UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIANA BATISTA PEREIRA

Avaliação *in vitro* da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência.

> Ribeirão Preto 2009

## LUCIANA BATISTA PEREIRA

## Avaliação *in vitro* da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto 2009 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Pereira, Luciana Batista

Avaliação *in vitro* da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência./ Luciana Batista Pereira; orientadora Karina Fittipaldi Bombonato Prado. Ribeirão Preto, 2009.

76 p. : II. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral) — Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Odontoblasto, 2. Laser, 3. Biomodulação

## FOLHA DE APROVAÇÃO

## Luciana Batista Pereira

Avaliação *in vitro* da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral

Aprovado em: \_\_\_\_\_de \_\_\_\_\_de 2009.

## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

## Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus país, Adinézia, ser humano exemplar e mãe incansável nos seus esforços para que eu possa alcançar meus objetivos, e José Jairo, pai compreensivo e amoroso que sempre me deu apoio. Dedico este trabalho também à minha irmã, Lorena, por quem tenho um amor inestimável e a Deus, minha fonte de força e esperança.

# Agradecimento especial

Agradeço à Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, que entre tantas coisas me ensinou que paciência, educação e respeito são as bases para o sucesso. Obrigada pela credibilidade em meu trabalho e pela paciência ao me ensinar o básico e ao corrigir meus erros. Obrigada por tudo!

## Agradecímentos

Ao Roger Rodrígo Fernandes e à Júnia Ramos, técnicos do Laboratório de Cultura de Células, e à Fabiola Singareti de Oliveira, técnica do Laboratório de Biología Molecular, por me ensinarem com paciência as técnicas utilizadas neste trabalho e, especialmente, pelo convivio agradável e divertido de todos os días. Obrigada de coração!

A todos os amigos de trabalho do laboratório, em especial à Grasiele Edilaine Crippa, Larissa Moreira Spinola de Castro, Larissa Sverzut Bellesini e ao Lucas Novaes Teixeira pela ajuda e apoio indispensáveis.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luíz Rosa e ao Prof. Dr. Márcio Mateus Belotí, pelos primeiros ensinamentos científicos durante a minha iniciação científica e, principalmente, pelo exemplo de profissionalismo e caráter dado por vocês.

Ao Luis Marcelo Teixeira, pelo companheirismo e por me ensinar que para vencer na vida não é preciso ter sorte, basta ter força de vontade e amor em tudo que se faz. A todos os meus amigos mais intimos pela distração nas horas livres e pelo apoio nos momentos difíceis.

À empresa Kondortech pelo empréstimo temporário do aparelho de laser utilizado neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquísa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro, fundamental para realízação deste trabalho.

 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superíor pela bolsa de estudo concedida durante o período de mestrado.

Enfím, agradeço a todas que foram imprescindiveis para a realização deste trabalho.

"Um homem é um sucesso se pula da cama pela manhã, vaí dormír à noíte e, nesse meio tempo, faz o que gosta." *Bob Dylan* 

## Sumário

1		14
2		
	2.1 Dentinogenese	
	Z.Z LASER	
	2.2.1 Laser de baixa potência	26
3 PROPOSIÇÃO		31
4	MATERIAIS E METODO	33
	4.1 Protocolo de Biomodulação Celular	33
	4.2 Cultura da Linhagem Celular	
	4.3 Metodos de Avaliação do Estimulo Celular	34
	4.3.1 Proliferação celular	34
	4.3.2 Viabilidade celular	35
	4.3.3 Conteudo de proteina total	35 25
	4.3.4 Medida da alividade de losialase alcalina (ALF)	
	4.3.6 Ensaio de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	
	4.3.7 Imunolocalização	
	4.4 Análise estatística	
5 RESULTADOS		41
	5.1 Proliferação Celular	41
	5.2 Viabilidade Celular	42
	5.3 Conteúdo de proteína total	43
	5.4 Atividade de Fosfatase Alcalina	44
	5.5 Mineralização	45
	5.5.1 Análise qualitativa de depósito de cálcio	45
	5.5.2 Análise quantitativa de depósito de cálcio	46
	5.6 VEGF	47
	5.7 Imunomarcação	48
	5.7.1 Morfologia celular	48
	5.7.2 Expressão de proteínas colágenas e não colágenas	48
6 DISCUSSÃO		56
7	CONCLUSÕES	62
8	BIBLIOGRAFIA	64
9	APENDICE	75

### Resumo

Pereira, L.B. Avaliação *in vitro* da biomodulação de células de linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos com laser de baixa potência. Ribeirão Preto, 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O laser de baixa intensidade ou terapêutico promove a biomodulação das respostas reparadoras naturais de células pulpares como os odontoblastos, sendo uma estratégia de tratamento a ser utilizada na terapia pulpar. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro o efeito da irradiação do laser terapêutico de arseniato de gálio e alumínio (GaAlAs) no comportamento da linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos. Células odontoblásticas foram plaqueadas na concentração de 10<sup>4</sup> células/poco (n=5) e submetidas às irradiações nos dias 0, 1, 2 e 3 após o plaqueamento. Foram avaliadas as doses de 0,2 e 1,0 J/cm<sup>2</sup> e comparadas ao grupo controle não irradiado. Os parâmetros analisados foram proliferação e viabilidade celular, quantidade de proteína total, atividade de fosfatase alcalina após 3, 7, 10 e 14 dias; detecção e quantificação de matriz mineralizada após 14 dias e quantificação do fator de crescimento VEGF no sobrenadante das culturas após 7 e 10 dias. Imunofluorescência para proteínas colágenas e não-colágenas após 3, 7 e 10 dias foi realizada para verificar sua expressão qualitativa nos grupos propostos. Os resultados mostraram que o laser não afetou a viabilidade celular que ficou acima dos 90% em todos os grupos e períodos experimentais. De modo geral, os grupos irradiados apresentaram redução na proliferação, maior conteúdo de proteína total e maior atividade de ALP em relação ao observado no grupo controle. A marcação com vermelho de alizarina mostrou maior guantidade de áreas nodulares de matriz calcificada no grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, dados comprovados pela análise quantitativa. Uma maior concentração de VEGF no sobrenadante da cultura foi observada no grupo irradiado com a menor dose. A imunofluorescência revelou que a menor dose favoreceu a secreção de proteínas colágenas e não colágenas Portanto, o laser de baixa potência, dentro dos parâmetros empregados, favoreceu a expressão do fenótipo odontoblástico.

## Abstract

Low-level laser therapy (LLLT) has been studied as a strategy to be used in pulp therapy through biomodulation of its cells, like odontoblasts. The purpose of this investigation was to evaluate the effect of biomodulation on odontoblastic cells using low-level GaAlAs laser. Odontoblastic cells were cultured in a concentration of 10<sup>4</sup> cells/well (n=5) and submitted to the energy fluencies of 0,2 and 1,0 J/cm<sup>2</sup> and compared to control group. There were evaluated cell proliferation and viability, total protein content and alkaline phosphatase activity (3, 7, 10 and 14 days), as well as detection and quantification of mineralized nodules after 14 days and VEGF quantification after 7 and 10 days. Immunofluorescence for collagen and noncollagen proteins was performed to verify their qualitative expression in the proposed groups after 3, 7 and 10 days. The results showed that LLLT did not affect cell viability in all the experimental groups. The irradiated cultures presented reduction in the proliferation, higher total protein content and ALP activity compared to the control group. Staining with red alizarin showed greater amount of nodular areas of calcified matrix in the group irradiated with 0.2 J/cm<sup>2</sup>, data confirmed by quantitative analysis. It was also observed a higher concentration of VEGF in the culture of the cells irradiated with the lowest energy fluence as well as an enhancement of the secretion of collagen and non-collagen proteins revealed through immunofluorescence. It was concluded that therapy with LLLT favors the expression of odontoblastic phenotype.

Introdução

### 1 INTRODUÇÃO

A dentinogênese é um processo contínuo e dinâmico regulado pelos odontoblastos. A matriz dentinária, constituída por componentes orgânicos e inorgânicos, é secretada por estas células e pode ser reparada através da formação de dentina terciária como resposta a vários estímulos externos, tais como cáries, atrição ou trauma. Algumas intervenções beneficiam este reparo, como o laser de baixa potência que pode promover efeitos biomodulatórios nos processos inflamatórios e reparativo do tecido pulpar.

Desde que o laser de rubi foi desenvolvido por Maiman em 1960, pesquisadores têm investigado aplicações do laser na Odontologia. O laser, acrônimo em inglês de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, é um equipamento que transforma a luz de várias frequências em uma radiação cromática com ondas capazes de mobilizar grande quantidade de energia e força quando focalizadas a uma distância pequena.

O laser vem sendo cada vez mais empregado na Odontologia, mostrando-se eficaz e benéfico quando bem utilizado. Sabe-se que o laser apresenta uma grande diversidade de indicações como em osteotomias, tratamento de lesões prémalignas, espectroscopia de fluorescência e terapia fotodinâmica (Deppe e Horch, 2007).

Os efeitos bioestimuladores da terapia com laser de baixa intensidade, atualmente descritos como biomoduladores, foram primeiramente demonstrados por Mester et al. (1971), na reparação tecidual de feridas induzidas em ratos. Esta terapia envolve a interação do laser com o tecido com a intenção de estimular e melhorar a regeneração e cicatrização através da absorção de energia pelas células e sua conversão em adenosina trifosfato (ATP), consequentemente estimulando a atividade celular (Parker, 2007b).

Estudos in vitro com vários tipos celulares foram realizados para analisar o efeito da irradiação a laser. Renno et al. (2007) observaram que a irradiação de luz laser com comprimento de onda de 830-nm aumentou significativamente a proliferação de osteoblastos in vitro, assim como a atividade de fosfatase alcalina. Mirzaei et al. (2007) demonstraram um aumento significante na proliferação de fibroblastos de ratos após a irradiação com laser de baixa potência. Saygun et al. (2007) observaram que a terapia com laser de baixa potência aumentou a proliferação e a viabilidade celular de fibroblastos gengivais além da liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento insulin-like (IGF-1), e receptor de IGF-1 (IGFBP3). Gulsoy et al. (2006) observaram que a aplicação de laser He-Ne aumentou significativamente a proliferação de células mononucleares do sangue in vitro. Skinner et al. (1996) utilizaram laser de baixa intensidade (GaAlAs) para estimular fibroblastos humanos embrionários em cultura com diferentes doses em um período de 4 dias, observando que doses mais baixas podem favorecer a síntese protéica. Segundo Abergel et al. (1987), este efeito poderia ocorrer provavelmente através de uma estimulação metabólica, incluindo a aceleração da taxa de transcrição de RNAm de genes ou mudanças enzimáticas após a biomodulação com laser.

A utilização do laser como biomodulador do tecido pulpar é uma realidade, podendo afetar a expressão de componentes da matriz na dentinogênese nas reações inflamatórias e de defesa da polpa dentária, que normalmente ocorrem extracelularmente (Linde, 1985). A matriz extracelular representa uma complexa rede de macromoléculas composta por várias proteínas versáteis e polissacarídeos, que são secretados localmente e montados em uma organizada rede associada à superfície celular que os produz e que atua no comportamento das células com as quais faz contato, influenciando seu desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função. É através da matriz que as células são fisicamente conectadas e que sinais quimiotáticos podem ser transmitidos entre estas células (Chiquet-Ehrismann et al. 1988).

Como a dentina é um tecido análogo ao osso, sua matriz extracelular compartilha muitas similaridades com a matriz óssea (Lu et al, 2007). Assim, na dentina, o colágeno tipo I representa 97% da matriz orgânica secretada pelos odontoblastos; os restantes 3% da matriz da dentina são constituídos pelas proteínas não-colágenas, como a sialofosfoproteína (DSPP), proteínas da matriz dentinária (DMP1, DMP-2 e DMP-3) e pequenas quantidades de osteopontina, osteonectina e osteocalcina, que são abundantes no osso (Mjor et al. 2001). Acredita-se também que as proteínas não colágenas exerçam um papel na formação dos tecidos mineralizados, por promover e controlar o processo de mineralização e a função celular (Butler et al. 1992). Mattuella et al. (2007) observaram que a dentina possui fatores de crescimento com capacidade de influenciar eventos celulares no complexo dentino-pulpar quando liberadas durante a desmineralização, podendo contribuir para o processo reparativo. Entre eles, o VEGF produzido por células estromais de polpas saudáveis (Artese et al. 2001) e em células odontoblásticas (Botero et al. 2003) pode ter uma ação autócrina e promover quimiotaxia e proliferação/diferenciação celular (Mattuella et al. 2007).

Linhagens celulares estabelecidas, oriundas de linhagem odontoblástica ou que mimetizam odontoblastos, podem ter utilidade para uma variedade de objetivos como a síntese de moléculas específicas incluindo proteínas, RNAm e DNA para estudo do processo da dentinogênese, estudo de uma variedade de moléculas como hormônios, fatores de crescimento e citocinas para verificar possíveis efeitos na função celular e testes com biomateriais ou situações ambientais com possíveis efeitos na função celular com potencial para alterar a odontogênese (Hanks et al. 1998). A linhagem MDPC-23 foi desenvolvida como uma linhagem celular espontaneamente imortalizada derivada de células da papila dentária do primeiro molar de fetos de camundongos e clonadas para especificamente desenvolverem uma alta atividade de fosfatase alcalina (ALP) e a habilidade de formar nódulos calcificados com multicamadas e um tempo de duplicação de 24 horas (Hanks et al. 1998). Ainda segundo estes autores, esta linhagem celular é única por sintetizar proteínas como a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), que é clivada em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP), sintetizadas principalmente por odontoblastos, além de também sintetizar outras proteínas comuns a outros tecidos mineralizados como a ALP, colágeno tipo I, osteopontina, osteocalcina e fatores de crescimento como o VEGF (Botero et al. 2003).

Nossa hipótese de trabalho foi verificar se este tratamento aumenta a atividade funcional dos odontoblastos aumentando a secreção de fatores de crescimento e proteínas essenciais para a formação de nova dentina.

Revísão de Líteratura

#### 2 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1 Dentinogênese

A dentina é um tecido conjuntivo avascular e mineralizado que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo responsável pela sustentação do esmalte e proteção da polpa dentária. Apesar da sua estrutura não apresentar células em seu interior, nos túbulos que percorrem toda sua extensão, são observados prolongamentos de células da periferia da polpa, denominadas odontoblastos.

Os odontoblastos são células altamente especializadas, de origem mesenquimal, diferenciadas a partir da papila dentária e responsáveis pela síntese e formação da dentina (Sasaki e Garant, 1996). Suas características ultra-estruturais são típicas de células sintetizadoras e secretoras de proteínas, com complexo de golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, além de inúmeros microtúbulos e microfilamentos responsáveis pelo transporte dos produtos sintetizados para a periferia dos processos odontoblásticos (Sasaki e Garant , 1996; Yu e Abbott, 2007).

Durante a formação e reparo do elemento dental, os odontoblastos secretam constituintes fibrilares e não fibrilares envolvidos na síntese do tecido dentinário. Uma vez que a formação da raiz está completa e o dente se apresenta em sua posição funcional, os odontoblastos reduzem de forma marcante sua atividade secretória e passam a sintetizar e depositar dentina secundária em um processo fisiológico, lento e contínuo (Linde et al. 1993).

A atividade dos odontoblastos é dependente de uma interrelação estrutural e funcional entre a polpa e a dentina, como na presença de lesões cariosas onde ocorre o estímulo desse complexo, de modo que a formação de dentina seja intensificada na tentativa de criar uma barreira protetora, dificultando a chegada do agente irritante à polpa. A dentina formada nessa ocasião é denominada dentina terciária (Goldberg e Smith, 2004). Portanto, mesmo após a formação da dentina primária os odontoblastos permanecem com capacidade para responder aos estímulos ambientais e locais, sendo suas atividades secretórias ativadas durante a dentinogênese terciária (Mitsiadis e Rahiotis, 2004).

A dentina terciária, resultante do comportamento secretório após uma estimulação focal, tem sido subdividida nas variantes reacionária e reparativa para diferenciar os processos envolvidos em cada ocasião. A dentina reacionária é secretada pelas células odontoblásticas pós-mitóticas sobreviventes, responsáveis pela secreção da dentina primária, em resposta a um estímulo de baixa ou média intensidade (Arana-Chaves e Massa, 2004). Já a dentina reparativa é secretada por uma nova geração de odontoblastos em reflexo às injúrias de forte intensidade capazes de provocar a morte das células secretoras da dentina primária (Goldberg e Smith, 2004).

A dentina é composta de 10% de água e aproximadamente 70% de material inorgânico, sendo o principal componente a hidroxiapatita. A parte orgânica, que equivale a 20% da dentina, é constituída principalmente pelo colágeno tipo I. Em menor quantidade, também estão presentes o colágeno tipo III, colágeno tipo V e proteínas não colágenas, como: fosforinas, fosfoproteínas, sialoproteínas dentinárias (DSPs), proteínas morfogenéticas dentinárias (DMPs), Gla-proteínas (osteocalcinas), proteoglicanas, glicoproteínas ácidas (osteonectinas) e proteínas séricas (Mjor et al. 2001; Papagerakis et al. 2002).

O colágeno é sintetizado intracelularmente em pequenas porções e exportado para fora da célula, onde, através da atuação de enzimas polimerizantes,

é definida a estrutura própria de colágeno em alfa-hélice-tripla. Nos tecidos mineralizados, os 40 nm de lacunas entre as extremidades das subunidades do tropocolágeno provavelmente servem como área nucleadora para deposição dos componentes minerais dos cristais (Hillmann et al. 1997). O colágeno dá à dentina sua elasticidade e contribui para sua resistência à fratura (Wiesmann et al. 2005).

Porém, somente a presença do colágeno não é suficiente para desencadear o processo de deposição dos íons para o início da mineralização (Saito et al. 2001). Várias outras proteínas não colágenas, secretadas pelos odontoblastos, tem sido relatadas como importantes precursoras deste processo (Saito et al. 2001). Acreditase que a mineralização seja iniciada pelas proteínas fosforiladas da matriz extracelular, localizadas próximas às zonas de abertura dos colágenos, que se ligam aos íons cálcio e fosfato numa conformação apropriada para nuclear a formação dos cristais de apatita (Lu et al. 2007).

A DMP1, uma fosfoproteína ácida não colágena, é um membro da família das SIBLING (*small integri-binding ligand, N-linked glycoprotein*), na qual estão inclusas a osteopontina, sialoproteína óssea, DSPP, enamelina e fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE) (Fisher et al. 2003; Qin et al. 2004). Essas proteínas exercem papel importante na mineralização de tecidos e mostram algumas características em comum, tais como: localização no cromossomo humano 4q21, múltiplos locais de fosforilação, elevada natureza ácida e a presença de um domínio celular ligante de arginine-glycine-aspartate (RGD) (Ling et al. 2005). A DMP1 é expressa no cemento, nas células indiferenciadas da polpa, nos odontoblastos, na pré-dentina e dentina e os seus níveis são controlados por fatores chaves como a concentração de íons fósforos (Qin et al. 2007). Defeitos no seu processamento do DMP1 podem levar a mudanças morfológicas na dentina (Qin et al. 2007), uma vez

que, além de atuar nos processos de mineralização e diferenciação dos odontoblastos, a DMP1 também está envolvida na ativação da matriz metaloproteinase-9 e na formação e manutenção do sistema tubular (Ye et al. 2005; Ogbureke et al. 2007).

A DSPP, outro membro das SIBLING, é uma proteína da matriz extracelular e é clivada em sialoproteína dentinária (DSP), glicoproteína dentinária e fosfoproteína dentinária (DPP) (Qin et al. 2004). Entre as proteínas não colágenas, as DSP e as DPP são as mais específicas da dentina e acredita-se que elas exerçam um papel crucial na conversão da pré-dentina em dentina mineralizada (Sreenath et al. 2003; Chen et al. 2004).

A DSP, a parte amino-terminal da DSPP, é uma proteína glicosilada com altos níveis de ácido siálico e apresenta similaridades com outras sialoproteínas, incluindo sialoproteína óssea, DMP1 e osteopontina (Chen et al. 2004). A DPP, uma proteína altamente fosforilada, representa 50% da matriz extracelular, sendo a principal proteína não colágena (Chen et al. 2004). Acredita-se que a DPP é o arquétipo de macromoléculas que podem regular o processo de mineralização se ligando às proteínas estruturais da matriz, nucleando a mineralização e controlando o crescimento dos cristais (Linde e Goldberg, 1993). Estudos correlacionam a glicoproteína dentinária e a DPP ao enrijecimento normal do colágeno, a proteína mais abundante da dentina (van den Bos et al. 1993). Embora também seja encontrada no tecido ósseo, os níveis de expressão de DSPP nos ossos longos de ratos é 1:400 em relação ao encontrado na dentina, sugerindo que a DSPP está essencialmente envolvida na formação e mineralização da dentina (Qin et al. 2003).

Mutações no gene DSPP humano estão associadas com a dentinogênese imperfeita tipo II, tipo III e com a displasia dentinária tipo III (Hu et al. 2007; Barron et al, 2008). Pacientes com essas doenças apresentam descoloração dental, alargamento da câmara pulpar, espessamento da pré-dentina, com consequente redução na espessura da dentina, hipomineralização e prevalência de exposição pulpar (Barron et al, 2008).

A osteopontina (OPN), uma proteína não colágena abundante na matriz óssea, mas usualmente não detectada na dentina primária e terciária, foi observada em grandes quantidades na dentina reparativa (Aguiar e Arana-Chaves, 2007). A OPN é uma glicoproteína ácida fosforilada presente tanto nos fluidos corporais, na forma de citocina, como nos tecidos mineralizados, onde atua como proteína de adesão celular (Sodek et al. 2000). A idéia de a OPN estar envolvida na regulação da matriz mineralizada e no controle da adesão celular surgiu com base na sua distribuição tecidual, particularmente nas regiões interfibrilares, e no fato de conter regiões de ligação à matriz e à célula (Nanci, 1999). Em acréscimo, a OPN exibe alta afinidade para o cálcio e para os cristais de cálcio e fosfato, provavelmente devido à quantidade de locais de fosforilação (Qin et al. 2004) e da presença de regiões ácido aspártica nessa molécula (Giachelli e Steitz, 2000).

Desde a década de 20, quando os estudos de Robson em ratos e coelhos mostraram uma considerável atividade de fosfatase envolvida na formação do osso, a fosfatase alcalina (ALP) é relacionada ao processo de mineralização (Robson et al. 1923). Nos tecidos mineralizados, níveis elevados de fosfatase alcalina enriquecem o meio com fosfato inorgânico e viabilizam a nucleação dos cristais de hidroxiapatita dando início a mineralização (Bellows et al. 1991; Balcerzak et al. 2003), Em acréscimo, tem sido sugerido que a ALP atua na degradação de pirofosfato, um inibidor da mineralização (Whyte, 1994). As melhores evidências do envolvimento da ALP na mineralização são as características clínicas de pessoas portadoras da

hipofosfatasia hereditária, as quais apresentam defeitos na mineralização óssea além da perda prematura de dentes decíduos e permanentes (Macfarlane e Swart, 1989).

Além das proteínas colágenas e não colágenas, o odontoblastos também secretam fatores de crescimento que influenciam na sua cinética durante o reparo da dentina (Grando et al. 2007). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta a neovascularização induzindo a migração e a proliferação das células endoteliais (Mastrangelo et al. 2005), além de elevar a sobrevivência dessas células através da sinalização do VEGFR-2 e da indução da proteínas anti-apoptótica Bcl-2 (Nör et al. 1999). Assim, considerando a capacidade do VEGF em induzir a angiogênese, sua liberação para a matriz pode contribuir para um reparo pulpar após uma injúria (Derringer et al. 1996).

Diversos estudos têm utilizado linhagens celulares para aumentar o conhecimento sobre os eventos celulares envolvidos na dentinogênese, como Pang et al (2006) que estabeleceu uma nova ligação molecular entre o metabolismo e o transporte de íons cálcio com a proteína DMP1, importante regulador de mineralização da dentina, utilizando células da linhagem odontoblásticas MDPC-23 como modelo de estudo. He et al. (2004) avaliou a via Smad na linhagem MDPC-23 e notou que a Smad3 parece estar envolvida na repressão da proteína DSPP por meio do fator TGF-beta1, fato que aumenta a possibilidade da sinalização de Smad estar envolvida na dentinogênese. Outros estudos avaliaram a reação dessas células frente à exposição a agentes utilizados em tratamentos odontológicos. de Lima et al. (2009) avaliaram o efeito do peróxido de carbamida (CP) nas células odontoblásticas e observaram que, mesmo em baixas concentrações, o extrato do gel de CP é citotóxico. O mesmo efeito foi observado quando essas células foram

expostas a adesivos *self-etching* (Lanza et al. 2008), hidróxido de cálcio (de SOUZA Costa et al. 2008) *e* clorexidina (de SOUZA et al. 2007).

#### 2.2 LASER

Os princípios físicos do laser, acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação foram descritos pelo físico Albert Einstein no trabalho intitulado "*Zur Theorie der Strahlung*" em 1917 (Parker, 2007b).

O laser é uma luz eletromagnética não ionizante, fruto da emissão de fótons a partir do bombeamento de uma matéria (Knappe et al. 2004). A fonte dos fótons é denominada meio ativo e os seus componentes dão o nome ao laser que pode ter composição:sólida (rubi, titânio-safira), líquida (corantes de Rodaminas), gasosa (Hélio e Neônio, gás carbônico Argônio) ou semicondutora (Arseniato de Gálio, Arseniato de Gálio- Alumínio, Indio-Gálio-Alumínio-Fósforo) (Sun et al. 2004). Os íons que compõem o meio ativo encontram-se no estado de baixa energia, chamado estado fundamental (Parker, 2007b). Quando expostos a uma fonte de energia externa, seja ela elétrica, luminosa ou até mesmo outro laser, os elétrons saltam para uma camada mais externa, permanecendo em um estado de maior energia, porém transitório. (Knappe et al. 2004). Logo após a maioria dos átomos atingirem a excitação no fenômeno de inversão da população, inicia-se a emissão espontânea em que os elétrons retornam à camada inferior emitindo um fóton. Os fótons emitidos ao se chocarem com os outros átomos excitados estimulam o decaimento num processo que passa a ocorrer em cascata, resultando na emissão estimulada de radiação (Parker, 2007b). A radiação produzida é amplificada graça a presença de espelhos na cavidade óptica, onde está alojado o meio ativo. Os espelhos refletem a radiação e a mantém confinada dentro da cavidade. Quando a energia acumulada atinge um limiar, parte dos fótons atravessa o semi-espelho e é então gerado um feixe de luz colimado, coerente e monocromático, denominado laser (Knappe et al. 2004).

#### 2.2.1 Laser de baixa potência

O laser pode ser classificado como de alta (*Hight Intensity Laser Therapy* – HILT) ou de baixa potência (*Low Intensity Laser Therapy* – LILT ou Low Level Laser Therapy - LLLT) de acordo com a intensidade de emissão da radiação ou segundo o modo de atuação sobre o tecido, sendo então denominados cirúrgicos ou não cirúrgicos (Parker, 2007c). Os LLLT, também conhecidos como laser terapêutico, laser mole, laser frio ou *soft-laser*, emitem radiações de baixa intensidade, sem potencial destrutivo, porém com capacidade de regular processos fisiológicos como dor e inflamação (Sun et al. 2004). As primeiras aplicações com o laser de baixa potência foram realizadas por Ender Mester no final da década de 60 em um estudo sobre possíveis efeitos carcinogênicos do laser de rubi e de HeNe. Além de não terem sido observadas alterações carcinogênicas, o laser acelerou o crescimento dos pelos dos camundongos no grupo experimental quando comparado ao grupo controle (Mester et al. 1971).

A teoria mais aceita que explica os efeitos e os mecanismos do laser terapêutico é a teoria fotoquímica (Sun e Túner, 2004). De acordo com esta teoria, reações bioquímicas são moduladas quando a luz aplicada sobre o tecido é absorvida por cromóforos fotorreceptores localizados nas células (Renno et al. 2007). Zungu et al. (2009) relatou que o laser estimula o aumento do íons cálcio intracelular resultando no aumento de MMP, ATP e cAMP, e , por fim, promove a fotobiomodulação e a restauração da homeostase das células injuriadas. Ao estimular a respiração mitocondrial, a produção de oxigênio molecular e de ATP (Stein et al. 2005), o laser induz a síntese de DNA, RNA e de proteínas reguladoras do ciclo celular, e desse modo induz a proliferação celular (Dörtbudak et al. 2000).

Tais características peculiares do laser o fazem um instrumento de grande interesse e importância para aplicações nas áreas da saúde, tanto no diagnóstico como na terapia de diversas enfermidades (Dederich e Bushick, 2004; Parker 2007a). Na literatura científica, diversos trabalhos comprovam a eficácia da laserterapia no reparo de feridas (Medrado et al. 2008; Viegas et al, 2008), alívio da dor (Emshoff et al. 2008; Mazzeto et al. 2007), redução de processos inflamatórios (Albertini et al. 2007; Gavish et al, 2008) e normalização da circulação sanguínea (Mennel et al. 2007).

Desde 1971, quando Mester et al. mostraram evidências de maior acúmulo de fibrilas colágenas e vesículas intracitoplasmáticas eletrodensas nos fibroblastos estimulados com laser, vários outros estudos foram realizados e comprovaram o efeito benéfico do laser na cicatrização. Segundo Dederich e Bushick 2004, o efeito fotobiológico dos lasers de hélio-neônio, arsênio-gálio e de arseniato de gálio e alumínio, alteram o comportamento de fibroblastos regulando sua proliferação, maturação e locomoção. Além disso, o laser é capaz de aumentar a proliferação e a ativação dos linfócitos, bem como, elevar a capacidade fagocística dos macrófagos, a secreção de fatores de crescimento de fibroblasto e intensificar a reabsorção de fibrina (Walsh, 1997). No estudo de Cressoni et al (2008), o tratamento com laser proporcionou efeitos antiinflamatórios, reduziu o número de leucócitos na região da injúria e acelerou a regeneração da ferida em ratos durante a fase inflamatória aguda. Ainda analisando o efeito do LLLT sobre as feridas, Maiya et al. (2005) notaram por meio de análises bioquímicas e histopatológicas que, mesmo em

animais diabéticos, as feridas irradiadas cicatrizaram melhor e mais rapidamente quando comparadas ao grupo não irradiado.

Estudos voltados à Odontologia demonstram a eficácia do laser de baixa potência na recuperação mais rápida nos casos de estomatite aftosa recorrente (Pinheiro et al. 1997), úlceras traumáticas, gengivite, gengivoestomatite herpética primária, gengivoestomatite herpética secundária - Herpes Simples (Navarro et al. 2007), queilite angular, pericementite (Yamaguchi et al. 2005), síndrome da ardência bucal, alveolite e mucosite (Genot et al. 2007).

Pacientes portadores de Disfunção Temporo Mandibular apresentaram melhora no quadro clínico doloroso após exposição ao LLLT no trabalho realizado por Mazzetto et al. 2007. Segundo os autores, a redução da sintomatologia dolorosa após aplicação do laser é possível graças à ação antiinflamatória e a mudança de potencial da membrana, dificultando a formação de impulso nervoso (Mazzetto et al 2007). Outros estudos sugerem que o efeito analgésico do laser ocorre devido à liberação de serotonina e acetilcolina centralmente, e histamina e prostaglandina na periferia (Zarković et al. 1989; Parker, 2007a). Além disso, a redução da dor também tem sido relacionada à alteração do limiar da dor e ao efeito do LLLT no aumento da síntese de betaendorfina e bradicinina (Honmura et al. 1992; Hagiwara et al. 2007).

Na Ortodontia os efeitos biomoduladores do laser são utilizados na realização da expansão rápida da maxila para diminuir a dor e o desconforto do paciente, como também para acelerar a reparação óssea (Saito e Shimizu, 1997). Saito e Shimizu mostraram que o osso neoformado apresenta uma qualidade superior em relação ao osso formado quando não se utiliza a luz laser. Alguns autores sugerem que o LLLT pode acelerar a formação óssea pelo aumento da atividade osteoblástica, vascularização e organização das fibras colágenas (Pinheiro

et al. 2006). Dependendo da fase do reparo ósseo, o LLLT pode acelerar atividade de reabsorção ou de formação. Khadra et al. 2005 observaram um aumento na adesão, proliferação, diferenciação e produção de TGF-beta em células osteoblásticas após a irradiação com laser de baixa intensidade, indicando modulação da atividade celular. Em acréscimo, a síntese de DNA e de RNA nos osteoblastos, a formação de nódulos ósseos e a expressão dos genes da osteocalcina e osteonectina aumentaram com a irradiação de laser (Hamajima S 2003; Khadra, 2005). Além disso, a atividade de ALP, um marcador da diferenciação dos osteoblastos, parece aumentar após exposição ao LLLT (Stein et al. 2005).

Em células da polpa, como os odontoblastos, estudos *in vivo* investigaram em dentes humanos o efeito biomodulatório do laser GaAlAs na expressão de colágeno III, tenascina e fibronectina, observando um aumento na expressão destas proteínas nas células irradiadas (Ferreira et al. 2006). Godoy et al. (2007) também observaram que dentes irradiados com laser após preparo cavitário apresentaram processos odontoblásticos em maior contato com a matriz extracelular. Matsui et al. (2007) observaram mineralização de células da polpa estimuladas por irradiação de laser GaAlAs provavelmente devido à geração de grupos hidroxilas.

Embora a maioria dos estudos tenha mostrado resultados satisfatórios da terapia com laser, efeitos indesejados também foram observados. Tate et al (2006) relataram que altas doses de energia podem levar a mudanças irreversíveis na polpa, como a formação de tecido ósseo intrapulpar. Segundo Knappe et al. (2004), a associação correta entre as propriedades de cada tecido e os parâmetros empregados é necessária para que sejam obtidos resultados satisfatórios, sendo que o grau e a extensão do efeito são dependentes tanto da propriedades do tecido, quanto dos parâmetros do laser empregados.

Proposíção

## 3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo foi proposto com o objetivo de avaliar o efeito da biomodulação com laser de baixa intensidade (GaAlAs) na atividade funcional de células de linhagem odontoblástica de camundongos (MDPC-23). Para este fim, células controles e irradiadas foram avaliadas por meio das análises de proliferação e viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e quantidade de proteína total, assim como, imunomarcação de proteínas e formação de nódulos de calcificação. Além disso, também foi avaliada a concentração do fator de crescimento endotelial vascular no sobrenadante das culturas.

Materíais e Método

### 4 MATERIAIS E MÉTODO

#### 4.1 Protocolo de Biomodulação Celular

A biomodulação celular foi realizada de acordo com protocolo de Skinner et al. (1996), considerando a dose que sai da ponta, sendo as células divididas em três grupos: (D<sub>1</sub>) biomodulação na dose de 0,2 J/cm<sup>2</sup>, (D<sub>2</sub>) biomodulação na dose de 1 J/cm<sup>2</sup> e (3) células controles sem biomodulação. A aplicação do laser foi realizada por 4 dias consecutivos com início imediato após o plaqueamento. O aparelho utilizado foi o modelo BioWave LLLT Dual (Kondortech, São Carlos, Brasil) com emissão não pulsada, no comprimento de onda de 830 nm, na potência de 20 mW, sendo o laser classificado como terapêutico (de baixa intensidade) do tipo GaAlAs. As irradiações foram realizadas no centro do poço a 3 cm de distância, entre a ponta ativa do laser e a cultura. O feixe do laser apresentava uma divergência de 20º graus (dado oferecido pelo fabricante), e consequentemente a área atingida foi de 4,83 cm<sup>2</sup>. Portanto, ela foi maior que a do poço que equivale a 1,76 cm<sup>2</sup>. Para que durante a irradiação os poços vizinhos não fossem atingidos, as culturas foram distribuídas pela placa a uma distância maior que a da área irradiada. Além disso, os experimentos foram realizados em placas diferentes para cada grupo experimental.

#### 4.2 Cultura da Linhagem Celular

Células de linhagem odontoblástica de camundongos (MDPC-23) foram gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Jacques Eduardo Nor, Professor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, USA. As células foram

mantidas em tubos criogênicos de 2 ml em tambores de nitrogênio líquido e descongeladas para obtenção de culturas.

Após o descongelamento, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> com 10 ml de meio de cultura D-MEM com 10% de soro fetal bovino suplementado com gentamicina. Foram adicionados 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico para promover a formação de colágeno e matriz extracelular (Franceschi et al. 1994) e 2mM de beta-glicerofosfato para a formação e mineralização de nódulos em multicamada (Tenenbaum, 1981). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada dois dias. Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco) e contadas utilizando um hemocitômetro (Fisher Scientific). Em seguida, as células foram passadas para placas de 24 poços a uma densidade de 10<sup>4</sup> células/poço e classificadas nos grupos descritos acima (n=5).

#### 4.3 Métodos de Avaliação do Estímulo Celular

#### 4.3.1 Proliferação celular

Após 3, 7, 10 e 14 dias do plaqueamento o meio das células odontoblásticas foi removido, os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) aquecida a 37°C para remover as células não aderidas. Em seguida, foram preenchidos com 1,5ml de uma solução de EDTA 1mM e tripsina 0,25%, para remover as células aderidas, etapa que foi monitorada pela observação em

microscópio de fase invertido. Amostras dessa suspensão de células em solução enzimática foram utilizadas para contagem do número de células.

#### 4.3.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando alíquotas das mesmas soluções utilizadas para calcular a proliferação celular. Estas alíquotas foram incubadas por 5 minutos com o mesmo volume de azul de tripan 1% (Sigma) e as células não-viáveis foram contadas utilizando um hemocitômetro. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células viáveis.

#### 4.3.3 Conteúdo de proteína total

O conteúdo de proteína total foi determinado utilizando o método de Lowry modificado (Lowry OH et al. 1951). As proteínas foram extraídas de cada poço com lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma) por 30 minutos, adicionando-se a essa solução igual volume de solução Lowry (Sigma) por 20 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi diluído em reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi avaliada a 680nm utilizando espectrofotômetro (Cecil CE3021, Cambridge, Inglaterra). O conteúdo de proteína total foi calculado através de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em µg/ml, para culturas nos tempos de 3,7,10 e 14 dias.

#### 4.3.4 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados para a avaliação de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do
substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Inicialmente, 50  $\mu$ l de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 ml de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 min a 37°C. À solução foi então acrescentada alíquota de 50  $\mu$ l de lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 m l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Em seguida a Absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina, calculada a partir da curva padrão usando timolftaleína em uma escala de 0,012 a 0,4 µmol de timolftaleína/h/mL. Os dados foram expressos como atividade de fosfatase alcalina normalizada pelo número de células, para as culturas nos tempos de 3,7,10 e 14 dias.

#### 4.3.5 <u>Detecção e quantificação de matriz mineralizada</u>

Para detecção macro de acúmulos de cálcio, ao final de 14 dias em cultura, o meio foi removido, os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato aquecida a 37°C e preenchidos com solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato (pH 7,3). Em seguida, os poços foram desidratados em série crescente de alcoóis e processados para coloração com Alizarin S a 2% (Sigma), pH 4,2, por 10 minutos que cora em vermelho os nódulos de mineralização, ricos em cálcio, e então as placas foram fotografadas e em seguida estocadas a -20°C. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 150 ul de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos de 1,5 ml e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, 100 ul de óleo mineral foram adicionados à amostra para evitar evaporação, que foi aquecida a 85° C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, adicionados 40 ul de hidróxido de amônia a 10% e os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de alizarina de 0,5 a 3 mM em acetato de amônia (10% de ácido acético glacial e 5M de hidróxido de amônia). A média e a comparação entre os grupos foram realizadas através de teste estatístico.

#### 4.3.6 Ensaio de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

O Kit Quantikine Murine VEGF (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA) foi usado para quantificar a expressão de VEGF164 no sobrenadante das culturas controles e biomoduladas. Após o plaqueamento, as células foram cultivadas por 7 e 10 dias e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos a 4° C. O meio condicionado (100ul) foi coletado e colocado em placas de 96 poços, que foram previamente recobertos com anticorpo monoclonal para VEGF e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Subsequentemente à lavagem de substâncias não ligantes, um anticorpo secundário foi adicionado a cada poço e incubado por 2 horas adicionais. Após lavagem dos poços, os poços foram incubados por 30 minutos com uma solução de substrato cromogênico e a reação terminada com adição de uma *stop solution.* A absorção foi lida a um comprimento de onda de 450 nm em um aparelho leitor de placa de ELISA (MicroQuant, Biotek).

#### 4.3.7 Imunolocalização

Para a imunolocalização de proteínas colágenas (colágeno do tipo 1) e nãocolágenas (DSPP, DMP1, ALP e OPN), as células nos períodos experimentais de 3, 7 e 10 dias cultivadas sobre lamínulas de vidro foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (de Oliveira & Nanci, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Os anticorpos primários monoclonais e/ou policionais para ALP e OPN (Sigma-Aldrich, USA), COL1A1, DSPP e DMP1 (Larry Fisher, USA) foram diluídos em concentrações de trabalho e incubados por 1 hora, seguidos de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas à lamínula, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes-1:300). A substituição dos anticorpos primários por P.B. foi usada como controle negativo. Entre cada incubação, as amostras eram lavadas 3 vezes com em P.B., % minutos cada. Após montagem de lamínula de vidro sobre os discos, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica modelo DMLB (Alemanha). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop para ajustes em dimensões, brilho e contraste, sobreposições de fluorescências vermelha, verde e azul (modo de mesclagem: clarear) e montagem de pranchas.

## 4.4 Análise estatística

Os dados relativos aos parâmetros de análise de diferenciação celular acima especificados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 5). Os dados foram submetidos ao Teste de Kruskall-Wallis, quando apropriado, para comparação de cada um dos parâmetros avaliados. Resultados com p ≤ 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

#### 5 **RESULTADOS**

## 5.1 Proliferação Celular

A proliferação celular (Figura 1) teve pico no 7º dia em todos os grupos, havendo um decaimento após esse período. O grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> apresentou menor proliferação no 7º e 10º dias comparado aos demais grupos. Não houve diferença significante somente entre os grupos irradiados e entre o grupo controle e o irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup> nos períodos de 3 e 7 dias, respectivamente.





## 5.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular (Figura 2), expressa como porcentagem de células viáveis, permaneceu acima de 90% em todos grupos e tempos, mostrando que as doses empregadas não interferiram na viabilidade das células de forma significativa. Não houve diferença estatisticamente significante em nenhum período.



**Figura 2.** Viabilidade celular das células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle). Os dados representam média aritimética (n= 5). Teste estatístico de Kruskall-Wallis,  $p \le 0,05$ .

#### 5.3 Conteúdo de proteína total

Na quantificação da proteína total (Figura 3), o pico de síntese do grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> foi antecipado em relação aos demais grupos. Enquanto no grupo irradiado com a menor dose foi observada maior quantidade de proteína total no  $10^{\circ}$  dia, nos demais grupos, este pico ocorreu no  $14^{\circ}$  dia. Houve diferença estatisticamente significante entre todos os grupos e em todos os tempos, exceto no  $3^{\circ}$  dia, entre o grupo controle e oirradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 3.** Conteúdo de proteína total de cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle). Os dados representam média aritimética (n= 5). Teste estatístico de Kruskall-Wallis, p≤0,05.

#### 5.4 Atividade de Fosfatase Alcalina

A maior produção de fosfatase alcalina (Figura 4), enzima relacionada ao processo de mineralização, foi observada no  $10^{\circ}$  dia nos grupos irradiados e no  $14^{\circ}$  dia no grupo controle. Em todos os tempos, exceto no  $14^{\circ}$  dia, o grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> foi o que apresentou maior produção de ALP. Houve diferença estatística entre os grupos irradiados e entre o grupo controle e irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup> nos períodos de 3, 7 e 10 dias, assim como entre o grupo controle e o irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> aos 10 e 14 dias.



**Figura 4.** Atividade de fostase alcalina de cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle). Os dados representam média aritimética (n= 5). Teste estatístico de Kruskall-Wallis, p≤0,05.

#### 5.5 Mineralização

#### 5.5.1 Análise qualitativa de depósito de cálcio

A análise qualitativa da formação de nódulos calcificados (Figura 5), realizada no 14º dia, indicou diferença na quantidade, na forma e na distribuição dos nódulos, entre os grupos estudados. No grupo controle (A), foram observados escassos pontos de mineralização, concentrados principalmente nas bordas dos poços. No grupo irradiado com 0,2 J/cm² (B), os nódulos corados, distribuídos por todo o poço, apresentaram-se em tanto na forma de pontos, quanto na de pequenas placas. Já no grupo irradiado com 1 J/cm² (C), os pontos se concentraram majoritariamente em uma porção do poço e se apresentaram na forma de pontos e, visualmente, em maior quantidade quando comparado ao grupo controle.



**Figura 5.** Imagens macroscópicas de nódulos calcificados, corados em vermelho de alizarina após 14 dias, referentes à cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B), 1 J/cm<sup>2</sup> (C) e não irradiadas (A).

## 5.5.2 Análise quantitativa de depósito de cálcio

A quantificação do vermelho de alizarina mostrou que houve diferença na quantidade de depósito de cálcio entre todos os grupos, sendo que o grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> foi o que apresentou maior quantidade de cálcio, seguido do grupo irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup> e do controle (Figura 6).



**Figura 6.** Formação de nódulos calcificados após 14 dias em cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle). Os dados representam média aritimética (n= 5).Teste estatístico de Kruskall-Wallis,  $p \le 0,05$ .

## 5.6 VEGF

Após a normalização dos dados pelo número de célula, foi observada maior concentração de VEGF no grupo irradiado com a dose de 0,2 J/cm<sup>2</sup> aos 7 e 10 dias, comparado aos demais grupos (Figura 7). Aos 10 dias, o aumento na concentração de VEGF, em relação aos níveis observados no sétimo dia, foi menos expressivo no controle e no grupo irradiado com 1 J/cm<sup>2</sup> quando comparado ao aumento observado no grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> e no controle positivo no qual as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS).

Dias	7	10
LPS x Controle	1%	0,1%
LPS x 0,2 J/cm <sup>2</sup>	1%	1%
LPS x 1 J/cm <sup>2</sup>	0,1%	1%
Controle x 0,2 J/cm <sup>2</sup>	0,1%	0,1%
Controle x 1 J/cm <sup>2</sup>	1%	1%
0,2 J/cm <sup>2</sup> x 1 J/cm <sup>2</sup>	0,1%	0,1%



 $\square$  LPS  $\blacksquare$  Controle  $\square$  0,2 J/cm<sup>2</sup>  $\blacksquare$  1 J/cm<sup>2</sup>



#### 5.7 Imunomarcação

#### 5.7.1 Morfologia celular

As imagens obtidas através de imunofluorescência mostraram que os grupos irradiados apresentaram similaridade na morfologia das células odontoblásticas MDPC-23 quando comparados ao grupo controle. As células permaneceram com sua forma poligonal e organizadas em grupos, apesar de haver uma redução na quantidade celular no grupo irradiado com a menor dose, confirmado pela contagem celular realizada anteriormente. É freqüente a presença de algumas células isoladas maiores com o formato alongado ou triangular, tendo sido observada nos três grupos experimentais.

#### 5.7.2 Expressão de proteínas colágenas e não colágenas

A imunolocalização da osteopontina foi realizada após 3, 7 e 10 dias de cultura. As imagens mostram que nos três grupos experimentais a marcação da proteína foi mais intensa ao décimo dia no grupo irradiado com dose de 0,2 J/cm<sup>2</sup>, passando do meio intracelular para o meio extracelular. Já a imunolocalização para a proteína ALP foi menos intensa. Mesmo assim, similarmente ao observado na OPN, sua expressão foi maior aos 10 dias no grupo irradiado com a menor dose quando comparado aos demais grupos. A expressão de colágeno do tipo 1 foi intensa aos 7 dias de cultura principalmente nos grupos controle e irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, podendo observar as pontes de colágeno entre os grupos celulares. As células apresentaram fraca marcação para DSPP e DMP1, sendo ela mais intensa aos 10 dias no grupo irradiado comparado aos outros grupos experimentais.



**Figura 8.** Epifluorescência de duplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Fluorescência azul (marcação do DNA com DAPI) permite a identificação dos núcleos celulares. O cito esqueleto de actina é detectado por marcação com faloidina (verde) conjugada com Alexa Fluor 488.



**Figura 9.** Epifluorescência de duplas e triplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Marcação para colágeno do tipo 1 em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI). O cito esqueleto de actina é detectado por marcação com faloidina (verde) conjugada com Alexa Fluor 488 (D,E e F).



**Figura 10.** Epifluorescência de duplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Marcação para proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI).



**Figura 11.** Epifluorescência de duplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Marcação para sialofosfoproteína dentinária (DSPP) em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI).



**Figura 12.** Epifluorescência de duplas e triplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Marcação para osteopontina (OPN) em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI). O cito esqueleto de actina é detectado por marcação com faloidina (verde) conjugada com Alexa Fluor 488 (G, H e I).



**Figura 13.** Epifluorescência de duplas marcações de cultura de células odontoblásticas controle (A, D e G), irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup> (B, E e H) e 1 J/cm<sup>2</sup> (C, F e I), nos período de 3 (A, B e C), 7 (D, E e F) e 10 dias (G, H e I). Marcação para fosfatase alcalina (ALP) em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI).

Díscussão

## 6 DISCUSSÃO

A utilização de linhagens celulares odontoblásticas tem sido amplamente empregada para estudar os efeitos de substâncias biológicas e sintéticas nas funções celulares envolvidas na dentinogênese (Lanza et al. 2008). No presente estudo, foi avaliado o efeito biomodulador do laser terapêutico (GaAlAs) em células de uma linhagem odontoblástica (MDPC-23) de camundongos na expressão de marcadores do fenótipo odontoblástico. A avaliação *in vitro* permitiu estudar de forma mais detalhada o efeito do laser sobre eventos celulares, de modo que fosse possível analisar qualitativa e quantitativamente a produção de proteínas essenciais para a formação da dentina. Os resultados mostraram que o laser é capaz de estimular a dentinogênese, induzindo a expressão de proteínas não colágenas e colágenas, como também a formação de nódulos de calcificação.

Considerando a ampla diversidade de equipamentos empregados nos estudos de LLLT e possíveis diferenças na calibração destes aparelhos, a veracidade dos valores especificados em cada aparelho deve ser conferida para minimizar as contraversões tão comuns entre resultados obtidos neste tipo de estudo. Para a mensuração dos valores de energia que sai da caneta do aparelho BioWave LLLT Dual da Kondortech, foi utilizado um potenciômetro, verificando-se que a potência correta da luz emitida quando o aparelho marcava 10mW era de 20mW. Consequentemente, as doses de 0,1 e 0,5 mostradas no visor do equipamento equivalem a 0,2 e 1 J/cm<sup>2</sup> respectivamente. É importante destacar que as doses relatadas não se referem a energia final depositada no fundo dos poços de cultura, mas à quantidade de energia que sai da caneta (*output*). Estes valores foram utilizados devido a inviabilidade do cálculo da quantidade de energia perdida pelo feixe de luz ao atravessar a tampa de acrílico e o meio de cultura.

A magnitude do efeito biomodulador do LLLT depende do estado fisiológico da célula no momento da irradiação, sendo o estágio inicial de proliferação o mais responsivo a essa terapia (Pinheiro e Gerbi, 2006). Desta forma, foi adotado o protocolo de Skinner et al. (1996) e as irradiações foram realizadas nos 4 primeiros dias após o plaqueamento, período correspondente a fase proliferativa da cultura.

Foram avaliadas duas doses do laser infravermelho e os resultados mostraram que variações na quantidade de energia fornecida interferem na resposta celular. Fato este que corrobora com o trabalho de Marsilio et al. (2003), que relata que diferentes densidade e intensidade de energia podem levar ao sucesso ou fracasso da terapia de laser de baixa intensidade. No presente estudo, a menor dose induziu a maior atividade celular enquanto a maior dose apresentou resultados semelhantes ao controle.

A dentinogênese é resultado de inúmeras etapas, caracterizada pela diferenciação das células da papila dentária em odontoblastos seguida pela secreção e mineralização da matriz extracelular (Linde e Goldberg, 1993). Segundo Nakasone et al. (2006), no estudo sobre a relação entre proliferação e expressão do marcador de diferenciação odontoblástica HSP-25, o aumento fenotípico do odontoblasto diferenciado, caracterizado pela secreção de proteínas relacionadas à formação da dentina, é precedido pela redução da proliferação celular. Portanto, a redução da proliferação celular observada no grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> parece estar relacionada ao aumento da síntese de proteínas e não à morte celular, já que o laser não afetou a viabilidade das células odontoblásticas.

Ferreira et al. (2006) relataram que, *in vivo*, o LLLT influenciou positivamente a atividade de síntese dos odontoblastos e antencipou o processo de reparo da dentina. De maneira similar, os resultados do presente estudo indicam que o LLLT aumentou o conteúdo de proteína total. Além disso, quando os dados foram normalizados pelo número de células, os resultados mostraram que a menor dose de LLLT antecipou a atividade secretora das células odontoblásticas, com pico em 10 dias, enquanto o grupo controle e o grupo irradiado com a maior dose apresentaram pico de secreção aos 14 dias.

No presente estudo, a exposição ao laser aumentou a atividade de fosfatase alcalina das células odontoblásticas. Este resultado está de acordo com outros estudos, como o de Matsui et al, que mostrou aumento da atividade de ALP em células humanas da polpa dentária biomoduladas com laser de GaAlAs. Considerando que a fosfatase alcalina está relacionada ao processo de mineralização (Balcerzak et al. 2003), a maior formação de nódulos de calcificação foram observados nos grupos que apresentaram maiores níveis de ALP. A formação de nódulos tem sido considerada um predecessor e um importante distintivo para a mineralização (Pang et al, 2006). A coloração com vermelho de alizarina mostrou que o tamanho e a quantidade dos nódulos de cálcio do grupo irradiado com 0,2 J/cm<sup>2</sup> foram maiores quando comparados aos demais grupos.

Neste estudo, o VEGF foi selecionado como biomarcador para estudar a influência do LLLT na liberação de citocinas secretadas pelas células odontoblásticas. O VEGF, um potente fator pró-angiogênico, é benéfico no processo de reparação da polpa dentária, pois o acesso de anticorpos derivados do sangue e de células de defesa para proteger o tecido pulpar contra agentes exógenos nocivos é conseqüência do aumento do suprimento sanguíneo (Mantelete MG, 2005). Os resultados mostraram que os odontoblastos secretam VEGF *in vitro* e que a produção por célula pode ser significativamente aumentada após a exposição ao laser de baixa potência com dose de 0,2 J/cm<sup>2</sup>. Esses resultados são consistentes

com relatos anteriores nos quais a secreção de fatores de crescimento por diversos tipos celulares aumentou após a irradiação com LLLT (Hou et al. 2008).

No presente estudo, as análises por imunofluorêscencia indireta sugeriram que a exposição das células odontoblásticas ao LLLT estimulou a síntese e secreção de colágeno do tipo 1. De maneira similar, no trabalho de Godoy et al. (2007), o grupo irradiado apresentou fibras mais agregadas e organizadas após o preparo cavitário (Godoy et al. 2007). O colágeno, proteína mais abundante na dentina, confere viscoelasticidade e também define compartimentos para o depósito ordenado dos minerais (He et al. 2004, Garcia JMQ 2003, Massa LF 2005). Sendo assim, ao favorecer a formação de fibras colágenas, o LLLT pode induzir a formação de dentina e acelerar a recuperação da estrutura dentária.

Na dentina, assim como ocorre no tecido ósseo, as proteínas não-colágenas são necessárias no processo de diferenciação celular e em períodos mais tardios, na mineralização. A irradiação com LLLT aumenta a secreção de proteínas não-colágenas em células osteoblásticas humanas, tanto *in vitro* como *in vivo* (referências). Este estudo evidenciou o efeito positivo do LLLT na síntese das proteínas colágenas e não colágenas, sugerindo o efeito benéfico da terapia na formação de novo tecido mineralizado.

Portanto, os resultados sugerem que a irradiações com laser de GaAlAs promovem a biomodulação dos odontoblastos da linhagem MDPC-23 *in vitro* e que a variação da dose empregada interfere na resposta celular, sendo que menores doses podem promover induções na expressão do fenótipo odontoblástico de forma mais significativa.

Por fim, considerando a necessidade de se encontrar agentes que estimulam a formação de dentina, para aumentar o isolamento da polpa dental do

meio externo, após preparo cavitário ou em casos de hipersensibilidade dentinária, os resultados deste trabalho sugerem que o laser de baixa potência pode ser uma ferramenta útil na clínica odontológica pela sua capacidade em estimular a síntese de proteínas e fatores de crescimento envolvidos no processo da dentinogênese. No entanto, a inclusão desta terapia como procedimento rotineiro na clínica odontológica ainda levará algum tempo, visto que a extrema sensibilidade da resposta celular aos parâmetros empregados somada às possíveis variações de cor e espessura da dentina sobre a qual o laser será irradiado dificultam a padronização de protocolos de aplicação de laser de baixa potência.

Conclusões

# 7 CONCLUSÕES

Podemos concluir neste trabalho que a terapia com laser de baixa potência (LLLT) modulou a atividade funcional das células da linhagem odontoblástica de camundongos (MDPC-23) e que a dose de 0,2 J/cm<sup>2</sup>:

-permitiu a viabilidade celular;

-reduziu a proliferação celular;

-aumentou a quantidade de proteína total e atividade de fosfatase alcalina;

-aumentou a quantidade de nódulos mineralizados;

-favoreceu a expressão de proteínas colágenas e não colágenas;

-favoreceu a secreção de VEGF.

Bibliografia

## 8 **BIBLIOGRAFIA**

ABERGEL, R.P.; LYONS, R.F.; CASTEL, J.C.; DWYER, R.M.; UITTO, J. Biostimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. J Dermatol Surg Oncol, v. 13, p. 127-33, 1987.

AGUIAR, M.C.; ARANA-CHAVEZ, V.E. Ultrastructural and immunocytochemical analyses of osteopontin in reactionary and reparative dentine formed after extrusion of upper rat incisors. J Anat, v. 210, p. 418-27, 2007.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; SALGADO, M.A.; BJORDAL, J.M.; ALVES, L.P.; MUNIN. E.; COSTA, M.S. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. J Photochem Photobiol B, v. 89, p.50-5, 2007.

ARANA-CHAVEZ, V.E.; MASSA, L.F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. Int J Biochem Cell Bio, v. 36, p. 1367-73, 2004.

ARTESE, L.; CORRADO, R.; FERRERO, G.; FIORINI, M.; SANTINELLI, A.; PIATELLI, A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*, v. 28, p. 20–23, 2001.

BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. Acta Biochim Pol, v. 50, p. 1019-38, 2003. Review.

BARRON, M.J.; MCDONNELL, S.T.; MACKIE, I.; DIXON, M.J. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. Orphanet J Rare Dis, v. 3, p. 31, 2008

BELLOWS, C.G.; AUBIN, J.E.; HEERSCHE, J.N. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. Bone Miner, v. 14, p. 27-40, 1991.

BOTERO, T.M.; MANTELLINI, M.G.; SONG, W.; HANKS, C.T.; NÖR, J.E. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. Eur J Oral Sci, v. 111, p. 228–234, 2003.

BUTLER, W.T.; BHOWN, M.; BRUNN, J.C.; D'SOUZA, R.N.; FARACH-CARSON MC, HAPPONEN, R.P. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). Matrix, v. 12, p. 343-51, 1992.

CHIQUET-EHRISMANN R, KALLA P, PEARSON CA, BECK K, CHIQUET M. Tenascin interferes with fibronectin action. Cell, v. 53, p. 383-390, 1988.

CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A.The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. Photomed Laser Surg, 2008. [Epub ahead of print].

de LIMA, A.F.; LESSA, F.C.; GASPAROTO MANCINI, M.N.; HEBLING, J.; de SOUZA COSTA, C.A.; MARCHI, G.M. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. [Epub ahead of print].

de OLIVEIRA, P.T.; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials, v.* 25, p. 403-13, 2004.

de SOUZA COSTA, C.A.; DUARTE, P.T.; DE SOUZA, P.P.; GIRO, E.M.; HEBLING, J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. Am J Dent. v. 21, p. 255-61, 2008.

de SOUZA, L.B.; DE AQUINO, S.G.; DE SOUZA, P.P.; HEBLING, J.; COSTA, C.A. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. Am J Dent, v. 20, p. 400-4, 2007.

DEDERICH, D.N.; BUSHICK, R.D. Lasers in dentistry: separating science from hype. J Am Dent Assoc. v. 35, p. 204-12, 2004.

DEPPE, H.; HORCH, H.H. Laser applications in oral surgery and implant dentistry. Lasers Med Sci, v. 22, p. 217–221, 2007.

DERRINGER, K.A.; JAGGERS, D.C.; LINDEN, R.W. Angiogenesis in human dental pulp following orthodontic tooth movement. J Dent Res, v. 75, p. 1761-6, 1996.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MALLATH-POKORNY, G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. Clin Oral Implants Res, v. 11, p. 540-5, 2000.

EMSHOFF, R.; BÖSCH, R.; PÜMPEL, E.; SCHÖNING, H.; STROBL, H. Low-level laser therapy for treatment of temporomandibular joint pain: a double-blind and placebo-controlled trial. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v. 105, p. 452-6, 2008.

FERREIRA, A.N.S.; SILVEIRA, L.; GENOVESE. W.J.; DE ARAÚJO, V.C.; FRIGO, L.; DE MESQUITA, R.A.; GUEDES, E. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. Photomed Laser Surg, v. 24, p. 358-65, 2006.

FISHER, L.W.; FEDARKO, N.S. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. Connect Tissue Res, v. 44, p. 33–40, 2003.

FRANCESCHI, R.T.; IYER, B.S.; CUI Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res,* v. 9, p. 843-54, 1994.

GAVISH, L.; PEREZ, L.S.; REISSMAN, P.; GERTZ, S.D. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. Lasers Surg Med, v. 40, p. 371-8, 2008.

GENOT, M.T.; KLASTERSKY, J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. Curr Opin Oncol, v. 17, p. 236-40, 2005. Review.

GIACHELLI, C.M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix Biol, v. 19, p. 615-22, 2000.

GODOY, B.M.; ARANA-CHAVEZ, V.E.; NUNEZ, S.C.; RIBEIRO, S.R. Effects of lowpower red laser on dentine–pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. Arch Oral Biology, v. 52, p. 899-903, 2007.

GOLDBERG, M.; SMITH, A.J.Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: a Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. Crit Rev Oral Biol Med, v. 15, p. 13-27, 2004.

GRANDO MATTUELLA, L.; WESTPHALEN BENTO, L.; DE FIGUEIREDO, J.A.; NÖR, J.E.; DE ARAUJO, F.B.; FOSSATI, A.C. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. J Endod, v. 33, p. 524-30, 2007. Review.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.;, PEISTER, A.; PROCKOP, D.J.; An Alizarin redbased assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, v. 329, p. 77-84, 2004.

GULSOY, M.; OZER, G.;, BOZKULAK, O.; TABAKOGLU, H.O.; AKTAS, E.; DENIZ, G.; ERTAN, C. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J Photochem Photobiol B*, v. 82, p, 199-202, 2006.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; OKUDA, K.; NOGUCHI, T. GaAlAs (830 nm) lowlevel laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. Lasers Surg Med, v. 39, p. 797-802, 2007.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA, K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. Lasers Med Sci, v. 18, p. 78-82, 2003.

HANKS, C.T.; FANG, D.; SUN, Z.; EDWARDS, C.; BUTLER, W.T. Dentin-specific proteins in MDPC-23 cell line. Eur J Oral Sci, v. 106, p. 260-266, 1998.

HE, W.X.; NIU, Z.Y.; ZHAO, S.L.; LI, P.; GAO, J. Transcriptional regulation of dentin sialophosphoprotein by c-Jun/c-Fos. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, v. 24, p. 67-9, 2006.

HILLMANN, G.; GEURTSEN, W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. Cell Tissue Res, v. 289, p. 145-54, 1997.

HONMURA, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. Lasers Surg Med, v. 12, p. 441-9, 1992.

HOU, J.F.; ZHANG, H.; YUAN, X.; LI. J.; WEI, Y.J.; HU, S.S. In vitro effects of lowlevel laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. Lasers Surg Med, v. 40, p. 726-33, 2008.

HU, J.C.; SIMMER, J.P. Developmental biology and genetics of dental malformations. Orthod Craniofac Res, v. 10, p. 45-52, 2007.

KHADRA, M. The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and in vitro studies. Swed Dent J Suppl, n.172, p. 1-63, 2005.

KHADRA, M.; LYNGSTADAAS, S.P.; HAANAES, H.R.; MUSTAFA, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. Biomaterials, v. 26, p. 3503-9, 2005.

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. Photomed Laser Surg, v. 22, p. 411-7, 2004. Review.

LANZA, C.R.; DE SOUZA COSTA, C.A.; FURLAN, M.; ALÉCIO, A.; HEBLING, J. Transdentinal diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. Cell Biol Toxicol, 2008. [Epub ahead of print].

LINDE A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. J Dent Res, v. 64, p. 523-9, 1985.

LINDE, A.; GOLDBERG, M. Dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med, v. 4, p. 679-728, 1993. Review.

LING, Y. RIOS, H.F.; MYERS, E.R.; LU, Y.; FENG, J.Q.; BOSKEY, A.L. DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. J Bone Miner Res, v. 20, p. 2169-77, 2005.

LU, Y.; YE, L.; YU, S.; ZHANG, S.; XIE, Y.; MCKEE, M.D. et al. Rescue of odontogenesis in Dmp1-deficient mice by targeted re-expression of DMP1 reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. Dev Biol, v. 303, p. 191-201, 2007.

MACFARLANE, J.D.; SWART, J.G. Dental aspects of hypophosphatasia: a case report, family study, and literature review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 67, p. 521-6, 1989.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. Nature, v. 187, p. 493–4, 1960.

MAIYA, G.A.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. Photomed Laser Surg, v. 23, p. 187-90, 2005.

MARSILIO, A.L.; RODRIGUES, J.R.; BORGES, A.B. Effect of the clinical application of the GaAlAs laser in the treatment of dentine hypersensitivity. J Clin Laser Med Surv.v. 21, p. 291-6, 2003.

MASTRANGELO, F.; PICCIRILLI, M.; DOLCI, M.; TETÉ, S.; SPERANZA, L.; PATRUNO, A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human tooth germ center. Int J Immunopathol Pharmacol, v. 18, p. 587-94, 2005.

MATSUI, S.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUSHIMA, K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by Ga-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. Biol Pharm Bull, v. 30, p. 27-31, 2007.

MATTUELLA, L.G.; WESTPHALEN, L.B.; DE FIGUEIREDO, J.A.; NOR, J.E.; DE ARAUJO, F.B.; FOSSATI, A.C. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. J Endod, v. 33, p. 524-30, 2007.

MAZZETTO, M.O.; CARRASCO, T.G.; BIDINELO, E.F.; DE ANDRADE PIZZO, R.C.; MAZZETTO, R.G. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I double-blind study. Cranio, v. 25, p. 186-92, 2007.

MEDRADO, A.P.; SOARES, A.P.; SANTOS, E.T.; REIS, S.R.; ANDRADE, Z.A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. J Photochem Photobiol B, v. 92, p. 144-52, 2008.

MENNEL, S.; BARBAZETTO, I.; MEYER, C.H.; PETER, S.; STUR, M. Ocular photodynamic therapy--standard applications and new indications. Part 2. Review of the literature and personal experience. Ophthalmologica, v. 221, p. 282-91, 2007.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE B E TOTA, J.G. Effect of laser rays on wound healing. Am J Surg 1971 122:532-5.

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of laser rays on wound healing. Am J Surg, v. 122, p. 532-5, 1971.

MIRZAEI, M.; BAYAT, M.; MOSAFA, N.; MOHSENIFAR, Z.; PIRYAEI, A.; FAROKHI, B. et al. Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. Photomed Laser Surg, v. 25, p. 519-25, 2007.

MITSIADIS, T.A.; RAHIOTIS, C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. J Dent Res, v. 83, p. 896-902, 2004. Review.

MJOR, I.A.; SVEEN, O.B.; HEYERAAS, K.J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. Quintessence Int, v. 32, p. 425, 2001.

NANCI, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. J Struct Biol, v. 126, p. 256-69, 1999.

NAVARRO, R.; MARQUEZAN, M.; CERQUEIRA, D.F.; SILVEIRA, B.L.; CORRÊA, M.S. Low-level-laser therapy as an alternative treatment for primary herpes simplex infection: a case report. J Clin Pediatr Dent, v. 31, p. 225-8, 2007.

NÖR, J.E.; CHRISTENSEN, J.; MOONEY, D.J.; POLVERINI, P.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. Am J Pathol, v. 154, p. 375-84, 1999.

OGBUREKE, K.U.; NIKITAKIS, N.G.; WARBURTON, G.; ORD, R.A.; SAUK, J.J.; WALLER, J.L; FISHER, L.W. Up-regulation of SIBLING proteins and correlation with cognate MMP expression in oral cancer. Oral Oncol, v. 43, p. 920-32, 2007.

PANG, J.L.; WU, B.L.; HE, W.X.; ZHANG, Y.Q.; ZHAO, H.P.; XIE, Z.H. Effect of antisense oligonucleotide against mouse dentine matrix protein 1 on mineralization ability and calcium ions metabolism in odontoblast-like cell line MDPC-23. Int Endod J, v. 39, p. 527-37, 2006.

PAPAGERAKIS, P.; BERDAL, A.; MESBAH, M.; PEUCHMAUR, M.; MALAVAL, L.; NYDEGGER, J. et al. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone, v. 30, p. 377-85, 2002.

PARKER, S. Low-level laser use in dentistry. Br Dent J, v. 202, p. 131-8, 2007a.

PARKER, S. Verifiable CPD paper: introduction, history of lasers and laser light production. Br Dent J, v. 202, p. 21-31, 2007b.

PARKER, S. Verifiable CPD paper: laser-tissue interaction. Br Dent J, v. 202, p. 73-81, 2007c.

PINHEIRO, A.L.; CAVALCANTI, E.T.; PINHEIRO, T.I.; ALVES, M.J.; MANZI, C.T. Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. J Clin Laser Med Surg, v. 15, p. 181-3, 1997.

PINHEIRO, A.L.; GERBI, M.E. Photoengineering of bone repair processes. Photomed Laser Sur, v. 24, p. 169-78, 2006.

QIN, C.; BABA, O.; BUTLER, W.T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med, v. 15, p. 126-36, 2004.

QIN, C.; BRUNN, J.C.; CADENA, E.; RIDALL, A.; BUTLER, W.T. Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. Connect Tissue Res, v. 44, p. 179-83, 2003.

QIN, C.; D'SOUZA, R.; FENG, J.Q. Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. J Dent Res, v. 86, p. 1134-41, 2007.

RENNO, A.C.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. Photomed Laser Surg, v. 25, p. 275-80, 2007.

RENNO, A.C.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. Photomed Laser Surg, v. 25, p. 275-80, 2007.

ROBISON, R. The Possible Significance of Hexosephosphoric Esters in Ossification. Biochem J, v. 17, p. 286-93, 1923.

SAITO, M.; IWASE, M.; MASLAN, S.; NOZAKI, N.; YAMAUCHI, M.; HANDA, K. et al. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. Bone, v. 29, p. 242-8, 2001.

SAITO, S,.; HIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. Am J Orthod Dentofacial Orthop, v. 111, p. 525-32, 1997.
SASAKI, T.; GARANT, P.R. Structure and organization of odontoblasts. Anat Rec, v. 245, p. 235-49, 1996.

SAYGUN, I.; KARACAY, S.; SERDAR, M.; URAL, A.U.; SENCIMEN, M.; KURTIS B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. Lasers Med Sci, 2007. [Epub ahead of print].

SKINNER, S.M.; GAGE, J.P.; WILCE, P.A.; SHAW, R.M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. Aust Dent J, v. 41, p. 188-92, 1996.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M.D. Osteopontin. Crit Rev Oral Biol Med, v. 11, p. 279-303, 2000.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. Photomed Laser Surg, v. 23, p. 161-6, 2005.

SUN, G.; TUNÉR, J. Low-level laser therapy in dentistry. Dent Clin North Am, v. 48, p. 1061-76, 2004.

TATE, Y.; YOSHIBA, K.; YOSHIBA, N.; IWAKU, M.; OKIJI, T.; OHSHIMA, H. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. Eur J Oral Sci, v. 114, p. 50-7, 2006.

TENENBAUM, H.C. Role of organic phosphate in mineralization of bone *in vitro*. *J Dent Res*, v. 60, p. 1586-9, 1981.

VAN DEN BOS, T.; STEINFORT, J.; BEERTSEN, W. Effect of bound phosphoproteins and other organic phosphates on alkaline phosphatase-induced mineralization of collagenous matrices in vitro. Bone Miner, v. 23, p. 81-93, 1993.

VIEGAS, V.N.; ABREU, M.E.; VIEZZER, C.; MACHADO, D.C.; FILHO, M.S.; SILVA, D.N.; PAGNONCELLI, R.M.; Effect of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. Photomed Laser Surg, v. 25, p. 467-73, 2007.

WALSH, L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Aust Dent J, v. 42, p. 247-54, 1997. Review.

WHYTE, M.P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. Endocr Rev, v. 15, p. 439-61, 1994.

WIESMANN, H.P.; MEYER, U.; PLATE, U.; HÖHLING, H.J. Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. Int Rev Cytol, v. 242, p. 121-56, 2005. Review.

YAMAGUCHI, M.; KASAI, K. Inflammation in periodontal tissues in response to mechanical forces. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), v. 53, p. 388-98, 2005. Review.

YE, L.; MACDOUGALL, M.; ZHANG, S.; XIE, Y.; ZHANG, J.; LI, Z. et al. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. J Biol Chem, v. 279, p. 19141-8, 2004.

YU, C.; ABBOTT, P.V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. Aust Dent J, v. 52, (1 Suppl):S4-16, 2007.

ZARKOVIĆ, N.; MANEV, H.; PERICIĆ, D.; SKALA, K.; JURIN, M.; PERSIN, A.; KUBOVIĆ, M. Effect of semiconductor GaAs laser irradiation on pain perception in mice. Lasers Surg Med, v. 9, p.63-6, 1989.

ZUNGU, I.L.; HAWKINS EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Mitochondrial Responses of Normal and Injured Human Skin Fibroblasts Following Low Level Laser Irradiation-An In Vitro Study. Photochem Photobiol, 2009. [Epub ahead of print].

## Apêndice

## 9 APÊNDICE

**Tabela 1.** Média aritmética  $\pm$  desvio padrão referentes à proliferação de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

Proliferação				
	Controle	0,2 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>	
3 dias	1,4 ± 0,28	0,8 ± 0,51	1,1 ± 0,40	
7 dias	12,4 ± 1,08	5,1 ± 1,01	11,0 ± 1,60	
10 dias	6,0 ± 1,70	0,9 ± 0,22	2,7 ± 0,99	
14 dias	0,4 ±0,09	$2,4 \pm 0,34$	0,6 ± 0,15	

**Tabela 2.** Média aritmética  $\pm$  desvio padrão referentes à porcentagem de células odontoblásticas viáveis irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

Viabilidade celular					
	Controle 0,2 J/cm <sup>2</sup> 1 J/cm <sup>2</sup>				
3 dias	97,7 ± 4,97	100,0 ± 0,00	93,8 ± 8,52		
7 dias	97,3 ± 1,39	98,1 ± 2,71	97,8 ± 1,46		
10 dias	98,2 ± 1,75	97,7 ± 4,97	98,6 ± 2,98		
14 dias	96 ± 8,94	97,3 ± 3,68	96,0 ± 8,94		

**Tabela 3.** Média aritmética ± desvio padrão referentes ao conteúdo de proteína total em cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

Conteúdo de proteína total						
	Controle 0,2 J/cm <sup>2</sup> 1 J/cm <sup>2</sup>					
3 dias	18,9 ± 2,01	21,9 ± 7,31	24,4 ± 1,84			
7 dias	10,0 ± 0,35	16,4 ± 2,00	9,0 ± 0,91			
10 dias	9,8 ± 1,54	150,9 ± 11,81	46,9 ± 4,03			
14 dias	124,6 ± 13,75	19,5 ± 1,96	72,9 ± 14,07			

**Tabela 4.** Média aritmética ± desvio padrão referentes à atividade de fosfatase alcalina de cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

A	Atividade de fosfatase alcalina			
	Controle	0,2 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>	
3 dias	0,19 ± 0,09	0,24 ±0,12	0,02 ± 0,03	
7 dias	0,36 ± 0,07	$0,42 \pm 0,03$	0,25 ± 0,09	
10 dias	0,27 ± 0,15	4,54 ± 0,70	2,33 ± 0,56	
14 dias	1,53 ± 0,63	$0,26 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,24$	

**Tabela 5.** Média aritmética  $\pm$  desvio padrão referentes à deposição de nódulos de calcificação em cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

Nódulos de calcificação			
	Controle	0,2 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>
14 dias	0,20 ± 0,021	0,53 ± 0,084	0,29 ± 0,036

**Tabela 6.** Média aritmética  $\pm$  desvio padrão referentes à concentração de VEGF, normalizada pelo número de células, no sobrenadante da cultura de células odontoblásticas irradiadas com 0,2 J/cm<sup>2</sup>, 1 J/cm<sup>2</sup> e não irradiadas (controle).

VEGF				
	LPS	Control	0,2 J/cm <sup>2</sup>	1 J/cm <sup>2</sup>
7 dias	1372,220617	1088,36369	1625,19633	657,5539483
10 dias	3924,48	1490,157913	6662,425263	1813,14383