UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MATHEUS VÖLZ CARDOSO

**Efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da
granulação óssea**

BAURU
2017

MATHEUS VÖLZ CARDOSO

**Efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da
granulação óssea**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral, linha de pesquisa em Periodontia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Carla Andreotti Damante

BAURU

2017

Cardoso, Matheus Völz

C179e

Efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da granulação óssea / Matheus Völz Cardoso. – Bauru, 2017.

137 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Carla Andreotti Damante

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

NÃO SE APLICA

Folha de aprovação

DADOS CURRICULARES

Nascimento	1º de julho de 1991
Naturalidade	Santa Rosa-RS
Filiação	Celso Cardoso Eliane Völz Cardoso
2011-2015	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
2011-2014	Projeto de extensão de Aumento de Coroa Clínica (PROJACC) (FO/UFPel).
2012	Presidente 50ª Semana Acadêmica Odontológica, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
2013-2014	Centros de Atenção Psicossociais de Pelotas/RS (FO/UFPel).
2013	Projeto de extensão Atenção Odontológica materno infantil (FO/UFPel).
2014-2015	Bolsista no Programa de Educação pelo Trabalho em Saúde/Pró-PET Saúde Pelotas UFPel e UCPel (Ministérios da Educação e Saúde)
2013-2014	Projeto de extensão reparo de próteses parciais e totais (FO/UFPel).

2014	Projeto de extensão Núcleo de estudos e tratamentos dos traumatismos alvéolo dentários na dentição decídua (NETRAD) (FO/UFPel).
2015-2016	Projeto de extensão Clínica de Cirurgia Plástica Periodontal (CPP) (FOB/USP).
2015-2016	Aperfeiçoamento em Implantodontia (Straumann) FUNBEO.
2015-2017	Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, Área de concentração Reabilitação Oral com linha de pesquisa em Periodontia, como bolsista CNPq.

DEDICATÓRIA

*De forma póstuma à memória ao meu Avô Elemar Völz, o
que sou e o que sei hoje é graças aos esforços, o convívio,
os ensinamentos e a sabedoria que me passasse de forma
brilhante.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Celso e Eliane. Que me proporcionaram tranquilidade para seguir nos estudos e realizar o sonho de cursar uma pós-graduação. Agradeço a educação e aos ensinamentos proporcionados por vocês, a ajuda em diferentes momentos, e ao entendimento que a distância entre nós é necessária, devido a essa progressão, além de profissional também pessoal. A minha avó Selí pelas conversas, histórias e quando juntos, os chimarrões que tomamos, sempre conversando e relembrando fatos e eventos em que estivemos muito felizes, a Sr.^a é também muito responsável por tudo o que conquistei até hoje, teu apoio e confiança também me ajudaram a chegar até aqui, e por isso sou muito grato.

Ao meu avô Elemar, que mesmo tendo pouco estudo, foi o melhor professor da escola da vida que já tive. Todo seu conhecimento, sabedoria e calma permanecem conosco, nos reconfortando. Além dos momentos infinitamente bons em que estivemos juntos. Obrigado por acreditar em mim e me dar força desde sempre, um dia iremos nos reencontrar.

À Gabi, minha companheira em todos os momentos. Agradeço pela tua paciência, carinho e amor entregues. Se não fossem os teus incentivos, as tuas injeções de ânimo, com certeza não conseguiria ter iniciado esse ciclo que estamos ultrapassando. Obrigado por me dar apoio incondicional e prestar a prova do mestrado, mesmo sabendo que teríamos que enfrentar a distância e outras dificuldades, isso demonstra o quanto tu me conheces, acredita e me apoia nessas novas conquistas. Saiba que também por isso, além de tudo que já vivemos e passamos juntos eu te amo e tenho muito respeito e carinho por ti. Hoje não vivemos todos os dias do ano um ao lado do outro fisicamente, mas em pensamento estamos sempre conectados, enfrentando a realidade e dificuldades diárias, nos apoiando nesses momentos e sabendo que este espaço de tempo é transitório. Logo vamos poder desfrutar do convívio diário

novamente. Por tudo isso agradeço imensamente a força, luz e paz que tu trazes através de palavras, incentivos e carinho. Te amo muito!

A toda família Lamas, pessoas que tive o prazer de conhecer e que me acolheram de forma amável. Tenho muito carinho, respeito e admiração por todos. Obrigado pelo incansável apoio e por se importarem comigo. Agradeço de forma especial ao Vô Roberto, Vô Albina, Vô Nely, Joaquim e Denise, graças a todos os momentos, aos reconfortos e ajudas. Bem como ao Roberto Jr., Samira, Loiva (Neca), Elto, Leandro e Luana, todos vocês espalham muitas vibrações favoráveis, além de serem exemplos de pessoas muito boas.

Ao meu irmão e colega de profissão, Willian e também à Kelly, obrigado por acreditarem e me apoiarem nessa jornada.

Aos colegas e bons amigos da Faculdade de Odontologia de Pelotas, Maíke, Henrique, Camila, Carianne e Renan. Obrigado pela amizade e pelos bons e memoráveis momentos durante a graduação. Ao grande professor e amigo, Dr.º José Antônio Mesquita Damé, obrigado pelos inúmeros ensinamentos, incentivos e ajuda. Tu és um grande exemplo de profissional, que serve de espelho a muitos alunos, obrigado!

As minhas colegas de mestrado: Ísis, Giovana e Erika. Vocês são muito importantes nessa caminhada em busca do conhecimento. Agradeço por tudo que passamos juntos, em seminários, clínicas aprimorando nossos conceitos, saberes e melhorando como profissionais. Obrigado pelos momentos alegres e por serem boas ouvintes nos momentos de angústia e dificuldade. Aprendi e sigo aprendendo muito com vocês.

Giovana, obrigado pela ajuda nos plaqueamentos dos experimentos no laboratório, além dos artigos que redigimos juntos, pude aprender muito contigo nesses momentos.

Aos colegas de pós-graduação Andreia, Bruna, Gustavo, Luísa, Paula Cunha, Paula Karam, Rafael (Poma), Raphaella, Vítor. Todos são muito importantes, e mesmo sem saber através de conversas, brincadeiras, ideias, foram muito acolhedores e ajudaram no transcorrer do dia a dia. Além dos inúmeros ensinamentos e conhecimentos que absorvi a partir de cada um. Tenho muito carinho por todos e desejo muitas felicidades e virtudes naquilo em que vocês estiverem elaborando.

À Raphaella, obrigado por me ensinar inúmeros conceitos e práticas na cultura celular, por ter disponibilizado a tua pesquisa para que eu aprendesse. Além da ajuda prontamente dispensada em toda a minha pesquisa. Agradeço também pelas conversas, ensinamentos gerais e risos.

À Paula Karam, por teres me ensinado tudo o que sabes em cultura de células, a tua ajuda além de muito valiosa proporcionou a execução desse trabalho.

À Bruna, tenho extinta admiração pela professora, profissional, clínica e pessoa que és. Obrigado pelos ensinamentos em diferentes áreas, por ter me proporcionado a realização de procedimentos clínicos complexos. Além da extrema ajuda laboratorial, sem a tua participação esse trabalho seria muito mais difícil.

Aos demais colegas de pós-graduação, obrigado pelos bons momentos.

Aos funcionários da disciplina de Periodontia, pela atenção, disposição e presteza.

Asascleide Vital (Cleidinha), Marcela Maria Pereira e Marcos Antonio de Godoy (Marcão), obrigado por estarem sempre ajudando em diversos momentos.

À Edilaine Lúcio R. Torrencilha, obrigado pela atenção nas atividades clínicas e com os prontuários dos pacientes, pelas conversas animadas e ajuda com a localização de diversos lugares aqui na cidade.

À Ivânia Komatsu da Costa Arruda, pelo tempo dispensado em ajudar. Imagino que tudo que fazas é pensando no bem, na intenção de nos tornarmos melhores do que quando chegamos. Pode ter certeza que essa qualidade que tens, de identificar problemas ou defeitos e falar olhando no olho da pessoa é muito valiosa. Algum dia tudo isso não será mais preciso, graças aos teus conselhos. És uma pessoa com um grande coração, obrigado.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, obrigado por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores da Disciplina de Periodontia FOB/USP:

À Professora Dr.^a Adriana, és um exemplo de conciliação de múltiplas tarefas, e consegues fazer-las todas muito bem. Obrigado pela ajuda na cultura celular, pela doação da linhagem empregue nesse estudo. Pelos muitos ensinamentos prestados em clínica, seminários e aulas.

À Professora Dr.^a Maria Lucia (Malu), obrigado pelas críticas construtivas ao longo de todo o mestrado, certamente graças ao seu olhar pude ampliar minha visão sobre muitos conceitos e com isso aprender muito.

À Professora Dr.^a Mariana, obrigado por acreditar e confiar em mim dispondo atividades sob minha responsabilidade, visando o aprimoramento do aprendizado. Pelas reuniões em que aprendi mais do que qualquer livro, aula ou seminário que tivesse entrado em contato, os momentos de discussão foram muito importantes para o meu amadurecimento acadêmico. A senhora é um espelho

de profissionalismo, extremamente dedicada e sabia naquilo que se propõem, é uma honra poder ter trabalhado em diferentes projetos na tua companhia.

Ao Professor Dr.^o Sebastião, pelos conselhos, histórias e conhecimento passados desde conversas informais, seminários, aulas e ambiente clínico. Os seus ensinamentos são muito ricos e expõem uma carreira brilhante. Obrigado pelos momentos de brincadeiras e descontração.

Agradeço de forma especial a Professora Dr.^a Carla, que me orientou, confiando na minha capacidade de poder desenvolver esse projeto de pesquisa. A Sr.^a me fez conhecer e estudar novos campos, o trabalho em cultura celular, estudo das fototerapias, além das disciplinas em que pude enriquecer a capacidade de desenvolver assuntos de forma crítica. Tendo participação na ampliação do meu conhecimento científico e clínico, além de estimular o hábito de ensinar, sempre que proporcionou situações em que me deixará como preceptor de cirurgias nas clínicas da graduação ou no ensino do uso do laser e LED. Obrigado pelo voto de confiança e atenção dispensada de forma incansável além da compreensão e paciência em diversos momentos. A senhora é um exemplo de profissional bem-sucedida e que batalha diariamente em busca dos seus desejos, certamente sobre o que já conversamos, vou levar uma bagagem muito grande de tudo que me proporcionou ao me auxiliar na busca dessa conquista. Mais uma vez obrigado, sou muito grato por tudo isso!

Agradeço também aos demais professores da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP), pelos momentos de aprendizagem e enriquecimento do conhecimento.

Ao Professor Dr.^o Rodrigo, do departamento de Bioquímica, graças a sua parceria com a Prof.^a Carla, pudemos realizar todo esse projeto no laboratório. Sem contar das inúmeras vezes em que contribuiu visando favorecer a execução dos ensaios. Pelos seus ensinamentos, ajuda e tempo dispensado com esse trabalho muito obrigado.

Aos funcionários do CIP, Rafaela e Marcelo, e da bioquímica, Thelma obrigado pela prestação de ajuda, conversas, paciência e compreensão em inúmeros momentos.

Aos pós-graduandos da disciplina de bioquímica, principalmente a Cíntia, Adriana e Flávia, que estiveram sempre e prontamente ativas para ajudar. Obrigado por repartirem comigo os conhecimentos que possuem, e passarem longos períodos me auxiliando em metodologias, preparo de soluções e substâncias e também na realização dos ensaios. Especialmente a Cíntia, que não mediu esforços para ajudar em diversos momentos, agradeço por todas as tuas contribuições.

À professora Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado pelo empréstimo do protótipo do LED para o uso nessa pesquisa.

Aos professores da disciplina de bioestatística Dr.^o Heitor Marques Honório e o Prof. Dr.^o José Roberto Pereira Lauris, pelos ensinamentos e contribuições na realização e supervisão da análise estatística desse trabalho.

Aos pacientes que buscaram tratamento na clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, obrigado pela confiança que dispensaram sob mim ao permitir que os atendessem. Vou levar um pouco de cada um comigo, nas conversas em que tivemos rapidamente entre os procedimentos que realizamos. Obrigado e foi uma honra conhece-los e poder contribuir modificando diversas condições apresentadas.

Agradeço a toda ajuda recebida por pessoas de luz, Amílton e Beth Lamas, Roberto Jr. e Samira Lamas, Carlos Augusto (Guga) e Helena. Vocês são exemplos de bondade, almas caridosas que não medem esforços para trazer a paz espiritual, obrigado a todos.

Agradeço ainda a equipe médica e de enfermagem da ala de cirurgia geral do Hospital de Base de Bauru, que recentemente conheci e fui tratado de forma extremamente salutar, a todos vocês muito obrigado, o apoio que tive em um momento de moléstia foi incomensurável. Além das boas conversas e do prazer de ter conhecido o Sr. Darcí e Sr. Benedito.

Por fim a todos que participaram dessa importante fase da minha vida, de alguma forma seja por palavras, risos, histórias, passagens rápidas ou não. Obrigado pela alegria dispensada.

"Happiness is only real when shared"

Christopher McCandless - Into the Wild

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À esta Faculdade, em nome da diretora Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado e ao vice-diretor Prof. Dr.^o Carlos Ferreira dos Santos, por disponibilizar e fornecerem a melhor estrutura possível.

Ao Prof. Dr.^o Guilherme Janson, presidente da Comissão de Pós-Graduação por todo auxílio e atenção dispensada.

Ao Prof. Dr.^o Paulo Cesar Rodrigues Conti, chefe do departamento de Prótese, por toda ajuda prestada.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela disponibilidade da bolsa de estudo (processo 134188/2015-2).

*“Se as coisas são inatingíveis...ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a mágica presença das estrelas! ”*

Das Utopias

Mario Quintana

RESUMO

Cardoso MV. Efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da granulação óssea [dissertação]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2017.

A fotobioestimulação por laser e LED é uma tendência terapêutica inovadora e não invasiva. Os efeitos fotofísicos e fotoquímicos dessa terapia geram imunomodulação, aceleram a cicatrização e angiogênese, bem como reduzem a dor. Dessa forma tem-se buscado o emprego desses estímulos no tecido ósseo, porém ainda inexistem padrões definidos para obter a melhor fotobioestimulação nas células ósseas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade da fotobioestimulação na viabilidade celular e mineralização de células da granulação óssea de ratos (rGO). Células rGO na 6ª passagem foram plaqueadas em placas de 96 poços para os ensaios de viabilidade celular (1×10^3) e em placas de 24 poços para os ensaios de cicatrização de feridas *in vitro* (1×10^4), mineralização e atividade da fosfatase alcalina (FALC) (4×10^4). As células receberam DMEM (10% SFB) e irradiações com laser (AlGaAs-660nm e AlGaInP-810nm) e LED (637 ± 15 nm). Os grupos experimentais foram: laser vermelho (3 e 5 J/cm²), laser infravermelho (3 e 5 J/cm²) e LED (3 e 5s), além dos grupos controles, positivo (C+) e negativo (C-, 1%SFB). Para os ensaios de mineralização e atividade de fosfatase alcalina, além do meio convencional, grupos com meio osteogênico e os mesmos tratamentos luminosos foram acrescentados. A viabilidade celular foi avaliada pelos testes do MTT e cristal violeta nos períodos de 24, 48, 72 e 96h. O ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* foi avaliado por meio da porcentagem da área de fechamento da ferida nos períodos de 12, 24, 36, 48h. O teste de mineralização foi feito por meio do teste com vermelho de alizarina nos períodos de 14, 21 e 28 dias enquanto que a atividade da FALC foi medida em 7, 14 e 21 dias. A análise estatística foi realizada através dos testes ANOVA complementados por Tukey ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que as terapias com luz de maneira geral aumentaram a viabilidade o fechamento da ferida *in vitro*, principalmente os grupos laser vermelho e LED5s ($p < 0,05$). Pode-se observar um bom desempenho do grupo LED5s no ensaio de mineralização, onde nos grupos que receberam meio osteogênico houve um efeito somatório com a ação da

fotobioestimulação promovendo maior produção de nódulos *in vitro*. Também, as terapias com luz, estimularam a produção de nódulos mineralizados nos grupos que receberam meio convencional de forma a superar o C+ osteogênico ($p<0,05$), denotando uma ação de indução osteogênica a partir da fotobioestimulação. A fosfatase alcalina foi estimulada pelos tratamentos com luz no período de 7 dias ($p<0,05$). Em conclusão, as terapias com laser e LED foram capazes de estimular a viabilidade e migração celular e eventos de mineralização em osteoblastos, sendo que o laser vermelho e LED promoveram os melhores resultados.

Palavras-chave: Bioestimulação a Laser. Cultura Primária de Células. Osteoblastos.

ABSTRACT

Cardoso MV. Photobiomodulation effects by laser and LED in osseous granulation cells [Master Dissertation]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2017.

Photobiomodulation by laser and LED is a new therapeutic non-invasive trend. Photophysical and photochemical effects occur in immunomodulation, acceleration of wound healing and angiogenesis and reduction of pain. These effects are desired in bone tissue but there are no defined parameters for light irradiation and no consensus for the best effect on osseous cells. The aim of this study was to evaluate photobiomodulation effects on cell viability and mineralization events of rat osseous granulation cells (rGO). Cells in 6th passage were plated in 96-well plates for viability tests (1×10^3 cells), and 24-well plates for *in vitro* wound healing test (1×10^4 cells), mineralization and alkaline phosphatases (AF) activity (4×10^4 cells). Cells were cultured in DMEM (10% bovine fetal serum) and irradiation with lasers (AlGaAs-660nm e AlGaInP-810nm) and LED (637 ± 15 nm). Experimental groups were red laser (3 and 5 J/cm²), infrared laser (3 and 5 J/cm²), LED (3 and 5s), positive(C+) and negative controls (C-, 1% bovine fetal serum). For mineralization and AF assays, other groups with osteogenic medium and same light treatments were added. Cell viability was evaluated by MTT and crystal violet tests at 24, 48, 72 and 96h. *In vitro* wound healing test evaluated the percentage of wound closure area by cells migration at 12, 24, 36, 48h. Mineralization test was done by alizarin red at 14, 21 and 28 days. AF activity was measured at 7, 14 and 21 days. Statistical analysis was performed by ANOVA complemented by Tukey's test ($p < 0,05$). Results showed that light therapies in general increased viability and wound healing closure, mostly red laser and LED5s ($p < 0,05$). Best results in mineralization stimulation were observed for LED5s. In groups with osteogenic medium, a synergistic effect of photobiomodulation resulted in higher numbers of mineral nodules. Light groups stimulated higher mineral nodule formation than positive control ($p > 0.05$) even in groups with regular medium, showing an osteogenic induction by light. Increased AF activity was observed at 7 days in light treatment groups ($p < 0,05$). In conclusion, laser and LED photobiostimulation increased

viability, cell migration and mineralization events in osteoblasts with best results for red laser and LED.

Keywords: Low-Level Light Therapy. Primary Cell Culture. Osteoblasts. Photomodulation

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
AE	Atividade Enzimática
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea 2
CV	Cristal Violeta
DE	Densidade de Energia
DMEM	Meio de Cultura Celular de Eagle Modificado
DO	Densidade Óptica
DP	Densidade de Potência
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
Er: YAG:	Laser sólido de Érbio granada
FALC	Fosfatase Alcalina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo
g	grama
GaAlAs:	Laser diodo arseneto de gálio e alumínio
GaAs:	Laser diodo arsetento de gálio
GO	Células da Granulação Óssea
h	horas
He:Ne	Laser gasoso de Hélio Neônio
InGaAlP:	Laser diodo índio gálio alumínio e fosforo
IV	Infravermelho
J	Joule
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
LASER	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LED	Diodo Emissor de Luz
LIV	Laser Infravermelho
LV	Laser Vermelho
MC3T3	Células imortalizadas derivadas de rato
mg	miligrama

MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio
mW	mili Watts
mW/cm ²	mili Watts por centímetro quadrado
Na/K	sódio e potássio
Nd:YAG:	Laser sólido de Neodímio granada
nm	nanômetros
ost	Osteogênico
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
PDGFββ	Fatores de crescimento derivados de plaquetas
pH	Potencial Hidrogeniônico
pNP	p-nitrofenol
pNPP	p-nitrofenilfosfato
reg	Regular
rGO	Células da granulação óssea derivadas de rato
rhBMP-2	Proteína morfogenética óssea 2 recombinante humana
s	segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Temperatura Ambiente
TGF β1	Fator de transformação do crescimento beta
UE	Unidade Enzimática
V	Vermelho
VA	Vermelho de Alizarina

LISTA DE SÍMBOLOS

λ	comprimento de onda
%	porcentagem
°	grau
ε	fator de correção
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	FOTOBIOESTIMULAÇÃO POR LASER E LED	29
2.2	O TECIDO ÓSSEO E OS EFEITOS E EVENTOS DA FOTOBIOESTIMULAÇÃO POR LASER E LED	35
2.3	FOTOBIOESTIMULAÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS ÓSSEAS.....	41
2.4	CÉLULAS DA GRANULAÇÃO ÓSSEA	52
3	PROPOSIÇÃO	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	ENSAIOS DE CURTA DURAÇÃO.....	61
4.1.1	TESTE DO MTT	65
4.1.2	TESTE DO CRISTAL VIOLETA.....	66
4.1.3	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E QUALITATIVA	66
4.1.4	ENSAIO DE “WOUND HEALING”	67
4.2	ENSAIOS DE LONGA DURAÇÃO	69
4.2.1	ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO (VERMELHO DE ALIZARINA)	70
4.2.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (FALC)	71
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5	RESULTADOS	75
5.1	ENSAIOS COLORIMÉTRICOS	77
5.1.1	MTT	77
5.1.2	CRISTAL VIOLETA	79
5.2	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E QUALITATIVA	80
5.3	ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS <i>IN VITRO</i> (WOUND HEALING).....	80
5.4	VERMELHO DE ALIZARINA (ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO)	83
5.5	FOSFATASE ALCALINA	87

6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS.....	125

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A terapia de fotobioestimulação por laser (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) e LED (diodo emissor de luz) tem sido bastante difundida atualmente (ROLA; DOROSZKO; DERKACZ, 2014; ANDERS; LANZAFAME; PRAVEEN, 2015). Em periodontia, essa terapêutica é creditada tomando como relação seu potencial de modular a inflamação e incrementar o reparo e cicatrização de feridas por estimulação de células e tecidos (PASSANEZI et al., 2015). A literatura tem mostrado resultados positivos na redução da hipersensibilidade dentinária após procedimentos de raspagem e alisamento periodontal (MELLO, 2001), e na cicatrização de feridas (AMORIM et al., 2006). Porém existem estudos em que a terapia laser não alterou da mesma forma a viabilidade em todas as células testadas (DAMANTE et al., 2009) demonstrando que a avaliação da forma com que o laser age sobre as células deve ser particularizada e estudada amplamente a fim de estabelecer protocolos clínicos efetivos.

Assim, frente aos diferentes resultados, cabe a análise das diversas e variadas características aplicadas para cada tipo de laser e LED, e seus parâmetros, buscando evidências das causas do sucesso e também de quando não houve correspondência ao esperado, pela terapia.

Alguns trabalhos visam explicar a biomodulação do laser nas células ósseas (COOMBE et al., 2001), objetivando conhecer melhor as características dessas células quando expostas a irradiação, além de incrementar o processo de reparo e cicatrização do tecido ósseo. Clinicamente, já foram observadas melhorias no tratamento de lesões de furca, extrações dentais, procedimentos regenerativos e reabilitadores como enxertos e implantes (PETRI et al., 2010; PETROV; TONCHEV, 2015). Apesar do sucesso alcançando em alguns trabalhos laboratoriais, em termos de proliferação e viabilidade celular (OZAWA et al., 1995; ARISU; TÜRKOZ; BALA, 2006; PAGIN et al., 2014) o mecanismo de ação do laser no tecido ósseo não está completamente explicado e conseqüentemente ainda não existem configurações e protocolos clínicos consensuais sobre qual o melhor laser a ser utilizado e também as características e configurações mais adequadas a serem empregadas (AMID et al., 2014).

Relato precursor que empregou a terapia laser em linhagem celular osteoblástica derivada de humanos foi o de Stein et al. (2005) (He-Ne, λ 632,8 nm, 10 mW, 180 mW/cm², 1s: 0,14; 3s: 0,43; 10s: 1,43 J/cm²; duas aplicações 24 e 48h após cultura inicial) observando a viabilidade e maturação de osteoblastos *in vitro*. Nesse trabalho foi comprovada a capacidade do laser em interagir com as células ósseas, sugestionando a possibilidade da fotobioestimulação incrementar o reparo ósseo também em humanos.

Em relação aos efeitos do laser em osteoblastos, os estudos têm mostrado resultados positivos no aumento na produção de fosfatase alcalina (STEIN et al., 2005, OZAWA et al., 1998), osteocalcina (OZAWA et al., 1998; KHADRA et al., 2005), osteopontina e sialoproteína óssea (STEIN et al., 2005). Há também, aumento expressivo na adesão e viabilidade dos osteoblastos (FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006) e produção de nódulos mineralizados (OZAWA et al., 1998; DÖRTBUDAK; HAAS; MALLATH-POKORNY, 2000; KHADRA et al., 2005). Ozawa et al. (1998), sugeriram que o laser induz a formação de nódulos mineralizados e a diferenciação de células imaturas da linhagem osteoblástica, porém esses efeitos podem não ser encontrados em células maduras. As pesquisas com LED são mais recentes e geralmente dispõem resultados similares aos encontrados com a aplicação laser, dadas as diferentes propriedades entre esses estímulos luminosos, ambos parecem estimular as células principalmente quando comparados sob os mesmos comprimentos de onda (SOUSA, 2008; ACIOLE, 2014; ROSA, 2014).

Um estudo, onde células tronco mesenquimais de rato foram irradiadas com LED, mostrou maior diferenciação em osteoblastos e produção de fosfatase alcalina (LI; LEU; WU, 2010), porém esses efeitos não foram comparados com os da irradiação com laser. Em trabalho anterior, da disciplina de Periodontia da FOB, o laser em baixa intensidade foi comparado ao LED em relação ao estímulo da viabilidade celular e produção de fosfatase alcalina por pré-osteoblastos MC3T3 (PAGIN et al., 2014). A viabilidade celular foi aumentada em 3,6 vezes pelo LED, 6,8 vezes pelo laser vermelho (3J/cm²) e 10 vezes pelo laser vermelho (5J/cm²) no período de 7 dias. Porém não houve diferenças na produção de fosfatase alcalina por essas células.

As células de granulação óssea (GO), derivadas de humanos, apresentam fatores de crescimento em potencial, podendo conter células ósseas em vários

estágios de maturação, uma vez que são coletadas de alvéolos 21 a 28 dias após exodontia. A junção dos resultados obtidos nos trabalhos clínico e histológico de Passanezi et al. (1989), Sant'Ana et al. (2012) com o de Barbosa (2012), estipula que essas células possuem plasticidade celular equiparáveis as células tronco mesenquimais, suportadas pelo fato de terem dado origem a pelo menos três tecidos distintos o osso alveolar, cimento e ligamento periodontal. Devido a sua grande viabilidade celular, apresentam efeitos proliferativos compatíveis com células de alta atividade metabólica. Outro trabalho (MEDINA-VALDÍVIA, 2013), avaliou o comportamento mineralizador dessas células. A produção de fosfatase alcalina foi semelhante para as células tratadas em meio convencional e osteogênico. A atividade de mineralização e deposição de cálcio foi semelhante aos 7 dias e maior aos 14 e 21 dias para as células tratadas com meio osteogênico. Esse estudo demonstrou que, mesmo sem a indução de um meio osteogênico, essas células têm alta capacidade de mineralização.

Dessa forma, estudos com células da granulação tem importância devido a sua distinção e composição por osteoblastos em vários estágios de maturação. Sua utilização e aplicação em âmbito clínico, associada à fotobioestimulação por laser de baixa potência ou LED, pode ter resultados promissores no tratamento com enxertos e incremento do reparo ósseo, modulação da inflamação e redução do edema.

Baseados nesse *background*, e principalmente, pela falta de estabelecimento de protocolos de aplicação da fotobioestimulação, o presente estudo visa testar variados parâmetros de aplicação do laser em baixa intensidade e o LED, a fim de observar aumento na viabilidade celular e indução de eventos de mineralização nessas células.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fotobioestimulação por Laser e LED

A luz é uma entidade quântica de característica dual, que se propaga no vácuo tanto como onda quanto como partícula, por intervalos (comprimentos de onda: λ) dentro do espaço e tempo. As ondas possuem a responsabilidade de propagação e as partículas tem importância na interação com a matéria. A principal parte corpuscular que interage com a matéria é o fóton e, quando isso ocorre, é entregue em pacotes de energia, que excitam os elétrons da superfície alvo e acabam sendo substituídos por fótons ativados. Esses são derivados do estímulo luminoso e a energia molecular final permanece constante (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2012). Essas partículas ativas são responsáveis por desencadear efeitos endógenos em diferentes organelas celulares, onde se supõem que haja o aumento da energia produzida, a partir da interação mitocondrial e estímulo da secreção de componentes ativos intracelulares (GENOVESE, 2000).

Recentemente a denominação das terapias ópticas sob células e tecidos foi alterada, à título de padronização científica dos termos empregados (ANDERS; LANZAFAME; PRAVEEN, 2015), visando facilitar a comunicação entre os trabalhos realizados em todo o mundo. Assim o nome “terapia de fotobioestimulação” é baseado na aplicação dos estímulos ópticos gerando efeitos terapêuticos, tanto fotofísicos quanto fotoquímicos, em partículas celulares endógenas (cromóforos), sem a geração de calor (DESMET et al., 2006). A partir disso são observáveis efeitos na viabilidade e atividade celular, promovendo a modulação da inflamação, alívio da dor, incremento da angiogênese, no reparo e cicatrização de feridas (REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 2001; WOODRUFF et al., 2004).

Os cromóforos, são moléculas fotoabsorvedoras. Para a luz visível, possuem uma diferença de energia entre os elétrons em dois orbitais moleculares diferentes, o que coincide com energia do fóton dentro do espectro visível. As principais partículas que podem se comportar como fotoabsorvedoras são a citocromo C oxidase (λ compatível ao infravermelho próximo), flavoproteínas e as porfirinas fotoativas (KUSHIBIKI et al., 2015; de FREITAS; HAMBLIN, 2016), essas sustentam

a hipótese do oxigênio singleto. Especificamente nesses casos há a suposição de que na interação com estímulos de baixa densidade de energia, essas moléculas tendem a ser estimulantes. Já a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) utiliza-se dessas mesmas moléculas ativadas, porém sob altas densidades de energia e assim tem-se características citotóxicas desenvolvidas (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2012)

Dentre os diferentes espectros da luz, o vermelho (λ 400 a $\cong$ 700 nm) e o infravermelho próximo (λ 630 a 1000 nm), são os mais empregados nos dispositivos para a fotobioestimulação. Cada um desses espectros interage com diferentes organelas. O mecanismo de ação do laser que opera na luz visível (vermelho) promove ação fotoquímica na cadeia redox da mitocôndria, culminando na estimulação da produção de energia. Já a luz infravermelha ativa a membrana celular (canais de Na/K) liberando cálcio para o citoplasma, que participa do estímulo na proliferação e diferenciação celular ou na síntese de proteínas (KARU, 1990; SMITH et al., 1992).

Os dispositivos ópticos (laser e LED) possuem uma série de meios de ativação (AsGa, AsGaAl, AlGaInP, que são diodos semicondutores), é desses que surgem os pacotes de energia, por meio dos fótons estimulados, entregues na interação com células e tecidos (NEVES et al., 2005). Essas moléculas podem promover, por excitação, a emissão de outros fótons ou amplificar o fóton inicial emitido, gerando assim radiação coerente e não ionizante (ENWEMEKA et al., 2004).

Porém, a coerência acaba sendo perdida conforme o estímulo luminoso interage com os tecidos. Se aplicados sob a pele, essa característica se perde já nas primeiras camadas (KARU, 1999; SMITH, 2005), mas não há perda do seu efeito estimulante. Mesmo conhecendo puramente as características ópticas do tecido alvo, não se torna capaz prever precisamente quão distante o fóton irá se propagar antes de gerar algum tipo de interação. Isso se dá devido ao mecanismo das radiações não ionizantes, onde a interação com a matéria varia de acordo ao comprimento de onda incidente e com as características ópticas teciduais (heterogêneas e muito complexas). Assim é extremamente dificultoso emoldurar todas as possíveis interações e trajetórias dos fótons e o valor máximo da densidade de energia intrateciduals.

A terapia de fotobioestimulação pode ser realizada tanto por dispositivos laser em baixa potência quanto por LED, e isso se deve principalmente a observação

de que a coerência não é a principal responsável pelos efeitos do laser (KARU, 1999; SMITH, 2005). Dessa forma, a luz derivada dos dispositivos LED, que são não coerentes, também passou a ter a sua utilização pesquisada da mesma forma que a terapia por laser (SOUSA, 2008; ACIOLE, 2014; ROSA, 2014). Assim, existe a consideração que hajam efeitos bioestimulatórios semelhantes gerados nas partículas em nível celular, pelo laser e LED, quando comparados sob os mesmos comprimentos de onda (WHELAN et al., 2002; CORTI, et al. 2006; SOUSA et al., 2010).

Fisicamente existem diferenças em relação aos principais geradores de estímulos luminosos. O laser possui uma emissão estimulada e amplificada de radiação, além de ser monocromático (emissão de fótons sempre sob o mesmo comprimento de onda) sendo assim uma fonte de luz marcadamente coerente (KARU, 2003). Possui ainda o efeito de colimação ou pouca divergência, se propagando espacialmente de forma bastante linear (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2012), possibilitando seu uso como instrumento de precisão para realização de medidas e até mesmo miras de instrumentos bélicos.

Já o LED é um dispositivo de emissão espontânea de radiação luminosa não coerente e não colimado (TUNER; HODE, 2004). É policromático (verde, laranja, vermelho, infravermelho próximo e azul), mas passível de ser configurado como monocromático, e é isso que ocorre nos dispositivos que propõem a utilizar essa fonte de radiação não ionizante para fins terapêuticos.

Em relação aos parâmetros de irradiação, muita divergência é encontrada e isso repercute nas pesquisas, uma vez que a definição de protocolos é uma busca constante e intermitente nos centros de pesquisas mundiais. Esse é um aspecto muito complexo de ser elaborado também devido as características do tecido alvo e as múltiplas interações que ocorrem nesses cenários. As principais configurações nos dispositivos são potência, o comprimento de onda, o tempo total de irradiação e a densidade de energia emitida para o alvo (SOMMER et al., 2001). Devido a variação existente é possível que os efeitos terapêuticos quando testados clinicamente sejam inexpressivos ou pouco aparentes. Assim, pesquisas básicas em ambientes controlados tem importância na delimitação dos efeitos e observação das respostas celulares.

Embora existam relatos da utilização da fotobioestimulação para cicatrização de feridas em tecido mole (SOUSA, 2008), e também em tecidos duros

(PINHEIRO et al., 2013) não há consenso e deliberação dos parâmetros ótimos de irradiação em relação aos efeitos das fototerapias em tecido ósseo. Esse é um importante nicho de pesquisas, uma vez que o incremento do reparo ósseo por laser ou LED é bastante promissor e poderá vir a facilitar condições de osteoporose, distúrbios metabólicos (diabetes mellitus), regenerações alveolares pós extrações, para fins periodontais ou implantares, reconstruções alveolares e regeneração óssea guiada e ainda em associação a diferentes tipos de enxertos, entre outros cenários médicos possíveis.

Apesar de muitos estudos já serem realizados em ambientes clínicos ou *in vivo*, esses ocorrem centrados em procedimentos ou áreas específicas, assim um maior número de estudos em condições controladas deve ser realizado para que se possa elencar e observar mais estreitamente os efeitos gerados e possíveis sob o emprego de cada protocolo de irradiação testado, em situações específicas.

Importante observar que em cenários controlados em pesquisas *in vivo* em cobaias ou *in vitro*, como na cultura celular, muitas vezes adaptações devem ser realizadas para viabilizar a execução dos ensaios propostos. Mas apesar disso, esses trabalhos vinculam um embasamento bastante representativo na eficácia ou não dos parâmetros eleitos nas unidades básicas funcionais do organismo e tem importante evidência na eleição das configurações de irradiação.

Embora exista um menor número de pesquisas com LED em relação ao laser (XAVIER et al., 2010) é possível observar efeitos de fotobioestimulação em cultura celular de fibroblastos de pacientes com síndrome de Down e não sindrômicos, sob determinados parâmetros de irradiação (MICHEL, 2016). Ainda a deposição de fibras colágenas e o incremento da angiogênese em feridas cutâneas (SOUSA, 2008). Já em estudos de cultura de células ósseas derivadas de ratos, houve aumento da viabilidade celular (PAGIN et al., 2014) e maior diferenciação celular e produção da fosfatase alcalina (LI; LEU; WU, 2010).

Estudos clínicos empregando a fotobioestimulação por LED sobre a pele humana com uma amostra contendo diferentes pigmentos melânicos, observou que esses dispositivos, assim como o laser, não são capazes de entregar calor ao alvo aplicado a partir dos parâmetros terapêuticos empregados (GRANDINÉTTI et al., 2015).

Em termos de efeitos observados clinicamente a partir da fotobioestimulação por laser, além da redução da dor em distúrbios na junção temporomandibular (AYYILDIZ; EMIR; SAHIN, 2015.). Outros relatos visam incrementar o reparo e modulação da inflamação na cicatrização de feridas no palato a partir do laser diodo, após a remoção de enxertos gengivais destinados a cirurgias de recobrimento radicular (DIAS et al., 2015) e na própria área de recessão gengival recoberta (FERNANDES-DIAS et al., 2015), ambos obtendo ganhos cicatriciais nas comparações aos controles a partir dos protocolos utilizados, inclusive na taxa de recobrimento radicular (FERNANDES-DIAS et al., 2015). Resultado que não fora observado em pacientes fumantes, onde o laser não aumentou a taxa de recobrimento radicular quando comparado ao controle (FONSECA, 2016). Outro estudo clínico randomizado avaliou alguns fatores de crescimento, em áreas palatinas após remoção de enxerto, porém empregando o laser Nd:YAG, que também foi capaz de acelerar o reparo além de estimular a produção de fatores de crescimento colhidos do palato e avaliados por marcadores específicos (KESKINER et al., 2016).

Estudo de boca dividida empregou 300 pacientes, todos com doença periodontal, sendo que alguns eram diabéticos e outros não. O objetivo foi avaliar os efeitos da fotobioestimulação por laser GaAlAs nessa amostra. Que fora dividida em grupos que eram 1: pacientes com periodontite e diabetes mellitus tipo 1 (n:54 mulheres e n: 46 homens). Grupo 2 são pacientes com periodontite e diabetes mellitus tipo 2 (n: 48 mulheres e n:52 homens). Grupo 3 consistia em pacientes sistemicamente saudáveis com doença periodontal (n: 50 mulheres e n: 50 homens). Após exames iniciais e a realização do índice gengival de Loe e Silness (1963), também foram coletadas amostras da smear layer próximas da gengiva dos pré-molares de ambos os lados e completamente erupcionados. Todos os indivíduos foram submetidos a raspagem, maximização dos cuidados de higiene e profilaxia oral além da aplicação do laser diodo GaAlAs, apenas nos pré-molares do lado direito (λ 670nm; 5mW, 14 min/dia, em contato com a gengiva, durante 5 dias consecutivos). Após a terapia o índice gengival foi novamente executado bem como a coleta da camada superficial dos pré-molares bilaterais (tratado ou não com laser). Após a comparação dos resultados das análises laboratoriais e levando em conta os parâmetros clínicos da região irradiada e não irradiada pode-se observar que o laser foi adjunto a terapia

periodontal convencional e reduziu a inflamação gengival em pacientes com periodontite e diabetes mellitus (OBRADOVIĆ et al., 2012).

Alguns relatos recentes tem demonstrado que a fotobioestimulação pode ser empregada adjunto a raspagem e alisamento corono-radicular e desempenhado bons resultados na redução da profundidade de sondagem, aumento do nível de inserção clínica e redução de placa, sangramento e gengivite (MAKHLOUF et al., 2012; ALEKSIC et al., 2010; QADRI et al., 2010; MIZUTANI et al., 2016). O que fora observado em apenas dois ensaios clínicos randomizados, empregando laser diodo mas com grandes diferenças entre si, relacionadas aos protocolos e desenhos metodológicos utilizados (PEJCIC et al., 2010; AYKOL et al., 2011). Além de acelerar o reparo e regeneração tecidual após o preparo inicial, são observados efeitos na modulação da inflamação e redução da dor (MIZUTANI et al., 2016). Porém esses achados são muitas vezes questionados devido as metodologias empregadas nos trabalhos, encaminhando a necessidade de ensaios clínicos randomizados que empreguem a fotobioestimulação no preparo inicial dos pacientes periodontais e com desenho experimental conforme o rigor das pesquisas clínicas atuais (MIZUTANI et al., 2016).

Recentemente implicações da fotobioestimulação laser na redução da dor associada a anestesia foram investigadas. Os resultados demonstraram que o estímulo óptico pode inibir a função nervosa de forma reversível em estudos *in vivo*, inibindo receptores específicos para a nocicepção regional e bloqueando a condução do estímulo doloroso ao sistema nervoso central, o que capacita a aplicação dessa terapia de forma mais vigorosa, em ambientes clínicos visando ganhos nas condições de manejo da dor e anestesia (CHOW; ARMATI, 2016).

A comparação entre laser e LED também já fora avaliada *in vivo* e possibilitou contribuir na afirmação de que a coerência é a principal forma de ação do laser (SOUSA et al., 2013). Uma vez que o laser e o LED foram capazes de estimular a angiogênese em feridas cutâneas em ratos. Embora a maioria dos estudos *in vivo* avaliem o desempenho do laser, existem relatos de que o LED desempenha resultados terapêuticos semelhantes, empregando os mesmos parâmetros que o laser (SOUSA, 2008; ACIOLE, 2014; ROSA, 2014).

2.2 O tecido ósseo e os efeitos e eventos da fotobioestimulação por Laser e LED

O tecido ósseo, devido suas características básicas, possui a capacidade de se remodelar. Dessa forma ao sofrer algum tipo de injúria osteoblastos, osteoclastos e células osteoprogenitoras atuam conjuntamente visando o reparo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O processo ósseo cicatricial inicia com a fase inflamatória e preenchimento do local pelo coágulo. Com ele um infiltrado de células inflamatórias é trazido à região para tornar o cenário favorável à regeneração tecidual. O tecido de granulação regional é formado pela junção dos vasos sanguíneos, células inflamatórias e fibroblastos imaturos. Esse tecido vai sendo substituído pelo tecido conjuntivo provisório e rico em fibras colágenas, e se torna responsável por uma rápida formação da matriz conjuntiva. Projeções ósseas são observadas inicialmente adjacente a vasos sanguíneos e começam a dar origem a ósteons (sistema de Havers) primários. A partir de então o osso passa por uma fase de modelamento e remodelamento sofrendo uma série de alterações qualitativas e quantitativas, o que nos alvéolos pós-extrações dentais, acaba gerando alterações dimensionais (ARAÚJO; LINDHE, 2008). Durante esse processo uma série de fatores de crescimento, moléculas mediadoras e sinalizadoras são secretados em diferentes períodos de tempo da reparação e incrementam o processo como um todo (FISCHER et al., 2004).

A cicatrização e preservação alveolar tem sido muito estudada recentemente, uma vez que com o crescimento da indicação e instalação dos implantes dentários tem surgido cada vez mais a intenção da reabilitação por essa modalidade, para reposição de dentes perdidos ou condenados. Assim é conhecido que após a extração, graças ao processo fisiológico de reparação, uma contração tecidual é esperada na área. O que pode vir a dificultar posteriormente a disposição espacial ótima do implante intra-ósseo. Uma série de técnicas utilizando diferentes dispositivos e biomateriais são descritos e analisados para viabilizar a reabilitação mais próxima do ideal (ARAÚJO et al., 2015).

Visando incrementar a cicatrização óssea em ratos, relatos observaram que o laser operando sob comprimento de onda pertencente ao infravermelho próximo tem surtido resultados melhores quando comparado ao espectro de luz vermelha. Há estimulação na proliferação de osteoblastos, na síntese de colágeno e formação

óssea (PINHEIRO et al., 2013), sendo observado que a partir desse espectro o efeito luminoso teve maior penetrabilidade nos tecidos irradiados.

Em relação às formas de ação da fotoestimulação sobre o tecido ósseo, acredita-se que a osteogênese seja estimulada pelo uso das fototerapias, uma vez que células mesenquimais no local da aplicação, podem se diferenciar em osteoblastos e inclusive se transformar em osteócitos, graças aos efeitos dos estímulos luminosos. Uma série de fatores (genético, sistêmico) interfere nesse processo, mas é possível que haja a indução da diferenciação celular a partir do laser ou LED. Os osteócitos aprisionam osteoblastos, a partir da matriz mineral, interferindo no metabolismo ósseo, mantendo as características e funções do tecido (PINHEIRO; GERBI, 2006).

Outra possibilidade é que a fotobioestimulação aumente a produção de energia no local da aplicação (interação mitocondrial) e com isso as células se tornem mais ativas sintetizando substratos (proteínas) e se multiplicando mais rapidamente e com ausência de atipias. Com isso o reparo cicatricial pode vir a ocorrer em menor tempo (MA et al., 2008).

É importante observar que para ser efetivo o estímulo luminoso deve ser aplicado sob regiões de alta proliferação celular, onde geralmente existe alguma injúria tecidual ou houve algum processo de intervenção local. Como nos casos de extração dental, instalação de implantes ósseointegráveis, regiões fraturadas, entre outras (SAITO; SHIMIZU, 1997; PETROV; TONCHEV, 2015). Além da estimulação cicatricial somam-se os efeitos de modulação da inflamação e analgesia (SILVA et al., 2010).

O preciso mecanismo de ação do LED no tecido ósseo não é totalmente conhecido, há a suposição do seguimento dos mecanismos muito similares aos do laser. Porém relatos mais elucidativos devem ser analisados para que se conheça precisamente os detalhes sobre os parâmetros empregados. Uma vez que, da mesma forma que o laser, possam existir configurações energéticas que não induzam efeito notável (DESMET, et al; 2006; ROSA, 2014).

Apesar disso, estudos clínicos são conduzidos em diferentes condições e cenários, obtendo também uma série de possibilidades e desfechos. Em um recente ensaio clínico controlado de boca dividida, pacientes com indicação de extração ortodôntica bilateral, receberam aplicação de LED apenas em um lado. A taxa de

fechamento do espaço criado a partir do movimento ortodôntico com e sem LED, foi testada a partir de um dispositivo que o paciente auto-aplicava o estímulo. Porém não houve diferença nos parâmetros avaliados entre a terapia testada e o controle, o que contraria os resultados do laser nesses cenários, onde esse geralmente agiliza o fechamento ortodôntico (CHUNG; TOMPSON; GONG, 2015).

Outros estudos clínicos visando o incremento da cicatrização óssea utilizaram pacientes submetidos a distração osteogênica com finalidade ortognática e aplicação de laser diodo GaAs para fotobioestimulação (n:10 pacientes) (λ 905nm/500mW, 4 áreas de aplicação 2 min cada, densidade de energia total 20 J/cm²), em 12 sessões, demonstraram incremento na densidade de osso formado, quando comparado aos do grupo controle não irradiado (n: 10) (ABD-ELAAL et al., 2015).

Um estudo clínico bastante relevante, avaliou o desempenho da fotobioestimulação após a extração de molares. Aplicando laser diodo GaAlAs (λ 808nm, 100 mW, 0.04cm², 75J/cm², 5 pontos de aplicação, 30s cada) durante e imediatamente após a cirurgia, além de 24, 48, 72 e 96h bem como aos 7 e 15 dias após o procedimento. Aos 40 dias os resultados do grupo controle e experimental foram avaliados por micro tomografias e histomorfometricamente para observar o tecido formado nos alvéolos. Os pacientes que receberam laser (n:10) obtiveram um maior ganho ósseo em volume do que os pacientes do grupo controle não irradiado (n:10), e também apresentaram uma disposição óssea trabecular mais homogênea, observada nos cortes histológicos, o que facilitou e agilizou a reabilitação com implantes. Os autores concluem que o laser é capaz de acelerar o reparo alveolar após a exodontia em molares (ROMÃO et al., 2015).

Em cirurgias periodontais também existe uma série de relatos do uso do laser para a modulação da inflamação, analgesia e incremento do reparo, tanto em cirurgias a retalho quanto em gengivectomias e gengivoplastias (DAMANTE et al., 2004; SOBOUTI et al., 2015). Esses objetivos foram avaliados em um relato de caso para o tratamento de defeito periodontal intraósseo, associando debridamento mecânico, preparo químico com agente quelante (EDTA), preenchimento com enxerto ósseo xenógeno e empregando laser diodo (GaAlAr, λ 810nm, 4J/cm²), aplicado por 10 minutos diariamente até cinco dias após a cirurgia. Os resultados demonstraram bom desempenho aos objetivos e parâmetros clínicos avaliados (preenchimento do

defeito, redução da profundidade de sondagem, grau de inflamação e recessão tecidual remanescentes) além do incremento do reparo no período avaliado de 12 meses, para esse caso clínico isolado (BHARDWAJ et al., 2016). Ensaios clínicos randomizados também são encorajados para maior aprofundamento do nível de evidência dessas associações terapêuticas.

Uma revisão sistemática na área da implantodontia avaliou o incremento da osseointegração com o uso da fotobioestimulação (PRADOS-FRUTOS et al., 2016). Porém as buscas resultaram em um maior número de trabalhos em animais e poucos estudos clínicos (n: 2/14), impossibilitando análises centradas em pacientes. Uma variação muito grande foi observada entre os parâmetros empregados em cada estudo. Mas mesmo assim trabalhos com animais tem demonstrado efeitos positivos do uso do laser na aceleração do reparo e incremento do contato osso e implante (PETROV; TONCHEV, 2015; MENEZES et al., 2016; MIZUTANI et al., 2016).

Em relação as perspectivas da fotobioestimulação por laser, alguns ensaios *in vivo* em cobaias demonstraram resultados promissores no tratamento ou atenuação de uma série de doenças, inclusive neurológicas entre elas o Parkinson e o Alzheimer (DESMET, et al; 2006). Outros trabalhos tendem alocar essa terapia não medicamentosa no incremento de respostas aos tratamentos do reparo ósseo (KHADRA et al., 2004; PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007), da osteoporose (SCALIZE et al., 2015), em condições sindrômicas metabólicas como o diabetes mellitus (MAIYA; KUMAR; RAO, 2005; PATROCÍNIO-SILVA, et al., 2014), nos alvéolos pós extrações, após expansões maxilares e também associado a movimentos ortodônticos (HABIB et al., 2012).

Um estudo observou durante a movimentação dental ortodôntica em ratos, que além da estimulação do metabolismo ósseo e aceleração do movimento dental induzido, houve a inibição da reabsorção radicular. Empregando de forma unilateral o laser diodo GaAlAs (λ : 810nm, 100mW, 0,02 cm²; 15s em dois pontos a cada 48 horas, durante o tempo do experimento), no lado contralateral a cobaia não recebeu aplicação, o laser foi aplicado nesse regime até que fosse observado clinicamente a migração dental, um miniparafuso foi implantado em todos os ratos a uma distância padronizada e serviu como limitador da movimentação. Foi possível observar pelos instrumentos de medida do efeito testado (análise histomorfométrica, imuno-histoquímica, micro tomografias e microscopia eletrônica de varredura) que o laser foi

capaz de preservar a camada de cementoblastos sobre a superfície da raiz, o que evitou danos radiculares. Associado ao elevado grau de atividade osteoclástica, inferindo que a fotobioestimulação foi capaz de modular a reabsorção óssea e radicular ao mesmo tempo (SUZUKI et al., 2016).

Os efeitos terapêuticos do LED também foram avaliados *in vivo* em ratos (n:48) com defeitos intraósseos criados cirurgicamente. O LED ($\lambda 660 \pm 25 \text{ nm}$; $3,5 \text{ mW/cm}^2$) foi aplicado diariamente em duas fluências 0 ou 10 J/cm^2 e em todos os grupos experimentais (1: controle/ retalho reposicionado apicalmente somente, 2: membrana somente, 3: xenoenxerto somente, 4: xenoenxerto associado a membrana), uma parte dos animais (n: 24) recebeu o estímulo durante uma semana e os outros (n:24) durante quatro semanas, no fim de cada período foram eutanaziados. Os resultados demonstraram melhor cicatrização e reparo do retalho, porém o incremento do tecido ósseo por essa terapia e com esses parâmetros, não foi observado entre todos os grupos (TAO et al., 2016).

O reparo ósseo incrementado pelas terapias ópticas é muito estudado *in vivo*, inclusive obtendo bons resultados (KHADRA et al., 2004; PRETEL; LIZARELLI; RAMALHO, 2007; PECCIN et al., 2013; TIM et al., 2014; PAOLILLO et al., 2015). Porém a extrapolação dos protocolos *in vivo* para o clínico muitas vezes é a principal limitação desses estudos, embora muitos ganhos sejam observados e análises histológicas e fisiológicas sejam possíveis, grande parte desses relatos utilizam defeitos ou doenças induzidas. Assim as respostas em ambientes clínicos podem vir a ser diferentes, mas a discussão científica é extremamente importante para a elaboração dos parâmetros de irradiação, dessa forma será possível utilizar o que há de mais pertinente para o tratamento de uma série de mazelas.

Outro campo das pesquisas *in vivo* é testar os efeitos dos parâmetros da fotobioestimulação explorando o potencial dessa terapia na incorporação de benefícios aos enxertos utilizados para diversas finalidades regenerativas. Avaliando o desempenho dos dispositivos luminosos em somar os potenciais de reparo regional. Sendo observado o incremento da cicatrização de enxertos ósseos autógenos (WEBER et al., 2006; ALMEIDA et al., 2014; OLIVEIRA GONÇALVES et al., 2016). Mas também associado a uma série de biomateriais, objetivando reduzir a limitação da indicação e emprego dos enxertos xenógenos e sintéticos. Um estudo observou o desempenho da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) associada à

fotobioestimulação no incremento da cicatrização de enxertos ósseos sintéticos, os resultados do reparo, nas cobaias, foram melhores para a associação do que para o uso segregado desses agentes de indução regenerativa (KOPARAL et al., 2016).

Outro estudo avaliou o desempenho de defeitos preenchidos somente pelo rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea 2 recombinante humana) associado à fotobioestimulação, também no infravermelho próximo e a combinação dos agentes desempenhou melhores resultados no incremento ósseo na calvária de ratos (ROSA et al., 2012).

O estímulo por LED também já fora associado a elementos regenerativos *in vivo*. Entre esses o fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF $\beta\beta$) associado ao LED (cor vermelha, 660 $\pm$ 25nm; 3,5mW/cm²; 10J/cm²), em defeitos ósseos em na maxila edêntula de ratos. Avaliado em curto período de tempo, o maior estímulo osteogênico da associação foi observado aos 14 dias, em comparação ao tratamento somente com LED ou somente com o PDGF (CHANG; WANG; SHENG-CHUEH, 2014).

O reparo de enxertos ósseos liofilizados derivado de bovinos (Genox-Baumer) já fora testado em cobaias, na associação com a fotobioestimulação por laser infravermelho próximo, os efeitos observados histologicamente foram positivos em termos de aceleração da deposição de fibras colágenas bem como na melhor organização do trabeculado ósseo, nos grupos irradiados (MARTÍNEZ; PINHEIRO; RAMALHO, 2008), assim abordagens a essas áreas podem ser realizadas em menor tempo, como por exemplo para a instalação de implantes. Outro enxerto comercialmente disponível (Bio-oss-Geistlich) foi avaliado associado a fotobioestimulação e comparado a mesma associação ao osso autógeno, na calvária de ratos. As associações dos enxertos ao laser tiveram melhores resultados na formação óssea, comparado aos grupos onde enxertos foram utilizados sozinhos. A associação do xenoenxerto ao laser demonstrou que a terapia além de incrementar a cicatrização, promoveu a reabsorção mais rápida das partículas desse biomaterial (CUNHA et al., 2014).

A vitrocerâmica bioativa, um enxerto sintético, tem sido empregada em estudos visando incremento ósseo e possui uma vertente comercial desenvolvida no Brasil (SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011). Quando associado ao laser infravermelho e no preenchimento de defeitos ósseos na tíbia de ratos, desempenhou bons resultados

no incremento das propriedades bioquímicas na cicatrização óssea (FANGEL et al., 2014).

2.3 Fotobioestimulação em cultura de células ósseas

Ozawa et al. (1998), sugeriram que, *in vitro*, o laser induz a formação de nódulos mineralizados e a diferenciação de células imaturas da linhagem osteoblástica, porém esses efeitos podem não ser encontrados em células maduras. Um dos relatos precursores da capacidade do laser (He-Ne, λ 632,8 nm, 10 mW, 180 mW/cm²; 1,43 J/cm²) em interagir com as células ósseas humanas *in vitro*, foi descrito por Stein et al. (2005), onde após a comprovação houve a suposição da possibilidade do incremento do reparo ósseo clinicamente em humanos. Outros trabalhos com células ósseas irradiadas com laser já relataram o aumento na produção de fosfatase alcalina (OZAWA et al., 1998; STEIN et al., 2005), síntese de osteocalcina (OZAWA et al., 1998; KHADRA et al., 2005) e osteopontina e sialoproteína óssea (STEIN et al., 2005), aumento expressivo na adesão e viabilidade dos osteoblastos (FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006), bem como a produção de nódulos mineralizados (OZAWA et al., 1998; DÖRTBUDAK; HAAS; MALLATH-POKORNY, 2000; KHADRA et al., 2005; AMID et al., 2014). E o LED, também em células de linhagem óssea, já demonstrou o aumento da viabilidade celular (PAGIN et al., 2014). Demonstrando a importância do conhecimento dos efeitos do Laser e LED na unidade básica celular, para que a partir da observação desses os melhores parâmetros possam ser empregados com maior segurança. Maiores detalhes e outros relatos que utilizaram a fotobioestimulação em células ósseas podem ser observados a seguir (QUADRO 1).

Além dos achados e eventos demonstrados a nível celular por inúmeros estudos, algumas revisões sistemáticas visam entender melhor os efeitos da fotobioestimulação e por isso os estudos *in vitro* tem grande importância na construção desse conhecimento. A partir das revisões foi observado que a fotobioestimulação em diferentes linhagens celulares foi capaz de aumentar a viabilidade celular, síntese de DNA, RNA e produção de colágeno, inclusive estimulando o início da mitose celular. A fotobioestimulação excita os fotorreceptores presentes nas estruturas e organelas

celulares, convertendo a luz em energia química através da formação de ATP o que aumenta as taxas de função e viabilidade celular (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012). As cascatas de eventos gerados nas células a partir da fotobioestimulação são amplamente estudadas. Em relação ao tecido ósseo e seu reparo foi observado que o laser é capaz de estimular a viabilidade e diferenciação de osteoblastos repercutindo no aumento da expressão da atividade da fosfatase alcalina e produção de nódulos mineralizados, na síntese de colágeno tipo I, osteopontina e sialoproteínas ósseas. Dependendo da dose empregada há o incremento da TGF β 1 e redução do número de osteoclastos, com aumento e diferenciação de osteoblastos, porém esse mecanismo não é completamente entendido (WU; XING, 2014).

Marcadores genéticos ósseos interagem com os estímulos luminosos, como é o caso do fator de transcriptase reversa 2 (Runx2) desencadeando algumas cascatas de sinalização (ERK 1/2) e de ativação de quinases (PI3K/p21 e PAK1) (ROLA; DOROSZKO; DERKACZ, 2014). É sugerido que o laser também ative a liberação do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1, nos osteoblastos, além de BMPs, mediadores que fazem o transporte de proteínas nos fluidos sanguíneos para a região onde o estímulo luminoso foi aplicado, além de aumentar o tempo de meia-vida desses fatores. As BMPs são importantes sinalizadores na formação óssea, o laser incrementa os níveis de fosforilação e BMP-2 que induzem a atividade da fosfatase alcalina (WU; XING, 2014). Todas essas cascatas foram observadas *in vitro* e embasam o conhecimento biomolecular sobre a bioestimulação óptica. Muitos marcadores e sinalizadores já foram utilizados a fim do conhecimento das reações moleculares em linhagens osteogênicas (HENG et al., 2004). O que se pode notar, é que os efeitos da fotobioestimulação no incremento e reparo do tecido ósseo vão muito além de uma simples interação, promovendo o desencadeamento de reações complexas e diversas em âmbito celular, culminando geralmente na aceleração dos processos testados, na dependência dos parâmetros utilizados, mas promovendo também a modulação do metabolismo das células ósseas.

O quadro 1 mostra um panorama da variabilidade de parâmetros de fotobioestimulação usados nos estudos *in vitro* e seus principais resultados.

Quadro 1- Estudos laboratoriais (*in vitro*) da fotobioestimulação envolvendo células ósseas.

Autor (artigos ordenados por ano)	Tipo de célula óssea	Meio ativo e comprimento de onda (λ)	Potência (W ou mW)	Forma de aplicação (pulso/contínuo)	Densidade de energia J/cm ²	nº Energia total- (joules) por tratamento	Principais resultados
OZAWA et al., 1995	osteoblastos da calvária de ratos	Laser diodo GaAIAs (830 nm)	60 mW	Contínuo	346 - 3460 J/cm ² (3 a 30min) grupo de irradiação múltipla (do 3º ao 21º dias/diariamente) X grupo de irradiação única	10,8 a 108 J / por ponto: 0,64J/cm ²	Sugerem que a FBE Laser atue na estimulação inicial, mais do que nos períodos seguintes de diferenciação e viabilidade celular (período inicial estimulante). Houve maior atividade da FALC durante os estímulos iniciais 3º, 6º e 10º d.
OZAWA et al., 1998	osteoblastos da calvária de ratos	Laser GaAIAs (830 nm)	500 mW	Pulso	Total: 3.82 J/cm ² (10min)		Hipótese da irradiação desempenhando a estimulação da formação óssea e viabilidade celular (inicialmente) e posteriormente a estimulação da diferenciação celular), resultando em células osteoblásticas mais diferenciadas e incremento da formação óssea. Observações que foram demonstradas apenas nos osteoblastos imaturos e não nos maduros.
DÖRTBUDAK; HAAS; MAIALATH-POKORNY, 2000	osteoblastos da medula óssea de ratos	Laser (690nm)	21 mW	pulso X contínuo	1,6 J/cm ² - 60s (dias 3, 5 e 7)		Proposta de um novo método de fluorescência para comparação dos nódulos ósseos, os grupos experimentais (Laser pulsado) demonstraram maior número de depósitos ósseos fluorescentes que os controles (Laser contínuo).
COOMBE et al., 2001	osteoblastos humanas (SaOS-2)	Laser GaAIAs (830 nm)	90 mW	contínuo	1,7-25,1 J/cm ² (aplicação por 10 dias comparada a única)	0,3; 0,5; 1,2; 4J	A viabilidade celular não foi afetada pela irradiação. A LILT não foi capaz de estimular a viabilidade de células e a FALC. Houve aumento de cálcio intracelular indicando alguma interação celular com a irradiação.
YAMAMOTO et al., 2001	osteoblastos da calvária de ratos MC3T3-E1	Laser GaAIAs (830 nm)	500 mW	Contínuo	7,64 J/cm ²		FBE incrementou a replicação do DNA, estimulou a viabilidade de osteoblastos e a expressão do gene MCM3 (envolvido no início da replicação do DNA).
HAMAJIMA et al., 2003	MC3T3-E1	Laser GaAIAs (830 nm)	500 mW (DP: 6.4 mW/cm ²)	Contínuo	7.64 J/cm ² (20min)		O aumento da expressão do gene OGC promovido pela LILT ocorreu transitoriamente e apenas no primeiro estágio de proliferação celular. Os efeitos da LILT na expressão dos pequenos proteoglicanos ricos em leucinas não estão bem definidos.

44 Revisão de Literatura

KHADRA et al., 2005	osteoblastos derivadas de humano (HOB)	Laser GaAlAs (830 nm)	84 mW	Contínuo	1.5 ou 3J/cm ² (aplicada 3 dias consecutivos)		Marcadores OC e TGF-β1 tiveram aumento significativo na configuração DE: 3J/cm ² . O LLLT possui a tendência de promover a adesão, viabilidade, diferenciação celular e aumento da secreção de alguns marcadores, demonstrando o efeito FBE <i>in vitro</i> da adesão celular ao redor de discos de titânio (com diferentes tratamentos de superfície).
STEIN et al., 2005	Cultura de osteoblastos humanos	Laser He-Ne (632,8nm)	10 mW (DP: 180 mW/cm ²)	Contínuo	0,14 J/cm ² (1s); 0,43J/cm ² (3s); 1,43 (10s) aplicada nos dias 2 (24h) e 3 (48h)		Incremento na viabilidade celular, a FALC e expressão de OPN e BSP foram duas vezes maiores nas células irradiadas. LILT promoveu a viabilidade e maturação de osteoblastos humanos <i>in vitro</i> .
AIHARA et al., 2006	Osteoclastos precursores derivados de rato	Laser diodo (810nm)	50 mW	Contínuo	9,33; 27,99; 55,98; 93,30 J/cm ²		LLLTL facilita a diferenciação e ativação dos osteoclastos via expressão do RANK (sistema RANK/RANKL), influenciando no metabolismo ósseo.
ARISU;TÜRKÖZ;BALA, 2006	SaOS-2	Laser Nd:YAG (1,064nm) X Laser He-Ne (1,064nm)	Nd:YAG: 0,2-3,6W / He-Ne: 0,1 W	He-Ne contínuo / Nd:YAG pulsado: energia do pulso: 20-120 mJ, taxa de repetição de pulso: 10-30 Hz			Comparação Laser de corrente contínua X corrente pulsada. Houve decréscimo na viabilidade celular quando as características de energia do pulso foram aumentadas. O laser He-Ne e o laser Nd:YAG 20mJ,10 Hz,10s estimularam a viabilidade celular.
FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES 2006	células da calvária de ratos (Osteo-1 lineage)	Laser GaAlAs (780 nm)	10 mW		3 J/cm ² (12s)		LLLTL estimulou a viabilidade de osteoblastos independente da presença de dexametasona, sugerindo que a FBE possui importância coadjuvante na manipulação clínica para aceleração da regeneração óssea.
FUKUHARA et al., 2006	osteoblastos da calvária de ratos	Laser GaAlAs (905nm)			1,25J/cm ² (150s); 3,75 J/cm ² (450s) parâmetro ótimo; 6,25J/cm ² (750s)		Laser (3,75 J/cm ² ; 450s parâmetro ótimo) promoveu a aceleração da formação óssea e também alterou o ciclo celular, sugerindo que esses efeitos promovam melhora na cicatrização óssea.
RENNO et al., 2007	pré-osteoblastos de rato MC3T3	Laser 670m; 780nm; 830nm	10 mW		0,5; 1, 5 e 10 J/cm ²		Com base em comparação a estudos prévios observaram que cada linhagem celular respondeu diferente em relação ao comprimento de onda e dose de aplicação do dispositivo óptico.

HAXSEN et al., 2008	SaOs-2	Laser (690nm)	DP: 51mW/cm ² ; 102 mW/Jcm ² ; 204 mW/cm ²		178mJ/cm ² (limiar de ativação)		Laser estimulou a FALC nos osteoblastos, com relação logarítmica entre dose (J) dependência (FALC e dose). Em menor escala que a dose, a irradiância (W/cm ²) é também importante para o efeito do laser.
PIRES-OLIVEIRA et al., 2008	osteoblastos OFCOL II	Laser GaAlAs (830 nm)	50 mW		3 J/cm ² (36s)		O Laser operando no único parâmetro utilizado, foi capaz de alterar a atividade mitocondrial das células, avaliadas pelo MTT e marcadores celulares de fluorescência.
STEIN et al., 2008	SaOS-2	Laser (670nm)	400 mW	contínuo	1 e 2 J/cm ² (30 ou 60s) aplicação única		Houve incremento da FALC e deposição de OPN e colágeno tipo I aumentados nos parâmetros de 1 e 2 J/cm ² .
BOUVET-GERBETTAZ et al., 2009	osteoblastos derivados da medula óssea	Laser diodo (808nm)			4 J/cm ²		Laser IV no parâmetro testado não alterou a viabilidade e diferenciação celular, em comparação ao controle.
KUSHIBIKI; AWAZU, 2009	osteoblastos derivados da medula óssea de ratos	Laser azul (405nm)	DP: 0, 50; 100; 150 e 200mW/cm ² (180s)				O Laser promoveu a calcificação extracelular (VA) induzindo a translocação da proteína CRY-1 do citoplasma para o núcleo, reduzindo os níveis de CRY-1 mRNA. Assim foi capaz de modular e acelerar o ritmo circadiano de síntese protéica.
SARACINO et al., 2009	MG-63	Laser GaAs (904-910nm)	45 W	pulsado 30kHz (200 ns)	6,7 J/cm ²	60J (5min)	O Laser pulsado aumentou a quantidade e o tamanho dos depósitos de cálcio pelas células (VA). Reduziu o crescimento celular mas induziu a expressão de genes (TGF-β2, BMP-4, BMP-7, colágeno tipo I, ALP e OC).
XU et al., 2009	osteoblastos da calvária de rato	Laser (650nm)	2 mW	pulsado	1,14 e 2,28 J/cm ² (5 e 10min)		Aumento significativo em relação aos controles da FALC, nível de RANKL, síntese de OPG e expressão do mRNA
ALEKSIC et al., 2010	MC3T3-E1	Laser Er:YAG (2.94nm)		pulsado: 50Hz e 30-350mJ/pulso (200 ns)	0,7-17,2 J/cm ²	30-350 mJ	O Laser Érbio granada pode ser uma ferramenta de promoção do reparo ósseo, observação a partir da análise da viabilidade e morte celular, além da liberação de MAPK.
FUJIMOTO et al., 2010	MC3T3-E1	Laser GaAlAs (830nm)	500 mW	pulsado: 2Hz	0,96-3,82 J/cm ² (5-20min)		A irradiação na densidade de energia de 1,91 J/cm ² (10min) aumentou significativamente a expressão gênica (BMPs, Runx2, Osterix, Dix5, Mx2 e fosforilação do Smad1). Além do incremento de cálcio ao nível celular (VA).

46 Revisão de Literatura

KIYOSAKI et al., 2010	MC3T3-E1	Laser diodo			0,96-3,82 J/cm ²		LLLT na densidade de energia de 1,91 J/cm ² promoveu o aumento significativo da expressão de genes (IGF-I, Runx2 e fosforilação de ERK), na viabilidade celular e formação de nódulos mineralizados.
LI; LEU; WU, 2010	osteoblastos derivados da medula óssea de ratos	LED (V:630 nm)	5 e 15 mW/cm ²		2 e 4 J/cm ²		A maior taxa de viabilidade celular foi observada com exposições múltiplas do LED nas densidades 15mW/cm ² e 4 J/cm ² . Houve também incremento da FALC e expressão de OC.
PETRI et al., 2010	osteoblastos obtidas do osso alveolar humano	Laser GaAlAs (780 nm)	70 mW		3 J/cm ² (9min) 2 dias (dias 3 e 7 após o plaqueamento)		O Laser modula de forma complexa as respostas celulares. Expressão gênica da FALC, OC, BSP e BMP-7 foram maiores nos grupos tratados com a LLLT, já a de Runx2, OPN e OPG foram menores. Não houve mudança na expressão de RANKL. A irradiação não alterou a viabilidade celular, atividade de FALC e a formação de matriz óssea mineralizada.
KANENARI; ZHAO; ABIKO, 2011	MC3T3-E1	Laser GaAlAs (830 nm)	100-700 mW		7,64 J/cm ² (20min)		LLLT estimulou a viabilidade e diferenciação dos osteoblastos bem como o incremento da expressão do gene MAP1A.
da SILVA et al., 2012	osteoblastos do palato de ratos após expansão rápida de maxila†	Laser GaAlAs (830nm)	30 mW		160 J/cm ² † (0,42s)		†Laser aplicado nos ratos e células foram coletadas e analisadas <i>in vitro</i> . Demonstrou o efeito a nível celular da FBE realizada <i>in vivo</i> . Incremento na FALC e formação de matriz óssea mineralizada. Células demonstraram maior atividade da fosfatase alcalina, viabilidade e diferenciação após 48h.
RUDD, 2012	osteoblastos derivados de humanos CRL 1427	Laser GaAlAs (830 nm)	85 mW		0,6; 1,5; 1,8 J/cm ²		DE: 1,5 e 1,8 J/cm ² aumentaram de forma significativa a expressão de FALC, OPG, RANKL e RANK mRNAs em comparação ao controle. A LLLT pode influenciar diretamente a expressão de genes associados ao metabolismo ósseo, potencializando mecanismos para a rápida remodelação óssea.
WU et al., 2012	osteoblastos derivados da medula óssea de ratos	Laser GaAlAs (820nm)	50 mW		0; 1; 2 ou 4 J/cm ² (100, 200 ou 400s) em 2 dias seguidos		Expressão dos genes BMP2, OC, FALC e RUNX2 levemente aumentada com o parâmetro 4 J/cm ² . A FALC foi expressa somente no 5º dia por esse parâmetro. A expressão de RANKL decresceu levemente nos grupos irradiados.

BLOISE et al., 2013	SaOs-2	Laser diodo (659 nm)	10 mW		1 e 3 J/cm ²		A partir da deposição de cálcio (VA) e FALC observam que a LLLT é um recurso promissor no incremento do reparo ósseo.
JAWAD et al., 2013	osteoblastos derivados do feto humano	Laser diodo (940nm)	100; 200; 300 mW				Incremento da FALC, viabilidade celular (MTT) e OC principalmente quando a potência não ultrapassa os 200mW.
PYO et al., 2013	osteoblastos derivadas do feto humano (linhagem 1.19)	Laser diodo (808m)	1000 mW	contínuo	1,2; 2,4 e 2,6 J/cm ²		LILT induziu a expressao de BMP-2, OC e TGF-β1.
PACHECO et al., 2013	MC3T3	Laser InGaAlP (V: 660 nm) e GaAlAs (IV: 780 nm)	40± 6.24 mW (DP: 1 W/cm ²)		90 e 150 J/cm ² (90 e 150 s) Laser IV – 90 J/cm ² / Laser IV – 150 J/cm ² Laser V – 90 J/cm ² / Laser V – 150 J/cm ²		A LILT em altas densidades de energia (tanto no V quando no IV), não estimulou o crescimento celular nem a atividade da fosfatase alcalina (FALC).
HUERTAS et al., 2014 (Lasers Med Sci)	MG-63	Laser diodo GaAlAs (940nm)	70 mW DP: 1W/cm ² 1,5W/cm ² (3J e10s); 1W/cm ² (4J e 19s); 1,5 W/cm ² (4J e 12s)	contínuo		3J (14s)	Houve aumento na expressão da FALC, sendo o melhor parâmetro 1W/cm ² e 3J. Os parâmetros utilizados reduziram em diferente intensidade a expressão dos genes CD54, CD86 e HLA-DR, reduzindo em pequeno grau a capacidade fagocitária celular. Sugerem que a fotobioestimulação pode ser uma boa terapia para a regeneração de tecidos ósseos.
HUERTAS et al., 2014 (Biol. Res. Nurs.)	MG-63	Laser diodo (940nm)	DP: 0,5; 1; 1,5 e 2 W/cm ²	pulsado		1, 2, 3, 4 e 5J	LLLT pulsado parece exercer efeitos bioestimulatórios na viabilidade celular os parâmetros de 0,5-1,5W/cm ² foram mais efetivos na bioestimulação.
LIM et al., 2014	osteoblastos da medula óssea de ratos	LED (635nm)	DP: 2 mW/cm ²				O LED promoveu de forma mais eficaz a redução da formação de osteoclastos específicos que preservam a reabsorção óssea. Sugerindo que o LED possa regular a remodelação óssea creditando seu uso para o manejo da osteoporose.

48 Revisão de Literatura

MIGLIARIO et al., 2014	MC3T3	Laser diodo (980nm)	1 W	contínuo	1,57; 7,87; 15,74; 39,37; 78,75 J/cm ²	1-50J	A FBE pelo Laser, dentro dos parâmetros testados, pode ser uma boa terapia para o incremento da regeneração óssea.
PAGIN et al., 2014	MC3T3	Laser GaAlAs (V: 660nm) e InGaAlP (IV: 780 nm) E LED (630±10 nm)	Lasers 40± 6,24 mW DP: 1 W/cm ² e LED 60 mW/cm ²	contínuo	Laser 3 e 5J/cm ² (3 e 5 s) LED 3 e 5 J/cm ² (83 e 50 s)		LILT e LED possuem efeitos similares na estimulação dos fatores de crescimento, mas não foram efetivos na diferenciação celular. Não houve aumento da atividade da FALC tanto com o Laser quanto com o LED. O Laser (V) de 3 e 5 J /cm ² e o LED a 5 J/cm ² tiveram efeitos semelhantes na estimulação dos pré-osteoblastos, demonstrando crescimento celular em períodos de tempo precoces.
ATES et al., 2015	osteoblastos humanos (CRL-11372)	Laser (V: 635nm e IV: 809nm)	V: 400 mW; IV: 1W		0,5J/cm ² (10s); 1J/cm ² (20s) e 2J/cm ² (40S)		A análise da viabilidade celular não demonstrou efeito citotóxico após a aplicação do estímulo luminoso. No comprimento de 635nm (V) não houve efeito na viabilidade celular. Já o comprimento de 809nm (IV) promoveu a bioestimulação dos osteoblastos de forma significativa nos períodos de 48 e 72h.
CAVALCANTI et al., 2015	osteoblastos derivados da medula óssea de cães	Laser (660nm)	50 mW		1 - 12 J/cm ²		O Laser não alterou a morfologia celular e promoveu a viabilidade celular significativamente, sem produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio, além de interagir no ciclo celular (fase G2/M), principalmente nas densidades de energia de 6, 10 e 12J/cm ² . A produção de malonaldeído foi incrementada pela densidade de 8J/cm ² (o que é ruim, uma vez que essa substância está ligada a peroxidação lipídica, que é o mecanismo pelo qual as espécies reativas de oxigênio promovem ações deletérias a nível celular, principalmente pela liberação de radicais livres, inclusive podendo culminar em atipia celular) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).
SOHN et al., 2015	osteoblastos da medula óssea de ratos	LED (635nm)	DP: 5 mW/cm ²	contínuo			O LED foi capaz de reduzir no modelo experimental <i>in vitro</i> a osteoclastogênese de forma indireta por ativação da expressão de uma série de genes (ERK, p38, NF-kB, ERK, TRAP, DC-STAMP, OSCAR, catepsina K e MMP9 do mRNA) que inativam a osteoclastogênese. Dessa forma o LED é creditado como ferramenta para o tratamento conservador da osteoporose.

KARO USSIS et al., 2016	MG-63	Laser Nd:YAG (1.064nm)			4 J/cm ² (40s)		O Laser incrementou a viabilidade e diferenciação celular promovendo e influenciando positivamente a adesão celular em duas diferentes superfícies de implantes (uma polida e lisa e outra tratada).
MERIGO et al., 2016	osteoblastos da medula óssea de ratos C57BL/6	Laser Verde KTiOPO4/KTP (532nm)			4 J/cm ² (3x/semana)		As células irradiadas tiveram incremento na diferenciação osteogênica (teste X controle), foi o primeiro relato desse modo ativo de Laser verde em células ósseas.
OLIVEIRA et al., 2016	osteoblastos humanos (cultura 1ª explantes ósseos)	LLLT x LED: LLLT InGaAlP (V: 660nm); (IV: 780nm) e LED (637±15nm)	40 mW (DP: 1W/cm ²)	contínuo	10 e 50 J/cm ² ensaio de viabilidade aplicação dupla (6h de intervalo) comparada a aplicação única /ensaios de mineralização aplicação a cada 6 dias (renovação do efeito)	6J (10s) e 31 J (50s)	Houve mineralização celular e incremento das células viáveis, principalmente pelo LLLT. O Laser V dose 10J/cm ² e o IV nas duas doses induziram a ativação do gene ERK1/2. O Laser V ativou a expressão do gene COL1A1 e o IV a expressão de ONC. O LED nas duas doses aumentou a expressão de COL1A1 e ONC. Observaram que o LLLT e o LED modularam de forma diferente as células e ativando diferentes marcadores específicos.
CHINTAVALAKORN et al., 2016	MC3T3-E1	LED (680nm)	DP: 2 mW/cm ²		3 J/cm ² (25min)/dia durante 42 dias		Exibiu calcificação recente nos grupos irradiados comparados ao controle. A expressão do gene mRNA e dos marcadores RUNX2, OPN, OC também foram maiores.
ATES; CAN; GÜLSOY, 2017	Osteoblastos humanos (CRL-11372)	Laser (V:635 e IV:809nm)	DP:50mW/cm ²		0,5 J/cm ² (10s); 1 J/cm ² (20s) e 2 J/cm ² (40s)		As doses de energia empregadas no estudo obtiveram um efeito transitório (48h após a aplicação do laser) na viabilidade dos osteoblastos. A irradiação pareceu não gerar nenhum efeito sobre a FALC, o que foi confirmado pela análise do RT-PCR.
OLIVEIRA et al., 2017	MC3T3-E1	Laser (V:660nm e IV: 780nm)	20mW	Contínuo	1,9 J/cm ² e 3,8J/cm ² aplicação única	0,08J (4s) e 0,16J (8s)	Os tratamentos por laser V e IV aumentaram significativamente a viabilidade celular nos períodos de 24 e 48h comparados ao controle. A FALC foi modulada positivamente pelo laser IV:1,9J/cm ² no período de 24h e às 72h na DE: 3,8J/cm ² no V e IV induziram positivamente a FALC. O laser V na DE 1,9J/cm ² promoveu o incremento da atividade da MMP-2 às 48 e 72h. Não houve diferenças na atividade da MMP-9.

50 *Revisão de Literatura*

Legenda: quadros em branco: estudos não informam/não está claro; FBE: fotobioestimulação; LLLT: Low Level Laser Therapy; VA: vermelho de alizarina; V: vermelho; IV: infravermelho; cultura 1ª: cultura primária; DP: Densidade de Potência; DE: Densidade de Energia; FALC: atividade da fosfatase alcalina; RANK: compõe o sistema RANK/RANKL que regula a ativação e diferenciação de osteoclastos; OGC: osteoglicina; OC: osteocalcina; ONC: osteonectina; BSP: sialoproteína óssea; OPN: osteopontina; OPG: osteoprotegerina; MAPK: proteínas quinase ativadas por mitógeno; ERK: quinases reguladas por sinal extracelular; TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato; Ti: titânio; λ : comprimento de onda; nm: nanômetros; W: Watt; mW: miliWatt; Hz: Hertz; KHz: quilohertz; Ø: diâmetro; μ m: micrômetros; GaAlAs: Laser diodo arseneto de gálio e alumínio; InGaAlP: Laser diodo índio gálio alumínio e fosforo; GaAs: Laser diodo arseneto de gálio; Er: YAG: Laser sólido de Érbio granada; Nd:YAG: Laser sólido de Neodímio granada; He:Ne: Laser gasoso de Hélio Neônio; KTiOPO4/KTP: Laser potássio-titânio-fosfato/ potássio-titanyl-fosfato; ns: nanosegundos.

Além dos já citados marcadores específicos para análise do incremento do tecido ósseo, ensaios de mineralização (vermelho de alizarina) são executados *in vitro*, associados ao laser e LED observando o potencial de liberação de cálcio pelas células (OLIVEIRA et al., 2016). Em osteoblastos derivados da medula óssea de ratos e cultivados por 14 dias, foi observado que as células coradas pelo vermelho de alizarina estavam distribuídas de forma circular e muito semelhante ao diâmetro do feixe de irradiação do laser aplicado sobre elas, demonstrando a interação entre célula e estímulo luminoso. Não apenas isso, mas fora demonstrado uma relação de dose dependência, conforme maior a densidade de potência aplicada ($200\text{mW}/\text{cm}^2$) maior era a quantidade de nódulos mineralizados e deposição de cálcio (KUSHIBIKI et al., 2015). Embora essa relação tenha sido observada poucos relatos com células derivadas de humano foram de encontro a esse achado.

Tomando em consideração a engenharia óptica do reparo ósseo e a terapia com laser a partir das propriedades fotofísicas e fotoquímicas, há importância no conhecimento desses atributos para desenvolvimento das ações terapêuticas. Os parâmetros e propriedades dos dispositivos são os responsáveis diretos pela observação dos efeitos celulares e teciduais. Dessa forma para que a biomodulação seja observável e positiva a seleção desses atributos deve ser correta e apropriada (ARANY, 2016; de FREITAS; HAMBLIN, 2016). Porém na maioria das vezes não se conhecem os parâmetros ótimos de irradiação para a geração de efeitos. Relatos visando o reparo ósseo observaram que o comprimento de onda infravermelho demonstra melhores desempenhos na viabilidade de osteoblastos, deposição de colágeno e formação óssea. É observado também que não apenas a dose total de irradiação é responsável pela ação estimulante, mas também o tempo e modo de irradiação são importantes (PINHEIRO; GERBI, 2006). O desenvolvimento de protocolos de aplicação é uma busca constante na literatura (FEKRAZAD et al., 2016), devido a complexa interação dos estímulos com os tecidos e células se torna difícil este estabelecimento, mas as pesquisas *in vitro* tem grande importância na construção, desenvolvimento e acompanhamento desses aspectos.

Em relação a fotobioestimulação não apenas eventos de viabilidade, diferenciação, mineralização e caracterização genética das células ósseas, a capacidade de fechamento de feridas *in vitro* também tem sido avaliada. Uma vez que esse ensaio foi proposto (HOANG; OATES; COCHRAN, 2000) visando observar o

grau de migração celular calculando a área de fechamento cicatricial por períodos determinados de tempo. Além de ser de baixo custo é um protocolo simplificado para avaliação do fechamento cicatricial *in vitro* (RODRIGUEZ; WU; GUAN, 2005; LIANG; PARK; GUAN, 2007; WEINREB; NEMCOVSKY, 2015). Recente revisão de literatura em relação a fotobioestimulação e a cicatrização de feridas *in vitro* e *in vivo*, observou que a aplicação única dos estímulos ópticos é pouco eficaz, principalmente quando comparada a aplicações simultâneas (2 ou mais), essas promovem o fechamento da ferida de forma efetiva (KUFFLER, 2016). Esse trabalho observou diferentes ensaios e intuítos da fotobioestimulação, mas concluiu que estudos são amplamente necessários a fim de observar e identificar os mecanismos de ação e comprimentos de onda mais indicados para cada tecido alvo visando a sua cicatrização.

Os principais achados da fotobioestimulação em ensaios *in vitro* de fechamento de feridas com células ósseas (Saos-2), onde o laser diodo GaAlAs (915nm) foi aplicado de forma única, nas densidades de energia da 0 J/cm² (0s), 5 J/cm² (48s), 10 J/cm² (96s) e 15 J/cm² (144s). A área da ferida foi mensurada nos períodos de 4, 24, 48 e 72h após a irradiação. Além da viabilidade celular, quantificação do DNA e expressão de genes. Os resultados demonstraram que o laser incrementou significativamente o fechamento da ferida *in vitro* quando comparado aos controles, mesmo quando aplicado unicamente. Os tratamentos de 5 e 10 J/cm² promoveram o fechamento completo no período de 72h. A viabilidade celular e expressão génica (TGF-β1 e síntese colágeno tipo I) foi maior nos grupos experimentais, demonstrando que também foram bioestimuladas pela aplicação do laser (TSCHON et al., 2015).

2.4 Células da Granulação Óssea (GO)

A técnica da granulação óssea, ou enxerto ósseo em neoformação, foi empregada por Passanezi et al. (1989) fazendo parte de um procedimento que procura incrementar a neoformação óssea utilizando-se um enxerto autógeno altamente reparativo para ser utilizado classicamente em defeitos ósseos periodontais (EVIAN et al., 1982). Mais recentemente, a técnica foi associada a recobrimentos radiculares em recessões classe I e II de Miller (FERRAZ, 2009), também combinado

a enxertos xenógenos em levantamentos de seio maxilar (FERRAZ, 2013), bem como associado a instalação de implantes (trabalho ainda não publicado da disciplina de Periodontia FOB USP). Para isso, utiliza-se o tecido de granulação ou em neoformação de um alvéolo natural ou criado cirurgicamente entre 21 à 28 dias de cicatrização. Uma pesquisa recente (SANT'ANA et al., 2012) mostrou que o enxerto de granulação óssea pode ser utilizado em técnicas de recobrimento radicular com bons resultados. No mesmo ano, foi estabelecida a cultura primária dessas células (BARBOSA, 2012), permitindo a análise, com obtenção e comprovação de algumas de suas características e comportamentos esperados. A linhagem foi chamada de células de granulação óssea (GO), reforçando que essa granulação é distinta da inflamatória. É um tecido de reparo avermelhado e granuloso, por isso recebeu essa denominação. Outro estudo avaliou executou a cultura e caracterização das células da GO a partir da curva de crescimento, potencial de mineralização e liberação de cálcio por essas células, além da atividade da fosfatase alcalina (MEDINA-VALDÍVIA, 2013).

Relatos que associam o uso da fotobioestimulação a diferentes tipos de enxerto são aparentes na literatura, sendo que o desempenho dos enxertos autógenos, biomateriais sintéticos e xenógenos avaliados *in vivo* já foram citados previamente. Outra faceta de utilização é a associação com tecidos ou células autógenas, onde o aspirado da medula óssea de roedores foi incorporado com o estímulo óptico (laser InGaAlP, 606nm, 4,9J/cm²) visando potencializar os efeitos regenerativos sobre defeitos ósseos na calvária de ratos. O grupo com aspirado de medula e laser obteve maior formação de novo osso que todos os outros tratamentos propostos (NAGATA et al., 2013).

Por outro lado, quando testado o efeito sinérgico do laser diodo (GaAlAs, 810nm; 0,2W/cm²; 4J/cm²) associado a células mesenquimais (cultivadas do aspirado da medula), houve apenas modulação da inflamação e não foi observado a melhora do reparo ósseo em defeitos na calvária de ratos. Tanto nos que foram preenchidos somente pelas células quando nos que foram tratados pela associação das células e irradiados pelo laser. Assim o efeito sinérgico da associação não foi observado (FEKRAZAD et al., 2015).

Essas pesquisas visam o emprego do potencial das células osteoprogenitoras advindas do hospedeiro, associando assim a fotobioestimulação

pelas terapias luminosas e amplificando os efeitos desejados, como o potencial osteogênico e de reparação e cicatrização do tecido ósseo. O uso de células na regeneração óssea é tema de estudos, que fazem valer as características e princípios dessas visando melhorias cicatriciais. Inclusive com o desenvolvimento da engenharia de tecidos é crescente o fomento de pesquisas empregando células na viabilização de áreas ósseas injuriadas. Assim osteoblastos derivados de conjuntos celulares embrionários, pluripotentes e mesenquimais são associados a enxertos com matrizes determinadas visando o incremento ósseo. Os resultados são promissores e muito pertinentes para serem utilizados futuramente, quando maior número de estudos demonstrar as limitações e características desse artifício (ROLA; DOROSZKO; DERKACZ, 2014; PANEK; MARIJANOVIĆ; IVKOVIĆ, 2015).

Porém inexistem relatos da aplicação do laser ou LED sobre células GO, principalmente adquiridas pela técnica do enxerto ósseo em neoformação (QUADRO 1). Assim a avaliação do comportamento desse enxerto, potencialmente ativo para a regeneração, sob diferentes protocolos de irradiação é pertinente a ponto da observação dos efeitos sinérgicos dos estímulos luminosos. Havendo correspondência favorável as hipóteses lançadas transpõem-se esses atributos aplicando-os clinicamente, visando o incremento do reparo periodontal e implantar, em situações de regeneração tecidual e óssea guiada, reconstrução ou preservação alveolar e ainda pacientes com algum grau de debilidade óssea cicatricial.

Dessa forma, o presente estudo visou observar os efeitos de amplificação das células derivadas do enxerto ósseo em neoformação, combinado ou não a aditivos osteogênicos e associado aos fotoestímulos por laser e LED, se tornando um degrau na escala de evidência com intenção de promover futuramente o desenvolvimento promissor dessas características em ambiente clínico, em cenários críticos como distúrbios metabólicos, áreas de pouca irrigação (ao redor de implantes) e defeitos periodontais necessitados de regeneração.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar se a fotobioestimulação por laser em baixa intensidade (vermelho e infravermelho) e LED, em diferentes parâmetros de aplicação, foi capaz de estimular a viabilidade celular e a capacidade de mineralização de células da granulação óssea de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem celular utilizada para o experimento foram as células retiradas da calvária de rato, pela técnica do enxerto ósseo em neoformação e obtenção da granulação óssea (Linhagem rGO) obtidas por cultura primária de tecido de granulação da calvária após 21 dias da criação do defeito com broca trefina e cobertura da área com membrana, similar ao procedimento empregado na obtenção da granulação óssea humana (PASSANEZI et al., 1989; MEDINA-VALDÍVIA, 2013). Essas células foram obtidas em estudo anterior, sob aprovação no comitê de ética em animais (parecer CEEPA-Procuração Nº 020/2014), esse além da coleta expandiu e caracterizou as células rGO (trabalho ainda não publicado). As células estavam congeladas em nitrogênio líquido no laboratório de cultivo celular da disciplina de Bioquímica da FOB-USP.

As células foram descongeladas e incubadas em ambiente úmido a 37°C, numa atmosfera contendo 95% de ar e 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura celular utilizado foi DMEM (Sigma-Aldrich®-St. Louis-EUA) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC biotecnologia®-Cotia-São Paulo-Brasil) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (Sigma-Aldrich®-St. Louis-EUA). Nos grupos que receberam meio osteogênico, nos ensaios de longa duração, o meio DMEM foi complementado por ácido ascórbico (50 µg/ml) e 10 mM de β-glicerofosfato, para indução da diferenciação osteogênica das células. Os ensaios colorimétricos (MTT e Cristal Violeta) e o ensaio de cicatrização *in vitro* (Wound Healing), por serem de curta duração, foram realizados apenas com o meio regular, uma vez que o meio osteogênico somente desempenha e demonstra seus efeitos indutivos em períodos de tempo maiores.

4.1 Ensaios de curta duração - Viabilidade celular – MTT e cristal violeta.

Os grupos experimentais, para os testes de curta duração (colorimétricos e ensaio de wound healing), foram divididos em:

- C + = Controle positivo– meio DMEM regular
- C - = Controle negativo– meio DMEM regular
- LV 5 = Laser vermelho - meio DMEM regular 5J/cm²
- LV 8 = Laser vermelho - meio DMEM regular 8J /cm²
- LIV 5 = Laser infravermelho - meio DMEM regular 5J/cm²
- LIV 8 = Laser infravermelho - meio DMEM regular 8J /cm²
- LED 3= LED vermelho - meio DMEM regular 3s
- LED 5 = LED vermelho - meio DMEM regular 5s

Para esses experimentos foram plaqueadas 2×10^3 células na 6ª passagem em placas de 96 poços (Kasvi®-Curitiba-Paraná-Brasil), cada grupo com cinco réplicas. No primeiro dia as células foram plaqueadas, conforme protocolo padrão na literatura (FRESHNEY 2010), e alocadas respeitada a distância entre poços na mesma placa, afim de evitar o efeito de sobreposição da ação do laser e LED no mesmo conteúdo celular (DAMANTE et al., 2009).

Para isso foram realizados testes visuais. Tomando como base o diâmetro de irradiação do feixe dos estímulos luminosos, relatado pelo fabricante do aparato (0,024cm² -Thera Lase DMC), foi avaliada a propagação luminosa nas placas de cultivo celular de 96 poços, para cada um dos espectros de luz utilizados (laser Vermelho, laser Infravermelho, com luz guia e LED vermelho) (FIGURA 1). Assim todos os grupos foram alocados nas placas de 96 poços, de modo a não adquirirem efeito somatório do estímulo luminoso. Os demais poços, foram preenchidos com água destilada esterilizada por filtração. Uma vez que as placas seriam incubadas em estufa, esse artifício visou evitar o ressecamento do conteúdo líquido do meio de cultura, devido a distância na qual os poços preenchidos ficaram um dos outros.

Figura 1- Teste de propagação do feixe de irradiação e distribuição entre grupos experimentais nas placas de 96 poços de cultura celular para o Laser vermelho (a), Laser infravermelho (com luz guia) (b) e LED (c).

Após 24h o meio de todos os grupos foi substituído por DMEM com 1% de SFB, para indução de um estado de quiescência, de redução dos estímulos e fatores de crescimento (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Passadas mais 24h, esse meio foi removido e meio convencional (DMEM a 10% SFB) foi adicionado. Com exceção do grupo C –, que a partir de então ficou somente em contato com meio DMEM a 1% de SFB, que foi renovado no dia 3 (FIGURA 2). Em seguida foi feita a irradiação das placas conforme os grupos e parâmetros estipulados (QUADRO 2). Os protocolos foram baseados em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (PAGIN et al., 2014, MICHEL, 2016).

Figura 2 - Cronograma de execução dos ensaios colorimétricos.

Durante a irradiação todas as placas ficavam dispostas sob as mesmas condições dentro da capela de fluxo laminar. A irradiação de forma contínua e pontual, foi feita pelo fundo dos poços, sempre pelo mesmo operador, com o laser diodo em baixa intensidade Thera Lase (DMC – São Carlos-SP) com comprimento de onda 810nm (infravermelho próximo) e 660nm (vermelho). Como o poliestireno das placas gera uma perda de 12% na potência do laser, essa foi compensada na programação do aparelho para 45mW (DAMANTE; MARQUES, 2014). O LED trata-se de um protótipo do centro de pesquisa em óptica e fotônica do instituto de física de São Carlos cedido para estudos na FOB. Ele emite luz não coerente polarizada com faixa de comprimento de onda de $637 \pm 15\text{nm}$ e 40mW de potência, não ajustáveis. Tanto o LASER quanto o LED tiveram regime reaplicação, com intervalo de 6 horas entre cada aplicação, para cada poço. Em sentido da renovação do estímulo óptico, uma vez que aplicações unitárias tem se mostrado pouco eficazes (STEIN et al., 2005; DAMANTE et al., 2009; DAMANTE; MARQUES, 2014; PAGIN et al., 2014).

Quadro 2- Especificações do laser vermelho e infravermelho - Thera Lase (DMC) e LED.

Fonte de emissão	Potência	λ	Meio ativo	Densidade de Energia	Tempo	Ponta ativa / Área do poço*	Energia total	Densidade de potência
Vermelho	45 mW	660nm	AlGaInP	5J/cm ²	3s	0,024cm ²	0,12J	1666 mW/cm ²
Vermelho	45mW	660nm	AlGaInP	8 J/cm ²	5s	0,024cm ²	0,2J	126 mW/cm ²
Infravermelho	45 mW	810nm	GaAlAs	5 J/cm ²	3s	0,024cm ²	0,12J	1666 mW/cm ²
Infravermelho	45 mW	810nm	GaAlAs	8J/cm ²	5s	0,024cm ²	0,2J	126 mW/cm ²
LED	40mW	637±15nm		0,05J/cm ²	3s	1,91 cm ² ou 0,316cm ²	0,01J	150mW/cm ²
LED	40mW	637±15nm		0,03J/cm ²	5s	1,91 cm ² ou 0,316cm ²	0,009J	150 mW/cm ²

* Obs.: área do poço: 1,91 cm² para placas de 24 poços e 0,316 cm² nas placas de 96poços. Para os lasers vermelho e infravermelho apenas o diâmetro da ponta foi levado em consideração. Para o LED apenas o diâmetro do poço. Nas placas de 24 poços independente do dispositivo foram executadas duas aplicações por poço em diferentes regiões.

4.1.1 Teste do MTT

Os dados de viabilidade celular foram obtidos através da análise da viabilidade celular pelo teste do MTT. A análise da atividade mitocondrial das células foi feita pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel (FIGURA 3). O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração foi determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562nm (Synergy H1 – BioTek).

Figura 3 – Ensaio colorimétrico do MTT. Imagem antes (a) e após (b) penetração dos cristais pela membrana das células rGO. Imagem em aumento de 100 micrômetros/10x (grupo LED5s 72h).

4.1.2 Teste do cristal violeta

As mesmas características de plaqueamento e aplicação da fotobioestimulação foi seguido no ensaio colorimétrico por cristal violeta. Após cada período experimental (24, 48, 72 e 96h), as células viáveis foram lavadas com PBS e fixadas em etanol-glacial absoluto e ácido acético (3:1, vol/vol) por dez minutos a temperatura ambiente, deixando secar ao ar (eventualmente encubando a 4° C, envolvida em papel alumínio). As células foram coradas com cristal violeta a 0,1% (peso/vol) por dez minutos a temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido por decantação e lavado duas vezes com água destilada. O corante foi extraído em ácido acético a 10% (vol/vol) e a densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro a 550nm (Synergy H1 – BioTek). Os dados de densidade óptica (DO) foram utilizados para análise estatística.

4.1.3 Avaliação morfológica e qualitativa (método simples)

As células da granulação, após serem submetidas aos tratamentos de fotobioestimulação propostos sob cada um dos parâmetros descritos anteriormente, foram avaliadas morfolologicamente, visando observar possíveis alterações anatômicas geradas pelas terapias de fotobioestimulação, comparando-as aos controles (não irradiados). Bem como analisar de forma qualitativa a densidade celular nos diferentes períodos de tempo, anteriormente a realização dos ensaios colorimétricos, conforme descrito previamente (ARTILHEIRO et al., 2010). Dessa forma foi realizado o registro fotográfico com emprego de microscópio de fase invertida (OLYMPUS CKX41 TR obtido através de processo FAPESP 2014/05234-2) em cada poço das placas de 96 poços, após o plaqueamento (2×10^3) 6ª passagem, nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, para os oito grupos. Sempre sob o mesmo protocolo de aquisição de imagem e aumento de (10x /100 μ m). As imagens foram alocadas em painéis e avaliadas por comparação direta (teste X controle) dos parâmetros (morfologia e densidade).

Um examinador experiente e cego ao experimento (CAD), analisou as imagens e descreveu as características morfológicas das células da granulação quanto a densidade, espalhamento, achatamento, geometria e assimetria celulares, para possível interferência quanto a atipias celulares.

4.1.4 Ensaio de “wound healing” ou cicatrização de feridas *in vitro*

A capacidade de migração e viabilidade das células rGO submetidas ou não (controles) ao tratamento com laser e LED foi realizada através de um protocolo *in vitro* de cicatrização de feridas (HOANG; OATES; COCHRAN, 2000; LIANG; PARK; GUAN, 2007). 2×10^3 células na 6ª passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços, conforme protocolo estabelecido (FRESHNEY, 2010). Cada grupo com cinco réplicas. Uma vez que o diâmetro do poço é maior, testes da incidência do feixe de radiação foram realizados nessas, afim de alocar os grupos e promover a fotobioestimulação em todo o conteúdo do poço (FIGURA 4). Assim tomando em consideração o feixe de emissão luminoso dos dispositivos (informado pelo fabricante) e o diâmetro dos poços, houve a necessidade de aplicações em dois pontos, para cada poço, feitas de forma padronizada, onde o poço foi dividido por um sinal em caneta permanente e a cada semicírculo foi feita uma aplicação (FIGURA 5). Uma vez que a aplicação única não é garantia de abrangência de todo o conteúdo do mesmo poço de cultivo. Dessa forma a energia total foi o resultado da soma energética das duas aplicações (QUADRO 3).

Figura 4 – Teste de incidência do feixe de irradiação nas placas de 24 poços para alocação das distâncias dos grupos. a) padrão para observação da incidência do feixe luminoso. b) LV, c) LIV, d) LED. Mesmo o LED não abrange todo o poço da placa.

Figura 5 – Padronização da aplicação em dois pontos (cada semicírculo) de cada poço das placas pelo Laser e LED. Aplicação percorrendo a extensão de cada semicírculo (pontual). DE: densidade de energia J/cm² (somatória das duas densidades aplicadas em cada poço).

Quadro 3 Energia total por ponto e densidade de energia para os ensaios com placas de 24 poços.

Estímulo	Energia total	DE
LV 5 J/cm ²	0,24J	10 J/cm ²
LV 8 J/cm ²	0,4J	16 J/cm ²
LIV 5 J/cm ²	0,24J	10 J/cm ²
LIV 8J/cm ²	0,4J	16 J/cm ²
LED 3s	0,02J	0,10 J/cm ²
LED 5s	0,018J	0,06 J/cm ²

Anteriormente à aplicação dos estímulos e após 24 h do plaqueamento e cultivo celular, foi promovido o estado de quiescência celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). No dia seguinte uma “ferida” *in vitro* foi criada, utilizando-se para isto, a ponta cortada de uma pipeta de 1000µl (LIANG; PARK; GUAN, 2007; BASSO et al., 2012). A seguir, as células foram irradiadas utilizando os protocolos de irradiação elaborados e descritos anteriormente. A migração celular foi avaliada nos períodos de 12, 24, 36, 48 h, além do período inicial.

A análise da migração das células da granulação óssea rGO para a área central da ferida foi feita por fotografias obtidas através de câmera acoplada a microscópio invertido (OLYMPUS CKX41 TR obtido através de processo FAPESP 2014/05234-2). As áreas das feridas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX51, Miami, FL, EUA) equipado com câmera fotográfica (Olympus c 5060) e submetidas à análise por software Image J (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, EUA) através da mensuração da área da “ferida” e comparação do fechamento nos diferentes tempos (0, 12, 24, 36 e 48) (BASSO et al., 2012; MICHEL, 2016).

4.2 Ensaios de longa duração

Os grupos experimentais, para os testes de mineralização, foram 16, divididos em 4 réplicas.

- C + = Controle positivo (10% SFB) – meio DMEM regular
 - C - = Controle negativo (1% SFB) – meio DMEM regular
 - COST + = Controle positivo (10% SFB) – meio DMEM osteogênico
 - COST - = Controle negativo (1% SFB) – meio DMEM osteogênico
 - LVreg = Laser vermelho 5 e 8 J/cm² - meio DMEM regular
 - LVOST = Laser vermelho 5 e 8 J/cm² - meio DMEM osteogênico
 - LIVreg = Laser infravermelho 5 e 8 J/cm² - meio DMEM regular
 - LIVOST = Laser infravermelho 5 e 8 J/cm² - meio DMEM osteogênico
 - LEDreg = LED vermelho 3 e 5s- meio DMEM regular
 - LEDOST = LED vermelho 3 e 5s- meio DMEM osteogênico
-

4.2.1 Ensaio de mineralização (vermelho de alizarina)

Para avaliar a capacidade de mineralização, a deposição de cálcio foi observada através da coloração com vermelho de alizarina. Os períodos experimentais foram de 14, 21 e 28 dias. Para tanto, as células rGO foram plaqueadas na 6ª passagem e densidade de 4×10^4 , em placas de 24 poços. Após a aderência, as células foram divididas em 16 grupos por meio de cultivo. Em oito grupos, as células rGO foram cultivadas em DMEM + 10% SFB (meio não osteogênico/regular) e no restante dos grupos, as células da rGO foram submetidas ao estímulo osteogênico e cultivadas em meio DMEM + 10% SFB + 50 µg/ml ácido ascórbico + 10 mM β-glicerofosfato (meio osteogênico). A mineralização foi avaliada por coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil). O laser e LED foram aplicados duas vezes por semana antes do período de 14 dias e entre os intervalos de 21 e 28 dias, sem que o estado de quiescência fosse reproduzido. O meio de cultura foi constantemente trocado (FIGURA 6).

Após 14, 21 e 28 dias de cultivo, o sobrenadante das células rGO foi descartado e as células foram lavadas com PBS uma vez, fixadas com solução de formaldeído a 4% por 5 minutos em temperatura ambiente (TA). Então as células foram incubadas com solução de alizarina a 2%, pH 4,2 durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguidas de 3 lavagens com água deionizada ultra-pura. As placas quando secas, foram fotografadas utilizando a câmera El Logic 100 Imaging System e analisadas pelo programa Kodak Molecular Imaging software v.4.5.

Figura 6 – Cronograma do experimento, as irradiações foram repetidas duas vezes por semana para manter o estímulo com o laser e LED nas células rGO e o meio de cultura trocado a cada três dias.

A análise quantitativa da coloração foi avaliada pelo método colorimétrico (PETRI et al., 2010; SILVA et al., 2011). Após as placas estarem totalmente secas, foram adicionados 280 µl de ácido acético a 10% diretamente em cada poço corado com vermelho de alizarina. A placa foi submetida à agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos *ependorf*, os quais foram aquecidos a 85° C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos, centrifugados a 20.000g por 15 minutos e 100 µl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para poços de placas com 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 40 µl de hidróxido de amônia a 10% em cada poço para neutralização do ácido. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 405 nm (Synergy H1 – BioTek), e a formação de matriz mineralizada foi expressa como densidade óptica (D.O.).

4.2.2 Determinação da atividade de fosfatase alcalina (FALC)

Para esse experimento, as células, na sexta passagem, foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 4×10^4 células/poço com grupos contendo

somente meio regular e outros o meio osteogênico (meio DMEM + ácido ascórbico (50 µg/ml) e 10 mM de β-glicerofosfato).

Os períodos experimentais foram de 7, 14 e 21 dias. As irradiações foram distribuídas conforme os grupos descritos anteriormente. As fotobioestimulações (laser e LED) eram reaplicadas duas vezes a cada semana (em intervalos de três dias), a título de renovação do efeito óptico. Começando antes do período de leitura de 7 dias e entre os intervalos de 14 e 21 dias, sem que o estado de quiescência fosse reproduzido. O meio de cultura foi constantemente trocado (FIGURA 7).

Figura 7 – Cronograma do experimento, as irradiações foram repetidas duas vezes por semana para manter o estímulo com o laser e LED nas células rGO e o meio de cultura trocado a cada três dias.

A atividade da FALC é dada pela conversão do pNPP, substrato da enzima, pelo p-nitrofenol, produto de coloração amarela. Após o período de leitura semanal, sob placas de 96 poços foi adicionada solução contendo tampão glicina (25mM, pH 9,4), acrescido de 2 mM de MgCl₂ e 1 mM de p-nitrofenilfosfato -pNPP). Após a incubação da solução em estufa por 30 minutos a 37°C (tempo necessário para a estabilização), foram adicionados 50 µl das amostras de cada grupo por poço (ressuspensas em 10mM Tris HCl pH7,5; 0,5mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100). A placa foi mantida a 37° C durante o tempo necessário para a reação ocorrer. A reação foi paralisada com NaOH 1 M, seguida da leitura em espectrofotômetro a 405 nm (Synergy H1 – BioTek). A unidade enzimática (UE) foi calculada utilizando a equação:

$$UE = \frac{(\text{absorbância} \times \text{Volume final (mL)} \times 106)}{\text{Volume da amostra } (\mu\text{L}) \times \varepsilon \times \text{tempo de reação}}$$

A atividade enzimática (AE) foi dada pela equação:

$$AE = \frac{UE}{\text{mg de proteína total}}$$

4.3 Análise Estatística

Os dados de densidade óptica, absorbância e porcentagem de migração celular foram analisados estatisticamente. Todos os resultados dos ensaios laboratoriais foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) e complementados pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos de curta duração (ensaios colorimétricos e de cicatrização de feridas) compararam os diferentes tratamentos em relação ao tempo. Todos os grupos experimentais foram comparados aos grupos controles e posteriormente comparados entre si nos períodos de avaliação analisados. O período final 96h foi evidenciado e ilustrado nesses ensaios por mostrar maior representatividade nos resultados e está disposto de forma comparativa e ilustrado em tabelas abaixo, o resultado integral da análise dos dados pode ser observado nos apêndices A e B.

Já os ensaios de longa duração comparam a interação entre os diferentes tratamentos e a aplicação ou não de aditivos osteogênicos junto ao meio de cultura celular, assim os resultados evidenciados foram a cada período de tempo (em dias) de coleta do substrato celular. Estão dispostos dessa forma nesse capítulo e os resultados na íntegra disponíveis nos apêndices D e E.

5.1 Ensaios colorimétricos

5.1.1 MTT

A figura 8 mostra os resultados da análise da viabilidade celular pelo MTT nas células rGO, da comparação dos diferentes grupos entre si nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A comparação expandida entre todos os períodos e grupos experimentais está na tabela no apêndice A.

Em comparação ao C+ todos os grupos experimentais, a exceção do grupo LIV8, tiveram aumento na viabilidade celular, em algum período, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O grupo LIV8 apresentou viabilidade celular inferior ao C+ em todos os períodos de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Já o grupo LED5 no período de 72h foi melhor, estatisticamente significativa, em relação ao C+ no mesmo período ($P < 0,05$) e estatisticamente semelhante ao C+ no período de 96h ($p > 0,05$).

Os grupos controles C+ e C- foram estatisticamente diferentes entre si em todos os períodos ($p < 0,05$). Quando comparados ao C- os grupos experimentais tiveram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em algum período. A exceção do grupo LIV8 que foi estatisticamente semelhante ao C- no período de 48h ($p > 0,05$), porém em todos os outros períodos obteve menor viabilidade celular de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em relação ao período final apenas o grupo LV8 obteve resultados maiores que o C+ e que todos os outros grupos experimentais ($p < 0,05$). O grupo LV5 foi estatisticamente semelhante ao grupo C+, e os demais grupos (LED3, LED5, LIV5, C- e LIV8) não obtiveram diferença estatística em relação ao C+ ($p > 0,05$), porém obtiveram entre si ($p < 0,05$).

Figura 8 Gráfico da viabilidade celular a partir da densidade óptica em relação ao tempo pelo ensaio do MTT. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$), descritas apenas para o período de 96h.

Um resumo dos resultados no período de 96h, representado na forma de esquema:

LV8 > C+ = LV5 > LED3 > LED5 > LIV5 > C- > LIV8

5.1.2 Cristal Violeta

A figura 9 mostra os resultados da análise da viabilidade celular pelo ensaio do cristal violeta nas células rGO, da comparação dos diferentes grupos entre si nos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h. A comparação expandida entre todos os períodos e grupos experimentais está na tabela no apêndice B.

Todos os grupos experimentais tiveram diferença estatisticamente significativa, em algum dos períodos, na comparação com o C+ ($p < 0,05$). Já o C+ obteve maior viabilidade celular de forma estatisticamente significativa somente ao C- nos períodos de 72h e 96h ($p < 0,05$), nos demais períodos foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$).

Em comparação ao C-, todos os grupos foram diferentes estatisticamente em algum período experimental ($p < 0,05$). Em se tratando do período final todos os grupos experimentais foram diferentes estatisticamente ao C+ e ao C- ($p < 0,05$). O grupo LED5 obteve a maior viabilidade celular, porém demonstrou-se estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) aos grupos LED3, LV8, LIV5 e LV5. Todos esses grupos, bem como o grupo LED 5 obtiveram diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo LIV8 e aos controles.

Figura 9 Gráfico da viabilidade celular a partir da densidade óptica em relação ao tempo pelo ensaio do Cristal Violeta. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$), descritas apenas para o período de 96h.

Um resumo dos resultados no período de 96h, representado na forma de esquema:

$$\text{LV8} = \text{LED5} = \text{LED3} = \text{LIV5} = \text{LV5} > \text{LIV8} > \text{C+} > \text{C-}$$

5.2 Avaliação morfológica e qualitativa

A tabela de comparação entre todos os períodos e grupos experimentais está no apêndice C, e a partir dela podemos observar os resultados da avaliação das imagens fotográficas adquiridas nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas demonstraram que não houve alteração morfológica entre as células cultivadas e associadas as diferentes terapêuticas empregadas.

As principais características são células aderentes, com poucos prolongamentos. Dispostas em monocamadas, possuindo formato cubóide ou cuboidal, não alongadas. Denotando acúmulo importante de conteúdo citoplasmático colagenoso. Dispostas de forma desordenada, não linear.

Em relação a densidade e confluência celular, pouca alteração foi observada no período de 48h, mas durante os períodos de 24, 72 e 96h houve um acréscimo gradativo na densidade celular entre cada período de tempo analisado, o que é comprovado e quantificado pelos testes de viabilidade celular.

5.3 Ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* (Wound Healing)

A figura 10 ilustra a migração celular de alguns grupos experimentais (LV5, LIV5 e LED5), além do controle positivo, nos períodos de tempo (0h, 12h, 24h, 36h e 48h). É possível observar que houve preenchimento nos grupos LV5, LIV5 e LED5 no período de 48h. No grupo C+, o preenchimento ainda não estava completo após às 48h do experimento.

Figura 10 Fotografias obtidas por microscópio invertido para cultura celular do ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*. Os grupos LV5, LIV5 e LED5 apresentaram fechamento mais rápido na comparação direta ao grupo C+, avaliados nos períodos de 0h, 12h, 24h, 36h e 48h.

As interações dos dados estatísticos complementados pelo pós-teste de Tukey estão demonstrados na figura 11 que traz a média dos resultados em porcentagem do preenchimento das feridas *in vitro* nas células rGO, entre os diferentes períodos de tempo do ensaio, comparando a média dos grupos controles com a dos grupos experimentais. O período em que a fotobioestimulação demonstrou-se efetiva foi às 36h, quando houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em comparação aos períodos iniciais, que foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Às 48h a média de fechamento atinge próximo a 100%.

Figura 11 Gráfico da média do preenchimento das feridas *in vitro* (em %) ao longo do tempo, comparação da média dos grupos controles com a média dos grupos experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Já a figura 12 demonstra em porcentagem o resultado da comparação dos diferentes grupos e tratamentos entre si no desempenho do fechamento das feridas. Onde o grupo LED5 apresenta a maior taxa em porcentagem de fechamento da ferida, próxima a 90%, obtendo diferença estatística ($p < 0,05$) aos demais grupos. Os grupos LV5, LIV8 e LIV5 obtiveram desempenhos similares entre si ($p > 0,05$) porém todos foram superiores ao C- e C + ($p < 0,05$). O grupo LV8 foi superior apenas ao C+ e LED3 ($p < 0,05$). O grupo LED3 obteve desempenho inferior a todos os grupos ($p < 0,05$).

Figura 12 Gráfico demonstrado o preenchimento da ferida *in vitro* (em %) pelos diferentes tipos de tratamento/grupos. Letras diferentes ($p < 0,05$).

Um resumo do período mais representativo do efeito da fotobioestimulação no ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* disposto em forma de esquema:

LED5 > LV5 = LIV8 = LIV5 > C- > LV8 > C+ > LED3

5.4 Vermelho de Alizarina (ensaio de mineralização)

A comparação entre todos os períodos e grupos experimentais está na tabela no apêndice D. A figura 13 representa os nódulos mineralizados e deposição de cálcio nas células da granulação óssea.

Figura 13 Imagem em microscópio invertido (10X) do ensaio de mineralização por vermelho de alizarina apresentando os nódulos de cálcio mineralizados e corados do grupo LED5ost aos 21 dias.

Nas figuras 14, 15 e 16 abaixo os resultados são expostos segregados pelos períodos experimentais em dias. A figura 14 mostra os resultados da análise da deposição de cálcio pelas células rGO no período de 14 dias, demonstrando a comparação dos diferentes grupos entre si no período.

Figura 14 Gráfico da mineralização celular da densidade óptica pelo ensaio do Vermelho de Alizarina no período de 14 dias. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Resumo em forma de esquema do período de 14 dias:

**LED5ost>LED3ost>LED5reg=LED3reg=LV8ost>LV5ost>LV5reg=LV8reg>
LIV5ost=LIV8ost=LIV8reg>LIV5reg>C+ost>C+reg>C-ost=C-reg**

A figura 15 mostra os resultados da análise da deposição de cálcio pelas células rGO no período de 21 dias, demonstrando a comparação dos diferentes grupos entre si no período.

Figura 15 Gráfico da mineralização celular da densidade óptica pelo ensaio do Vermelho de Alizarina no período de 21 dias. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Resumo em forma de esquema do período de 21 dias:

**LED5ost>LED3ost>LV8ost>LV5ost>LED5reg>LV8reg=LED3reg=
LV5reg>LIV5ost>LIV8ost>LIV8reg=LIV5reg>C+ost>C-ost>C+reg>C-reg**

A figura 16 mostra os resultados da análise da deposição de cálcio pelas células rGO no período de 28 dias, demonstrando a comparação dos diferentes grupos entre si no período.

Figura 16 Gráfico da mineralização celular da densidade óptica pelo ensaio do Vermelho de Alizarina no período de 28 dias. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Resumo em forma de esquema do período de 28 dias:

**LED5ost>LED3ost>LED3reg>LV8ost>LV5ost>LED5reg>LV5reg>LV8reg>
LIV5ost>LIV8ost>LIV8reg>LIV5reg=C+ost>C+reg=C-ost>C-reg**

Na comparação global entre todos os grupos e períodos, observa-se que aos 21 dias há maior atividade de mineralização celular ($p < 0,05$). Onde o grupo LED5ost nesse período, obteve o maior número de depósito de cálcio que todos os outros grupos e períodos ($p < 0,05$). Em relação ao meio regular, o mesmo tratamento óptico o do grupo LED5reg aos 21 dias foi o que obteve maior atividade de mineralização, sendo superado pelos grupos LED e laser vermelho condicionados ao meio osteogênico (LED5ost, LED3ost, LV8ost, LV5ost) ($p < 0,05$). Além da maioria dos grupos regulares terem superado o grupo controle osteogênico durante o ensaio, demonstrado o efeito da terapia luminosa sozinha como ativadora da mineralização.

Os grupos osteogênicos (LED5ost, LED3ost, LV8ost, LV5ost) desempenharam melhores resultados que os condicionados com o meio regular e os demais grupos ($p < 0,05$), principalmente aos 21 dias. Em relação aos grupos de laser infravermelho do grupo osteogênico (LIV5ost e LIV8ost), os grupos regulares LED5reg, LED3reg, LV8reg, LV5reg obtiveram de forma geral, melhor desempenho ($p < 0,05$).

Em relação ao meio regular o tratamento mais eficaz foi o do grupo LED5reg. Porém a dosagem inferior, do grupo LED3sreg e os grupos LV5reg e LV8reg obtiveram resultados significantes ($p < 0,05$), sob alguns tratamentos osteogênicos, como por exemplo dos grupos LIV5ost e LIV8ost. Já os grupos infravermelho regulares (LIV5reg e LIV8reg) de modo geral, superaram apenas os grupos controles, em algum período de tempo ($p < 0,05$). Na comparação entre esse tratamento os grupos com substrato osteogênico (LIV5ost e LIV8ost) obtiveram maiores índices de mineralização ($p < 0,05$), que os infravermelhos regulares.

Todos dos grupos experimentais regulares obtiveram melhores resultados que os controles C+reg e C-reg. A maioria desses grupos experimentais regulares, também obteve melhores resultados que os grupos controles osteogênicos C+ost e C-ost, demonstrando a promoção da mineralização pelas terapias luminosas. Apenas o grupo LIV5reg aos 28 dias não superou o grupo C+ost.

5.5 Fosfatase Alcalina

Os resultados derivados do experimento, realizado em duplicata, partiram da expressão da atividade da fosfatase alcalina em μmol por p nitrofenol (pNP) divididos pelos 60 minutos da reação após a multiplicação pelas diferentes quantidades de proteína, que variaram entre os grupos de 0,0044 até 0,019 mg/proteína, obtidas a partir da dosagem pelo método de Bradford (espectrofotômetro a 595nm). Foi empregada a curva pequena para quantificação da amostra, essa foi diluída em 75 vezes (149 μl de água e 2 μl da amostra), uma vez que as amostras foram mantidas congeladas em 200 μl da solução tampão com 1% de inibidor de protease.

A comparação entre todos os períodos e grupos experimentais está na tabela no apêndice E. Apenas no período inicial (7 dias) houve diferença estatística na comparação das médias da atividade da FALC de todos os grupos aos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$), já esses períodos (14 e 21d) foram semelhantes estatisticamente (FIGURA 17).

tempo (dias)	a	b	c
7		p=0,00013*	p=0,00013*
14	p=0,00013*		p=0,817768
21	p=0,00013*	p=0,817768	

*significância $p < 0,05$

Figura 17 Tabela dos valores de p da comparação entre as médias de todos os grupos da atividade da fosfatase alcalina divididos pelos períodos do ensaio 7, 14 e 21 dias. O sinal (*) representa significância estatística ($p < 0,05$).

A figura 18 demonstra o desempenho de todos os grupos em todos os períodos para a FALC. Onde podemos observar que nenhum tratamento específico dos grupos experimentais se destacou nos períodos de tempo avaliados ($p > 0,05$). Mas no período de 7 dias houve diferença de todos os grupos experimentais em relação aos grupos controle ($p < 0,05$) e em relação a todos os grupos dos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$). Os grupos controle em todos os períodos foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Nos demais períodos os grupos experimentais foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Observando as médias apenas de forma descritiva (APÊNDICE E e FIGURA 18), houve pouca variação dos resultados entre todos os grupos.

Figura 18 Gráfico da atividade da fosfatase alcalina dividido pela atividade da enzima nos grupos e períodos avaliados (7, 14 e 21 dias). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo observou o efeito da fotobioestimulação por laser e LED nas células da granulação. As terapias com luz, de forma geral, foram favoráveis para a viabilidade celular, fechamento de feridas e depósito de cálcio. Demonstrando ativação da fosfatase alcalina aos 7 dias. Dentre os parâmetros de aplicação o LED5s associado ao meio osteogênico mostrou maior deposição de cálcio, e nos ensaios de viabilidade e fechamento de feridas, o tratamento por LED também incrementou favoravelmente a viabilidade celular. Os tratamentos com laser V e IV foram semelhantes ao LED apenas nos ensaios de viabilidade celular.

Os parâmetros de irradiação foram baseados em trabalhos anteriores sobre fotobioestimulação (DAMANTE et al., 2009; PAGIN et al., 2014), e foram modificados com base nos achados e hipóteses desses, onde as aplicações não eram repetidas. A partir disso e baseado na literatura (STEIN et al., 2005; DAMANTE et al., 2009; DAMANTE; MARQUES, 2014; PAGIN et al., 2014), aumentamos a quantidade de vezes em que as células entraram em contato com o estímulo luminoso, uma vez que foi demonstrado que a reaplicação do LED rendeu melhores resultados do que a aplicação individual (LI; LEU; WU, 2010). Nos ensaios de curta duração a reaplicação fora realizada após 6 horas (OLIVEIRA et al., 2016), e nos ensaios de longa duração as reaplicações eram realizadas a cada três dias.

Em relação ao laser, nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho, utilizou-se duas doses de energia total, de 0,12J e 0,2J, com base em estudos passados (DAMANTE et al., 2009). Os parâmetros do LED derivam das especificações técnicas dos idealizadores desse protótipo, dessa forma foram realizados cálculos levando em conta o diâmetro do poço das placas de cultura celular com a área irradiada (QUADRO 2). Mas nas placas de 24 poços, onde o diâmetro dos poços era maior que o estímulo luminoso, foram realizadas duas aplicações por poço, visando abranger um maior número de células, supondo que uma aplicação não seria capaz de interagir com todas as células. Nesses casos as doses de energia total derivam da soma das duas aplicações (FIGURA 5) (QUADRO 3).

Estudos recentes demonstram que a fotobioestimulação por LED possui efeitos semelhantes que a do laser (SOUSA, 2008; ACIOLE, 2014; ROSA, 2014), o

que também foi notado em nosso estudo, a pesar do LED ter mostrado resultados melhores em alguns ensaios, o laser vermelho obteve resultados semelhantes em algumas situações. Embora diga-se que o LED tenha menor custo e maior portabilidade que o laser, na área da saúde ainda não se pode lograr dessa redução de valores, que é proporcionada de forma ampla na iluminação pública, uso em eletrodomésticos e outras áreas, além de possuir maior autonomia e duração nesses casos. Na área da saúde o LED tem seu espaço, já comercializado, nos curadores portáteis de resina composta e nas áreas de estética, fisioterapia e podologia, onde muitas vezes os aparelhos empregam o LED associado ao laser. Nesses casos o comprimento de onda do LED é pertencente a luz azul. Há também o LED para fotocclareamento dental emitindo a luz violeta (ZANIN et al., 2016). Mas nesse estudo empregamos um protótipo de LED, de luz vermelha, uma vez que até então esse dispositivo não aparece comercializado no Brasil, visando a fotobioestimulação e nesse espectro de luz. Já, os aparelhos de laser, tem seu tamanho cada vez mais reduzido conforme a tecnologia de produção avança e também já se apresentam dispositivos que são facilmente transportáveis.

O meio de cultura celular utilizado neste trabalho foi o DMEM completo, diferentemente de outros trabalhos com cultura osteoblástica que utilizam o α MEM (LIM et al., 2014). Em trabalho anterior (MEDINA-VALDÍVIA, 2013) que utilizou as células da granulação humana, também derivadas de cultura primária, o meio DMEM foi empregado sendo realizados ensaios de viabilidade, mineralização e curva de crescimento celular, os quais não apresentaram distorções e possibilitaram a mineralização das células. O trabalho que obteve as células empregadas nesse estudo (ainda não publicado), fez o mesmo seguimento metodológico e não demonstrou distúrbios na cultura celular, possibilitando a mineralização e análise da atividade da fosfatase alcalina das células da granulação óssea de rato. Observando os dados técnicos (data sheet ATCC) o meio DMEM é mais completo que o α MEM e dispõe das condições necessárias para cultura com células ósseas.

Um artifício metodológico empregado foi o distanciamento dos poços das placas de cultura celular, para todos os ensaios executados, evitando o efeito somatório do laser e do LED sob os poços próximos da placa de cultura. Esse mesmo protocolo foi executado em trabalho anterior (MICHEL, 2016), e o distanciamento foi

calculado com base no diâmetro e dissipação do feixe em cada placa de 96 ou 24 poços.

Outra consideração é que os grupos variaram conforme a duração do ensaio. Uma vez que o meio osteogênico não foi empregado nos ensaios de curta duração (colorimétricos e de cicatrização de feridas), porque esses têm interesse em avaliar essencialmente a viabilidade e migração celular. Quando esses ensaios são realizados também com o meio osteogênico o mais provável é que a proliferação celular e fechamento da ferida não sejam tão aparentes comparados ao meio convencional. Isso pode ser explicado devido ao fato de que ao entrar em contato com os substratos pró mineralização a célula irá se programar para diferenciar e não possuído a intenção de proliferação. Isso posto não se faz interessante portanto, a comparação dos dois diferentes meios empregados nesse trabalho nos ensaios de curta duração. Diferente dos ensaios de longa duração que são essencialmente para avaliar a diferenciação celular capacitando a mineralização. Nesse caso observamos diferenças entre os meios de cultura, onde os substratos osteogênicos demonstraram, nesse trabalho, um efeito sinérgico ou somatório na associação a fotobioestimulação, promovendo maior deposição de cálcio. Tal resultado pode estimular um maior número de estudos empregando essa associação, visando futuramente a melhora em cenários clínicos em que se empregam enxertos ósseos e sejam deficitários na cicatrização.

Os ensaios colorimétricos avaliam essencialmente a viabilidade celular, porém se o ensaio demonstrar resultados inferiores é provável que não tenhamos nenhuma célula disponível, afetando portanto a proliferação celular. Há diferença no perfil desses, um está ligado as mitocôndrias (MTT) e o outro possui afinidade ao DNA (cristal violeta), dessa forma é esperado que seus resultados sejam diferentes, porém complementares. Uma vez que o laser vermelho atue diretamente nas mitocôndrias, é possível que essas organelas estejam superestimuladas e superativas no momento do ensaio e assim corarem de forma mais representativa, elevando o índice de viabilidade celular nos períodos, além de ser o teste mais realizado *in vitro* para avaliar as células viáveis. Já o cristal violeta possui interação nuclear e complementa a análise da viabilidade celular. Como podemos observar o grupo laser vermelho 8J/cm² apresentou melhores resultados para o MTT e também no cristal violeta, embora nesse tenha adquirido similaridade estatística a outros grupos (LED5,

LED3, LIV5 e LV5). No ensaio do cristal violeta todos os grupos experimentais (LV, LIV e LED) ultrapassaram os controles nos períodos de 48 e 96h ($p < 0,05$), sendo períodos representativos do efeito positivo da fotobioestimulação de todos os parâmetros empregados nesse estudo.

Em relação aos relatos de que o tempo de exposição parece influenciar positivamente a viabilidade celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) observamos que isso foi aplicado no nosso trabalho, apenas para o grupo laser vermelho (LV8) no ensaio do MTT e para os grupos LED e laser vermelho no ensaio do cristal violeta, onde os grupos com maior tempo de exposição (LED5s e LV8 5s) atingiram maior viabilidade celular que seus grupos de menor tempo de exposição. Em se tratando dos grupos com laser vermelho há o aumento não apenas do tempo, mas também da dose, o que pode ter influenciado no incremento da viabilidade. Onde podemos notar de forma mais representativa o efeito que o tempo de aplicação possui sobre a viabilidade celular é nos grupos LED, uma vez que o protótipo empregado não possibilita mudanças na fluência. Dessa forma empregamos dois períodos de tempo de aplicação, análogos aos períodos em que aplicamos o laser, 3 e 5s, e pudemos observar que a viabilidade celular foi alterada positivamente pelo tempo de aplicação apenas por alguns parâmetros utilizados. Esse efeito do tempo também fora observado no ensaio de migração celular, onde o grupo LED5s desempenhou o fechamento da ferida *in vitro* mais rapidamente que todos os grupos, inclusive o grupo LED3s.

O LED teve desempenho inferior na viabilidade celular no MTT comparado aos grupos laser, diferentemente de estudos prévios em que os resultados foram semelhantes (PAGIN et al., 2014), no nosso estudo houve semelhança apenas no ensaio do cristal violeta. O que pode ser explicado pelas diferenças do dispositivo emissor, cultura celular ou ainda pelos parâmetros, já que no estudo de PAGIN et al., (2014) o LED foi aplicado em densidades de energia mais altas 3 e 5 J/cm² (83 e 50s) e através de uma mesa de LED (Biotable – USP – São Carlos). Outro estudo também com LED (DE: 2 e 4 J/cm²), em osteoblastos derivados da medula óssea de ratos, obteve maior taxa de viabilidade celular na DE 4 J/cm² (LI; LEU; WU, 2010).

Sob densidades de energia mais baixas (1,9 J/cm² e 3,8J/cm²) os tratamentos por laser vermelho e infravermelho (V:660nm e IV: 780nm/P: 20mW) aumentaram significativamente a viabilidade celular nos períodos de 24 e 48h

comparados ao controle, no teste do MTT (OLIVEIRA et al., 2017). Nosso estudo empregou células e um dispositivo de laser diferentes, mas atingiu com a densidade mais alta LV 8J/cm² maior viabilidade celular que os controles às 96h. Levando em conta os resultados de CAVALCANTI et al., (2015), onde com laser vermelho (660nm; 50mW, DE: 0-12J/cm²) obteve os melhores resultados para a viabilidade celular nas DE 6, 10 e 12J/cm², e na DE 8J/cm² observou a liberação de produtos da peroxidação lipídica e radicais livres, ávidos ao desenvolvimento de atipias celulares mas, apesar da presença desses produtos, não houve a demonstração de alterações morfológicas celulares, o que também não foi observado em nosso estudo.

Optamos por catalogar a avaliação morfológica e qualitativa visando observar possíveis atipias nas células, bem como realizando de forma associada a análise da densidade e confluência celular, nos diferentes períodos de tempo. Esse método foi baseado no estudo de Artilheiro et al. (2010), que emprega células cancerígenas e avalia possíveis distúrbios morfológicos a partir de fotografias prévias a reação do ensaio colorimétrico. Com a mesma preocupação realizamos esse ensaio simples e sem valor estatístico, onde apenas um avaliador observou todas as fotografias obtidas no microscópio invertido e comparou com as células do controle não irradiadas, o mais valioso é que não foram observadas atipias morfológicas nos grupos onde fora realizada a fotobioestimulação, considerando que o laser e LED nos parâmetros utilizados não foram capazes de alterar a morfologia das células empregadas nesse estudo.

O ensaio de cicatrização de feridas demonstrou que a fotobioestimulação foi eficaz ao promover o fechamento da ferida, principalmente no período de 36h. O grupo LED5 demonstrou a maior ativação da migração celular no ensaio, com desempenho inferior, o grupo LV5 e os dois grupos infravermelhos (LIV8 e LIV5) adquiriram fechamento estatisticamente significativo quando comparados aos controles, não irradiados. O estudo de Tschon et al. (2015), não trabalhou com o LED, mas com laser em osteoblastos imortalizados (Saos-2) nas doses 0, 5, 10, 15 J/cm², nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas. Em seu resultado, o laser GaAlAs (915nm/ 6W), aplicado de forma pulsada (100Hz) também promoveu o fechamento da ferida de forma estatisticamente significativa. Os tratamentos com as densidades 5 e 10 J/cm² obtiveram o fechamento mais rápido, às 72h, já a DE: 15J/cm² atingiu fechamento máximo após às 96h. No período final o grupo controle ainda não apresentava

fechamento completo. Diferentemente do nosso estudo, onde o período de tempo final foi 48h, e nesse praticamente todos os grupos possuíram fechamento integral, sendo que o período mais representativo da ação do LED e do laser nas células da granulação de rato foi às 36h. Se supõem que essa diferença seja em detrimento do tipo de linhagens celulares diferentes empregadas nos estudos, além dos protocolos e parâmetros de irradiação também diferentes. Este ensaio é barato e rápido de ser realizado (LIANG; PARK; GUAN, 2007), principalmente conforme a metodologia que empregamos, porém são escassos os relatos com células ósseas e o uso do LED na cicatrização de feridas. Por isso nosso estudo tem importância em demonstrar a capacidade de migração de células ósseas *in vitro* estimuladas de forma favorável principalmente pelo LED.

O ensaio de vermelho de alizarina ou ensaio de mineralização tem importante papel na diferenciação celular, não apenas na demonstração dos efeitos da fotobioestimulação, ele serve para caracterizar as células empregadas demonstrando que realmente estamos trabalhando com pré-osteoblastos com potencial de mineralizar, caso contrário esse substrato poderia não ser derivado das células da granulação. Esse fato é muito importante em estudos que utilizam culturas primárias, onde a caracterização celular é dependente de ensaios desse tipo, como é o caso do nosso estudo. A partir disso podemos evidenciar que a cultura celular empregada é a que nos destinamos a trabalhar, associado as características morfológicas e de viabilidade celular. Assim, esse ensaio de longa duração possibilitou a comparação dos diferentes meios de cultura celular, onde o meio osteogênico era aditivado com substâncias pró mineralização. Isso visa a comparação dos efeitos da fotobioestimulação em um substrato convencional e outro com elementos de favorecimento. No nosso estudo, pautado no ensaio de mineralização, observamos que de modo geral o meio osteogênico associado aos estímulos luminosos obteve um efeito somatório, viabilizando uma maior quantidade de nódulos de cálcio que os outros grupos experimentais, não complementados com substâncias adicionais.

Um importante achado nesse ensaio foi a demonstração da indução da produção de nódulos pela fotobioestimulação, uma vez que os grupos experimentais condicionados em meio regular superaram o grupo controle osteogênico na maioria das comparações entre os grupos. Onde podemos observar que a luz agiu de forma similar aos aditivos osteogênicos na promoção da mineralização. Dessa forma sugere-

se que a luz promoveu uma indução osteogênica, melhor que o meio osteogênico em si.

Dentre os grupos osteogênicos, os de maior destaque são os estimulados pelo LED, tanto o de 5s quanto o de 3s. Principalmente no período de pico do ensaio, aos 21 dias, onde fora obtida a maior concentração de nódulos de cálcio. Assim podemos observar uma relação entre tempo e efeito durante todos os períodos, onde o maior tempo de aplicação do LED (5sost) resultou em maior concentração de nódulos. Diferentemente de outro estudo, em que o vermelho de alizarina foi incrementado principalmente pelo laser e não pelo LED (OLIVEIRA et al., 2016). Os grupos osteogênicos do laser vermelho seguiram a mesma relação de proporção, porém nesse caso não apenas o tempo é maior, mas a dose também, onde o grupo LV8ost (5s) obteve maior mineralização que o grupo LV5ost (3s), em todo o ensaio. Similar a outro relato, onde em densidades de potência mais altas, o laser proporcionou maior produção nódulos mineralizados (KUSHIBIKI et al., 2015).

Em relação aos grupos com meio convencional, os tratamentos com LED foram também os que mais vezes resultaram na maior mineralização, durante os períodos experimentais, superado muitas vezes apenas pelos grupos LED osteogênicos. Isso demonstra que o efeito óptico causado pelo LED é favorável a mineralização celular e pode ser equiparado ao laser (SARACINO et al., 2009; KIYOSAKI et al., 2010; BLOISE et al., 2013), e quando acrescido a substratos osteogênicos sofre um efeito somatório, potencializando a mineralização celular. Em relação aos demais tratamentos, os grupos de laser vermelho regulares foram superados pelos LED regulares, e os grupos LV associados ao substrato osteogênico também obtiveram efeito somatório no desempenho de mineralização, conforme os períodos de tempo avaliados. Nos grupos LEDreg e LVreg não houve uma relação estabelecida entre dose e efeito.

Os resultados do laser infravermelho demonstram que houve, na maioria das vezes, maior mineralização apenas em relação aos grupos controle. Suas vertentes osteogênicas e regulares foram superadas pelos grupos LV e LED regulares e osteogênicos em todo o ensaio. Curiosamente o melhor desempenho foi do grupo LIV5ost, o de menor dose e tempo de aplicação, entre os grupos com essa fonte luminosa. Demonstrando que, nesse caso, quanto menor foi a dose aplicada do LIV maior foi a mineralização proporcionada. Tal resultado está de acordo com outro

artigo, que empregou laser infravermelho similar ao do nosso trabalho (830nm/500mW) na DE: 1,91 J/cm² por 10 minutos onde observou o maior estímulo da produção dos nódulos (FUJIMOTO et al., 2010). Já outro estudo, empregando laser infravermelho de menor comprimento de onda e potência (780nm/P:70mW), na DE: 3 J/cm² por 9 minutos, não promoveu alteração na produção dos nódulos (PETRI et al., 2010), apesar dos resultados contrários o laser infravermelho parece promover melhor a mineralização em densidades de energia mais baixas, além de um longo tempo de aplicação (em minutos) e maiores potências. Essas podem ser as causas do desempenho inferior do LIV nesse estudo, uma vez que aplicamos DE maiores e em tempos e potência menores que os outros relatos. De modo geral os grupos osteogênicos também experimentaram o efeito somatório que a luz proporcionou ao desempenho, uma vez que em todo o ensaio os grupos LIV osteogênicos superaram os regulares.

Sobre a expressão da fosfatase alcalina, existem relatos que creditam ao laser uma estimulação inicial maior que os períodos seguintes de diferenciação e proliferação celular (período inicial estimulante), demonstrando maior atividade da FALC durante o 3º, 6º e 10º dias (OZAWA et al., 1995; WU et al., 2012), o que acaba de ser reforçado, onde a fosfatase foi mais ativa em períodos recentes (24 e 72h) (OLIVEIRA et al., 2017). Podemos observar nesse trabalho que o pico da fosfatase foi no período inicial (7 dias). Porém nenhum tratamento se sobrepôs ao outro, apenas houve diferença em relação ao controle. Já a maior quantidade de nódulos mineralizados foi observada aos 21 dias no ensaio do vermelho de alizarina. Comparado a literatura em estudos de cultura celular, apesar dos diversos parâmetros de irradiação nesses trabalhos, também são perceptíveis inúmeras possibilidades do pico de liberação da FALC, enzima que normalmente está relacionada a diferenciação celular sendo expressiva no 7º dia (CHINTAVALAKORN et al., 2016; BARRON et al., 2012). Outro estudo utilizando a linhagem MC3T3-E1 obteve o pico da fosfatase alcalina aos trinta e cinco dias de experimento (JACKSON et al., 2006). E também existem estudos que aplicaram a fotobioestimulação em células ósseas e não obtiveram diferença na atividade da FALC (BOUVET-GERBETTAZ et al., 2009; RENNO et al., 2007; PAGIN et al., 2014). Mas o estudo precursor de Stein et al. (2005) empregou células imortalizadas derivadas de osteossarcoma humano (Saos-2) e observou diferença significativa na atividade da fosfatase. Esses resultados fortalecem

a hipótese de que cada linhagem celular responde de forma diferente na ativação da FALC e aos parâmetros da fotobioestimulação por laser ou LED (CHINTAVALAKORN et al., 2016).

Especificamente sobre os parâmetros de irradiação, em estudo anterior, a fotobioestimulação não foi perpetuada durante os diferentes períodos experimentais, e essa é uma hipótese da inobservância do aumento da atividade da FALC, uma vez que o estímulo inicial e único pode não se sustentar até o final do experimento aos 21 dias (PAGIN et al., 2014). Por isso neste trabalho empregamos a reativação do efeito luminoso, o reaplicando nos ensaios de longa duração a cada 3 dias (LI; LEU; WU, 2010). Mesmo assim os resultados não foram tão expressivos, em relação a atividade da FALC, demonstrando que esse artifício pouco incrementou a ativação dessa enzima nas células da granulação de rato. Outra hipótese é que a ausência da quiescência celular durante as reaplicações, possa ter influenciado o resultado obtido. Lembrando que esse estado é gerado visando criar um ambiente de escassez de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino, que é diminuído, na intenção não só de criar a analogia de uma ferida em débito de substratos, como também criando um cenário em que o efeito da fotobioestimulação possa ser observada *in vitro* (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Porém esse artifício não foi reproduzido já que não é aparente na literatura, trabalhos experimentais devem ser realizados futuramente para observar a possibilidade dos ensaios nesses modais.

Em termos de possíveis aplicações clínicas a estimulação de células ósseas pela fotobioestimulação é algo favorável para regeneração, podendo ser aplicada nas áreas médica (fraturas, indivíduos com cicatrização óssea comprometida) e odontológica (regeneração óssea guiada, enxertos, ossseointegração), situações cirúrgicas visando favorecer e acelerar o reparo ósseo, de forma simples e pouco invasiva. Esse estudo não é capaz de transpor protocolos clínicos, mas pode sugerir um tratamento inovador, associando o enxerto das células da granulação óssea a aditivos osteogênicos, visando se valer do efeito potencializador da fotobioestimulação. Para isso inúmeros testes e ensaios pré-clínicos devem ser feitos em busca de evidências. O que é fortemente difundido atualmente, antes de empregar o laser e o LED clinicamente para observar com segurança os efeitos da terapia de fotobioestimulação (ATEŞ; CAN; GÜLSOY, 2017).

Não foi possível estabelecer o melhor parâmetro de irradiação, devido as diferentes respostas dos ensaios realizados, mas o grupo LED5s obteve de modo geral bom desempenho. Os grupos de laser vermelho, também atingiram bons resultados, indo a favor às pesquisas que afirmam que esses tratamentos possuem resultados similares (SOUSA, 2008; ACIOLE, 2014; ROSA, 2014). O laser infravermelho desempenhou resultados limitados na maioria dos ensaios. Esse comprimento de onda possui penetrabilidade tecidual favorecendo a chegada nos tecidos mais profundos, portanto é indicado para ação em tecidos ósseos, principalmente quando aplicado *in vivo* (PINHEIRO et al., 2013). Neste estudo em cultura de células essa eficiência não foi vista de forma tão aparente.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados é possível concluir que o presente estudo demonstrou os efeitos da fotobioestimulação por laser e LED nas células da granulação óssea. Os parâmetros aplicados tiveram variações no desempenho, de forma geral o laser vermelho e o LED promoveram maior viabilidade celular, migração das células no fechamento de ferida *in vitro* e produção de nódulos mineralizados. A ativação da fosfatase alcalina fora amplificada por todos os grupos experimentais aos 7 dias.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS**(Formato Vancouver)**

Abd-Elaal AZ, El-Mekawii HA, Saafan AM, El Gawad LA, El-Hawary YM, Abdelrazik MA. Evaluation of the effect of low-level diode laser therapy applied during the bone consolidation period following mandibular distraction osteogenesis in the human. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(8):989-97.

Aciole JMS. Avaliação da fotobiomodulação Laser/LED em defeito ósseo no fêmur de ratas osteoporóticas: estudo histológico, histomorfométrico e por espectroscopia Ramam em modelo animal [tese]. Bahia (BA): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; 2014.

Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. *Lasers Med Sci*. 2006;21(1):24-33

Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci*. 2010;25(4):559–69.

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

Almeida AL, Medeiros IL, Cunha MJ, Sbrana MC, Oliveira PG, Esper LA. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(10):1131-36.

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.

Altan AB, Bicakci AA, Avunduk MC, Esen H. The effect of dosage on the efficiency of LLLT in new bone formation at the expanded suture in rats. *Lasers Med Sci*. 2015;30(1):255-62.

Amid R, Kadkhodazadeh M, Ghazizadeh Ahsaie M, Hakakzadeh A. Effect of Low Level Laser Therapy on Proliferation and Differentiation of the Cells Contributing in Bone Regeneration. *Lasers Med Sci*. 2014;5(4):163-70.

Amorim JCF, Sousa GR, Silveira LB, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(5):588–94.

Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(4):183-4.

Arany PR. Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy New Insights and Current Challenges. *J Dent Res.* 2016;95(9):977-84.

Araújo MG, Lindhe J. The edentulous alveolar ridge. In: Lindhe J, Lang NP, Thorkild K, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. p. 50–68.

Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000.* 2015;68(1):122-34.

Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd: Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci.* 2006;21(3):175-80.

Artalheiro PP, Barbosa JLP, Souza NHC, da Silva MT, Bussadori SK, Ferandes KPS, Ferrari RAM. Análise da proliferação e morfologia de mioblastos C2C12 durante o processo de diferenciação. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.* 2013;11(3):275-8.

Ateş GB, Ak A, Garipcan B, Yüksel Ş, Gülsoy M. Controversial effects of low level laser irradiation on the proliferation of human osteoblasts. *Proc. SPIE.* In press 2015.

Ateş GB, Can AA, Gülsoy M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2017:1-9.

Aykol G, Baser U, Maden I, Kazak Z, Onan U, Tanrikulu- Kucuk S, et al. The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment. *J Periodontol.* 2011;82(3):481–8.

Ayyildiz S, Emir F, Sahin C. Evaluation of Low-Level Laser Therapy in TMD Patients. *Case Rep Dent.* 2015 Oct 2015(2015):[6 p.].

Barbosa FA. Cultura primária e caracterização de células do tecido de granulação óssea (técnica do enxerto ósseo em neoformação) [monografia – graduação]. Bauru(SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012.

Barron MJ, Goldman J, Tsai CJ, Donahue SW. Perfusion flow enhances osteogenic gene expression and the infiltration of osteoblasts and endothelial cells into three-dimensional calcium phosphate scaffolds. *Int J Biomater.* 2012 Sep 2012;2012(915620):[10 p.].

Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, 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 July 2012(719452):[6 p.].

Bhardwaj S, George JP, Remigus D, Khanna D. Low Level Laser Therapy in the Treatment of Intra-Osseous Defect-A Case Report. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(3):6-8.

Bloise N, Ceccarelli G, Minzioni P, Vercellino M, Benedetti L, De Angelis MGC, et al. Investigation of low-level laser therapy potentiality on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors. *J Biomed Opt.* 2013 Dec 18(12):[8 p.].

Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):291-7.

Cavalcanti MFXB, Maria DA, de Isla N, Leal ECP Júnior, Joensen J, Bjordal JM, et al. Evaluation of the Proliferative Effects Induced by Low-Level Laser Therapy in Bone Marrow Stem Cell Culture. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(12):610-6.

Chang PC, Wang CY, Sheng-Chueh T. Combination of LED light and platelet-derived growth factor to accelerate dentoalveolar osteogenesis. *J Clin Periodontol.* 2014;41(10):999-1006.

Chintavalakorn R, Khantachawana A, Viravaidya-Pasuwat K, Santiwong P, Surarit R. In vitro effects of mechanical stimulation and photobiomodulation on osteoblastic cell function: A proof of concept study. *Pediatric Dental Journal.* In Press 2016;

Chow RT, Armati PJ. Photobiomodulation: Implications for Anesthesia and Pain Relief. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(12):599-609.

Chung SE, Tompson B, Gong SG. The effect of light emitting diode phototherapy on rate of orthodontic tooth movement: a split mouth, controlled clinical trial. *J Orthod.* 2015;42(4):274-83.

Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, et al. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4(1):3-14.

Corti L, Chiarion-Sileni V, Aversa S, Ponzoni A, D'Arcais R, Pagnutti S, et al. Treatment of chemotherapy-induced oral mucositis with light-emitting diode. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):207-13.

Cunha MJ, Esper LA, Sbrana MC, de Oliveira PG, do Valle AL, de Almeida ALP. Effect of low-level laser on bone defects treated with bovine or autogenous bone grafts: in vivo study in rat calvaria. *Biomed Res Int.* 2014 May 2014(2014):[9 p.].

da Silva AP, Petri AD, Crippa GE, Stuaní AS, Stuaní AS, Rosa AL, et al. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(4):777-83.

da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Lombardi I Júnior, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):17-21.

Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):885–91.

Damante CA, Gregghi SLA, Sant'Ana ACP, Passanezi E. Clinical evaluation of the effects of low intensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(2):133–6.

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

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016;22(3):1-17.

de Oliveira Gonçalves JB, Buchaim DV, de Souza Bueno CR, Pomini KT, Barraviera B, Ferreira RS Júnior, et al. Effects of low-level laser therapy on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrin sealant. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2016;162:663-8.

de Sousa APC, Paraguassú GM, Silveira NTT, de Souza J, Cangussú MCT, dos Santos JN, et al. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. *J Lasers Med Sci.* 2013;28(3):981-7.

de Sousa APC, Santos JN, dos Reis JA Júnior, Ramos TA, de Souza J, Cangussú MCT, et al. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(4):547-52.

Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM, et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):121-8.

Dias SBF, Fonseca MVA, dos Santos NCC, Mathias IF, Martinho FC, Santamaria M Júnior, et al. Effect of GaAlAs low-level laser therapy on the healing of human palate mucosa after connective tissue graft harvesting: randomized clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2015;30(6):1695-702.

Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Bioestimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(6):540-5.

dos Santos Grandinetti V, Miranda EF, Johnson DS, de Paiva PRV, Tomazoni SS, Vanin AA, et al. The thermal impact of phototherapy with concurrent super-pulsed lasers and red and infrared LEDs on human skin. *Lasers Med Sci.* 2015;30(5):1575-81.

Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Harkness LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg.* 2004;22(4):323-9.

Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *J Periodontol.* 1982;53(2):81-5.

Fangel R, Bossini PS, Renno AC, Granito RN, Wang CC, Nonaka KO, et al. Biomechanical properties: effects of low-level laser therapy and Biosilicate on tibial bone defects in osteopenic rats. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014;12(3):271-7.

Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KAM. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(11):533-42.

Fekrazad R, Ghuchani MS, Eslaminejad MB, Taghiyar L, Kalhori KAM, Pedram MS, et al. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B: Biol.* 2015;151:180-5.

Fernandes-Dias SB, de Marco AC, Santamaria M Júnior, Kerbauy WD, Jardini MAN, Santamaria MP. Connective tissue graft associated or not with low laser therapy to treat gingival recession: randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2015;42(1):54–61.

Ferraz BFR. Levantamento de seio maxilar com enxerto ósseo em neoformação associado a osso bovino inorgânico: avaliação clínica, histológica e histomorfométrica [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Ferraz BFR. Recobrimento radicular: avaliação clínica de nova abordagem terapêutica regenerativa em humanos. Acompanhamento longitudinal de 9 meses [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Fisher JP, Lalani Z, Bossano CM, Brey EM, Demian N, Johnston CM, et al. Effect of biomaterial properties on bone healing in a rabbit tooth extraction socket model. Part A. *J Biomed Mater Res*. 2004;68(3):428–38.

Fonseca MVA. Influência da aplicação de laser de baixa intensidade no recobrimento radicular associado à técnica de enxerto de tecido conjuntivo em indivíduos fumantes: ensaio clínico controlado [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP, Universidade Estadual Paulista; 2016.

Freshney RI. Culture of animal cells. Hoboken NJ: Wiley-Blackwell; 2010.

Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006;38(4):332–6.

Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsui N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, et al. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg Med*. 2010;42(6):519–26.

Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(6):443–50.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise; 2000.

Habib FA, Gama SK, Ramalho LM, Cangussú MCT, dos Santos Neto FP, Lacerda JA, Pinheiro AL. Effect of laser phototherapy on the hyalinization following orthodontic tooth movement in rats. *Photomed Laser Surg*. 2012;30(3):179–85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246(2):501-14.

Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):78-82.

Haxsen V, Schikora D, Sommer U, Remppis A, Greten J, Kasperk C. Relevance of laser irradiance threshold in the induction of alkaline phosphatase in human osteoblast cultures. *Lasers Med Sci*. 2008;23(4):381-4.

Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res*. 2004;19(9):1379-94.

Hoang AM, Oates TW, Cochran DL. In vitro wound healing responses to enamel matrix derivative. *J Periodontol*. 2000;71(8):1270 – 7.

Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, García-Martínez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs*. 2014;16(2):191-6.

Huertas RM, Manzano-Moreno FJ, De Luna-Bertos E, Ramos-Torrecillas J, García-Martínez O, Ruiz C. The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63). *Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1479-84.

Jackson RA, Kumarasuriyar A, Nurcombe V, Cool SM. Longterm loading inhibits ERK1/2 phosphorylation and increases FGFR3 expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Cell Physiol*. 2006;209(3):894-904.

Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *J Biomed Opt*. 2013 Dec 18(12):[8 p.].

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Kanenari M, Zhao J, Abiko Y. Enhancement of microtubule-associated protein-1 alpha gene expression in osteoblasts by low level laser irradiation. *Laser Ther*. 2011;20(1):47-51.

Karoussis IK, Kyriakidou K, Psarros C, Lang NP, Vrotsos IA. Nd: YAG laser radiation (1.064 nm) accelerates differentiation of osteoblasts to osteocytes on smooth and rough titanium surfaces in vitro. Clin Oral Implants Res. Clinical oral implants research. 2016; 1-6.

Karu TI. Low-power laser therapy. Biomedical photonics handbook. Boca Raton FL: CRC Press; 2003.

Karu, TI. Effects of visible radiation on cultured cells. J Photochem Photobiol B: Biol. 1990;52(6):1089-98.

Keskiner I, Lutfioğlu M, Aydogdu A, Saygun NI, Serdar MA. Effect of Photobiomodulation on Transforming Growth Factor- β 1, Platelet-Derived Growth Factor-BB, and Interleukin-8 Release in Palatal Wounds After Free Gingival Graft Harvesting: A Randomized Clinical Study. Photomed Laser Surg. 2016;34(6):263-71.

Khadra M, Kasem N, Haanæs HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(6):693-700.

Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. Biomaterials. 2005;26(17):3503-9.

Kiyosaki T, Mitsui N, Suzuki N, Shimizu N. Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. Photomed Laser Surg. 2010;28 Suppl1:167-72.

Koparal M, Kose I, Atalay Y, Cakmak O, Alan H, Agacayak KS, et al. The effects of recombinant human bone morphogenic protein-2 and low-level laser irradiation on synthetic graft healing in a rat bony defect model. Int J Clin Exp Med 2016;9(8):15709-18.

Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. Regen Med. 2016;11(1):107-22.

Kushibiki T, Awazu K. Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. Photomed Laser Surg. 2009;27(3):493-8.

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Low reactive level laser therapy for mesenchymal stromal cells therapies. Stem Cells Int. 2015 July 2015(974864):[12 p.].

Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(1):157–65.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.

Lim HJ, Bang MS, Jung HM, Shin JI, Chun GS, Oh CH. A 635-nm light-emitting diode (LED) therapy inhibits bone resorptive osteoclast formation by regulating the actin cytoskeleton. *Lasers Med Sci.* 2014;29(2):659-70.

Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand.* 1963;21:533–51.

Ma J, Wu Y, Zhang W, Smales RJ, Huang Y, Pan Y, et al. Up-regulation of multiple proteins and biological processes during maxillary expansion in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9(1):9-37.

Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):187-90.

Makhlouf M, Dahaba MM, Tuner J, Eissa SA, Harhash TA. Effect of adjunctive low level laser therapy (LLLT) on nonsurgical treatment of chronic periodontitis. *Photomed Laser Surg.* 2012;30(3):160–6.

Marques MM, Diniz IMA, de Cara SPHM, Pedroni ACF, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, et al. Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg.* 2016;34(11):500-8.

Martínez MEM, Pinheiro ALB, Ramalho LMP. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):313-7.

Medina-Valdívia MA. Cultura e caracterização de células da granulação óssea in vitro: efeitos proliferativos estimulados por diferentes biomateriais [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2013.

Mello JB. Laser em odontologia. São Paulo: Santos; 2001.

Menezes RF, Araújo NC, Carneiro VSM, Moreno LM, Guerra LAP, Santos AP Neto, et al. Assessment of the effects of laser photobiomodulation on peri-implant bone repair

through energy dispersive x-ray fluorescence: A study of dogs. SPIE Proceed. 2016;9695:7p.

Merigo E, Bouvet-Gerbettaz S, Boukhechba F, Rocca JP, Fornaini C, Rochet N. Green laser light irradiation enhances differentiation and matrix mineralization of osteogenic cells. J Photochem Photobiol B: Biol. 2016;155:130-6.

Michel RC. Efeitos da fotobiomodulação com laser e LED na proliferação e migração de fibroblastos gengivais de pacientes com e sem Síndrome de Down [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2016.

Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. Lasers Med Sci. 2014;29(4):1463-7.

Mizutani K, Aoki A, Coluzzi D, Yukna R, Wang CY, Pavlic V, et al. Lasers in minimally invasive periodontal and peri-implant therapy. Periodontol 2000. 2016;71:185–212.

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

Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, De Campos N, Messora MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. J Photochem Photobiol B: Biol. 2013;121:6-14.

Neves LS, Silva CMDs, Henriques JFC, Cançado RH, Henriques RP, Janson G. Lasers in orthodontics. Dental press journal of orthodontics. 2005;10(5):149-56.

Nunez, S, Garcez AS, Ribeiro MS. PDT-Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2012.

Obradović R, Kesić L, Mihailović D, Jovanović G, Antić S, Brkić Z. Low-Level Lasers as an Adjunct in Periodontal Therapy in Patients with Diabetes Mellitus. Diabetes Technol Ther. 2012;14(9):799–803.

Oliveira FA, Matos AA, Matsuda SS, Buzalaf MAR, Bagnato VS, Machado MADAM, et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. J Photochem Photobiol B: Biol. 2017;169:35-40.

Oliveira FA, Matos AA, Santesso MR, Tokuhara CK, Leite AL, Bagnato VS, et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. J Photochem Photobiol B: Biol. 2016;163:14-21.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998;22(4):347–54.

Ozawa Y, Shimizu N, Mishima H, Kariya G, Yamaguchi M, Takiguchi H, et al. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. *SPIE Int Soc Opt Eng*. 1995;1984:281-88.

Pacheco PS, de Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'Ana ACP, de Rezende MLR, Greghi SLA, et al. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation. *Photomed Laser Surg*. 2013;31(5):225-9.

Pagin MT, de Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'Ana ACP, de Rezende MLR, Greghi SLA, et al. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):55-9.

Panek M, Marijanović I, Ivković A. Stem cells in bone regeneration. *Periodicum biologorum*, 2015;117(1):177-84.

Paolillo AR, Paolillo FR, da Silva AMH, de Menezes RRB, Bagnato VS, Alves JM. Effects of infrared laser on the bone repair assessed by x-ray microtomography (μ ct) and histomorphometry. *SPIE Biophotonics South America*. 2015;95313.

Passanezi E, Damante CA, Rezende MLR, Greghi, SLA. Lasers in periodontal therapy. *J Periodontol* 2000. 2015;67(1):268-91.

Passanezi E, Janson WA, Nahas D, Campos A Júnior. Newly Forming Bone Autografts to Treat Periodontal Infrabony Pockets: Clinical and Histological Events. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1989;9(2):140-53.

Patrocínio-Silva TL, de Souza AMF, Goulart RL, Pegorari CF, Oliveira JR, Fernandes K, et al. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. *J Lasers Med Sci*. 2014;29(4):1357-64.

Peccin MS, de Oliveira F, Renno ACM, De Jesus GPP, Pozzi R, De Moura CFG, et al. Helium–neon laser improves bone repair in rabbits: comparison at two anatomic sites. *Lasers Med Sci*. 2013;28(4):1125-30.

Pejcic A, Kojovic D, Kesic L, Obradovic R. The effects of low level laser irradiation on gingival inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(1):69–74.

Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, Oliveira PTD, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dental J.* 2010;21(6):491-8.

Petrov P, Tonchev T. The effect of LLLT on the hard and soft tissues of the jaw bones. *Scripta Scientifica Medicinae Dentalis.* 2015;1(2):53-7.

Pinheiro ALB, Brugnera A Júnior, Zanin FAA. *Aplicação do laser na odontologia.* São Paulo: Santos; 2010.

Pinheiro ALB, Gerbi MEM. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(2):169-78.

Pinheiro ALB, Santos NRS, Oliveira PC, Aciole GTS, Ramos TA, Gonzalez TA, et al. The efficacy of the use of IR laser phototherapy associated to biphasic ceramic graft and guided bone regeneration on surgical fractures treated with wire osteosynthesis: a comparative laser fluorescence and Raman spectral study on rabbits. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):815-22.

Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):401-4.

Prados-Frutos JC, Rodríguez-Molinero J, Prados-Privado M, Torres JH, Rojo R. Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLLT) on dental titanium implant: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2016;31(2):383-92.

Pretel H, Lizarelli RF, Ramalho LT. Effect of low-level laser therapy on bone repair: Histological study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39(10): 788-96.

Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP- 2, osteocalcin, and TGF- β 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2013;28(2):543-50.

Qadri T, Poddani P, Javed F, Tuner J, Gustafsson A. A short-term evaluation of Nd:YAG laser as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal inflammation. *J Periodontol.* 2010;81(8):1161–6.

Quintana M. Das Utopias, In: *Espelho Mágico.* 1ª ed. Porto Alegre: Ed Globo; 1951. p. 50.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2001;9(3):248-55.

Renno A, McDonnell P, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(4):275-80.

Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-healing assay. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. Cell Migration.* 2005;294:23-9.

Rola P, Doroszko A, Derkacz A. The Use of Low-Level Energy Laser Radiation in Basic and Clinical Research. *Adv Clin Exp Med.* 2014;23(5):835-42.

Romão MMA, Marques MM, Cortes ARG, Horliana ACRT, Moreira MS, Lascalea, CA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of human alveolar bone repair induced by laser phototherapy: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(12):1521-8.

Rosa AP, de Sousa LG, Regalo SCH, Issa JPM, Barbosa APA, Pitol DL, et al. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. *Lasers Med Sci.* 2012;27(5):971-7.

Rosa CB. Efeito da Fotobiomodulação LASER ou LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana [tese]. Bahia (BA): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; 2014.

Rudd D. Effect of low level Ga-Al-As laser irradiation on osteogenic regulation of human osteoblastic cell line-CRL 1427 [dissertação]. Fort Lauderdale (FL): College of Dental Medicine, Nova Southeastern University; 2012.

Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111(5):525-32.

Sant'ana AC, Ferraz BF, de Rezende ML, Gregghi SL, Damante CA, Passanezi E. Newly forming bone graft: a novel surgical approach to the treatment of denuded roots. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(3):392-8.

Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):298-304.

Sayuri Suzuki S, Silva Garcez A, Suzuki H, Ervolino E, Moon W, Simões RM. Low-level laser therapy stimulates bone metabolism and inhibits root resorption during tooth movement in a rodent model. *J. Biophotonics.* 2016;9(11-12):1222-35.

Scalize PH, de Sousa LG, Regalo SCH, Semprini M, Pitol DL, da Silva GA, et al. Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model. *J Lasers Med Sci*. 2015;30(5):1599-607.

Silva APRB, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Rosa AL, Stuani, MBS. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci*. 2011;27(4):777-83.

Siqueira RL, Zanotto ED. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. *Quim Nova*. 2011;34(7):1231-41.

Smith RJ, Birndorf M, Gluck G; Hammond D; Moore WD. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. *Plastic Reconstruc Surg*. 1992;2(89):306-10.

Sobouti F, Khatami M, Heydari M, Barati M. The Role of Low-Level Laser in Periodontal Surgeries. *J Lasers Med Sci*. 2015;6(2):45-50.

Sohn H, Ko Y, Park M, Kim D, Moon YL, Jeong YJ, et al. Effects of light-emitting diode irradiation on RANKL-induced osteoclastogenesis. *Lasers Surg Med*. 2015;47(9):745-55.

Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(1):29-33.

Sousa APCD. Efeito das radiações laser e LED associadas ou não no reparo de feridas cutâneas em dorso de ratos: estudo histológico [tese]. Bahia (BA): Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia; 2008.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161-6.

Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr*. 2008;120(3-4):112-7.

Tao CY, Lee N, Chang HC, Yang C, Yu XH, Chang PC. Evaluation of 660 nm LED light irradiation on the strategies for treating experimental periodontal intrabony defects. *Lasers Med Sci*. 2016;31(6):1113-21.

Tim CR, Pinto KNZ, Rossi BRO, Fernandes K, Matsumoto MA, Parizotto NA, et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):147-56.

Tschon M, Incerti-Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. *J Biomed Opt*. 2015;20(7):078002.

Tuner J, Hode L. *The laser therapy handbook*. Grängesberg: Prima Books; 2004.

Weber JBB, Pinheiro ALB, Oliveira MGD, Oliveira FAM, Ramalho LMP. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(1):38-44.

Weinreb M, Nemcovsky CE. In vitro models for evaluation of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2015;68(1):41-54.

Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G, et al.. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg*. 2002;20(6):319-24.

Woodruff LD, Bounkeo JM, Brannon WM, Dawes KS, Barham CD, Waddell DL, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg*. 2004;22(3):241-7.

Wu JY, Wang YH, Wang GJ, Ho ML, Wang CZ, Yeh ML, et al. Low-power GaAlAs laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells via IGF1 and BMP2. *PLoS One*. 2012;7(9): e44027.

Wu S, Xing D. Intracellular signaling cascades following light irradiation. *Laser Photon Rev*. 2014;8(1):115-30.

Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med*. 2010;42(6):553-8.

Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, et al. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):309-15.

Yamamoto M, Tamura K, Hiratsuka K, Abiko Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2001;16(3):213-7.

Zanin F, Brugnera AP, Tameirão J, Windlin M, Panhoca VH, Brugnera A Júnior. New Bleaching Technique Using Only Light: Clinical Case. Presented at 15th Congress of the World Federation for Laser Dentistry; 2016 July 17-19; Nagoya, Japan. (*Journal of Japanese Society for Laser Dentistry.* 2016; 27, special ed.).

APÊNDICES

APÊNDICE A- Tabela dos dados estatísticos para o teste do MTT

grupo	período	MTT	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y
LIV8	24H	0,0018	****	****																							
LIV8	96H	0,0026	****	****																							
LIV8	48H	0,0032	****	****																							
LIV8	72H	0,0470	****	****	****																						
LED5	24H	0,0802	****	****	****	****																					
LED3	24H	0,0850	****	****	****	****	****																				
C-	48H	0,1206	****	****	****	****	****																				
C-	24H	0,1484	****	****	****	****	****	****																			
LV5	48H	0,1692	****	****	****	****	****	****	****																		
C-	96H	0,1710		****	****	****	****	****	****																		
LIV5	48H	0,1926			****	****	****	****	****	****																	
LED3	48H	0,1974			****	****	****	****	****	****																	
LV5	72H	0,2070			****	****	****	****	****	****	****																
LED5	48H	0,2108			****	****	****	****	****	****	****																
C-	72H	0,2352				****	****	****	****	****	****	****															
LV8	72H	0,2418				****	****	****	****	****	****	****	****														
LV8	48H	0,2462				****	****	****	****	****	****	****	****														
C+	48H	0,2984						****	****	****	****	****	****	****	****												
LIV5	96H	0,3054						****	****	****	****	****	****	****	****	****											
LV5	24H	0,3068						****	****	****	****	****	****	****	****	****											
LED3	72H	0,3142						****	****	****	****	****	****	****	****	****	****										
LED5	96H	0,3218						****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****									
LV8	24H	0,3304							****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****								
C+	72H	0,3470								****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****							
C+	24H	0,3568								****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****	****						

128 *Apêndices*[illegible]

APÊNDICE B - Tabela dos dados estatísticos para o teste do cristal violeta

GRUPO	PERIODO	CRISTAL	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
C-	24H	0,253600	****											
C-	48H	0,281200	****	****										
C+	24H	0,312200	****	****	****									
C+	48H	0,330200	****	****	****	****								
LIV8	24H	0,403400	****	****	****	****	****							
C-	96H	0,427000	****	****	****	****	****	****						
C-	72H	0,450800	****	****	****	****	****	****	****					
LIV5	72H	0,494200	****	****	****	****	****	****	****	****				
LIV8	72H	0,520800	****	****	****	****	****	****	****	****				
C+	72H	0,545800	****	****	****	****	****	****	****	****				
LV8	24H	0,574600	****	****	****	****	****	****	****	****				
LV5	72H	0,593600	****	****	****	****	****	****	****	****				
LIV5	24H	0,597400	****	****	****	****	****	****	****	****				
C+	96H	0,659800	****	****	****	****	****	****	****	****	****			
LIV5	48H	0,666200	****	****	****	****	****	****	****	****	****			
LIV8	48H	0,720000		****	****	****	****	****	****	****	****			
LV8	48H	0,728200		****	****	****	****	****	****	****	****			
LV5	24H	0,748600			****	****	****	****	****	****	****			
LV5	48H	0,781400				****	****	****	****	****	****	****		
LED3	24H	0,820200					****	****	****	****	****	****		
LED5	72H	0,851400					****	****	****	****	****	****	****	
LIV8	96H	0,884000						****	****	****	****	****	****	
LED5	48H	0,897400							****	****	****	****	****	
LED5	24H	0,918800								****	****	****	****	

130 *Apêndices*

LV8	72H	0,922000								****	****	****	****	
LED3	72H	0,931200								****	****	****	****	
LV5	96H	1,061000									****	****	****	****
LIV5	96H	1,070200									****	****	****	****
LED3	48H	1,077000									****	****	****	****
LV8	96H	1,238600										****	****	****
LED3	96H	1,312200											****	****
LED5	96H	1,462000												****

APÊNDICE C - Tabela para análise morfológica qualitativa

24h

48h

72h

96h

CONTROLE +

CONTROLE -

LV5J/cm²

LV8J/cm²

LIV5J/cm²

LIV8J/m²

LED3s

LED5s

APÊNDICE E - Tabela dos dados estatísticos para o ensaio da atividade da fosfatase alcalina

Grupo	Período(dias)	Média	a	b	c
C – reg	14	0,0015	xxxx		
C – ost	14	0,0017	xxxx		
C + reg	14	0,0018	xxxx		
C + ost	14	0,0020	xxxx		
LV 8reg	21	0,0021	xxxx		
LV 5reg	14	0,0021	xxxx		
LIV 8 reg	21	0,0022	xxxx		
LV 5 reg	21	0,0022	xxxx		
LV 5ost	14	0,0022	xxxx		
LV 8ost	14	0,0022	xxxx		
LIV 8 reg	14	0,0022	xxxx		
LED ost 3S	14	0,0023	xxxx		
LIV 8 ost	21	0,0023	xxxx		
LIV 5 reg	21	0,0023	xxxx		
LED ost 3S	21	0,0023	xxxx		
LED ost 5S	14	0,0024	xxxx		
LV 8reg	14	0,0024	xxxx		
C - reg	21	0,0024	xxxx		
LIV 8 ost	14	0,0024	xxxx		
LED reg 3S	21	0,0024	xxxx		
LED reg 5S	21	0,0025	xxxx		
LIV 5 ost	14	0,0025	xxxx		
LIV 5 ost	21	0,0025	xxxx		
LV 8 ost	21	0,0025	xxxx		
C- ost	21	0,0025	xxxx		
LED reg 5S	14	0,0026	xxxx		
LED ost 5S	21	0,0026	xxxx		
C+reg	21	0,0026	xxxx		
LED reg 3S	14	0,0027	xxxx		
LV 5 ost	21	0,0027	xxxx		
C+ ost	21	0,0028	xxxx		
LIV 5 reg	14	0,0029	xxxx		
C – reg	7	0,0037	xxxx	xxxx	
C – ost	7	0,0039	xxxx	xxxx	
C + ost	7	0,0046	xxxx	xxxx	
C + reg	7	0,0049	xxxx	xxxx	
LIV 8 reg	7	0,0071			xxxx
LV 8 reg	7	0,0072			xxxx
LED reg 3S	7	0,0072			xxxx
LED reg 5S	7	0,0072			xxxx
LV 5reg	7	0,0073			xxxx
LIV 5 reg	7	0,0073			xxxx
LIV 8 ost	7	0,0073			xxxx
LV 8 ost	7	0,0074			xxxx
LIV 5 ost	7	0,0075			xxxx
LED ost 5S	7	0,0079			xxxx
LED ost 3S	7	0,0079			xxxx
LV 5ost	7	0,0080			xxxx