **Processo nº 2015/19696-0** durante um ano, foi uma honra trabalhar para essa empresa tão séria e importante em nosso meio acadêmico. Obrigada pela oportunidade e por possibilitar o desenvolvimento dessa pesquisa.

*Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à
beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha
mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras,
enquanto o imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos.*

Isaac Newton

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade na viabilidade e proliferação celular de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos e na expressão de RNAm para DMP-1, DSPP, VEGF e FGF-2. Amostras de fibroblastos pulpaes da polpa de dentes decíduos humanos foram obtidas de um Biorrepositório. Foram utilizadas células entre a 4ª e a 7ª passagem, irradiadas com Laser de Baixa Intensidade (InGaAlP) de acordo com os seguintes grupos experimentais: Grupo 1: 1,2 J/cm² - 05 mW - 10s; Grupo 2: 2,5 J/cm² - 05 mW - 20s; Grupo 3: 3,7 J/cm² - 05 mW - 30s; Grupo 4: 5,0 J/cm² - 05 mW - 40s; Grupo 5: 6,2 J/cm² - 05 mW - 50s; Grupo 6: 2,5 J/cm² - 10 mW - 10s; Grupo 7: 3,7 J/cm² - 15 mW - 10s; Grupo 8: 5,0 J/cm² - 20 mW - 10s; Grupo 9: 6,2 J/cm² - 25 mW - 10s; Controle Negativo: DMEM 1% SFB – não irradiado; Controle Positivo: DMEM 10% SFB – não irradiado. As técnicas utilizadas para as análises de viabilidade e proliferação celular foram MTT e CV. A técnica utilizada para avaliação da expressão de RNAm para os alvos DMP-1, DSPP, VEGF e FGF-2 foi RT-PCR. Os resultados foram analisados pelo método ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para o teste MTT, na comparação intragrupos observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos 6h, 12h e 24h, diminuindo a viabilidade com o passar do tempo, exceto para o Grupo 1. Na comparação intergrupos, o MTT mostrou menor viabilidade para o controle negativo em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$), exceto com grupo 5 (5mW/50 seg). Observou-se que os grupos com maiores potências (10mW, 15mW, 20mW e 25mW), menores tempos de aplicação (10 segundos) e densidades de energia entre 2,5 J/cm² e 6,2 J/cm², apresentaram estatisticamente maior viabilidade que o grupo com menor potência (5mW), maior tempo de aplicação (50 segundos) e densidade de energia de 6,2 J/cm². Para o teste CV não houve diferença intragrupos, mas houve diferença intergrupos entre os controles positivo e negativo. Para a expressão de RNAm por RT-PCR, os fatores de crescimento VEGF e FGF-2 foram expressos em grande quantidade no primeiro período experimental, enquanto que DMP-1 e DSPP não foram expressos de maneira significativa. De acordo com os resultados obtidos, frente as diferentes densidades de energia, sugere-se que a terapia a laser de baixa intensidade manteve os fibroblastos viáveis e aumentou a expressão de RNAm para VEGF e FGF-2.

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

ABSTRACT

FGF2, VEGF, DSPP, and DMP-1 expression in cells of the pulp deciduous teeth with a Low Intensity Laser.

This study aimed to evaluate the effect of different energy densities of Low Level Laser (LLL) on cell viability and proliferation of fibroblasts from the pulp of human primary teeth (DHPF) and on the RNAm expression of DMP-1, DSPP, VEGF and FGF-2. DHPF were obtained from a biorepository and used at passages 4th to 7th. The cells were irradiated with LLL (InGaAlP) according to the following experimental groups: Group 1: 1.2 J/cm² - 05 mW - 10s; Group 2: 2.5 J/cm² - 05 mW - 20s; Group 3: 3.7 J/cm² - 05 mW - 30s; Group 4: 5.0 J/cm² - 05 mW - 40s; Group 5: 6.2 J/cm² - 05 mW - 50s; Group 6: 2.5 J/cm² - 10 mW - 10s; Group 7: 3,7 J/cm² - 15 mW - 10s; Group 8: 5.0 J/cm² - 20 mW - 10s; Group 9: 6.2 J/cm² - 25 mW - 10s; Negative Control: DMEM 1% SFB – not irradiated; Positive Control: DMEM 10% SFB – not irradiated. The techniques used to evaluate the cell viability/proliferation were MTT and Crystal Violet (CV) assays. RT-PCR was used to verify the RNAm expression of DMP-1, DSPP, VEGF, and FGF-2. Two-way ANOVA, followed by Tukey test ($p < 0.05$) was used to analyze the results. In the intragroup comparison, MTT assay revealed statistically significant differences among the periods of 6h, 12h, and 24h, with viability reduction as time went by, except for Group 1. In the intergroup comparison, the MTT assay showed that the negative control had statistically lower viability than that of the other groups ($p < 0.05$), except for Group 5 (5mW/50 s). The groups with higher powers (10mW, 15mW, 20mW, and 25mW), shortest application periods (10 s), and energy densities between 2.5 J/cm² and 6.2 J/cm² exhibited statistically higher viability than that of the group with small power (5mW), longer application period (50 s), and energy density of 6.2 J/cm². CV assay did not show intergroup statistically differences. In the intragroup comparison, CV assay revealed statistically significant differences between positive and negative controls ($p < 0.05$). RT-PCR revealed increased RNAm expression of the growth factors VEGF and FGF-2 at the first experimental period, while DMP-1 and DSPP was not significant. Based on the results and different energy densities used, LLL maintained DHPF viability and increased the RNAm expression of VEGF and FGF-2.

Key words: Low-Level Light Therapy. Cell Culture Techniques. Tooth Deciduous.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 -	Ensaio de MTT: Diferenças das médias de absorbância entre os grupos controle negativo (C-) e os demais grupos (Teste Anova a dois critérios, seguido do Teste de Tukey).....	34
Figura 2 -	Ensaio MTT: Análise da Viabilidade Celular dos grupos experimentais em relação ao controle positivo(DMEM 10% SFB), dados em porcentagem. Considerando os períodos 6h, 12h e 24h.....	35
Figura 3 -	Ensaio CV - Diferenças das médias de absorbância entre os grupos controle positivo (C+) e o controle negativo (C-) (Teste Anova a dois critérios seguido do Teste de Tukey).....	36
Figura 4 -	Ensaio CV: Análise da Viabilidade Celular dos grupos experimentais em relação ao controle positivo(DMEM 10% SFB), dados em porcentagem. Considerando os períodos 6h, 12h e 24h.....	37
Figura 5 -	Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para VEGF entre os grupos experimentais, nos períodos 6h, 12h e 24h. O gene de referência utilizado foi a B. act.....	38
Figura 6 -	Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para FGF-2 entre os grupos experimentais, nos períodos 6h, 12h e 24h. (*) diferença estatisticamente significativa na expressão de FGF-2 entre os grupos experimentais, nos períodos 6h, 12h e 24h. O gene de referência utilizado foi a B. act.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Grau Celsius
cm	Centímetros
cm²	Centímetro ao quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Cristal violeta/ Crystal violet
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNAc	Fita complementar de DNA
DPSC	Células-tronco derivadas da polpa dentária de dentes permanentes
SFB	Soro Fetal Bovino
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
h	Hora(s)
InGaAlP	Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo
J	Joules
LBI	Laser de Baixa Intensidade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol.L	Concentração molar (Molaridade)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
mW	Miliwatts
nm	Nanômetro
nº	Número
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
seg	Segundos
SDH	Succinato Desidrogenase
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	ARTIGO.....	25
3	DISCUSSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS.....	75

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A polpa dental é constituída por um tecido conjuntivo frouxo especializado e seus elementos celulares são essencialmente fibroblastos e odontoblastos (UTSUNOMIYA, 1998; MATTUELLA et al., 2007). Em dentes completamente formados, estímulos irritantes (como cáries, injúrias físicas ou químicas) atuam sobre as células da polpa dentária levando a uma modulação de suas atividades. A resposta a estes estímulos é a formação de uma matriz osteogênica específica, com origem reacional ou reparadora (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000; FERREIRA et al., 2006). Estas respostas são dependentes de vários fatores como a intensidade, severidade e duração do estímulo e podem produzir tanto inflamações reversíveis como irreversíveis, ou ainda em alguns casos, necrose total do tecido pulpar. Sobre estas células, os estudos com diferentes tipos de Lasers de Baixa Intensidade, utilizados em diferentes comprimentos de onda e dosimetrias, atuam basicamente aumentando a capacidade de proliferação *in vitro* (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MOORE et al., 2005), estimulando a síntese de proteínas da matriz extracelular (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004) e a produção de fatores de crescimento (SAYGUN et al., 2008).

Os dentes decíduos podem sofrer injúrias pulpares, que podem comprometer ou não sua permanência na cavidade oral, sendo muitas vezes necessário realizar o tratamento pulpar (FUKS, 2008; MORETTI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Para ocorrer o reestabelecimento da saúde da polpa dentária trabalhos na literatura têm buscado alternativas terapêuticas aos tratamentos convencionais (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000). Uma destas terapias alternativas baseia-se na aplicação do Laser de Baixa Intensidade (LBI) de forma direta (UTSUNOMIYA, 1998; FERNANDES et al., 2015; MARQUES et al., 2015) ou indireta sobre o tecido pulpar (FERREIRA et al., 2006). De acordo com os autores a terapia com Laser de Baixa Intensidade leva a um aumento na síntese de ATP pelas mitocôndrias, na síntese de DNA e de RNA, e na síntese de colágeno pelos fibroblastos auxiliando o processo de reparo (WILDEN; KARTHEIN, 1998; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

A terapia com Laser tem sido muito utilizada na área odontológica devido aos benefícios que esse método traz. Podem ser utilizados diferentes tipos de laser

com diferentes intensidades, o utilizado nesse estudo foi o Laser de Baixa Intensidade que é assim chamado porque os níveis ótimos de densidade de energia aplicados são baixos, o que confere maiores benefícios justamente por apresentar algumas características como menor comprimento de onda e menor densidade de energia, o que facilita sua penetração nos tecidos e sua posterior atuação na biomodulação celular e tecidual (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; GINANI et al., 2015). Os objetivos da terapia a laser são melhorar o processo cicatricial das feridas, analgesia, regressão do edema com consequente ação anti-inflamatória e bioestimulação celular sem causar aumento excessivo da temperatura (KIMURA et al., 2002, 2003; ALMEIDA-LOPES, 2003; STABHOLZ; SAHAR-HELFT; MOSHONOV, 2004; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009; DE ALENCAR MOLLO et al., 2011; MARTENS, 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; BASSO et al., 2012; DE COSTER; RAJASEKHARAN; MARTENS, 2013). O LBI também pode promover acelerada epitelização, maior grau de vascularização, aumento da síntese de colágeno com consequente aumento do metabolismo celular e atuar como estimulador ou inibidor de efeito sobre o tecido (OHSHIRO; CALDERHEAD, 1991; BASSO et al., 2012).

No tratamento de dentes decíduos, o LBI pode ser indicado em casos de terapia pulpar devido a sua ação anti-inflamatória, promovendo ausência do comprometimento da furca ou necrose pulpar, com penetração autolimitante e redução ou ausência de sangramento (KIMURA et al., 2003; LIU, 2006; ODABAS et al., 2007; TOOMARIAN et al., 2008; FERNANDES et al., 2015; MARQUES et al., 2015). Ressalta-se que a terapia com Laser de Baixa Intensidade é um procedimento indolor, não invasivo e não farmacológico, portanto bem apropriado para o atendimento do paciente infantil.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o LBI consegue modular processos fisiológicos, bioquímicos e de metabolização celular, podendo acelerar a proliferação celular e atuar na morfodiferenciação de diferentes tipos celulares. Assim, estudos mostram que o LBI acelera a proliferação de fibroblastos e a diferenciação de osteoblastos nos processos de regeneração e neoformação óssea. Estudos histopatológicos têm sido realizados na polpa dental com o intuito de avaliar os efeitos do Laser de Baixa Intensidade sobre o processo inflamatório pulpar e sobre a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC) da polpa (UTSUNOMIYA, 1998;

1 Introdução

OHBAYASHI et al., 1999; GINANI et al., 2015; MARQUES et al., 2015). Estas proteínas da MEC desempenham um papel importante na formação dos tecidos mineralizados e também são capazes de atuar na diferenciação, migração e proliferação celular durante vários estágios da dentinogênese e do processo cicatricial, sendo de fundamental importância no processo de reparo do tecido pulpar.

Quanto a relação entre LBI e a expressão gênica, estudos mostram que a irradiação com laser de baixa intensidade, no espectro de luz vermelho, em fibroblastos humanos, pode afetar a expressão de muito genes, que possuem diferentes funções, e estimular o crescimento celular diretamente com a regulação de genes relacionados com a proliferação celular e indiretamente com a regulação da expressão de genes relacionados com a migração e remodelação celular, síntese de DNA, reparo e metabolismo celular (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

A bioestimulação conseguida *in vitro* pelo Laser de Baixa Intensidade é dependente dos parâmetros de irradiação do Laser utilizados como: comprimento de onda, densidade de potência e densidade de energia. Assim, vários parâmetros têm sido utilizados com o intuito de induzir a proliferação celular *in vitro* (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PELOW et al., 2011; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; BASSO et al., 2012). A aplicação de parâmetros semelhantes pode exercer diferentes efeitos sobre as células em cultura. Dessa forma, parâmetros que melhoram o crescimento celular podem melhorar a síntese de proteínas (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; DAMANTE et al., 2009; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012). A dose de energia e a irradiância ideal ainda geram muitas dúvidas na literatura (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; GINANI et al., 2015). Uma revisão sistemática afirma que será necessária uma padronização dos parâmetros para o uso do laser de baixa intensidade, melhorando assim não só a comparação entre os trabalhos realizados, como os próprios resultados para a aplicação clínica ideal (GINANI et al., 2015). Por esta razão é fundamental que se conheça a correta combinação destes parâmetros, para alcançar os efeitos desejados nos pacientes.

Proteínas não colágenas da matriz extracelular têm sido relacionadas à regulação dos cristais inorgânicos sobre a matriz do osso, da dentina e esmalte, dentre as quais se destaca a proteína da matriz dentinária (DMP-1), originalmente encontrada nos dentes e ossos. Trata-se de uma fosfoproteína ácida relacionada a

processos de biomineralização (ALMUSHAYT et al., 2006; TURNER, 2007; GOLDBERG et al., 2008; BENIASH et al., 2011; MARTINI et al., 2013). A expressão da DMP-1 é notada tanto no tecido pulpar quanto nos odontoblastos. Está relacionada com a regulação da diferenciação dos odontoblastos, a formação do sistema tubular da dentina e a mineralização (ALMUSHAYT et al., 2006; SUZUKI et al., 2012). Outra proteína não colágena da matriz extracelular que se destaca é a Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP), que é uma fosfoproteína ácida relacionada a mineralização da pré-dentina e da matriz dentinária, ela é quebrada por uma protease em Sialoproteína Dentinária (DSP) e Fosfoproteína Dentinária (DPP) (MARTINI et al., 2013; YAMAMOTO; OIDA; YAMAKOSHI, 2015). Daí a importância da identificação da expressão dessas proteínas nos tecidos irradiados, comprovando a ação do LBI sobre o reparo da dentina (THEOCHARIDOU et al., 2017).

Fatores de crescimento são pequenas proteínas sinalizadoras liberadas por diferentes tipos celulares, incluindo os fibroblastos pulpares. Podem atuar de diferentes formas com a produção de novos vasos sanguíneos, colágeno, fibroblastos, entre outros componentes da matriz extracelular, bem como controlando a quebra do colágeno. Um dos fatores de crescimento estudados nesta pesquisa é o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que atua iniciando e regulando a proliferação dos capilares sanguíneos (angiogênese) e atua na permeabilidade vascular. Outro fator de crescimento é o Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (FGF-2) que está presente na dentina e é produzido por fibroblastos e células endoteliais, atuando na angiogênese e nas fases iniciais do reparo da área que sofreu injúria através do controle da produção da MEC (MATTUELLA et al., 2007; SHIMABUKURO et al., 2009).

Neste estudo, o comprimento de onda foi fixado em 660 nm (laser vermelho) e diferentes densidades de energia foram estabelecidas em função do tempo de irradiação e em função da potência, de acordo com o grupo experimental. Os efeitos da variação da densidade de energia ainda permanecem desconhecidos, principalmente quando se trata da observação destes efeitos sobre as células do tecido pulpar de dentes decíduos humanos. Muitos estudos têm testado diferentes densidades de energia (KUBASOVA et al., 1984; KIPSHIDZE et al., 2001; KREISLER et al., 2002; BASSO et al., 2012) e, segundo alguns autores, as densidades de energia que variam na faixa de 0,5-4 J/cm² são mais efetivas em estimular o crescimento

1 Introdução

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).

A procura por soluções e materiais ideais para qualquer área do 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 da polpa (MORETTI et al., 2008). O recente progresso no campo científico celular e molecular proporcionou um melhor entendimento sobre as alterações e o comportamento do tecido pulpar durante o processo de reparo tecidual, permitindo avaliar biologicamente as diferentes estratégias de terapia pulpar (LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013). Autores afirmam que a aplicação do LBI pode ser considerada uma técnica alternativa para terapia pulpar na prática clínica (KOTLOW, 2008; FERNANDES et al., 2015; MARQUES et al., 2015). Porém, existem poucas evidências demonstrando que o LBI influencie diretamente na recuperação do tecido pulpar de dentes decíduos humanos (DE COSTER; RAJASEKHARAN; MARTENS, 2013).

Tendo em vista a ausência de trabalhos na literatura a cerca da influência do Laser de Baixa Intensidade sobre o tecido pulpar de dentes decíduos, principalmente sobre a capacidade proliferativa *in vitro* de células provenientes deste tecido e com o intuito de averiguar outras opções terapêuticas na odontologia, o Laser de Baixa Intensidade foi utilizado nesse estudo, buscando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no metabolismo do tecido pulpar, os quais podem ser úteis em terapias pulpares preventivas e curativas de dentes decíduos.

2 Artigo

2 ARTIGO CIENTÍFICO

O presente artigo será submetido à revista Lasers in Medical Science (FI 2,461).

INTRODUÇÃO

A polpa dental é constituída por um tecido conjuntivo frouxo especializado, que contém fibras, vasos sanguíneos, terminações nervosas e células, como células endoteliais, odontoblastos, células de Schwann, células mesenquimais indiferenciadas, porém com predominância de fibroblastos (UTSUNOMIYA, 1998; MATTUELLA et al., 2007). A polpa dentária produz respostas a nível celular e molecular frente a estímulos irritantes, como cáries e traumas, levando a efeitos inflamatórios e regenerativos com a formação de uma matriz osteogênica específica, com origem reacional ou reparadora (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000; FERREIRA et al., 2006; COOPER; HOLDER; SMITH, 2014). Os dentes decíduos podem sofrer injúrias pulpares, comprometendo ou não sua permanência na cavidade oral, sendo de grande importância a possibilidade de realização de tratamento pulpar e a manutenção deste dente na cavidade bucal (FUKS, 2008; MORETTI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o Laser de Baixa Intensidade (LBI), utilizado em diferentes comprimentos de onda e dosimetrias, modula processos fisiológicos, bioquímicos e de metabolização celular, e atua basicamente aumentando a capacidade de proliferação *in vitro* (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MOORE et al., 2005), estimulando a síntese de proteínas estruturais (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004), a produção de fatores de crescimento (SAYGUN et al., 2008) e atuando na morfodiferenciação de diferentes tipos celulares (UTSUNOMIYA, 1998; OHBAYASHI et al., 1999; GINANI et al., 2015; MARQUES et al., 2015).

A Proteína da Matriz Dentinária 1 (DMP-1) é uma fosfoproteína ácida relacionada a processos de biomineralização da dentina (ALMUSHAYT et al., 2006; TURNER, 2007; GOLDBERG et al., 2008; BENIASH et al., 2011; MARTINI et al., 2013). Está relacionada com a regulação da diferenciação dos odontoblastos, a formação do sistema tubular da dentina e a mineralização (ALMUSHAYT et al., 2006; SUZUKI et al., 2012). Outra proteína não colágena da matriz extracelular presente em

grande quantidade na dentina é a Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP), que é uma fosfoproteína ácida relacionada a mineralização da pré-dentina e da matriz dentinária, ela é quebrada por uma protease em Sialoproteína Dentinária (DSP) e Fosfoproteína Dentinária (DPP) (PRASAD; BUTLER; QIN, 2010; MARTINI et al., 2013; YAMAMOTO; OIDA; YAMAKOSHI, 2015). Daí a importância da identificação da expressão dessas proteínas nos tecidos irradiados, comprovando a ação do LBI sobre o reparo da dentina (THEOCHARIDOU et al., 2017).

Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um fator de crescimento produzido por diferentes tipos celulares, dentre eles o fibroblasto. Atua iniciando e regulando a proliferação dos capilares sanguíneos (angiogênese) e na permeabilidade vascular, contribui para o maior aporte sanguíneo, suprimento de oxigênio, transporte de células-tronco indiferenciadas ao tecido lesado levando ao reparo tecidual (MATTUELLA et al., 2007; GOLDBERG; NJEH; UZUNOGLU, 2015). Outro fator de crescimento expresso por fibroblastos é o Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 (FGF-2) que está presente na dentina e é produzido por fibroblastos e células endoteliais, atuando na angiogênese, nas fases iniciais do reparo da área que sofreu injúria através do controle da produção da matriz extracelular (MEC), na proliferação, migração e mineralização de células pulpares (SHIMABUKURO et al., 2009; ABD-ELMEGUID et al., 2012). Esses fatores de crescimento estão envolvidos na regulação de importantes eventos celulares, permitindo o reparo do tecido pulpar.

Assim, com a ausência de trabalhos na literatura a cerca da influência do Laser de Baixa Intensidade sobre o tecido pulpar, principalmente sobre a capacidade proliferativa *in vitro* de células oriundas deste tecido, e com o intuito de averiguar outras opções terapêuticas para dentes decíduos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade na viabilidade e proliferação de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos; e da expressão de RNAm para DMP-1, DSPP, VEGF e FGF-2.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de Ética

Seguindo princípios éticos e jurídicos, a realização deste trabalho foi avaliada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de

2 Artigo

Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo e foi aprovado sob o número CAAE: 53785716.6.0000.5417 (ANEXO 1).

Foram utilizados fibroblastos da polpa de dentes decíduos humanos obtidos através de um Biorrepositório criado e devidamente regulamentado pelas diretrizes do CEP e CONEP, aprovado sob o número CAAE 49806215.6.0000.5417, tendo como pesquisadora responsável a Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira. O paciente foi devidamente informado sobre os riscos e a utilização do material biológico anteriormente doado por ele para o Biorrepositório através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)(ANEXO 2).

Determinação dos Grupos

As doses de energia e os controles positivo e negativo foram baseados em estudos prévios (DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016). 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:

- Grupo 1 (G1) : Laser Vermelho; 1,2 J/cm²; 05 mW; 10 seg.
- Grupo 2 (G2) : Laser Vermelho; 2,5 J/cm²; 05 mW; 20 seg.
- Grupo 3 (G3) : Laser Vermelho; 3,7 J/cm²; 05 mW; 30 seg.
- Grupo 4 (G4) : Laser Vermelho; 5,0 J/cm²; 05 mW; 40 seg.
- Grupo 5 (G5) : Laser Vermelho; 6,2 J/cm²; 05 mW; 50 seg.
- Grupo 6 (G6) : Laser Vermelho; 2,5 J/cm²; 10 mW; 10 seg.
- Grupo 7 (G7) : Laser Vermelho; 3,7 J/cm²; 15 mW; 10 seg.
- Grupo 8 (G8) : Laser Vermelho; 5,0 J/cm²; 20 mW; 10 seg.
- Grupo 9 (G9) : Laser Vermelho; 6,2 J/cm²; 25 mW; 10 seg.
- Controle Negativo (C-) : DMEM, 1% SFB.
- Controle Positivo (C+) : DMEM, 10% SFB.

Cultura Celular

Fibroblastos pulpare de dentes decíduos humanos após a 4ª passagem foram distribuídos em placas de 96 poços, na densidade celular de 1 x 10⁴ células por poço em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - Sigma Chemical Co, St.

Louis, MO) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e deixadas para adesão ao frasco de cultura em estufa por 24h. Após este período todos os poços receberam meio suplementado com SFB a 1% com a finalidade de sincronizar o ciclo celular antes da irradiação (KARU, 1989; DAMANTE et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010). Em seguida, um novo meio de cultura (Dulbecco's modified Eagle's medium - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) sem corante de vermelho de fenol (incolor) foi adicionado aos grupos experimentais e controles (DAMANTE et al., 2009) e antes da irradiação foi realizada a calibração do Laser de Baixa Intensidade para garantir maior confiabilidade dos resultados encontrados (HADIS et al., 2016).

Os grupos experimentais receberam irradiação. O controle negativo e o controle positivo não foram irradiados. O controle negativo foi composto por poços com 1×10^4 células com DMEM suplementado com 1% de SFB e o controle positivo foi composto por poços que receberam DMEM suplementado com 10% de SFB (DAMANTE et al., 2009; FERNANDES et al., 2016).

Irradiação com Laser de Baixa Intensidade

A irradiação com o Laser de Baixa Intensidade - Índio gálio alumínio fósforo/ Aluminium-gallium-indium-phosphide (InGaAlP) (Twin Flex Evolution MMOptics® – São Carlos, Brasil) no comprimento de onda de 660nm (vermelho); área do feixe de saída - $0,04 \text{ cm}^2$, variando a densidade de energia em função da potência e do tempo de irradiação foi empregada para cada grupo experimental, aplicada no fundo de cada poço previamente escolhido das placas de poliestireno TPP (Trasadingen, Suíça). A distância entre o feixe de laser e a monocamada celular foi constante permanecendo em 1 mm (EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016). E, sobretudo, a porcentagem da perda de energia foi considerada no experimento seguindo os estudos prévios (DAMANTE et al., 2009; DAMANTE; MARQUES, 2014). Para evitar a influência de outras fontes de luz indesejáveis, as placas de cultura foram envoltas por uma máscara confeccionada em cartolina preta com orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais, sendo que cada orifício possuía o diâmetro da ponta ativa do laser e estava vedado individualmente por uma portinhola, permitindo que apenas o orifício do poço irradiado permanecesse aberto durante a aplicação do LBI, enquanto todos

2 Artigo

os outros eram mantidos ao abrigo da luz (PEREIRA et al., 2002; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016).

Os grupos foram plaqueados em triplicata e os experimentos repetidos três vezes (FRESHNEY, 2000; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016).

Análise da Viabilidade e Proliferação Celular

- Ensaio 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 (cor amarela) a cristais de formazan (cor azul/púrpura) insolúveis, pela atividade metabólica celular da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SDH), sendo que esse processo só ocorre em células viáveis (MOSMANN, 1983).

A solução de MTT foi feita com a dissolução do MTT em DMEM puro na proporção 0,5mg/mL e após foi filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 µm. Terminado os períodos propostos 6h, 12h e 24h pós-irradiação, foram adicionados 110 µL/poço da solução de MTT às células. As placas foram envoltas por papel alumínio, sob o abrigo da luz, e incubadas por um período de 04 horas, em uma estufa a 37°C em 5% de CO². Após esse período, a solução de MTT foi aspirada dos poços e foram adicionados 200 µL/poço de DMSO (Dimetil Sulfóxido - Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) e permaneceram por 30 minutos fora da estufa em temperatura ambiente, antes da leitura no espectrofotômetro. A absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, Vermont, USA) com comprimento de onda de 570 nm (DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011; GASQUE et al., 2014; FERNANDES et al., 2016).

- Ensaio de Cristal Violeta (CV)

O Cristal Violeta é um corante responsável por avaliar a proliferação celular por corar o ácido desoxirribonucléico (DNA) celular, e essa reação só ocorre em células viáveis (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989).

Ao final dos períodos propostos 6h, 12h e 24h pós-irradiação, os sobrenadantes dos poços foram descartados e estes foram lavados com PBS 1X e em seguida fixados com Metanol 100% (Vetec – Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 10 minutos. Em seguida, em ambiente ao abrigo da luz, foi adicionada a solução de Cristal violeta nos poços permanecendo por 3 minutos. A solução foi removida e os poços foram lavados com solução PBS 1x por 2 vezes seguidas. Por fim, foi adicionada aos poços a solução de Citrato de sódio 0,05 mol.L por 10 minutos. Passado esse período a leitura da absorbância foi feita no espectrofotômetro (Synergy H1 Multi-Mode Reader, BioTek, Winooski, Vermont, USA) com comprimento de onda ajustado para 540 nm (FERNANDES et al., 2016).

Avaliação da Expressão de RNAm por RT-PCR

A expressão de RNAm foi avaliada pelo Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real considerando os períodos 6h, 12h e 24h após a irradiação das células. Essa técnica consiste na extração do RNAm total das células após o tratamento realizado utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (LifeTechnologies®, Carlsbad, California, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, para quantificar e determinar a qualidade do RNAm de cada amostra foi realizada a leitura em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, USA) (JEON et al., 2014; HUR et al., 2015; THEOCHARIDOU et al., 2017).

A fita complementar de DNA (DNAc) foi obtida a partir da transcrição do RNAm utilizando Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Foster City, California, USA), segundo recomendações do fabricante. Os alvos foram sintetizados e validados: DMP-1 (catálogo: Hs01009390_m1), DSPP (catálogo: Hs00171962_m1), VEGF (catálogo: Hs00900055_m1) e FGF-2 (catálogo: Hs00266645_m1) e foram adquiridos da empresa Thermo Fisher Scientific®, sendo utilizados segundo recomendações do kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (LifeTechnologies, Branchburg, NJ, USA). Foram adicionados à uma placa de 384 poços com as amostras (Applied Biosystems®, USA). Após a confecção dos ensaios a placa foi inserida e lida no aparelho VIIA 7 (Applied Biosystems®, USA). Como gene de referência para normalizar os resultados foi usada a β -Actina (catálogo: Hs99999903_m1).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com SigmaPlot versão 12.3 (2011 Systat Software, Alemanha). As premissas de igualdade de variâncias e distribuição normal dos erros foram verificadas. Uma vez que os pressupostos estavam satisfeitos, foram aplicados Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios seguida pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS**Avaliação da Viabilidade e Proliferação Celular**

O Ensaio de MTT revelou diferença estatisticamente significativa entre os períodos estudados : 6h, 12h e 24h ($p < 0,000$). Todos os grupos apresentaram diminuição da viabilidade com o passar do tempo, exceto o G1. Houve também diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (G1 a G9), controle negativo (C-) e controle positivo (C+). O controle negativo apresentou uma média estatisticamente menor que os grupos: G1 ($p = 0,000$), G2 ($p = 0,000$), G3 ($p = 0,005$), G4 ($p = 0,000$), G6 ($p = 0,000$), G7 ($p = 0,000$), G8 ($p = 0,000$), G9 ($p = 0,000$), porém sem diferença estatística com o G5 ($p = 0,459$) (Figura 1). O controle positivo apresentou diferença estatisticamente significativa com o controle negativo ($p = 0,000$) e o G5 ($p = 0,024$), apresentando maior viabilidade celular.

Figura 1 – Ensaio de MTT: Diferenças das médias de absorbância entre os grupos controle negativo (C-) e os demais grupos (Teste Anova a dois critérios, seguido do Teste de Tukey).

2 Artigo

Para dados em porcentagem, quando comparado o controle positivo com os demais grupos, observa-se diferença entre os grupos, sendo que G5 e o controle negativo apresentaram menor viabilidade celular (Figura 2).

Com relação as diferentes dosimetrias estudadas, observou-se que o G5 (5mW/50seg) exibiu menor média de viabilidade celular em relação ao G1 (5mW/10seg) ($p=0,029$), G6 (10mW/10seg) ($p=0,000$), G7 (15mW/10seg) ($p=0,000$), G8 (20mW/10seg) ($p=0,005$) e G9 (25mW/10seg) ($p=0,001$), com diferença estatisticamente significativa.

Figura 2 – Ensaio MTT: Análise da Viabilidade Celular dos grupos experimentais em relação ao controle positivo(C+), dados em porcentagem. Considerando os períodos 6h, 12h e 24h.

No Ensaio de Cristal Violeta observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos 6h, 12h e 24h ($p=0,2046$). Na comparação intergrupos houve diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e o controle negativo ($p=0,008$) (Figura 3).

Figura 3 – Ensaio CV: Diferenças das médias de absorbância entre os grupos controle positivo (C+) e o controle negativo (C-) (Teste Anova a dois critérios, seguido do Teste de Tukey).

2 Artigo

Para dados em porcentagem, quando comparado o controle positivo com os demais grupos, observou-se diferença entre os grupos, sendo que G5 e G6 apresentaram maior viabilidade celular que os demais grupos e todos os grupos apresentaram maior viabilidade no período inicial de 6h em comparação aos demais períodos (Figura 4).

Figura 4 – Ensaio CV: Análise da Viabilidade Celular dos grupos experimentais em relação ao controle positivo(C+), dados em porcentagem. Considerando os períodos 6h, 12h e 24h.

Avaliação da Expressão de RNAm por RT-PCR

A expressão gênica de RNAm pelos fibroblastos de dentes decíduos humanos para os alvos DMP-1, DSPP, VEGF e FGF-2 foi realizada utilizando o teste RT-PCR. Observou-se que DMP-1 e DSPP não foram expressas de maneira significativa para avaliação. Os genes VEGF e FGF-2 foram expressos nos três períodos analisados (6h, 12h e 24h).

Para VEGF, na comparação intragrupos, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos (6h, 12h e 24h): G2(6h)>G2(12h)

($p=0,000$), $G2(6h)>G2(24h)$ ($p=0,014$), $G3(6h)>G3(12h)$ ($p=0,000$), $G3(6h)>G3(24h)$ ($p=0,001$), $G4(6h)>G4(12h)$ ($p=0,004$), $G5(6h)>G5(12h)$ ($p=0,031$), $G5(6h)>G5(24h)$ ($p=0,013$), $G6(6h)>G6(12h)$ ($p=0,000$), $G6(6h)>G6(24h)$ ($p=0,000$), $G8(6h)>G8(24h)$ ($p=0,001$), $G9(6h)>G9(24h)$ ($p=0,008$). Na comparação intergrupos para o VEGF não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 5).

Figura 5 – Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para VEGF: comparação intergrupos, nos períodos 6h, 12h e 24h. O gene de referência utilizado foi a B. act.

Para FGF-2, na comparação intragrupos, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos (6, 12 e 24h): para todos os grupos (G1 a G9 e C+), sendo que o período 6h apresentou maior expressão de FGF-2 que o período 12h e que o período 24h ($p=0,000$). Na comparação intergrupos para o FGF-2 houve diferença entre os grupos: $G3>G8$ ($p=0,027$), $G3>G9$ ($p=0,001$), $G3>C+$ ($p=0,003$), $G6>G8$ ($p=0,021$), $G6>G9$ ($p=0,001$) e $G6>C+$ ($p=0,002$) no período 6h (Figura 6).

Figura 6 – Análise por RT-PCR da expressão de RNAm para FGF-2: comparação intergrupos, nos períodos 6h, 12h e 24h. (*) diferença estatisticamente significativa na expressão de FGF-2 entre os grupos experimentais, nos períodos 6h, 12h e 24h. O gene de referência utilizado foi a B. act.

Discussão

Muitos estudos avaliaram o efeito do Laser de Baixa Intensidade sobre diferentes tipos celulares como em fibroblastos imortalizados (PEREIRA et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010), fibroblastos gengivais (KREISLER et al., 2002; POURZARANDIAN et al., 2005; DAMANTE et al., 2009), fibroblastos pulpares de dentes permanentes (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) e células-tronco pulpares oriundas de dentes permanentes e de dentes decíduos (EDUARDO et al., 2008; ZACCARA et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; THEOCHARIDOU et al., 2017), mas estudos especificamente em fibroblastos pulpares de dentes decíduos ainda permanece escasso. Por serem os fibroblastos, as células mais abundantes no tecido pulpar podemos observar a relevância desse estudo pioneiro abordar a ação do LBI sobre este tipo celular buscando alternativas de tratamento regenerativo pulpar em dentes decíduos.

Neste estudo, para fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos, a proliferação e viabilidade foram significativas entre as dosimetrias

estudadas, sendo que menor viabilidade celular foi observada a uma dosimetria de $6,2\text{J}/\text{cm}^2$ com tempo de exposição ao laser de 50 segundos e potência de 05mW (G5), que apresentou diferença com o controle positivo, que é o grupo não irradiado e que se manteve em condições normais em DMEM com 10% SFB. Os grupos variaram a densidade de energia em função da potência e do tempo de aplicação do laser, observou-se que os grupos com maiores potências (10mW, 15mW, 20mW e 25mW), menores tempos de aplicação (10 segundos) e densidades de energia entre $2,5\text{ J}/\text{cm}^2$ e $6,2\text{ J}/\text{cm}^2$, apresentaram estatisticamente maior viabilidade que o grupo com menor potência (5mW), maior tempo de aplicação do laser (50 segundos) e densidade de energia de $6,2\text{ J}/\text{cm}^2$.

No presente estudo, quando comparados o G5 ($6,2\text{J}/\text{cm}^2$, 05mW, 50 segundos, $125\text{mw}/\text{cm}^2$) com o G9 ($6,2\text{J}/\text{cm}^2$, 25mW, 10 segundos, $625\text{mW}/\text{cm}^2$), que receberam densidades de energia iguais e irradiâncias diferentes, apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, sendo que o G9 teve melhores resultados de viabilidade celular. Assim como ocorreu em nosso estudo, alguns estudos mostram que maiores densidades de potência associadas a menores tempo de exposição a irradiação mostram-se mais benéficas para o crescimento celular *in vitro* do que menores densidades de potência associadas a maiores tempos de exposição a irradiação (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; EDUARDO et al., 2008).

A diferença de viabilidade e proliferação celular vista no ensaio MTT com o passar do tempo de 6h a 24h para todos os grupos, mostrou uma predominância na redução da viabilidade celular com o passar do tempo, exceto para a densidade de energia de $1,2\text{ J}/\text{cm}^2$, com 5 mW de potência e tempo de irradiação de 10 segundos (G1), em que foi observado um aumento da viabilidade celular com o passar do tempo. Existem muitos trabalhos na literatura visando estabelecer os melhores parâmetros de irradiação e há uma dificuldade em estabelecê-los. Estudos utilizando o LBI no espectro de cor vermelho sobre fibroblastos de dentes decíduos relacionadas a expressão dos genes avaliados neste estudo não foram encontrados na literatura, o que dificulta a discussão dos resultados encontrados.

A expressão do RNAm das proteínas da matriz extracelular e de fatores de crescimento foi avaliada utilizando o RT-PCR. Os resultados revelam que não houve a expressão significativa de DMP-1 e DSPP. Uma possível explicação é devido ao tipo celular estudado, fibroblastos pulpares de dentes decíduos, visto que a literatura

mostra que são os odontoblastos ou células que se diferenciarão em odontoblastos, as chamadas odontoblastos-like, que são células com funções semelhantes a dos odontoblastos, envolvidas na secreção da pré-dentina nas fases iniciais da dentinogênese, com a secreção de proteínas não colagenosas como a DSPP e a DMP-1, e na posterior biomineralização e formação da dentina (PRASAD; BUTLER; QIN, 2010). A literatura mostra que ratos com a ausência de DMP-1 apresentaram uma diminuição da expressão de DSPP (YE et al., 2004; PRASAD; BUTLER; QIN, 2010), sugerindo que DMP-1 possa controlar a expressão de DSPP e isto foi comprovado posteriormente também em outros estudos, onde observou-se que DMP-1 pode estar envolvida na regulação da transcrição da DSPP nas fases iniciais da dentinogênese (NARAYANAN et al., 2006). Isso pode ser visto em nosso estudo, onde os dois genes apresentaram expressão irregular e insignificante.

O VEGF é expresso por diferentes tipos celulares, atua na regulação de sinais intercelulares e está ligado ao processo de angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existent, contribuindo para a regeneração tecidual (MATTUELLA et al., 2007). Na comparação intragrupos, observamos que o VEGF teve expressões maiores no período inicial (6h pós-irradiação com LBI), quando comparado aos períodos de 12h e 24h pós-irradiação, mas isso não ocorreu para todos os grupos. Quando foi realizada a comparação intergrupos, observou-se que não houve diferença entre as dosimetrias estudadas para a expressão de VEGF ser maior ou menor, supondo que todas as dosimetrias são benéficas para a produção desse importante fator de crescimento.

O FGF-2 está envolvido na diferenciação de odontoblastos, na secreção de dentina, na modulação da proliferação, migração e mineralização de células pulpares de dentes humanos (SHIMABUKURO et al., 2009). Este fator tem grande atuação na regeneração e cicatrização de feridas, por regular processos como proliferação, migração e mineralização celular. O FGF-2 é produzido por fibroblastos e células endoteliais. Sua expressão foi maior no período inicial (6h pós-irradiação com LBI) em comparação com os períodos de 12h e 24h pós-irradiação, mostrando sua ação imediata no tecido e diminuição com o passar do tempo, isso ocorreu para todas as dosimetrias analisadas e talvez em períodos anteriores a 6h, poderemos observar maiores expressões do RNAm do FGF-2. Não existem estudos avaliando especificamente a atuação da FGF-2 em fibroblastos de dentes decíduos, apesar de

alguns estudos avaliarem a atuação desse fator de crescimento em células pulpares de uma maneira geral para dentes permanentes (SHIMABUKURO et al., 2005, 2009; MULLANE et al., 2008), nos fibroblastos do ligamento periodontal de dentes decíduos (YANAGITA et al., 2014) e em células mesenquimais da polpa dentária e SHED (KIM et al., 2014). Os estudos se referem a capacidade do FGF-2 quando aplicado sobre a cultura de células em atuar na proliferação celular, migração celular e angiogênese. Nosso estudo é pioneiro no estudo da expressão de RNAm desses fatores de crescimento e dessas proteínas da matriz extracelular em fibroblastos pulpares de dentes decíduos, mostrando a importância de avaliar o comportamento dessas células após aplicação de LBI.

Quando foram comparadas diferentes dosimetrias, observou-se que o G3 (3,7 J/cm², 05mW, 30 segundos) e o G6 (2,5 J/cm², 10mw, 10 segundos) tiveram diferenças significativas com o controle positivo, mostrando que a atuação do laser nesses casos foi expressiva na produção do FGF-2, utilizando as fluências de 3,7 J/cm² e 2,5 J/cm², possivelmente haverá uma melhora no reparo e produção de dentina.

Neste estudo observamos a expressão de RNAm para VEGF e FGF-2, o que comprova a ação benéfica e estimulatória do laser *in vitro* na angiogênese. Não observamos quantidade expressiva de RNAm de DMP-1 e DSPP. Para estudos futuros utilizando outras metodologias será possível verificar a expressão das proteínas destes alvos.

Ainda não se sabe a densidade de energia ideal para que haja a viabilidade/proliferação celular e a expressão de fatores de crescimento pelos fibroblastos de dentes decíduos. Observamos que quando utilizou-se os parâmetros: densidade de energia 2,5J/cm², potência de 10mW por um tempo de 10 segundos, houve de forma geral melhores resultados nos diferentes ensaios e métodos utilizados. Porém, por se tratar de um trabalho laboratorial não podemos extrapolar os resultados direto para a prática clínica, sem antes avaliar o efeito do Laser de Baixa Intensidade para os diferentes tipos celulares, por ser o tecido pulpar rico em outros tipos celulares além dos fibroblastos. Assim, outros estudos devem ser realizados para a padronização dos melhores parâmetros do LBI para as células pulpares dos dentes decíduos. Estudos *in vitro* são importantes para orientar os parâmetros que

serão aplicados em futuras pesquisas, empregando modelos *in vivo* e ensaios clínicos (PEREIRA et al., 2002; TAGLIANI et al., 2010).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, frente as diferentes densidades de energia, sugere-se que a terapia a laser de baixa intensidade manteve os fibroblastos viáveis e aumentou a expressão de RNAm para VEGF e FGF-2.

REFERÊNCIAS

1. Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. J Endod. 2012 Jan; 38(1): 75-80.
2. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. Lasers Surg Med. 2001; 29(2): 179-84.
3. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. Gene Therapy. 2006; 13: 611-20.
4. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. Lasers Med Sci. 2006; 21: 86–89.
5. Beniash E, Deshpande AS, Fang PA, Lieb NS, Zhang X, Sfeir CS. Possible role of DMP-1 in dentin mineralization. Jour Struct Biol. 2011; 174: 100-6.
6. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. JOE. 2014 April; 40(4S): S46-S51.
7. 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.
8. Damante CA, Marques MM. Laser power loss through polystyrene plates for cell culture. Lasers Med Sci. 2014; 29: 373.

9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th Edition: Wiley-Blackwell; 2000.
13. Fuks AB. Vital Pulp Therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Pediatr Dent.* 2008; 30(3): 211-219.
14. Gasque KCS, Al-Ahij LP, Oliveira RC, Magalhães AC. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2014; 57: 381-385.
15. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *Analytical Biochemistry.* 1986; 159(1): 109-13.
16. 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.
17. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Florence Carrouel F. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008; 58(2): 137-47.
18. Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 347649.
19. Hadis MA, Zainal SA, Holder MJ, Carroll JD, Cooper PR, Milward MR. The dark art of light measurement: accurate radiometry for low-level light therapy. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(4): 789-809.
20. Hur SW, Oh SH, Jeong BC, Choi H, Kim JW, Lee KN, Hwang YC, Ryu JH, Kim SH, Koh JT. COUP-TFII Stimulates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Mineralization in Odontoblasts. *Journal of Dental Research.* 2015; 94(8): 1135 – 1142.

21. Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS, Kim SO. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Archives of oral biology*. 2014; 59: 1013-1023.
22. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May; 56(5): 691-704.
23. 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 Jul 21; 9(7): e102893.
24. 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.
25. Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 1989 Oct; 182(1): 16-9.
26. 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.
27. 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 Med Sci*. 2015 Sep; 30(7): 1815-22.
28. Martini D, Triré A, Breschi L, Mazzoni A, Orsini G, Teti G, Falconi M, Ruggeri Jr A. Dentin matrix protein 1 and dentin sialophosphoprotein in human sound and carious teeth: an immunohistochemical and colorimetric assay. *Eur J Histochem*. 2013 Oct 29; 57(4): e32.
29. Mattuella LG, Bento LW, Figueiredo JAP, Nör JE, Araujo FB, Fossati ACM. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship with the Dental Pulp. *J Endod*. 2007; 33: 524–530.
30. 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.
31. 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.

32. 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.
33. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC-C, Botero TM, Holland GR, Nör JE. Effects of VEGF and FGF2 on the Revascularization of Severed Human Dental Pulps. *J Dent Res*. 2008; 87(12): 1144-1148.
34. Narayanan K, Gajjeraman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J. Biol. Chem*. 2006; 281: 19064–19071.
35. Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 1999 Jan; 25(1): 30-3.
36. 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 Apr; 14(2): 65-71.
37. 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 Aug; 28 Suppl 1: S3-40.
38. 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.
39. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SMPM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol*. 2005 Feb; 76(2): 187-193.
40. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res*. 2010; 51: 404–417.
41. Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008 Apr; 23(2): 211-5.
42. Shimabukuro Y, Ueda M, Ichikawa T, Terashi Y, Yamada S, Kusumoto Y, Takedachi M, Terakura M, Kohya A, Hashikawa T, Murakami S. Fibroblast Growth

-
- Factor-2 Stimulates Hyaluronan Production by Human Dental Pulp Cells. JOE. 2005 Nov; 31(11): 805-808.
43. Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S. Fibroblast Growth Factor–2 Regulates the Cell Function of Human Dental Pulp Cells. J Endod. 2009; 35: 1529–1535.
 44. Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin matrix protein-1: two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. Arch Oral Biol. 2012; 57: 1165-75.
 45. 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.
 46. Theocharidou A, Bakopoulou A, Kontonasaki E, Papachristou E, Hadjichristou C, Bousnaki M, Theodorou G, Papadopoulou L, Kantiranis N, Paraskevopoulos K, Koidis P. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg-based bioceramic scaffolds under low-level laser treatment. Lasers Medical Science. 2017; 32: 201-210.
 47. Turner CH. Dentin Matrix Protein 1 (DMP-1). J Musc Neur Int. 2007; 7(4): 306- 7.
 48. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Desining new treatment strategies in vital pulp therapy. J Dent. 2000; 28: 77-92.
 49. 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.
 50. 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.
 51. Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y. Dentin Sialophosphoprotein–derived Proteins in the Dental Pulp. J Dent Res. 2015 Aug; 94(8): 1120-7.
 52. Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of Dentin Matrix Protein-1 Leads to a Partial Failure of Maturation of Predentin into Dentin, Hypomineralization, and Expanded Cavities of Pulp and Root Canal during Postnatal Tooth Development. J Biol Chem. 2004 April; 279(18): 19141–19148.

53. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative Effects of FGF-2 and VEGF-A in Periodontal Ligament cells. J Dent Res. 2014; 93(1): 89-95.
54. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ACG, Barboza CAG. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cell. Lasers Med Sci. 2015; 30: 2259–2264.

3 Discussão

3 DISCUSSÃO

Visando proporcionar uma melhor interpretação dos resultados obtidos neste trabalho, serão discutidos inicialmente os aspectos referentes à amostra bem como a metodologia aplicada para obtenção dos resultados. Posteriormente, serão realizadas considerações sobre os resultados obtidos mediante análise dos dados e comparando-os com outros trabalhos existentes na literatura

Amostra

Muitos estudos avaliaram o efeito do Laser de Baixa Intensidade sobre diferentes tipos celulares como em fibroblastos imortalizados (PEREIRA et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010), fibroblastos gengivais (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; POURZARANDIAN et al., 2005; DAMANTE et al., 2009), fibroblastos pulpares de dentes permanentes (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) e células-tronco pulpares oriundas de dentes permanentes e de dentes decíduos (EDUARDO et al., 2008; ZACCARA et al., 2015; FERNANDES et al., 2016; THEOCHARIDOU et al., 2017), mas estudos especificamente em fibroblastos pulpares de dentes decíduos ainda permanece escasso. Por serem os fibroblastos, as células mais abundantes no tecido pulpar podemos observar a relevância desse estudo pioneiro abordar a ação do LBI sobre este tipo celular buscando alternativas de tratamento pulpar em dentes decíduos.

Existem diferenças entre dentes decíduos e dentes permanentes, quanto a expressão gênica, processo de desenvolvimento do dente, morfologia, ciclo vital e características histológicas. Sabe-se que dentes decíduos apresentam diferentes respostas celulares frente a estímulos externos, como em testes de sensibilidade, traumatismos dentários e exposição a materiais capeadores pulpares (KIM et al., 2014). Portanto, células pulpares de dentes decíduos, isoladas em cultura, podem apresentar funções e respostas a terapias pulpares regenerativas de forma diferente do que ocorreria com células pulpares de dentes permanentes. Desta forma, torna-se importante o estudo da atuação do LBI sobre as células pulpares oriundas de dentes decíduos.

Sabe-se que existem possíveis diferenças entre fibroblastos da polpa dental de dentes permanentes e decíduos (SHEKAR; RANGANATHAN, 2012;

SIPERT et al., 2013). Além disso, estudos prévios mostraram diversos efeitos da irradiação do laser em tipos variados de células, incluindo cultura primária e linhagens imortalizadas (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Visto que diferentes linhagens celulares podem responder peculiarmente a diferentes parâmetros de irradiação, existe, portanto, a necessidade de estabelecer parâmetros de dosimetria específicos para cada tipo celular.

Na polpa de dentes permanentes, os estudos demonstram que o Laser de Baixa Intensidade, quando usado em situações de exposição pulpar diminui o processo inflamatório (UTSUNOMIYA, 1998; MARQUES et al., 2015) e acelera o reparo do tecido pulpar pela formação de uma matriz fibrosa e de uma ponte de dentina, além da produção de proteínas colagênicas. Da mesma forma, quando aplicados indiretamente em cavidades preparadas sem exposição pulpar, o Laser de Baixa Intensidade também se mostrou capaz de causar uma biomodulação da atividade das células pulpares com menos inflamação e bioestimulação da dentinogênese reacional (FERREIRA et al., 2006).

Metodologia

Os efeitos da fotobiomodulação do LBI são conhecidos e amplamente estudados utilizando diferentes tipos de laser, diferentes dosimetrias e diferentes tipos celulares. Sabe-se que pode atuar na proliferação e viabilidade celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MOORE et al., 2005; ZACCARA et al., 2015), no aumento da vascularização (OHSHIRO; CALDERHEAD, 1991; BASSO et al., 2012), na cicatrização de feridas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001), na expressão de proteínas (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004) e na expressão de fatores de crescimento (SAYGUN et al., 2008). E em alguns tipos celulares específicos, como as células-tronco, o LBI promove, além desses efeitos, a diferenciação celular e tem contribuído para avanços na biomedicina e engenharia tecidual (THEOCHARIDOU et al, 2017).

Para a atuação do LBI ser eficaz nas células, estas precisam estar sob déficit no suplemento do meio *in vitro*, o que simula o estresse celular visto *in vivo*, dessa forma as células não estarão em estado de homeostasia celular e a atuação do LBI possivelmente será melhor (KARU, 1989; DAMANTE et al., 2009; TAGLIANI et al., 2010; VOLPATO et al., 2011; MOURA-NETTO et al, 2016). Para tanto fez-se

3 Discussão

necessária a diminuição da concentração de Soro Fetal Bovino (SFB) de 10% para 1%, gerando um déficit no suplemento do meio e alterando o estado de homeostasia das células estudadas, seguindo estudos prévios (DAMANTE et al., 2009; FERNANDES et al., 2016).

Para padronizar a aplicação do LBI sobre todos os poços que foram irradiados, e sabendo que a distância entre a fonte de luz e a superfície da placa, onde foi aplicada a luz é importante, nos experimentos propostos, o Laser foi aplicado através do fundo da placa de 96 poços, que é transparente, mantendo uma distância constante entre a fonte de luz e a superfície de aplicação do laser. Desta forma, o feixe de Laser não transpôs o meio de cultura e foi aplicado diretamente sobre a monocamada de células, seguindo a metodologia adotada por estudos prévios (PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; DAMANTE et al., 2009; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; VOLPATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2016).

A utilização de dois tipos de ensaios colorimétricos para avaliação da viabilidade e proliferação celular pretende averiguar se o efeito do laser sobre o tecido está ocorrendo em função do comprimento de onda e da potência aplicados, que é o desejável, ou em função da coerência da luz (VOLPATO et al., 2011). Assim foram realizados Ensaios MTT e Cristal Violeta para avaliação da viabilidade/proliferação dos fibroblastos de dentes decíduos humanos, segundo estudos prévios (EDUARDO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; FERNANDES et al., 2016). Nesse estudo foi realizado o ensaio MTT para avaliar as células que se apresentavam viáveis 6h, 12h e 24h após a irradiação com o LBI. O ensaio MTT 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). Como o LBI tem ação sobre o metabolismo celular e síntese de DNA, atuando na síntese de ATP, além do ensaio de MTT que avalia a viabilidade pela ação de uma enzima mitocondrial, fez-se necessário a utilização de outro teste que avaliasse a viabilidade e proliferação celular, visando uma maior confiabilidade dos resultados (WILDEN; KARTHEIN, 1998; ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012). Assim, nesse estudo utilizamos o Ensaio cristal violeta.

O Ensaio Cristal violeta possui algumas vantagens como o custo baixo e facilidade em sua realização. O Cristal Violeta é um corante que consegue corar o DNA celular e essa reação só ocorre em células viáveis (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). O ensaio Cristal Violeta tem sido descrito em vários estudos com diferentes finalidades e em diferentes tipos celulares. Este ensaio foi utilizado para contagem indireta do número de células e/ou proliferação celular (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989; FRESHNEY, 2000), ensaios de adesão celular (YUN et al., 2012), citotoxicidade (CAMARGO et al., 2009) e ensaios de viabilidade celular (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; FERNANDES et al., 2016). A viabilidade celular mensurada pelo CV consiste em corar apenas as células aderidas ao frasco de cultura, que portanto são as células viáveis, pois as mortas ao se desprenderem do frasco não são coradas e nem fixadas, portanto não fazem parte da densidade celular mensurada através da absorbância em espectrofotômetro. Nesse estudo, o Cristal violeta foi usado como um segundo teste para a mensuração da viabilidade e proliferação celular, por ser um ensaio realizado em células pulpares (YUN et al., 2012; FERNANDES et al., 2016) e pela facilidade e sensibilidade da técnica. Observou-se valores de absorbância menores para o ensaio Cristal Violeta e maiores para o ensaio MTT, possivelmente pela atuação do laser ser maior no metabolismo mitocondrial (VOLPATO et al., 2011).

Resultados

Neste estudo, para fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos, a proliferação e viabilidade foram significativas entre as dosimetrias estudadas, sendo que menor viabilidade celular foi observada a uma dosimetria de 6,2J/cm² com tempo de exposição ao laser de 50 segundos e potência de 05mW (G5), que apresentou diferença com o controle positivo, que é o grupo não irradiado e que se manteve em condições normais em DMEM com 10% SFB. Os grupos variaram a densidade de energia em função da potência e do tempo de aplicação do laser, observou-se que os grupos com maiores potências (10mW, 15mW, 20mW e 25mW), menores tempos de aplicação (10 segundos) e densidades de energia entre 2,5 J/cm² e 6,2 J/cm², apresentaram estatisticamente maior viabilidade que o grupo com menor

3 Discussão

potência (5mW), maior tempo de aplicação do laser (50 segundos) e densidade de energia de 6,2 J/cm².

A densidade de energia é um parâmetro importante quando é preciso avaliar a viabilidade celular, e altas doses podem causar efeitos negativos aos fotorreceptores celulares, prejudicando o efeito bioestimulatório do laser (KARU, 1987), enquanto que baixas doses podem não causar efeitos significativos no tecido (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012). No presente estudo, quando comparados o G5 (6,2J/cm², 05mW, 50 segundos, 125mw/cm²) com o G9 (6,2J/cm², 25mW, 10 segundos, 625mW/cm²), que receberam densidades de energia iguais e irradiâncias diferentes, apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, sendo que o G9 teve melhores resultados de viabilidade celular. Assim como ocorreu em nosso estudo, alguns estudos mostram que maiores densidades de potência associadas a menores tempo de exposição a irradiação mostram-se mais benéficas para o crescimento celular *in vitro* do que menores densidades de potência associadas a maiores tempos de exposição a irradiação (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; EDUARDO et al., 2008).

A diferença de viabilidade e proliferação celular vista no ensaio MTT com o passar do tempo de 6h a 24h para todos os grupos, mostrou que houve diferença entre eles, havendo uma predominância na redução da viabilidade celular com o passar do tempo, exceto para densidade de energia de 1,2 J/cm², com 5 mW de potência e tempo de irradiação de 10 segundos (G1), em que foi observado um aumento da viabilidade celular com o passar do tempo. Existem muitos trabalhos na literatura visando estabelecer os melhores parâmetros de irradiação e há uma dificuldade em estabelecê-los. Alguns autores encontram dificuldades em estabelecer os parâmetros ideais para utilizarem, pois os estudos diferem quanto ao tipo celular, metodologias, tipos de laser e parâmetros de irradiação em geral (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010). É preciso realizar estudos pilotos e procurar na literatura trabalhos que se assemelhem com o tipo celular e com o tipo de laser estudados a fim de obter melhores parâmetros para definir o protocolo do seu trabalho, sendo uma dificuldade encontrada, visto que este trabalho é pioneiro no estudo do LBI sobre os fibroblastos de dentes decíduos humanos. Estudos que utilizaram o LBI no mesmo comprimento de onda e com densidades de energia semelhantes ao do nosso estudo, porém com células diferentes mostraram o efeito benéfico do LBI na proliferação e viabilidade de

células tronco da polpa de dentes permanentes (ZACCARA et al., 2015) e dente decíduos humanos esfoliados (SHED) (FERNANDES et al., 2016), sendo que as SHED irradiadas com densidade de energia de 1,2 J/cm² apresentaram melhores resultados.

A expressão do RNAm das proteínas da matriz extracelular e de fatores de crescimento foi avaliada utilizando o RT-PCR. Os resultados revelam que não houve a expressão significativa de DMP-1 e DSPP. Uma possível explicação é devido ao tipo celular estudado, fibroblastos pulpares de dentes decíduos, visto que a literatura mostra que são os odontoblastos ou células que se diferenciarão em odontoblastos, as chamadas odontoblastos-like, que são células com funções semelhantes a dos odontoblastos, envolvidas na secreção da pré-dentina nas fases iniciais da dentinogênese, com a secreção de proteínas não colagenosas como a DSPP e a DMP-1, e na posterior biomineralização e formação da dentina (PRASAD; BUTLER; QIN, 2010). A literatura mostra que ratos com a ausência de DMP-1 apresentaram uma diminuição da expressão de DSPP (YE et al., 2004; PRASAD; BUTLER; QIN, 2010), sugerindo que DMP-1 possa controlar a expressão de DSPP e isto foi comprovado posteriormente também em outros estudos, onde observou-se que DMP-1 pode estar envolvida na regulação da transcrição da DSPP nas fases iniciais da dentinogênese (NARAYANAN et al., 2006). Isso pode ser visto em nosso estudo, onde os dois genes apresentaram expressão irregular e insignificante.

O VEGF é expresso por diferentes tipos celulares, atua na regulação de sinais intercelulares e está ligado ao processo de angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, contribuindo para a regeneração tecidual (MATTUELLA et al., 2007). Na comparação intragrupos, observamos que o VEGF teve expressões maiores no período inicial (6h pós-irradiação com LBI), quando comparado aos períodos de 12h e 24h pós-irradiação, mas isso não ocorreu pra todos os grupos. Quando foi realizada a comparação intergrupos, observou-se que não houve diferença entre as dosimetrias estudadas para a expressão de VEGF ser maior ou menor, supondo que todos as dosimetrias são benéficas para a produção desse importante fator de crescimento.

VEGF é um dos principais fatores envolvidos na angiogênese e vasculogênese, que são os primeiros estágios da resposta inflamatória frente à uma agressão pulpar, contribuindo para posteriormente ocorrer aumento da

3 Discussão

permeabilidade vascular e a formação da dentina terciária ou reparadora. Após a injúria pulpar e os efeitos anti-inflamatórios, com a liberação de fatores de crescimento endoteliais, há um aumento da vascularização no local promovendo a regeneração, cicatrização e proliferação celular com o suporte sanguíneo adequado (ZHANG et al., 2015). Existem diferentes isoformas do VEGF em sua família, como o VEGF- A, B, C, D, E e também o PDGF, sendo que os envolvidos na angiogênese são VEGF-A e VEGF-B (MATTUELLA et al., 2007), dessa forma com a expressão do RNAm desse fator podemos esperar um possível aumento da angiogênese e do reparo pulpar .

A literatura aborda diferentes estudos com as células da polpa dentária em dentes permanentes e em dentes decíduos, além de estudos em animais, para avaliação da produção de VEGF em polpas íntegras e polpas inflamadas. Sabe-se que este fator de crescimento é expresso tanto em situações fisiológicas, quanto patológicas pelo estímulo de um processo carioso, trauma ou injúria mecânica (Yang et al., 2004). Estudos utilizando o LBI no espectro de cor vermelho sobre fibroblastos de dentes decíduos relacionadas a expressão dos genes avaliados neste estudo não foram estudados na literatura, o que dificulta a discussão dos resultados encontrados.

O FGF-2 está envolvido na diferenciação de odontoblastos, na secreção de dentina, na modulação da proliferação, migração e mineralização de células pulpares de dentes humanos (SHIMABUKURO et al., 2009). Este fator tem grande atuação na regeneração e cicatrização de feridas, por regular processos como proliferação, migração e mineralização celular. O FGF-2 é produzido por fibroblastos e células endoteliais. Sua expressão foi maior no período inicial (6h pós-irradiação com LBI) em comparação com os períodos de 12h e 24h pós-irradiação, mostrando sua ação imediata no tecido e diminuição com o passar do tempo, isso ocorreu para todas as dosimetrias analisadas e talvez em períodos anteriores a 6h, poderemos observar maiores expressões do RNAm do FGF-2. Não existem estudos avaliando especificamente a atuação da FGF-2 em fibroblastos de dentes decíduos, apesar de alguns estudos avaliarem a atuação desse fator de crescimento em células pulpares de uma maneira geral para dentes permanentes (SHIMABUKURO et al., 2005, 2009; MULLANE et al., 2008), nos fibroblastos do ligamento periodontal de dentes decíduos (YANAGITA et al., 2014) e em células mesenquimais da polpa dentária e SHED (KIM et al., 2014). Os estudos se referem a capacidade do FGF-2, quando aplicado sobre a cultura de células, em atuar na proliferação celular, migração celular e angiogênese.

Estudos tem sido controversos quanto a questão da indução da diferenciação celular dos odontoblastos, sendo que uns afirmam a capacidade do FGF-2 em suprimir reversivelmente a expressão desses fatores na fase inicial do reparo (SHIMABUKURO et al., 2009) e outros falam que em baixas doses o FGF-2 pode atuar regulando a expressão de fatores relacionados a mineralização como DSPP e DMP-1 (KIM et al., 2014; SAGOMONYANTS et al., 2015). Nosso estudo é pioneiro no estudo da expressão de RNAm desses fatores de crescimento e dessas proteínas da matriz extracelular em fibroblastos pulpares de dentes decíduos, mostrando a importância de avaliar o comportamento dessas células após aplicação de LBI.

FGF-2 está envolvido na dentinogênese terciária ou reparadora, quando é liberado frente a uma injúria pulpar (TRAN-HUNG et al., 2008), está presente na dentina e é produzido por fibroblastos e células endoteliais (SHIMABUKURO et al., 2009). Dessa forma, tanto em situações fisiológicas como patológicas, as células da polpa dentária estão expostas ao FGF-2 e sua atuação. Nesse estudo, observou-se que a expressão de FGF-2 foi maior no período inicial (6h pós-irradiação com LBI) em comparação com os períodos de 12h e 24h pós-irradiação, mostrando sua ação imediata no tecido e diminuição com o passar do tempo, isso ocorreu para todas as dosimetrias analisadas. Quando foram comparadas diferentes dosimetrias, observou-se que o G3 (3,7 J/cm², 05mW, 30 segundos) e o G6 (2,5 J/cm², 10mw, 10 segundos) tiveram diferenças significativas com o controle positivo, grupo não irradiado que permaneceu em condições ideais, mostrando que a atuação do laser nesses casos foi expressiva na produção do FGF-2, utilizando essas fluências de 3,7 J/cm² e 2,5 J/cm², consequentemente há uma melhora no reparo e produção de dentina.

Neste estudo observamos a expressão de RNAm para VEGF e FGF-2, o que comprova a ação benéfica e estimulatória do laser *in vitro* na angiogênese. Não observamos quantidade expressiva de RNAm de DMP-1 e DSPP. Para estudos futuros utilizando outras metodologias será possível verificar a expressão das proteínas destes alvos.

Implicações Clínicas

Com o conhecimento dos melhores parâmetros do Laser de Baixa Intensidade, considerando: densidade de energia ou fluência, densidade de potência

3 Discussão

ou irradiância, potência, tempo de irradiação, feixe de abertura do laser e comprimento de onda; para aplicação sobre células do tecido pulpar, mais especificamente fibroblastos pulpares de dentes decíduos, que são as células mais abundantes na polpa dentária de dentes decíduos, podemos obter melhores resultados na prática clínica, mas especificamente na atuação no reparo do tecido pulpar. E com o conhecimento dos fatores de crescimento expressos após a irradiação, podemos conhecer melhor a função do laser no processo de reparo, e quem sabe optar por irradiações fracionadas, onde não ocorreria, possivelmente, a diminuição da dose de energia no tecido alvo, e assim haveriam maiores estímulos a níveis celulares e moleculares para a expressão de fatores de crescimento tão importantes no processo de reparo do tecido pulpar.

Ainda não se sabe a densidade de energia ideal para que haja a viabilidade/proliferação celular e a expressão de fatores de crescimento pelos fibroblastos de dentes decíduos. Observamos que quando utilizou-se os parâmetros: densidade de energia $2,5 \text{ J/cm}^2$, potência de 10mW por um tempo de 10 segundos, houve de uma forma geral melhores resultados nos diferentes ensaios e métodos utilizados. Porém, por se tratar de um trabalho laboratorial não podemos extrapolar os resultados direto para a prática clínica, sem antes avaliar o efeito do Laser de Baixa Intensidade para os diferentes tipos celulares, por ser o tecido pulpar rico em outros tipos celulares além dos fibroblastos. Assim, outros estudos devem ser realizados para a padronização dos melhores parâmetros do LBI para as células pulpares dos dentes decíduos. Estudos *in vitro* são importantes para orientar os parâmetros que serão aplicados em futuras pesquisas, empregando modelos *in vivo* e ensaios clínicos (PEREIRA et al., 2002; TAGLIANI et al., 2010).

Referências

REFERÊNCIAS

Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2012 Jan; 38(1): 75-80.

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 Jan; 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): 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 fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2): 179-84.

Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* 2006; 13: 611-20.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers Med Sci.* 2006; 21: 86–89.

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.

Beniash E, Deshpande AS, Fang PA, Lieb NS, Zhang X, Sfeir CS. Possible role of DMP-1 in dentin mineralization. *Jour Struct Biol.* 2011; 174: 100-6.

Referências

Camargo SEA, Camargo CHR, Hiller KA, Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *Int Endod J*. 2009; 42: 227–237.

Chan CP, Lan WH, Chang MC, Chen YJ, Lan WC, Chang HH, Jeng JH. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 2005 May; 50(5): 469-79.

Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: A Double-edged Sword. *JOE*. 2014 April; 40 (4S): S46-S51.

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; 29: 373.

De Alencar Mollo M, Frigo L, Favero GM, Lopes-Martins RA, Brugnera Junior A. In vitro analysis of human tooth pulp chamber temperature after low-intensity laser therapy at different power outputs. *Lasers Med Sci*. 2011 Mar; 26(2): 143-7.

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.

Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological Effects of Low Level Laser Therapy. *J Lasers Med Sci*. 2014; 5(2): 58-62.

Referências

Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. Cold Spring Harb Protoc. 2016 April 1; 2016(4): pdb.prot087379. doi: 10.1101/pdb.prot087379.

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 MP, Ferrari RA, 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 Dec; 27(6): 901-6.

Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6th Edition: Wiley-Blackwell; 2000.

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

Gasque KCS, Al-Ahj LP, Oliveira RC, Magalhães AC. Cell density and solvent are critical parameters affecting formazan evaluation in MTT assay. Braz Arch Biol Technol. 2014; 57: 381-385.

Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. Anal. Biochem. 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.

Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Florence Carrouel F. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*. 2008; 58(2): 137-47.

Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm*. 2015; 2015:347649.

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

Hur SW, Oh SH, Jeong BC, Choi H, Kim JW, Lee KN, Hwang YC, Ryu JH, Kim SH, Koh JT. COUP-TFII Stimulates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Mineralization in Odontoblasts. *J. Dent. Res*. 2015; 94(8): 1135 –1142.

Jeon M, Song JS, Choi BJ, Choi HJ, Shin DM, Jung HS, Kim SO. In vitro and in vivo characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth obtained by enzymatic disaggregation and outgrowth. *Arch Oral Biol*. 2014; 59: 1013-1023.

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

Karu T. Photobiological fundamentals of Low-Power Laser Therapy. *J Quantum Electron*. 1987; 23: 1703–1817.

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 Jul 21; 9(7): e102893.

Referências

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.

Kubasova T, Kovács L, Somosy Z, Unk P, Kókai A. Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, in vitro. *Lasers Surg Med.* 1984; 4(4): 381-8.

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, 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 Med Sci.* 2015 Sep; 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.
- Martini D, Triré A, Breschi L, Mazzoni A, Orsini G, Teti G, Falconi M, Ruggeri Jr A. Dentin matrix protein 1 and dentin sialophosphoprotein in human sound and carious teeth: an immunohistochemical and colorimetric assay. *Eur J Histochem.* 2013 Oct 29; 57(4): e32.
- Mattuella LG, Bento LW, Figueiredo JAP, Nör JE, Araujo FB, Fossati ACM. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship with the Dental Pulp. *J Endod.* 2007; 33: 524 –530.
- Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JC-C, Botero TM, Holland GR, Nör JE. Effects of VEGF and FGF2 on the Revascularization of Severed Human Dental Pulps. *J Dent Res.* 2008; 87(12): 1144-1148.
- 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.
- 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.

Referências

Moura-Netto C, Ferreira LS, Maranduba CM, Mello-Moura ACV, Marques MM. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz. Oral Res.* 2016; 30(1): e80.

Narayanan K, Gajjerman S, Ramachandran A, Hao J, George A. Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 19064–19071.

Odabas ME, Bodur H, Bariş 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.

Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 1999 Jan; 25(1): 30-3.

Ohshiro 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.

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 Apr; 14(2): 65-71.

Olivi G, Genovese MD, Caprioglio C. Evidence-based dentistry on laser paediatric dentistry: review and outlook. *Eur J Paediatr Dent.* 2009; 10(1): 2940.

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 Aug; 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 may; 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.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SMPM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol.* 2005 Feb; 76(2): 187-193.

Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 2010; 51: 404–417.

Sagomonyants K, Kalajzic I, Maye P, Mina M. Enhanced Dentinogenesis of Pulp Progenitors by Early Exposure to FGF2. *J. Dent. Res.* 2015; 94(11): 1582 –1590.

Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008 Apr; 23(2): 211-5.

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.

Shimabukuro Y, Ueda M, Ichikawa T, Terashi Y, Yamada S, Kusumoto Y, Takedachi M, Terakura M, Kohya A, Hashikawa T, Murakami S. Fibroblast Growth Factor-2 Stimulates Hyaluronan Production by Human Dental Pulp Cells. *JOE.* 2005 Nov; 31(11): 805-808.

Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S. Fibroblast Growth Factor-2 Regulates the Cell Function of Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2009; 35: 1529–1535.

Referências

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.

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

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin silaoprotein and dentin matrix protein-1: two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 1165-75.

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.

Teti G, Salvatore V, Ruggeri A, Manzoli L, Gesi M, Orsini G, Falconi M. In vitro reparative dentin: a biochemical and morphological study. *Eur J Histochem.* 2013 Aug 6; 57(3): e23.

Theocharidou A, Bakopoulou A, Kontonasaki E, Papachristou E, Hadjichristou C, Bousnaki M, Theodorou G, Papadopoulou L, Kantiranis N, Paraskevopoulos K, Koidis P. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg-based bioceramic scaffolds under low-level laser treatment. *Lasers Med Sci.* 2017; 32: 201-210.

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.

Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol.* 2008 Jan; 53(1): 9–13.

Turner CH. Dentin Matrix Protein 1 (DMP-1). *J Musc Neur Int.* 2007; 7(4): 306- 7.
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.

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.

Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998; 16: 159-165.

Yamamoto R, Oida S, Yamakoshi Y. Dentin Sialophosphoprotein–derived Proteins in the Dental Pulp. *J Dent Res.* 2015 Aug; 94(8): 1120-7.

Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. Cooperative Effects of FGF-2 and VEGF-A in Periodontal Ligament cells. *J Dent Res.* 2014; 93(1): 89-95.

Yang LC, Tsai CH, Huang FM, Su YF, Lai CC, Liu CM, Chang YC. Induction of vascular endothelial growth factor expression in human pulp fibroblasts stimulated with black-pigmented *Bacteroides*. *Int Endod J.* 2004; 37: 588–592.

Ye L, MacDougall M, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of Dentin Matrix Protein-1 Leads to a Partial Failure of Maturation of Predentin into Dentin, Hypomineralization, and Expanded Cavities of Pulp and Root Canal during Postnatal Tooth Development. *J Biol Chem.* 2004 April; 279(18): 19141–19148.

Referências

Yun Y-R, Kim H-W, Kangd W, Jeond E, Leed S, Lee H-Y, Kim C-H, Jangd J-H. Expression and purification recombinant human dentin sialoprotein in Escherichia coli and its effects on human dental pulp cells. *Protein Expr Purif.* 2012 May; 83(1): 47–51.

Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ACG, Barboza CAG. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cell. *Lasers Med Sci.* 2015; 30: 2259–2264.

Zhang J, Liu X, Yu W, Zhang Y, Shi C, Ni S, Liu Q, Li X, Sun Y, Zheng C, Sun H. Effects of human vascular endothelial growth factor on reparative dentin formation. *Mol Med Rep.* 2016; 13: 705-712.

Referências

Anexos

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2 em células derivadas da polpa de dentes decíduos após o uso do Laser de Baixa Intensidade

Pesquisador: Mariel Tavares de Oliveira Prado

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53785716.6.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.463.024

Apresentação do Projeto:

O projeto faz parte de uma linha de pesquisa consolidada da orientadora, com o intuito de se investigar o uso de laser de baixa intensidade na Odontologia/ Odontopediatria. Neste projeto a investigação visará a analisar a densiometria e as reações observadas por meio desta aplicação em células provindas de uma polpa decídua por meio das expressões gênicas e a cinética da expressão de proteínas.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos foram apresentados de forma clara e fundamentada: O objetivo do presente projeto será avaliar o efeito de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade na viabilidade celular de fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos humanos; na expressão gênica de RNAm para DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2; na cinética de expressão das proteínas DMP-1, DSPP, VEGF e FGF2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos foram claramente apresentados em todos os documentos em que deveriam constar:

Não há o risco direto pelo uso de células. Entretanto, o sigilo é assegurado em todas as etapas e a autorização de uso será obtida por meio de um novo TCLE assinado, embora a coleta da polpa dentária decídua já esteja armazenado sob responsabilidade de orientadora (CAAE).

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 1.463.024

49806215.6.0000.5417).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trará informações a respeito da aplicação de laser de baixa intensidade em tecido pulpar, no intuito de se investigar as diferentes densimetrias, visto que não há padronização a este respeito e as implicações celulares. O projeto está bem definido e bem apresentado, com potencial de contribuição científica e sem riscos éticos da forma apresentada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados, com exceção de:

- Termo de outorga do auxílio de pesquisa
- Folha de rosto constando a informação da FAPESP como patrocinador
- Termo de aquiescência do laboratório de Farmacologia

Recomendações:

Cuidado na qualidade dos documentos escaneados

Acertar os termos obrigatórios como mencionado acima.

Desta forma, recomenda-se submeter uma notificação para acertar as considerações documentais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os termos obrigatórios foram apresentados, com exceção de:

- Termo de outorga do auxílio de pesquisa
- Folha de rosto constando a informação da FAPESP como patrocinador
- Termo de aquiescência do laboratório de Farmacologia

Desta forma, recomenda-se submeter uma notificação para acertar as considerações documentais.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 16.03.2016, 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, se pertinentes.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP**

Continuação do Parecer: 1.463.024

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_621118.pdf	24/02/2016 23:17:56		Aceito
Outros	QuestionarioTecnicoPesquisador.pdf	24/02/2016 23:16:08	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	24/02/2016 17:03:41	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoCompromissoPesquisadorResultadosPesquisa.pdf	24/02/2016 17:02:18	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Outros	Carta_de_Encaminhamento_Termo_de_Aquiescencia_2016.pdf	24/02/2016 17:01:47	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	24/02/2016 17:00:25	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	24/02/2016 16:59:57	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 23 de Março de 2016

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva
Área Departamental de Odontopediatria

Página 1 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vimos por meio desta dar informações e convidá-lo (a) a participar da pesquisa "EXPRESSÃO DE DMP-1, DSPP, VEGF E FGF2 EM CÉLULAS DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS APÓS O USO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE". Este estudo tem como objetivo aplicar o Laser de Baixa Intensidade em células humanas provenientes do tecido pulpar de dentes decíduos, visando avaliar sua ação nestas células.

Para realização deste trabalho, serão utilizadas as células anteriormente obtidas e já doadas, armazenadas no Biorrepositório de células da Faculdade de Odontologia de Bauru, aprovado conforme a resolução da CNS n.411/2011 no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos desta Faculdade sob o número CAAE 49806215.6.0000.5417.

As células armazenadas no Biorrepositório estão sob a responsabilidade da Faculdade de Odontologia de Bauru, com o gerenciamento da Profa. Dra. Thais Marchini de Oliveira Valarelli. O material biológico coletado e armazenado no biorrepositório poderá ser utilizado em outras pesquisas autorizadas pelo Comitê de Ética desta instituição. Sendo assim viemos por meio deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido solicitar nova autorização para o uso do material biológico anteriormente doado e armazenado no Biorrepositório.

Não há riscos para o participante em ter seu material biológico reutilizado a partir do Biorrepositório, uma vez que continuará sendo mantido sigilo e privacidade do participante da pesquisa durante todas as suas etapas. O uso do Biorrepositório evitará futuras intervenções cirúrgicas e obtenção de novas amostras de material biológico, visto que esse material já foi obtido e está armazenado para o uso em outras pesquisas quando sob ciência e consentimento do doador.

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, pelo mesmo e pelo pesquisador.

Em casos de dúvidas ou qualquer esclarecimento sobre os procedimentos realizados, o responsável deverá entrar em contato com a Departamento de Odontopediatria da Universidade de São Paulo pelo telefone (14) 3235-8225, ou entrar em contato com a pesquisadora Mariel Tavares de Oliveira Prado Bergamo, através do telefone (14)99692-3070.

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)

Débora da Silva Santos Garber

portador da cédula de identidade 48786892-4, responsável pelo(a) menor

Luiz Henrique da Silva Santos Garber, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente da reutilização do material biológico doado anteriormente e armazenado no Biorrepositório, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando que o material biológico doado ao Biorrepositório seja reutilizado na pesquisa proposta. Fica claro que o responsável pelo sujeito da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e fazer com que o material biológico deixe de ser utilizado nesta pesquisa e está ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa:

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Página 2 de 2

Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva
Área Departamental de Odontopediatria

confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica). Por fim, como pesquisador 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 igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, 15 de junho de 2016.

Assinatura do Pai/Responsável pelo menor

Nome/Assinatura do Pesquisadora

Nome do pesquisador Responsável: Mariel Tavares de Oliveira Prado Bergamo
Telefone: (014) 99692-3070 e-mail: mariel.prado@usp.br
Endereço Institucional: Alameda Otávio Pinheiro Brisolla 9-70
Disciplina de Odontopediatria
Cidade: Bauru Estado: SP CEP: 17012-901

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, organizado e criado pela FOB-USP, em 29/06/98 (Portaria GD/0698/FOB), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:

Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira, no horário das 14hs às 17 horas, em dias úteis.

Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75

Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901

Telefone/FAX (14) 3235-8356 - e-mail: cep@fob.usp.br