

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

NELSON PEREIRA MARQUES

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE VERMELHO
E INFRAVERMELHO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS (SHED)**

Alfenas/MG

2017

NELSON PEREIRA MARQUES

**EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE VERMELHO
E INFRAVERMELHO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS (SHED)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas do Programa de Pós-graduação de Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Linha de pesquisa: Alterações patológicas do complexo Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Coorientadora: Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Marques, Nelson Pereira
M357e Efeitos da irradiação com laser de baixa intensidade vermelha e infravermelha na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos (SHED) / Nelson Pereira Marques. – Alfenas/MG, 2018.

51 f.: il. -

Orientador: João Adolfo Costa Hanemann.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018
Bibliografia.

1. Células-tronco. 2. Proliferação de Células. 3. Aderência Celular.
4. Terapia a Laser de Baixa Intensidade. I. Hanemann, João Adolfo Costa.
II. Título.

CDD-617.6



NELSON PEREIRA MARQUES

EFEITOS DA IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE VERMELHO E
INFRAVERMELHO NA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERI-
VADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS HUMANOS (SHED)

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 05/02/2018

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: João Adolfo Costa Hanemann

Profa. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Prof. Dr. Natalino Lourenço Neto
Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru
FOB-USP

Assinatura: Natalino Lourenço Neto

Dedico este trabalho com muito carinho aos meus pais, Nelson e Suzana, e a minha noiva Nádia. Vocês tornaram esta conquista possível!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, pela orientação durante esses dois anos e por contribuir intensamente para o meu crescimento profissional. Tantos obstáculos foram superados e objetivos alcançados. Você é um exemplo de dedicação na busca pelo bem-estar dos pacientes, pela disponibilidade em compartilhar tantos ensinamentos, e pelo incentivo na pós-graduação. Obrigado por cada oportunidade, pela confiança, apoio, paciência e disponibilidade. Muito obrigado!

À **Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai**, por ter me acolhido como coorientado com tanta generosidade. Agradeço por todo incentivo, pelas colaborações, por confiar no meu trabalho, e pela convivência tranquila. Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

As minhas irmãs, **Daniele** e **Nancy** pelo amor, amizade e confiança. Obrigado por torcerem por mim a todo momento. Tenho muito orgulho de vocês, meus exemplos de simplicidade e compreensão!

À minha noiva **Nádia**, obrigado por estar ao meu lado todos os dias. Desde o início você foi meu maior incentivo para chegar até aqui. Muito obrigado por ter me dado força nas horas mais difíceis e principalmente por me ensinar sempre. Aprendo com você diariamente e me inspiro em sua dedicação ao trabalho e determinação na busca pelos sonhos. Sinto muito orgulho de você! Conquistamos mais essa grande etapa juntos!!!

Aos meus familiares, **Sônia, Beto, Renata, Richard, Miro, Zuzu, Lulis, Biel, Guga, Enzo, Lucas e Luquinhas** e todos os outros, agradeço por todo amor, proteção, carinho, incentivo e torcida.

À família que me recebeu com tanto respeito e amor: **Neiva, Reinaldo, Luiza, Luiz Henrique, vó Nadyr...** obrigado por me proporcionarem tantas alegrias e me apoiarem nos momentos de trabalho.

Aos colegas da pós-graduação e pesquisa, **Clenivaldo, Paulinha, Rodrigo, Maria Clara, Ana Paula, Letícia, Mayara, Bianca, Joyce, Vanessa, Camilinha, Du, Leopoldo, Tati e Ugo**, agradeço pela companhia e pelas experiências compartilhadas ao longo desses anos.

À **Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**, pela disponibilidade e generosidade em permitir a realização de muitas pesquisas no laboratório de Bioquímica. E à equipe do Laboratório, **Gabriel e George**, pela contribuição e prontidão em ajudar.

À equipe das clínicas de Estomatologia e Odontopediatria, **Lu, D. Luzia, Paloma, Luzia, Patrícia e Mônica**, por toda colaboração e disponibilidade.

À **Profa. Dra. Marina Lara de Carli Dias**, pela amizade, experiências e conhecimento transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior**, pelo apoio, ensinamentos e por ser exemplo de generosidade, alegria e humildade.

Aos amigos da faculdade, **Carlos, Dib, Júlio, Gabriel, Guilherme, Dani e Vatrim** e demais amigos da turma, que mesmo distantes, sei o quanto torceram por mim. Àqueles que chegaram há pouco tempo, mas que já significam muito, **Camila e Ricardo Fonseca**, por se tornarem tão presentes. **Thássio, Bagé, Leandro, André, Paulo, Ju, Erik, Pedro, Norton, Ciro, Jeffinho, Marlos**, pelas boas lembranças divididas durante a residência em Bauru e São Paulo. Vocês são especiais!

Aos professores da UNIFAL-MG, **Prof. Dr. Edmer Silvestre Pereira Júnior, Prof. Dr. Carlos Eduardo Gomes do Couto Filho, Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira, Prof. Dr. Felipe Fornias Sperandio, Prof. Dr. Marcos José Marques, Profa. Dra. Ana Beatriz Moretti, Profa. Dra. Daniela Barroso** agradeço pela torcida, gentileza e lições transmitidas.

Aos Pós doutorandos **Dr. Fábio Colombo e Dra. Marta Miyazawa** por toda colaboração oferecida ao trabalho.

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

Aos **Funcionários da Biblioteca** e do **Serviço de Documentação**, pelo auxílio e atenção.

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

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

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Alfenas, **Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL.**

À comissão do programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas, representada pelo presidente **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann.**

À instituição de fomento **FAPEMIG (Bolsa e Auxílio à Pesquisa - Processo APQ-04004-16)** pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade (LBI) vermelho e infravermelho na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). As SHED foram mantidas em meio de cultura MEM α suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e penicilina e estreptomicina 1%. Entre a 10^a e 15^a passagem, as SHED foram irradiadas com laser vermelho (LV - 660 nm) ou laser infravermelho (LIV - 780 nm) programados com as seguintes dosimetrias: a (1,2 J/cm²), b (2,5 J/cm²), c (5,0 J/cm²), d (7,5 J/cm²), C+ (células não irradiadas e cultivadas em condições nutricionais regulares - 10% SFB), C- (células não irradiadas e cultivadas em déficit nutricional - 1% SFB). A viabilidade foi avaliada pelas técnicas MTT e Cristal Violeta (CV), e a proliferação celular através do ensaio SRB, 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Os valores obtidos foram analisados pelo método ANOVA a 2 critérios seguido do teste de Tukey com nível de significância de 5%. Nos períodos de 24 e 48 horas, o grupo LVc apresentou significativamente maiores taxas de viabilidade celular do que os grupos LVa, pelo ensaio MTT e LVb pelo ensaio CV. Às 48 horas, LVb também apresentou menor proliferação do que LVc. Comparado à C+, LVb apresentou menor viabilidade às 72 horas e menor proliferação às 24 e 48 horas. LVa, LIVa e LIVc foram menos viáveis às 24 horas, enquanto LVa, LIVb e LIVc revelaram menor capacidade proliferativa às 48 horas. Em relação aos diferentes tipos de laser, LVc favoreceu a viabilidade de SHED em comparação a LIVc às 24 e 48 horas. Os grupos LVa e LVb apresentaram menores taxas de viabilidade celular do que LIVa e LIVb às 48 horas. Neste período, a taxa de proliferação celular de LVb também foi menor do que LIVb. De acordo com os resultados obtidos, a dose 5 J/cm² aplicada com LV induziu taxas elevadas de viabilidade e proliferação celular, já a irradiação desta dose pelo LIV provocou efeitos negativos. As irradiações com 1,2 J/cm² e 2,5 J/cm² causaram danos à atividade metabólica e proliferação de SHED independentemente do tipo de laser, sendo que a redução das taxas de viabilidade e proliferação celular foi maior após aplicação destas doses com LV.

Palavras-chave: Células-tronco. Proliferação de células. Sobrevivência celular. Terapia a Laser. Terapia com luz de baixa intensidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of different energy density of visible and infrared Low-level laser (LLL) on the viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). SHED were maintained in MEMα culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin and streptomycin. Between the 10th and 15th passages, SHED were irradiated with red laser (I - 660 nm) or infrared laser (II - 780 nm) set with the following dosimetry: a (1.2 J/cm^2), b (2.5 J/cm^2), c (5.0 J/cm^2), d (7.5 J/cm^2), C+ (non-irradiated cells, grown under regular nutritional conditions - 10% FBS), C- (non-irradiated cells, grown under nutritional deficit - 1% FBS). Cell viability was assessed by MTT and Crystal Violet (CV) assays, and proliferation through SRB after 24, 48 and 48 h of irradiation. The values were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey test with statistical significance established at 5%. At 24 and 48 h period, group Ic showed significantly higher rates cell viability rates than Ia by MTT, and Ib group through CV assay. At 48 h, Ib also revealed lower proliferation than Ic. Comparing to the C+ group, Ib exhibited lower viability at 72 h, and proliferation at 24 and 48 h. Ia, IIa and IIc groups were less viable at 24 h, while Ia, IIb e IIc revealed lower proliferative capacity at 48 h. Regarding to the different types of laser, Ic enhanced SHED viability in comparison to IIc at 24 and 48 h. Ia e Ib groups showed lower cell viability rates than IIa e IIb at 48 h. In this period, cell proliferation rate of Ib was also lower than IIb. According to the results, 5 J/cm^2 applied by red LLL induced high rates of cell viability and proliferation, while the irradiation of this dose for infrared laser led to negative effects. LLL irradiation with 1.2 and 2.5 J/cm^2 caused damage to metabolic activity and proliferation of SHED regardless of the type of laser, and the reduction of viability and cell proliferation rates was higher after the application of these doses with red laser.

Key words: Stem Cells. Cell Proliferation. Cell Survival. Laser Therapy. Low-Level Light Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A – Dispositivo escuro posicionado para irradiação da placa; B – Posicionamento da ponta ativa do dispositivo do Laser no fundo da placa para irradiação das células.....	27
Figura 2 -	Dispositivo escuro com orifícios localizados na posição dos poços experimentais para armazenamento da placa durante a irradiação.....	27
Gráfico 1 -	Avaliação da viabilidade celular após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	32
Gráfico 2 -	Avaliação da viabilidade celular após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72.....	33
Gráfico 3 -	Avaliação da proliferação celular após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Grupos irradiados com laser vermelho (LV, comprimento de onda: 660 nm) e laser infravermelho (LIV, comprimento de onda: 780 nm) programados com diferentes densidades de energia e grupos controles.....	26
-------------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
CV	Cristal violeta/ Crystal violet
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DFSC	Células-tronco de folículo dentário
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPSC	Células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes
ESC	Células-tronco embrionárias
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GaAlAs	Arseneto de gálio e alumínio
h	Hora(s)
IDPSC	Células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes imaturos
InGaAlP	Índio-gálio-alumínio-fósforo
J	Joules
LBI	Laser de baixa intensidade
LIV	Laser infravermelho
LLL	Low-level laser
LLLT	Low-level laser therapy
LV	Laser vermelho
Ki67	Antígeno Ki67
MEMα	Minimum essential medium Eagle alpha modification
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mol.L	Concentração molar (molaridade)
MSC	Células-tronco mesenquimais
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
mW	Miliwatts
nm	Nanômetro
nº	Número
°C	Graus Celsius
P	Nível de significância
PBS	Phosphate buffered saline / Tampão fosfato-salino
PDLSC	Células-tronco de ligamento periodontal dentário
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
s	Segundo(s)
SCAP	Células-tronco da papila apical dentária
SHED	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1	CÉLULAS-TRONCO.....	15
1.2	LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	16
1.3	IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PULPARES.....	19
2	PROPOSIÇÃO.....	23
2.1	HIPÓTESES.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS.....	24
3.1.1	Obtenção das células.....	24
3.1.2	Subcultivo celular.....	24
3.2	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS.....	25
3.3	IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	26
3.4	ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	28
3.4.1	Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.....	28
3.4.2	Ensaio de viabilidade celular pelo método Cristal Violeta (CV)...	29
3.4.3	Ensaio de proliferação celular pelo método SRB.....	29
3.5	ANALISE ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS E VARIÁVEIS.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.	31
4.1.1	Ensaio MTT.....	31
4.1.2	Ensaio Cristal Violeta (CV).....	32
4.1.3	Ensaio SRB.....	33
5	DISCUSSÃO.....	35
6	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXOS.....	50

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A Odontologia tem buscado reestabelecer função e estética de diversas estruturas danificadas do sistema estomatognático através de abordagens regenerativas, visto que os materiais odontológicos apresentam vida útil limitada e, muitas vezes, necessitam de substituição (EDWARDS; MASON, 2006). Em casos de lesões dentárias e ósseas extensas, a reação inflamatória pode sobrepor a capacidade de reparo, e o tratamento tornar-se um desafio clínico com prognóstico duvidoso (AN, 2000).

Assim, em busca de progresso nas técnicas odontológicas convencionais, estudos no campo da engenharia tecidual têm sido realizados com o intuito de encontrar alternativas que proporcionem reparação e, talvez, substituição até mesmo por completo de estruturas teciduais perdidas, mantendo sua vitalidade. Este avanço baseia-se em princípios de que células indiferenciadas respondem a sinais específicos que induzem a proliferação, migração e diferenciação em linhagens celulares especializadas (CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2011; KERKIS; CAPLAN; 2012; MELERO-MARTIN et al., 2007; MIURA et al., 2003; NÖR, 2006; SAKAI et al., 2010; SAKAI et al., 2011; TELLES et al., 2011; WU et al., 2004).

1.1 CÉLULAS-TRONCO

As células indiferenciadas são geralmente células-tronco que apresentam graus variados de potência e plasticidade, bem como capacidade de autorrenovação e diferenciação multipotencial em diversas linhagens celulares. Existem duas categorias básicas de células-tronco classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação: células-tronco embrionárias (ESC) e células-tronco mesenquimais (MSC). Enquanto o uso de ESC é limitado por questões éticas, MSC constituem a linhagem celular mais favorável para engenharia tecidual. Células-tronco pós-natais têm sido isoladas de diversos tecidos incluindo o cérebro, pele, folículo capilar, músculo esquelético, tecido adiposo, ósseo e dentário (CHEN et al 2016; GINANI et al., 2017b; MVULA et al., 2008; VOLPONI et al., 2010). Quando isoladas a partir do

tecido dentário, células-tronco mesenquimais pós-natais são caracterizadas como: células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC), células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) e de dentes permanentes imaturos (IDPSC); células-tronco de ligamento periodontal dentário (PDLSC); células-tronco da papila apical dentária (SCAP); e células-tronco de folículo dentário (DFSC) (GRONTHOS et al., 2000; DEMARCO et al., 2011; KERKIS; CAPLAN, 2012; MIURA et al., 2003). Evidências recentes sugerem a possível utilidade do uso de células-tronco pulpaes para o reparo ósseo, em cartilagem, células neurais, adipócitos e até mesmo no próprio tecido pulpar (CHEN et al 2014; FAREA et al., 2014; HARA et al., 2011; KERKIS; CAPLAN, 2012; KOYAMA et al., 2009; SEO et al., 2008; TUNER; JENKINS, 2016).

A identificação de células adequadas e a compreensão da sinalização morfogenética dos fatores envolvidos são de extrema importância no processo de regeneração tecidual (CORDEIRO et al., 2008; MIURA et al., 2003; MORSCZECK et al., 2010; SEO et al., 2008; TOMASZEWSKA et al., 2013; WANG et al., 2012; YAMAZA et al., 2010). A comparação entre SHED e DPSC revela maior índice de proliferação celular, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e integridade celular das SHED (ARORA; ARORA; MUNSHI, 2009; CASAGRANDE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2008; DALTOE et al. 2014; DEMARCO et al., 2011; LEE et al., 2011; MIURA et al., 2003; SAKAI et al., 2010; TELLES et al., 2011). Além disso, as SHED apresentam vantagem de serem obtidas de maneira mais simples e conveniente (ARORA; ARORA; MUNSHI, 2009; CORDEIRO et al., 2008).

1.2 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Somado ao progresso científico no campo celular e molecular, que permite avaliar biologicamente as diferentes terapias regenerativas, o avanço tecnológico tem modificado e aprimorado os serviços oferecidos na odontologia (MARQUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2013). Atualmente, uma das alternativas terapêuticas aos tratamentos convencionais é o uso do laser de baixa intensidade (LBI), devido à ação adjuvante desta terapia na estimulação da epitelização, vascularização e síntese de colágeno, como consequência do aumento do metabolismo celular

(BASSO et al., 2012). A luz laser é uma radiação eletromagnética não ionizante com características específicas, tais como monocromaticidade, coerência e unidirecionalidade, as quais lhe conferem propriedades terapêuticas importantes (MARTENS, 2011; RAMAZANI et al., 2012). Os lasers são classificados de acordo com a interação entre a luz e o tecido alvo, sendo que o LBI oferece baixa densidade de energia para que a célula alvo a utilize de maneira a estimular membranas ou organelas, induzindo uma biomodulação, ou seja, estado em que a célula procura restabelecer a normalidade da região afetada (OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009).

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

As reações primárias são induzidas pela luz e indicam o mecanismo do laser sobre as células, sendo que várias teorias têm sido propostas. Olso, Schimmerling, Tobias (1981) sugerem que a absorção da luz por enzimas mitocondriais promove aquecimento localizado com aumento de vibração molecular. Breitbart et al. (1996) e Smith (1991) sugerem que o laser promove ativação dos canais de cálcio, elevando os níveis de cálcio intracelular e induzindo a proliferação celular. Outros autores propuseram que o laser estimula a produção de oxigênio singleto por excitação de porfirinas endógenas (GROSSMAN et al., 1998; PARSONS; PARSONS, 2004; POLO et al., 1999). Segundo Karu (1989), a absorção de fótons por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial afetam a transferência de elétrons, resultando em efeitos estimulatórios ou inibitórios no metabolismo celular. Flavinas e citocromos são cromóforos, ou seja, elementos capazes de absorver fótons e transformar a energia luminosa em energia fotoquímica. Esta reação ocorre a nível atômico, uma vez que os elétrons constituintes dos átomos dos cromóforos captam a energia do laser, deslocando-se para uma órbita mais energética. Após um período, os elétrons retornam naturalmente ao estado fundamental, liberando a energia absorvida. Assim, a energia liberada é utilizada nas atividades celulares. Além disso, a irradiação laser pode estimular o crescimento celular através da regulação de genes funcionais que regulam as atividades celulares (FARIVAR et al., 2014; PELOW et al., 2011). Reações secundárias são

aquelas que ocorrem na ausência de luz e sinalizam as consequências da absorção do laser pelas células, como aumento do metabolismo celular, aceleração da proliferação, migração e remodelação celular, aumento da síntese de proteínas, liberação de fatores de crescimento, aumento da síntese e proliferação de colágeno, estímulo da formação de RNA e DNA, formação de capilares, ativação de linfócitos e aumento da atividade leucocitária (FARIVAR et al., 2014; WAGNER et al., 2013).

Dependendo da dosagem aplicada, o laser pode estimular ou inibir as atividades celulares (KARU, 1989; OSHIRO, CALDERHEAD 1991). A bioestimulação conseguida pelo LBI é, portanto, dependente dos parâmetros de irradiação do laser utilizados como: comprimento de onda, potência, energia, densidade de energia (fluência), densidade de potência (irradiância), tempo de aplicação e área de saída do feixe de laser (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2011; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BASSO et al., 2012; KREISLER et al., 2003; OLIVI; GENOVESE; CAPRIOGLIO, 2009; PEREIRA et al., 2002). O comprimento de onda entre 630 a 680 nm caracteriza lasers vermelhos, que são visíveis ao olho humano. Os lasers infravermelhos, não visíveis ao olho humano, são constituídos por comprimento de onda na faixa de 750-910 nm (PANDESHWAR et al., 2012). O meio ativo dos LBI podem ser sólidos semi-condutores (diodos de Arseneto de gálio e alumínio, Arseneto de Gálio, Índio-gálio-alumínio-fósforo) ou gasosos (Hélio-Neônio). Os lasers de hélio-neônio eram mais utilizados inicialmente, mas foram sendo substituídos pelos lasers diodos semi-condutores (λ : 635 nm a 830nm) (CAPRIOGLIO; OLIVI; GENOVESE, 2011). A dose de energia ideal ainda gera muitas dúvidas na literatura (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; ALGHAMDI et al., 2012; GINANI et al., 2015; POURZARANDIAN et al., 2005).

Diferentes LBI, com diferentes comprimentos de onda e dosimetrias, têm sido utilizados para a reparação de tecidos comprometidos. Uma revisão sistemática recente afirma que é necessária uma padronização dos parâmetros ideais para o uso do LBI, melhorando assim os efeitos da aplicação clínica desta tecnologia (GINANI et al., 2015). Além disso, linhagens celulares variadas podem apresentar respostas diferentes após a irradiação com LBI, gerando resultados conflitantes na literatura (PEPLOW et al., 2010). Por esta razão, é fundamental que seja investigada a correta combinação dos parâmetros de irradiação para diferentes necessidades e tipos celulares, a fim de se alcançar os efeitos desejados (FERREIRA et al., 2009).

1.3 IRRADIÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PULPARES

Eduardo et al. (2008) revelaram os efeitos do LBI na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas de polpa dentária humana após duas irradiações com laser vermelho (λ : 660 nm) e densidade de energia 3 J/cm², aplicada com potência 40 mW associada ao tempo de 3 segundos ou 20 mW por 6 segundos. A atividade mitocondrial foi avaliada após 20, 24, 48, e 72 horas da irradiação pelo ensaio MTT. As células irradiadas apresentaram maior índice de crescimento do que o grupo controle (não irradiado). Células irradiadas com 20 mW de potência mostraram proliferação significativamente maior em comparação aos demais grupos na avaliação de 72 horas. Nas condições do referido estudo foi possível concluir que a terapia laser estimula a atividade mitocondrial de células-tronco derivadas de polpa dentária humana.

A influência da irradiação LED infravermelho (850 nm) com 2 e 4 J/cm² na viabilidade, proliferação celular e formação de tecido mineralizado por SHED, bem como, na expressão e síntese de proteínas da matriz dentinária foi investigada por Turrioni et al. (2014, 2015). Os resultados mostraram que as dosimetrias aplicadas proporcionaram aumento na viabilidade, proliferação celular, expressão e síntese de proteínas relacionadas com a formação de tecido mineralizado, e induziram a formação de núcleos mineralizados, sem comprometimento da morfologia celular. Estes efeitos foram evidenciados principalmente quando as células receberam 4 J/cm². O mesmo grupo de pesquisa ainda revelou que os parâmetros aplicados foram capazes de bioestimular SHED através de uma espessura de 0,2 mm de dentina (TURRIONI et al., 2016).

Diniz, Matos e Marques (2015) investigaram os efeitos citotóxicos de adesivos dentinários associados a terapia LBI em SHED, fibroblastos e células osteoblásticas. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT 24 horas após a irradiação com laser infravermelho (GaAIs, 780 nm) a 10 J/cm² por 10 segundos. As substâncias avaliadas foram menos citotóxicas para as células mesenquimais. Além disso, o LBI aumentou a taxa de viabilidade celular de SHED, o mesmo não ocorrendo para os demais tipos celulares avaliados.

Zaccara et al. (2015) avaliaram os efeitos da irradiação LBI sobre a proliferação e viabilidade de DPSC. As células receberam duas irradiações com

intervalo de 24 horas com laser vermelho (660 nm) programado a 0,5 e 1,0 J/cm². Células que não receberam irradiação foram consideradas controle. A viabilidade celular foi avaliada pelo MTT 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira aplicação do laser. As fases do ciclo celular e a apoptose foram analisadas por citometria de fluxo 24 horas após cada irradiação. As células irradiadas mostraram significativamente maior viabilidade do que as células não irradiadas no período de 72 horas, e a densidade de energia 1,0 J/cm² estimulou a atividade mitocondrial celular em comparação ao grupo controle na avaliação de 96 horas. A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi consistente com células em proliferação em todos os grupos avaliados. Os dados obtidos sugerem que a irradiação do LBI com densidade de energia 1,0 J/cm² pode contribuir para a viabilidade e proliferação celular de DPSC.

Fernandes et al. (2016) investigaram os efeitos da irradiação LBI (λ : 660 nm) com densidades de energia entre 1,2-6,2 J/cm² na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). A viabilidade celular foi avaliada através dos ensaios MTT e Cristal violeta 6 e 24 horas após as irradiações, enquanto que, o ensaio SRB (Sulforodamina B) evidenciou a proliferação celular nos períodos de 24, 48 e 72 horas. SHED irradiadas com as densidades de energia 1,2 e 5,0 J/cm² apresentaram maior viabilidade em comparação ao grupo controle 24 horas após as irradiações, pelo ensaio MTT. No ensaio Cristal violeta, células irradiadas com tais densidades de energia revelaram menor viabilidade neste período. O ensaio SRB mostrou maior proliferação em células que receberam 1,2 e 2,5 J/cm² até 48 horas após as irradiações.

Ginani et al. (2017a) avaliaram os efeitos da irradiação LBI com laser vermelho (InGaAlP, 660 nm) na viabilidade e proliferação de SHED. As células receberam duas irradiações com intervalo de 48 horas nas densidades de energia 0,5 ou 1 J/cm². A viabilidade e proliferação celular foram analisadas pelos ensaios MTT e o método de exclusão "Azul de Trypan" imediatamente, 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação do LBI. O ciclo celular e a expressão de Ki67 (proteína nuclear ausente em células em repouso – fase G0) foram analisados por citometria de fluxo. Os eventos relacionados à apoptose foram avaliados pela expressão de anexina V-FITC/PI e alterações morfológicas nucleares por coloração com DAPI. Os resultados mostraram que a densidade de energia de 1 J/cm² promoveu aumento na proliferação celular às 48 e 72 h, em comparação com os demais grupos. A análise do ciclo celular revelou uma

predominância de células nas fases de síntese (S) e segunda fase da intérfase (G2), e na fase mitótica (M) no grupos irradiados. A viabilidade celular não foi afetada pelas densidades de energia testadas, visto que houve fraca marcação para anexina V-FITC/PI e nenhuma mudança nuclear foi detectada. Os autores concluíram que a densidade de energia 1 J/cm² estimulou a proliferação de SHED e a manutenção da viabilidade celular.

Vale et al. (2017) investigaram os efeitos da fotobiomodulação com LED vermelho (630 nm) programado com diferentes densidade de energia na viabilidade e senescência de SHED. As células receberam 2, 4, 8, 16 e 32 J/cm². Células não irradiadas foram consideradas como controle. O ciclo celular e potencial de membrana mitocondrial foram avaliados através da citometria de fluxo 24 horas após a irradiação. Em comparação com o grupo controle, a irradiação com 16 J/cm² aumentou a porcentagem de células na fase S, indicando maior resposta proliferativa. SHED irradiadas com 4 e 32 J/cm² apresentaram maior taxa de fragmentação de DNA, indicando indução de apoptose. Não foram encontradas diferenças significativas em relação à porcentagem de células com mitocôndrias viáveis, bem como, na porcentagem de células na senescência entre culturas irradiadas e controle. A irradiação com LED vermelho a 16 J/cm² foi capaz de induzir uma resposta proliferativa em SHED, sem afetar a função mitocondrial ou a senescência.

Moura-Neto et al. (2016) avaliaram a influência do LBI (InGaAlP, 660 nm) na viabilidade celular de SHED cultivadas sob estresse nutricional. SHED mantidas em condições nutricionais regulares (15% SFB) por 12 horas, receberam déficit nutricional (5% SFB) previamente às irradiações. Os grupos experimentais foram irradiados duas vezes com 3 e 5 J/cm² em um intervalo de 6 horas. Células não irradiadas, mantidas em condições nutricionais regulares e em déficit nutricional foram consideradas, respectivamente, controles positivo (C+) e negativo (C-). Imediatamente, 24, 48 e 72 horas após a segunda irradiação LBI, a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTT. Os grupos irradiados apresentaram maiores taxas de viabilidade que C- em todos os períodos avaliados. SHED irradiadas com 5 J/cm² apresentaram viabilidade semelhante a C+ às 48 e 72 horas de avaliação, indicando que esta densidade de energia pode induzir o crescimento celular em situações déficit nutricional, diferentemente da densidade de energia 3 J/cm².

Souza et al. (no prelo) analisaram os efeitos de diferentes dosimetrias do LBI vermelho (InGaAIP, 660 nm) na viabilidade de SHED sob déficit nutricional (1% SFB) ou condições nutricionais regulares (10% SFB). SHED foram irradiadas com densidades de energia entre 1,2 J/cm² - 6,2 J/cm². Células não irradiadas foram consideradas como grupo controle. As células foram plaqueadas em MEM α suplementado com 10% SFB e, previamente à irradiação, todos os grupos receberam meio de cultura suplementado com 1% SFB durante 1 hora. Após a irradiação, um grupo recebeu meio de cultura MEM α 10% SFB (nutrição regular), e o outro 1% SFB (déficit nutricional). A viabilidade celular foi determinada pelos ensaios MTT e Cristal violeta (CV) 6 e 24 h após a irradiação. No ensaio MTT, SHED cultivadas sob déficit nutricional (1% SFB) revelaram maior viabilidade quando irradiadas 5 J/cm² em relação aos demais grupos, 6 horas após a irradiação. Após 24 horas, a dosimetria 1,2 J/cm² proporcionou menor viabilidade. Nas SHED mantidas em condições nutricionais regulares (10% SFB), a viabilidade manteve-se significativamente menor entre 1,2 J/cm² e os demais grupos em ambos os períodos, exceto 3,7 J/cm² às 24 horas. O ensaio CV revelou que SHED cultivadas sob déficit nutricional apresentaram menor viabilidade em 1,2 e 5 J/cm² do que no grupos controle, e nos irradiados com 3,7 e 6,2 J/cm², 24 horas após a irradiação. Todos os grupos revelaram significativamente maior viabilidade nas SHED mantidas sob déficit nutricional do que em condições nutricionais regulares, exceto nos grupos: 6,2 J/cm² às 6h e 24h, assim como 3,7 J/cm² e C às 24h do ensaio MTT, e 1,2 J/cm² às 24h do ensaio CV. Os autores concluíram que o LBI estimulou a viabilidade das SHED mantidas na condição de déficit nutricional, e a dosimetria aplicada em 1,2 J/cm² foi a menos favorável para a biomodulação com o LBI.

A bioestimulação induzida pelo LBI regula diferentes fatores relacionados ao complexo processo de reparo, como hemostasia, inflamação, migração, diferenciação, proliferação e remodelação celular (GÓRALCZYK et al., 2015; TOMASZEWSKA et al., 2013; YANG et al., 2013). Considerando a escassez de trabalhos na literatura acerca da influência do LBI sobre SHED, este trabalho teve como intuito elucidar parâmetros de irradiação adequados e comparar os efeitos de diferentes comprimentos de onda na estimulação do metabolismo celular e síntese de proteínas desta linhagem celular. A compreensão destes processos é fundamental para que protocolos de regeneração biológica de estruturas do complexo maxilo-facial possam futuramente ser estabelecidos.

2 PROPOSIÇÃO

Comparar os efeitos de diferentes densidade de energia aplicadas com Laser de Baixa Intensidade vermelho e infravermelho na viabilidade e proliferação de células tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos (SHED).

2.1 HIPÓTESES

- H0 - A hipótese nula é que não há diferença na viabilidade e proliferação de SHED após irradiação com diferentes dosimetrias dos LBI vermelho e infravermelho.
- H1 - A hipótese alternativa é que há diferença na viabilidade e proliferação de SHED após irradiação com diferentes dosimetrias dos LBI vermelho e infravermelho.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS

3.1.1 Obtenção das células

As células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), utilizadas nessa pesquisa foram fornecidas congeladas pelo Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti (Instituto de Ciência e Tecnologia, Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos - UNESP, SP, Brasil) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição (protocolo número 46420) (ANEXO A). Para a realização dos experimentos, as SHED foram descongeladas e mantidas em meio de cultura MEM α (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen) na incubadora a 37°C e 5% de CO₂ para subcultivo (expansão celular) e utilização entre a 10^a e a 15^a passagem. Os protocolos utilizados para a cultura de células foram seguidos conforme estabelecido por Sakai et al. (2010).

3.1.2 Subcultivo celular

No processo de expansão celular, a cada 2-3 dias foi realizada a troca do meio de cultura. Para tanto, a solução MEM α precedente foi completamente retirada do frasco, observando todos os cuidados inerentes à ausência de contaminação e, em seguida, foi adicionado solução tampão PBS (Phosphate buffered saline, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EU) às garrafas com o objetivo de remover impurezas das SHED na 1^a troca do meio de cultura, após a adesão das células descongeladas

na garrafa (Frasco para cultura celular com filtro, Corning, Ribeirão Preto, SP, BR). Esse tampão foi removido da mesma forma da garrafa e 10 mL do meio MEM α acrescentado. Após esse processo, as garrafas foram levadas para a incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Nas trocas subsequentes, foi realizada apenas a substituição da solução MEM α 10% SFB. As SHED foram mantidas em garrafa única até atingirem 80% de confluência. Após expandirem até esta proporção, as células foram divididas na razão de 1:3, sendo que duas porções foram distribuídas em dois frascos de cultura e a última congelada.

Após as SHED atingirem a subconfluência, o meio de cultura foi removido e, em seguida, adicionado 10 mL de PBS com o objetivo de inativar o SFB remanescente do meio e permitir a ação da tripsina no descolamento das células. Com o PBS adicionado, o frasco foi agitado suavemente em um movimento de “∞”, até que a solução foi removida e 3mL de tripsina – EDTA 0,25% adicionados à garrafa. Após isto, a cultura com a tripsina foi levada à incubadora 37°C e 5% de CO₂ por 3 a 5 minutos para permitir o descolamento celular. Terminado este intervalo, 6mL do meio de cultura foram adicionados à garrafa e a solução final coletada para um tubo falcon, que foi levado à centrífuga 800 rpm, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em novo meio de cultura, e então, adicionadas em novas garrafas para serem armazenadas na incubadora 37°C e 5% de CO₂. Este processo foi repetido algumas vezes a fim de que houvesse maior quantidade de células para a realização dos experimentos.

3.2 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS

Os grupos foram divididos de acordo com a irradiação Laser de Baixa Intensidade em relação ao comprimento de onda e à variação da densidade de energia, conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 - Grupos irradiados com laser vermelho (LV, comprimento de onda: 660 nm) e laser infravermelho (LIV, comprimento de onda: 780 nm) programados com diferentes densidades de energia e grupos controles.

Grupos	Subgrupos	Densidade de energia (J/cm ²)	Potência (mW)	Tempo (s)	Energia (J)
Laser vermelho (LV)	a	1,2	10	05	0,05
	b	2,5	10	10	0,10
	c	5,0	10	20	0,20
	d	7,5	10	30	0,30
Laser infravermelho (IV)	a	1,2	10	05	0,05
	b	2,5	10	10	0,10
	c	5,0	10	20	0,20
	d	7,5	10	30	0,30
Sem irradiação	C+	Controle positivo – SHED mantidas em 10% SFB	---	---	---
	C-	Controle negativo – SHED mantidas em 1% SFB	---	---	---

3.3 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

Para a realização dos experimentos, as células foram distribuídas em placas de poliestireno de 96 poços (Corning, Ribeirão Preto, SP, BR) com densidade de 1×10^4 células/poço e mantidas em MEM α 10% SFB por 24h na incubadora a 37°C com 5% de CO₂ para adesão. Depois deste período, todos os poços receberam meio suplementado com 1% SFB por 24 horas para que as células estivessem em estado de quiescência no momento da irradiação (DAMANTE et al. 2009). Em seguida, previamente à irradiação, o meio de cultura de todos os grupos, exceto dos controles negativos, foram trocados para MEM α suplementado com 10% SFB. O controle negativo recebeu novo meio de cultura MEM α suplementado com 1% SFB. Nos experimentos realizados, as placas de cultura foram posicionadas de modo que a ponta ativa do laser ficasse totalmente em contato com o fundo do poço a ser irradiado, sendo aplicado diretamente sobre as células sem transpor o meio de cultura, seguindo a metodologia adotada por estudos prévios (FIGURA 1)

(AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; MARQUES, 2016; MARQUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2002; VOLPATO et al., 2011). Assim, a distância entre o feixe de laser e a monocamada celular foi mantida constante a 1 mm (DAMANTE et al., 2009; EDUARDO et al., 2008; VOLPATO et al., 2011).

Para evitar a influência de outras fontes de luz além do laser, as placas de cultura foram envolvidas por uma máscara confeccionada em cartolina negra com orifícios localizados na posição dos poços dos grupos experimentais. Cada orifício foi vedado individualmente por uma portinhola também em cartolina negra, a qual permitiu que apenas o orifício do poço que estava sendo irradiado permanecesse aberto enquanto todos os outros eram mantidos ao abrigo da luz. Os orifícios da máscara possuíam o diâmetro compatível com a área da ponta ativa do dispositivo do laser (0,04 cm²) (FIGURA 2) (MARQUES, 2016; VOLPATO, 2009).

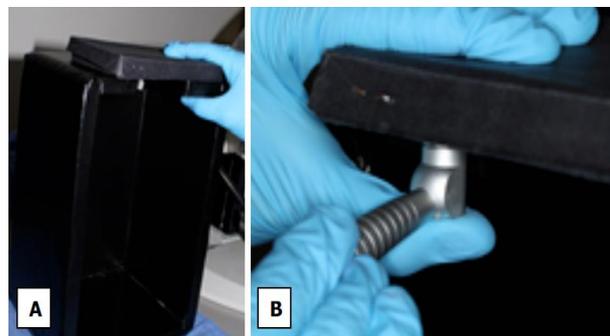


Figura 1 – A – Dispositivo escuro posicionado para irradiação da placa;
B – Posicionamento da ponta ativa do dispositivo do Laser no fundo da placa para irradiação das células.

Fonte: MARQUES (2016)



Figura 2 - Dispositivo escuro com orifícios localizados na posição dos poços experimentais para armazenamento da placa durante a irradiação.

Fonte: MARQUES (2016)

Em todos os grupos, a irradiação foi realizada com o Laser de Baixa Potência (Twin Flex Evolution MMOptics® – São Carlos, Brasil) no comprimento de onda de 660 nm (vermelho – meio ativo: Índio gálio alumínio fósforo - *InGaAlP*) ou 780 nm (infravermelho – meio ativo: Arseneto de gálio e alumínio - *GaAlAs*), variando a densidade de energia, de acordo com o grupo experimental. As células dos grupos controles permaneceram fora da incubadora o mesmo período que os grupos experimentais, exceto que para estes poços o dispositivo laser foi mantido desligado durante o experimento. Sendo assim todas as amostras foram submetidas às mesmas condições ambientais (DAMANTE et al., 2009; PACHECO et al., 2013; VOLPATO et al. 2011). Os grupos foram plaqueados em triplicata e os experimentos repetidos três vezes (DAMANTE et al., 2009; FRESHNEY, 2000; VOLPATO et al., 2011). No intuito de determinar a viabilidade e proliferação celular, as SHED foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24, 48 horas ou 72 horas após a irradiação com LBI em diferentes parâmetros.

3.4 ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.4.1. Ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT

Para o ensaio MTT, ao final da incubação nos respectivos períodos experimentais, os sobrenadantes foram descartados, e foi adicionada uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio), responsável por corar a clivagem da atividade mitocondrial, ao reduzir este sal em cristais de formazan (cor púrpura). A solução de MTT foi dissolvida em MEM α na proporção de 0,5 mg/mL, filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 μ m. A solução foi adicionada em cada poço (110 μ L/poço) onde permaneceram incubados por 4h a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. Em seguida, dimetil sulfóxido (DMSO - Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA) foi adicionado aos poços (200 μ L/poço), e mantido por 30 minutos em temperatura ambiente para dissolver os cristais azuis que coraram as mitocôndrias. A leitura da absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200

RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) com comprimento de onda ajustado em 570 nm (OLIVEIRA et al., 2016).

3.4.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método Cristal Violeta (CV)

No ensaio Cristal Violeta, nos determinados períodos, os sobrenadantes foram descartados, lavados com solução PBS 1x, e foi utilizada uma solução de Cristal Violeta, responsável por corar o ácido desoxirribonucléico (DNA) celular (KUENG SILBER; EPPENBERGER, 1989). Para tanto, após o descarte dos sobrenadantes e lavagem com PBS 1x, adicionou-se aos poços uma solução de metanol 100% (Vetec – Sigma- Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 10 minutos. Passado o tempo proposto, o metanol foi removido completamente e a solução de Cristal Violeta, adicionada aos poços por 3 minutos. Após a remoção da solução de Cristal Violeta, os poços foram novamente lavados com solução PBS 1x por 2 vezes. Então, após lavagem, adicionou-se citrato de sódio 0,05 mol.L aos poços por 10 minutos para leitura da absorbância no espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) com comprimento de onda ajustado para 540 nm (OLIVEIRA et al., 2016).

3.4.3 Ensaio de proliferação celular pelo método SRB

No ensaio de Sulforrodamina B (SRB), a solução SRB cora proteínas das células fixadas. Então, em cada período experimental, as SHED foram fixadas por meio da adição de ácido tricloroacético gelado (concentração final de 10%) e incubadas por 1 hora a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas em água corrente por 5-6 vezes e mantidas ao ar livre para secar. A proteína celular foi corada por meio da adição de SRB a 4% em ácido acético a 1% e incubada em temperatura ambiente durante 30 minutos. O excesso de SRB foi removido pela lavagem dos poços com ácido acético a 1%, e as placas foram deixadas para secar. Em seguida, o SRB remanescente foi solubilizado com Tris Base 10 mM não tamponado por 1 hora

em temperatura ambiente e a absorbância determinada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom LTD, Cambridge, Reino Unido) em comprimento de onda de 565 nm (KEEPERS et al., 1991; SAKAI et al., 2010).

3.5 ANALISE ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS E VARIÁVEIS

Os resultados foram analisados através do programa “R Statistical Software”. Os valores obtidos em triplicata foram analisados pelo método ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Tukey. Para que as diferenças fossem consideradas significativas, adotou-se um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A viabilidade e proliferação celular dos grupos foram comparadas em relação à irradiação com diferentes densidades de energia do laser vermelho e do laser infravermelho, bem como entre a irradiação com a mesma densidade de energia nos diferentes tipos de laser.

Conforme a determinação dos grupos, as expressões “LV” e “LIV” referem-se ao laser vermelho e infravermelho, respectivamente. As letras minúsculas (a), (b), (c), (d), correspondem às seguintes densidades de energia: 1,2; 2,5; 5 e 7,5 J/cm². Os grupos controles são representado por C+ (positivo) e C- (negativo).

4.1.1 Ensaio MTT

No período de 24 horas, os grupos LVa, LIVa, LIVc e C- foram menos viáveis do que o C+. Os grupos LVa e C- ainda mostraram menor viabilidade celular do que os grupo LVc e LVd. Na comparação entre a mesma densidade de energia nos diferentes tipos de lasers, notou-se que LIVc apresentou menor viabilidade do que LVc.

Após 48 horas de irradiação, todos os grupos mostraram valores de absorbância significativamente maiores que o controle negativo, exceto-os grupos LVa e LIVd. Além disso, a viabilidade celular em LVa foi significativamente menor do que nos grupos LVb, LVc, LVd e C+. E LIVd apresentou menor viabilidade do que LIVb e LIVc. Comparando os diferentes tipos de laser, LVa e LVb foram menos viáveis do que os grupos de densidades de energia correspondentes aplicadas com LIV.

Às 72 horas, C- apresentou menor viabilidade do que C+ e todos os grupos irradiados, exceto LVb. Este grupo irradiado também foi menos viável do que C+. Os grupos LVa e LVb se mantiveram menos viáveis do que os respectivos LIVa e LIVb (GRÁFICO 1).

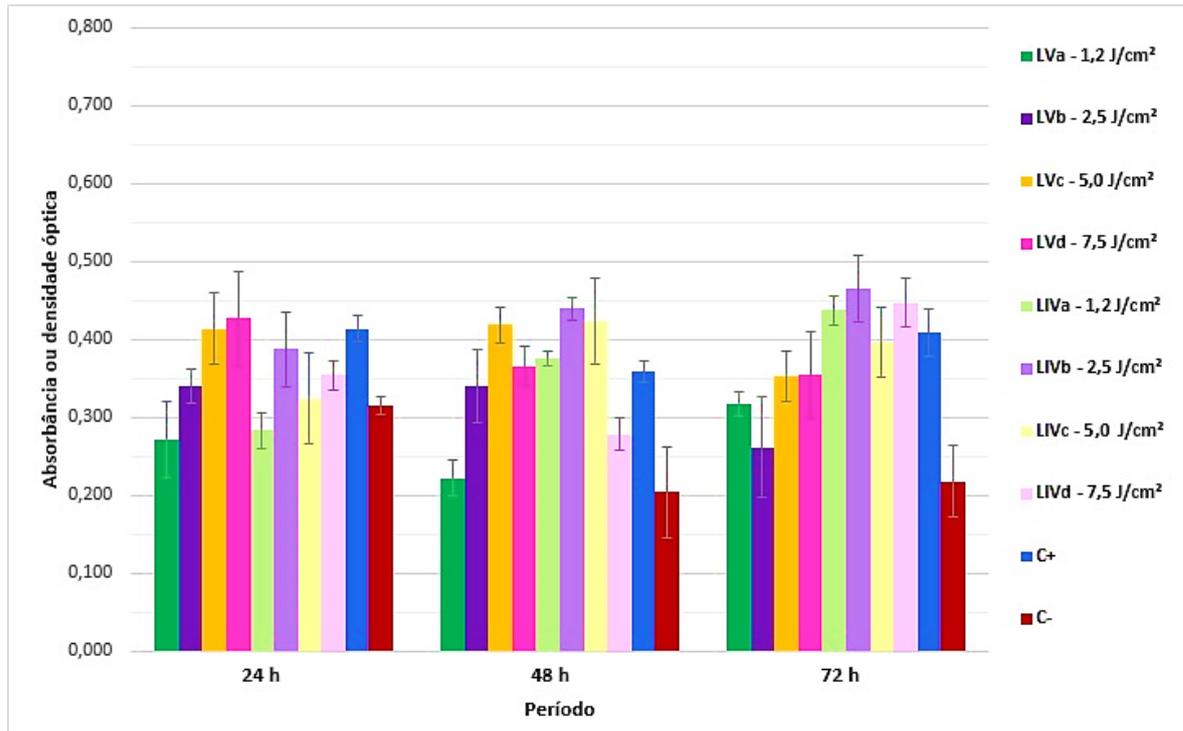


Gráfico 1 - Avaliação da viabilidade celular após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas ($P < 0,05$).

4.1.2 Ensaio Cristal Violeta (CV)

Para o período de 24 horas, observou-se que C- apresentou menor viabilidade do que C+, LIVb, LVd, e LVc. E LVb também foi menos viável do que LVc. Os grupos LIVc e LIVd apresentaram menor viabilidade do que os correspondentes grupos irradiados com LV.

Às 48 horas, os grupos controles e todos os grupos irradiados LV foram menos viáveis do que LVc. Para o LIV não houve diferença na viabilidade celular após irradiação com diferentes densidades de energia. No entanto, o grupo LIVc se manteve menos viável do que LVc.

Na avaliação de 72 horas, C- foi menos viável do que todos os grupos irradiados, exceto LVb e LIVc. E não houve diferença entre densidades de energia iguais aplicadas com diferentes tipos de laser (GRÁFICO 2).

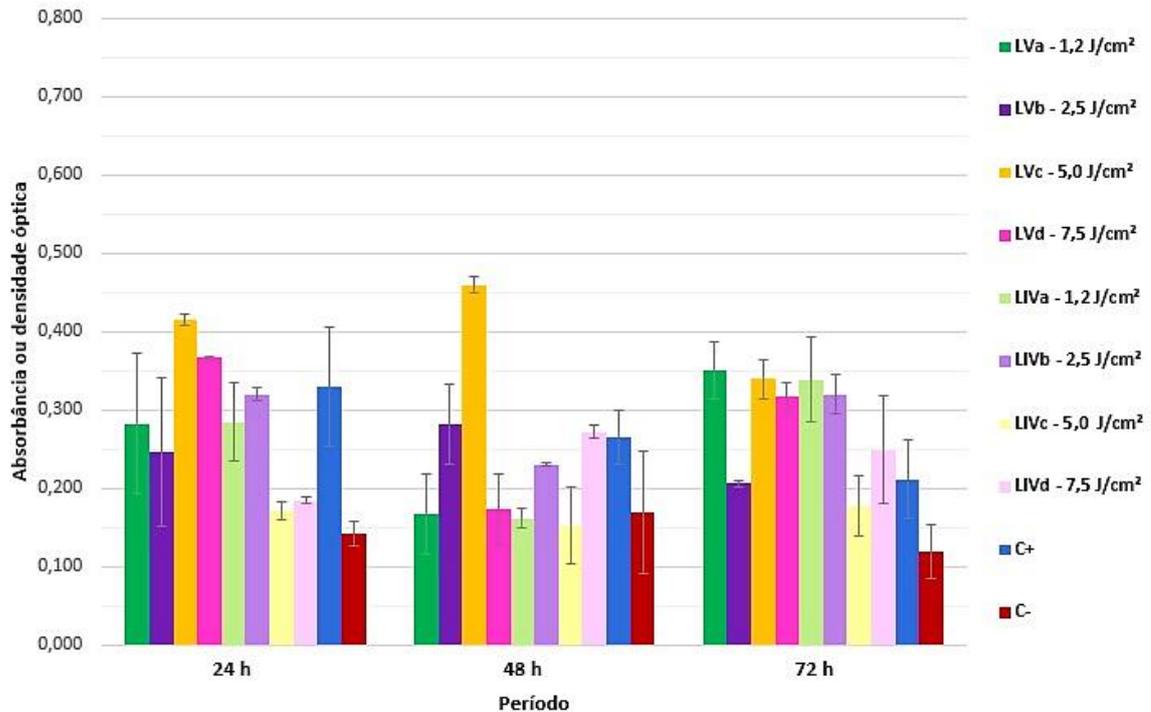


Gráfico 2 - Avaliação da viabilidade celular após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72 horas ($P < 0,05$).

4.1.3 Ensaio SRB

Os grupos LIVc e C+ mostraram maior proliferação do que C- e LVB respectivamente, 24 horas após a irradiação. Neste período, diferentes tipos de laser não influenciaram na taxa de proliferação quando foram aplicadas densidades de energia iguais.

Às 48 horas, o grupo C- apresentou menor proliferação do que os grupos C+, LIVd, LVC e LVD. As células de tais grupos irradiados com LV proliferaram mais do que LVB. O grupo LVD também mostrou maior proliferação do que LVA. Os grupos LVA, LVB, LIVb e LIVc apresentaram menores taxas de proliferação do que C+. A proliferação celular foi menor em LVB do que LIVb.

No período de 72 horas, LIVA mostrou menor proliferação do que LIVd. E C- apresentou capacidade proliferativa reduzida em comparação aos demais grupos. LVC apresentou menor proliferação do que LIVc (GRÁFICO 3).

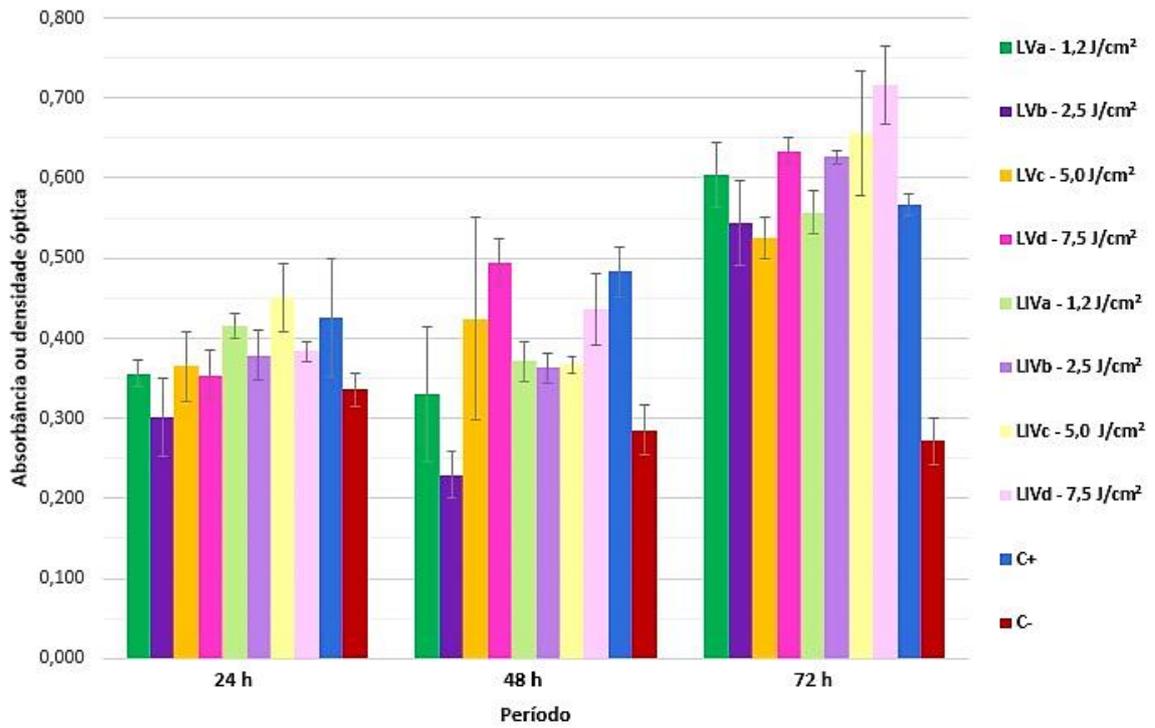


Gráfico 3 - Avaliação da proliferação celular após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas ($P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

A efetividade da terapia LBI na biomodulação celular tem sido amplamente discutida na literatura (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; GINANI et al., 2015; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; PELOW et al., 2011; PELOW; BAXTER, 2012), com a finalidade de se estabelecer parâmetros ideais para obtenção de respostas favoráveis em diferentes situações e tipos celulares específicos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BASSO et al., 2012; KREISLER et al., 2002; PEREIRA et al., 2002). No entanto, a investigação dos efeitos da fotobiomodulação celular com laser vermelho e infravermelho em SHED permanece inexplorada.

A polpa dentária de dentes decíduos consiste de uma fonte abundante de células-tronco jovens, que podem ser armazenadas através de criopreservação para o uso futuro em terapias celulares. A coleta do tecido pulpar para a obtenção destas células não envolve questões éticas complexas, visto que estes dentes são perdidos naturalmente pelo processo de esfoliação (KERKIS; CAPLAN, 2012). Embora existam protocolos bem definidos para a obtenção de SHED, a criopreservação de células já isoladas permite que esta etapa minuciosa não seja realizada (KERKIS; CAPLAN, 2012). Neste estudo, foram utilizadas SHED criopreservadas, sendo descongeladas e submetidas a processo de expansão celular para a realização dos experimentos.

O processo de criopreservação de células isoladas está bem estabelecido na literatura e pode ser considerado seguro (KERKIS; CAPLAN, 2012). Ginani et al. (2017b) e Vasconcelos et al. (2012) avaliaram a viabilidade, respectivamente, de células indiferenciadas derivadas de tecido adiposo e ligamento periodontal congeladas. Estes autores concluíram que a criopreservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em nitrogênio líquido não causaram prejuízos às células avaliadas. No entanto, pelo fato do estoque de polpa dentária poder ser constantemente renovado, sugere-se que a criopreservação a longo prazo seja evitada (KERKIS; CAPLAN, 2012).

Células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos e permanentes apresentam características semelhantes, como morfologia, alta capacidade de formar colônias aderentes e alto potencial proliferativo. No entanto, estas linhagens diferem-se funcionalmente, sendo que as SHED têm maior capacidade de manter a plasticidade ao longo das passagens (KERKIS; CAPLAN, 2012). Apesar das diferenças, a irradiação com laser vermelho a 1 J/cm^2 em DPSC (ZACCARA et al.,

2015) e SHED (GINANI et al., 2017a) mostraram taxas de viabilidade e proliferação satisfatória.

A terapia de fotobiomodulação pode ser realizada com diferentes fontes de radiação eletromagnética não ionizante, como lasers e LEDs, no espectro visível e infravermelho. Esta terapia visa alcançar benefícios terapêuticos, incluindo controle do processo inflamatório, imunomodulação e estimulação da regeneração de tecido, de acordo com os parâmetros aplicados (PANDESHWAR et al., 2016). Turrioni et al. (2014, 2015, 2016) realizaram uma sequência de estudos em que investigaram os efeitos do LED infravermelho com 4 J/cm² em SHED, concluindo que os parâmetros aplicados estimularam a viabilidade e proliferação celular, bem como, a formação de tecido mineralizado.

A definição das densidades de energia a serem avaliadas é fundamental na busca da resposta esperada. Este estudo utilizou alguns parâmetros baseadas em estudos prévios (FERNANDES et al., 2016; SOUZA et al., no prelo). Além das doses aplicadas, a eficácia da terapia laser está relacionada com a absorção da luz pelo tecido alvo. Lasers com diferentes comprimentos de onda têm sido utilizados no campo da Odontologia (CAPRIOGLIO; OLIVI; GENOVESE, 2009; SMITH 1991; PANDESHWAR et al., 2016), os quais podem ser vermelhos (λ : 630 a 750 nm) ou infravermelhos ($\lambda > 750$ nm). O dispositivo laser utilizado neste trabalho possui duas ponteiros, que diferem entre si pelo meio ativo e, conseqüentemente, comprimento de onda emitido.

O comprimento de onda ideal depende da especificidade das moléculas fotorreceptoras (KARU, 1988; SMITH, 1991). Os dispositivos laser de baixa intensidade possuem comprimento de onda entre 500 e 1200 nm, pois neste intervalo, chamado de “janela óptica”, no tecido não há moléculas de absorção específicas para estes comprimentos de onda, permitindo a passagem e espalhamento dos raios vermelhos e infravermelhos até as estruturas como citocromos das mitocôndrias (laser vermelho) ou membranas celulares (laser infravermelho). A penetração efetiva do tecido é maximizada dentro da janela óptica, pois os principais cromóforos teciduais possuem alta taxa de absorção em comprimentos de onda menores que 600 nm, enquanto que acima de 900 nm a absorção da luz é maior pela água (PANDESHWAR et al., 2016).

O laser vermelho está indicado para modulação superficial do tecido, e doses baixas 0,01-10 J/cm² tendem a ser suficientes. Já para efeitos em estruturas mais

profundas, o laser infravermelho tende a ser empregado com doses mais elevadas na faixa de 10-50 J/cm² (PANDESHWAR et al., 2016). Considerando que este estudo utilizou técnica de cultivo celular em monocamada, sugere-se que isto justifique os efeitos bioestimulatórios ou inibitórios maiores para SHED irradiadas com laser vermelho.

Visto que a radiação com determinados comprimento de onda diferem em suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas, a teoria de Smith (1991) surgiu com o intuito de complementar a teoria proposta por Karu (1988). Esta autora propôs que a luz vermelha absorvida promove mudanças fotoquímicas nos receptores das mitocôndrias, acelerando a atividade metabólica celular. Smith (1991) afirmou que a luz infravermelha inicia os eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos diretamente na membrana celular, certamente pela ativação dos canais de cálcio. Apesar de efeitos diferentes, ambos visam biomodular as atividades celulares. Logo, a resposta biológica após irradiação das células é resultante de alterações fotoquímicas e fotofísicas produzidas pela absorção da radiação não eletromagnética. Na luz visível, ao ocorrer absorção do fóton por uma molécula, os elétrons da molécula migram para uma órbita mais energética, e ao retornar liberam a energia absorvida. A absorção da radiação no espectro infravermelho resulta em rotações e vibrações moleculares (SMITH, 1991). Em 1991, Smith pressupôs que no início do século XXI, haveriam informações suficientes sobre os efeitos terapêuticos da fototerapia sobre as células, e o melhor comprimento de onda estaria determinado para aplicações específicas. No entanto, ainda há muito o que se investigar.

A magnitude dos efeitos biomoduladores do laser depende do estado fisiológico das células no momento da irradiação. Para que a luz seja absorvida de maneira satisfatória, estas devem encontrar-se fisiologicamente alteradas (KARU, 1989). A aplicação do LBI tem como intuito promover biomodulação das atividades celulares a fim de normalizar funções em situações de desequilíbrio, portanto em condições de homeostasia celular a fototerapia tende a não promover benefícios (AZEVEDO et al., 2006; DAMANTE et al., 2009; VOLPATO et al., 2011). O mecanismo de estresse celular ocorre devido a alterações desencadeadas por agentes oxidativos, temperatura e deficiência nutricional do meio de cultura (TAGLIANI et al., 2010). A diminuição da concentração de soro fetal bovino (déficit nutricional) no meio de cultura tem mostrado bastante eficácia para avaliar os efeitos da irradiação do LBI no metabolismo celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; DAMANTE et al. 2009;

EDUARDO et al., 2008; MOURA-NETO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011; SOUZA et al., no prelo). Souza et al. (no prelo) compararam a viabilidade de SHED irradiadas após 1 hora de déficit nutricional com 1% SFB, ou condições nutricionais regulares (10% SFB). Moura-Neto et al. (2016) consideraram como déficit nutricional adequado para desequilibrar a homeostasia celular de SHED, a suplementação do meio de cultura com 5% SFB por 12 horas, e como condição nutricional regular 15% SFB. Ambos estudos confirmaram que a redução da suplementação do meio de cultura pode ser considerada um método adequado para promover bioestimulação pelo LBI em SHED. No presente estudo, as SHED foram mantidas por 24 horas com suplementação de 1% SFB, sendo regularizada previamente à irradiação.

Os testes colorimétricos utilizados neste estudo revelam absorvância diretamente proporcional à taxa de viabilidade e proliferação celular. O ensaio MTT é utilizado para determinar a viabilidade celular pela redução deste sal a cristais de formazan, através da atividade metabólica de enzimas mitocondriais (MOSMANN, 1983). O ensaio Cristal violeta avalia a viabilidade celular por corar o DNA (FERREIRA et al., 2009; GILLIES et al., 1986; KUENG, SILBER; EPPENBERGER, 1989). Já o ensaio SRB marca proteínas celulares (KEEPERS et al., 1991; SAKAI et al., 2010). Visto que a terapia laser pode aumentar o metabolismo celular e a síntese de DNA e proteínas (KARU, 1989), tais ensaios são considerados adequados para a metodologia proposta (FERNANDES et al., 2016; SOUZA et al., no prelo).

Na literatura, alguns trabalhos compararam a ação de lasers vermelho e infravermelho sobre fibroblastos (ALMEIDA LOPES et al. 2001; DAMANTE et al., 2009; MOORE et al., 2005) e linhagem celular de mioblastos (FERREIRA et al., 2009). Os efeitos da terapia LBI em SHED foram avaliados por poucos estudos, sendo que a maioria avaliou a irradiação com laser vermelho (EDUARDO et al., 2008; FERNANDES et al., 2016; GINANI et al., 2017a; MOURA-NETTO et al., 2016; SOUZA et al., no prelo). Diniz, Matos e Marques (2015) investigaram a influência da irradiação com laser infravermelho na viabilidade de SHED mantidas em soluções contendo componentes de adesivos dentinários. Portanto, os resultados em relação à biomodulação de SHED com diferentes dosimetrias de laser vermelho e infravermelho apresentados pelo presente estudo podem ser considerados inéditos.

Neste estudo, SHED irradiadas com laser vermelho na densidade de energia 5 J/cm² apresentaram maiores taxas de viabilidade celular em todos os períodos avaliados, sendo maior do que os resultados apresentados por células irradiadas com

1,2 J/cm² às 24 e 48 horas do ensaio MTT. Da mesma maneira, Souza et al. (no prelo) revelaram menor viabilidade em SHED irradiadas com laser vermelho a 1,2 J/cm², às 24 horas do ensaio MTT. Contudo, neste período, Fernandes et al. (2016) mostraram que a densidade de 1,2 J/cm² estimulou a viabilidade de SHED, apesar de concordarem com o presente estudo, que 5,0 J/cm² favorece a atividade metabólica desta linhagem celular.

Moura-Neto et al. (2016) revelaram que SHED irradiadas com laser vermelho a 5 J/cm² apresentaram taxa elevada de viabilidade celular às 48 horas. Nossos resultados mostraram que este parâmetro ainda induziu significativamente maior viabilidade de SHED em comparação aos demais grupos às 48 horas do ensaio CV.

As densidades de energia 1,2 e 2,5 J/cm² promoveram taxas de proliferação celular menores do que o controle positivo, independentemente do laser aplicado, às 48 horas do ensaio SRB. Discordando novamente de Fernandes et al. (2016), que neste período mostraram maior proliferação em SHED irradiadas com laser vermelho programado com estas densidades de energia. Estes estudos diferem entre si em relação a passagem celular e detalhes da metodologia. No presente trabalho, SHED que receberam 2,5 J/cm² com laser vermelho ainda proliferaram menos do que aquelas irradiadas com 5 J/cm².

A influência de diferentes comprimentos de onda na aplicação da mesma densidade de energia mostrou resultados variados, mas condizentes com a biomodulação, ou seja estimulação ou inibição das respostas celulares. Assim, 5 J/cm² aplicado com laser vermelho estimulou maior viabilidade do que com infravermelho às 24 horas do ensaio MTT, e às 24 e 48 horas do ensaio CV. Já SHED irradiadas a 1,2 e 2,5 J/cm² com laser vermelho foram menos viáveis do que aquelas submetidas ao laser infravermelho pelo ensaio MTT ÀS 24 e 48 horas. Além disso, a densidade de energia 2,5 J/cm² induziu menor proliferação celular quando aplicada com laser vermelho do que infravermelho às 48 horas do ensaio SRB.

A variação das nomenclaturas, parâmetros aplicados e condições experimentais tem dificultado a comparação dos resultados da terapia laser em cultura de células. Assim, as respostas obtidas acerca da influência do LBI nas atividades celulares devem ser interpretadas com cautela (GINANI et al., 2015; HADIS et al., 2016; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010; TUNER; JENKINS, 2016). Além disso, a indicação incompleta de parâmetros e a falta de conhecimento dos pesquisadores promovem controvérsias, que podem afetar a confiabilidade das investigações. A falta

de compreensão das especificidades da terapia laser é evidente na literatura, uma vez que muitos estudos distorcem conceitos fundamentais (DINIZ et al., 2015; EDUARDO et al., 2008).

Sabendo que a ação do laser depende das propriedades ópticas do tecido alvo, experimentos laboratoriais *in vitro* não conseguem reproduzir integralmente as interações da luz com os tecidos e os múltiplos sistemas do organismo (AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; FRESHNEY, 2005; KREISLER et al., 2002). Portanto, a extrapolação dos resultados obtidos para a prática clínica torna-se inviável. Estes servem para guiar os parâmetros a serem aplicados de maneira segura em pesquisas futuras, empregando modelos *in vivo* e ensaios clínicos (PEREIRA et al., 2002; TAGLIANI, 2010; TUNER; JENKINS, 2016).

Nenhuma conclusão pode ser considerada definitiva, devido à grande variedade de parâmetros LBI relatados na literatura. A reprodutibilidade dos estudos laboratoriais para confirmação das respostas encontradas é fundamental para fortalecer as evidências científicas acerca da fotobiomodulação celular (TUNER; JENKINS, 2016). Portanto, mais estudos com metodologia controlada e parâmetros bem delimitados são necessários para que os efeitos do LBI com diferentes comprimentos de onda na viabilidade e proliferação de SHED possam ser esclarecidos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a dose de 5 J/cm² aplicada com laser vermelho induziu taxas elevadas de viabilidade e proliferação celular, já a irradiação desta dose pelo laser infravermelho provocou efeitos negativos. A irradiação com 1,2 J/cm² e 2,5 J/cm² causou danos à atividade metabólica e proliferação de SHED independentemente do tipo de laser, sendo que a redução das taxas de viabilidade e proliferação celular foi maior na aplicação destas doses com laser vermelho do que infravermelho.

Diante do exposto, aceita-se H1 e rejeita-se H0.

REFERÊNCIAS

ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; MOUSSA, N. A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 237-249, 2012.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

AN, Y. H.; WOOLF, S. K.; FRIEDMAN, R. J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopedic bioabsorbable devices. **Biomaterials** v. 21, p. 2635-2652, 2000.

ARORA, V.; ARORA, P.; MUNSHI, A. K. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. **J Clin Pediatr Dent**, v. 33, n. 4, p. 289-294, 2009.

AZEVEDO, L. H. et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Lasers Med Sci**, v. 21, n. 2, p. 86-89, 2006.

BASSO, F.G. et al. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int J Dent**. v. 2012, 2012.

BREITBART, H. et al. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). **J Photochem Photobiol B**, v. 34, n. 3, p. 117-121, 1996.

CASAGRANDE, L. et al. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. **J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 603-608, 2010.

CAPRIOGLIO, C.; OLIVI, G.; GENOVESE, M. D. Lasers in dental traumatology and low-level laser therapy (LLLT). **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 12, n. 2, p. 79-84, 2011.

CHENG, C. C. et al. Cell-autonomous heparanase modulates self-renewal and migration in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Biomed Sci**, v. 13, n. 21, p. 21, 2014.

CHEN, H. et al. Biological effects of low-level laser irradiation on umbilical cord mesenchymal stem cells. **AIP Advances**, v. 6, n. 4, p. 045018, 2016.

CORDEIRO, M. M. et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 962-969, 2008.

DALTOÉ, F. P. et al. Can SHED or DPSCs be used to repair/regenerate non-dental tissues? A systematic review of in vivo studies. **Braz Oral Res**, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2014.

DAMANTE, C. A. et al. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 6, p. 885-891, 2009.

DEMARCO, F. F. et al. Dental pulp tissue engineering. **Braz Dent J**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

DINIZ, I. M. A.; MATOS, A. B.; MARQUES, M. M. Laser phototherapy enhances mesenchymal stem cells survival in response to the dental adhesives. **ScientificWorldJournal**, v. 2015, 2015.

EDUARDO, F. P. et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Me**, v. 40, n. 6, p. 433-438, 2008.

EDWARDS, P. C.; MASON, J. M. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration:(2) dentin-pulp and periodontal regeneration. **Head Face Med**, v. 2, n. 1, p. 16, 2006.

FAREA, M. et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β (1) on the proliferation and osteogeni differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 12, p. 1400-1411, 2014.

FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **J Lasers Med Sci**, v. 5, n. 2, p. 58-62, 2014.

FERNANDES, A. P. et al. Effects of low-level laser therapy on stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 4, p. 332-337, 2016.

FERREIRA, M. P. P. et al. Effect of low energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 901-906, 2009.

FRESHNEY R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**, 6th Edition: Wiley-Blackwell, 2000.

GINANI, F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 8, p. 2189-2194, 2015.

GINANI, F. et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, p. 1-8, 2017a.

GINANI, F. et al. Low-level laser irradiation promotes proliferation of cryopreserved adipose-derived stem cells. **Einstein**, v. 15, n. 3, p. 334-338, 2017b.

GÓRALCZYK, K. et al. Effect of LLLT on endothelial cells culture. **Lasers Med Sci**, v.30, n. 1, p. 273-278, 2015.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13625-12630, 2000.

GROSSMAN, N. et al. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v. 22, n. 4, p. 212-218, 1998.

HARA, K. et al. Potential characteristics of stem cells from human exfoliated deciduous teeth compared with bone marrow derived mesenchymal stem cells for mineralized tissue-forming cell biology. **J Endod**, v. 37, n. 12, p. 1647-1652, 2011.

KARU, T. et al. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**, v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, n. 5, p. 691-704, 1989.

KEEPERS, Y. P. et al. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **Eur J Cancer**, v. 27, n. 7, p. 897-900, 1991.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue Eng Rev**, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2011.

KOYAMA, N. et al. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. **J OralMaxillofac Surg**, v. 67, n. 3, p. 501-506, 2009.

KREISLER, M. et al. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 30, n. 5, p. 365-369, 2002.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical biochem**, v. 182, n. 1, p. 16-19, 1989.

LEE, S. et al. Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Regen Med**, v. 6, n. 6, p. 689-699, 2011.

MARQUES, M. M. et al. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 34, n. 3, p. 260-265, 2004.

MARQUES, N. C. et al. Low-level laser therapy as an alternative for pulpotomy in human primary teeth. **Med Sci**, v. 30, n. 7, p. 1815-1822, 2015.

MARQUES, N. C. T. et al. Effects of PBM in different energy densities and irradiance on maintaining cell viability and proliferation of pulp fibroblasts from human primary teeth. **Lasers Med Sci**, v. 32, n. 7, p. 1621-1628, 2017.

MARQUES, N. C. T. **Influência de diferentes densidades de energia do laser de baixa intensidade em fibroblastos derivados da polpa de dentes decíduos**. 2016. 133f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2016.

MARTENS, L. C. Laser physics and a review of laser applications in dentistry for children. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 12, n. 2, p. 61-67, 2011.

MELERO-MARTIN, J. M. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. **Blood**, v. 109, n. 11, p. 4761-8, 2007.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

MORSCZECK, C. et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. **Clin Oral Investig**, v. 14, n. 4, p. 433-440, 2010.

MOURA-NETTO, C. et al. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 1, 2016.

MVULA, B. et al. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. **Lasers Med Sci**, v. 23, n. 3, p. 277-282, 2008.

NÖR, J. E. Tooth regeneration in operative dentistry. **Oper Dent**, v. 31, n. 6, p. 633-642, 2006.

OLIVEIRA, T. M. et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. **Eur Arch Paediatr Dent**, v. 14, n. 2, p. 65-71, 2013.

OLIVEIRA, F. A. et al. Low intensity lasers differently induce primary human osteoblast proliferation and differentiation. **J Photochem Photobiol B**, v. 163, p. 14-21, 2016.

OLIVI, G.; GENOVESE, M. D.; CAPRIOGLIO, C. Evidence-based dentistry on laser paediatric dentistry: review and outlook. **Eur J Paediatr Dent**, v. 10, n. 1, p. 29-40, 2009.

OLSON, J. E.; SCHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. **Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 436-440, 1981.

OSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. **J Clin Laser Med Surg**, v. 9, n. 1, p. 267-275, 1991.

PACHECO, P. S. et al. Laser phototherapy at high energy densities do not stimulate pre-osteoblast growth and differentiation. **Photomed Laser Surg**, v. 31, n. 5, p. 225-9, 2013.

PANDESHWAR, P. et al. Photobiomodulation in oral medicine: a review. **J Investig Clin Dent**, v. 7, n. 2, p. 114-126, 2016.

PARSONS, S. J.; PARSONS, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7906-7909, 2004.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v. 28, n. 1, p. 33-40, 2010.

PEPLOW, P. V. et al. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg**, v. 29, n. 5, p. 285-304, 2011.

PEREIRA, A. N. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v. 31, n. 4, p. 263-267, 2002.

POLO, L. et al. Role of ground and excited singlet state oxygen in the red light-induced stimulation of Escherichia coli cell growth. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 3, p. 753-758, 1999.

POURZARANDIAN, A. et al. Effect of low level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol**, v. 76, n. 2, p. 187-193, 2005.

RAMAZANI, N.; AHMADI, R.; DARYAEIAN, M. Oral and Dental Laser Treatments for Children: Applications, Advantages and Considerations. **J Lasers Med Sci**, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2012.

SAKAI, V. T. et al. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v. 89, n. 8, p. 791-796, 2010

SAKAI, V. T. et al. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. **Adv Dent Res**, v. 23, n. 3, p. 325-332, 2011.

SCHINDL, A. et al. Low-intensity laser therapy: a review. **J Investig Med**, v. 48, n. 5, p. 312-326, 2000.

SEO, B. M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis**, v. 14, n.5, p. 428-434, 2008.

SMITH, K. C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Therapy**, v. 3, n. 1, p. 19-24, 1991.

SOUZA, L. M. et al. Effect of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from exfoliated deciduous teeth under different nutritional conditions. **Laser Phys**, 2017. No prelo.

TAGLIANI, M. M. et al. Nutritional stress enhances cell viability of odontoblast-like cells subjected to low level laser irradiation. **Laser Phys Let**, v. 7, n. 3, p. 247, 2010.

TELLES, P. D. et al. Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells. **J Appl Oral Sci**, v. 19, n. 3, p. 189-194, 2011.

TOMASZEWSKA, J. M. et al. Characteristics of dental pulp in human upper first premolar teeth based on immunohistochemical and morphometric examinations. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 51, n. 2, p. 149-155, 2013.

TURRIONI, A. P. et al. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. **J Dent**, v. 42, n. 10, p. 1292-1299, 2014.

TURRIONI, A. P. et al. Dose-responses of Stem Cells from Human Exfoliated Teeth to Infrared LED Irradiation. **Braz Dent J**, v. 26, n. 4, p. 409-415, 2015.

TURRIONI, A. P. et al. Transdental photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth. **Int Endod J**, v. 50, n. 6, p. 549-559, 2017.

VALE, K. L. et al. The Effects of Photobiomodulation Delivered by Light-Emitting Diode on Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Study on the Relevance to Pluripotent Stem Cell Viability and Proliferation. **Photomed Laser Surg**, 2017.

VASCONCELOS, R.G. et al. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. **Cell Tissue Bank**, v. 13, n. 3, p. 461-469, 2012.

VOLPATO, L. E. R. **Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do light-emitting diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico.** 2009. 140f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

VOLPATO, L. E. et al. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. **J Biomed Opt**, v. 16, n. 7, p. 1-6, 2011.

VOLPONI, A. A.; PANG, Y.; SHARPE, P. T. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 12, p. 715-722, 2010.

WAGNER, V. P. et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. **J Biomed Opt**, v. 18, n. 12, p. 128-132, 2013.

WANG, X. et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 9, p. 1231-1240, 2012.

WU, X. et al. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 2, p. 480-487, 2004.

YAMAZA, T. et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem Cell Res Ther**, v. 1, n. 1, p. 5, 2010.

YANG, H. et al. Local injection of pulp cells enhances wound healing during the initial proliferative phase through the stimulation of host angiogenesis. **J Endod**, v. 39, n. 6, p. 788-794, 2013.

ZACCARA, I. M. et al. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. **Lasers Med Sci**, v. 30, n. 9, p. 2259-2264, 2015.

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens de células tronco de dentes permanentes e decíduos

Área Temática:

Pesquisador: Bruno das Neves Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

CAAE: 02210312.1.0000.0077

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 46420

Data da Relatoria: 26/06/2012

Apresentação do Projeto:

Com o advento da engenharia tecidual e busca de novas alternativas no que diz respeito ao tratamento e regeneração de tecidos perdidos, o uso de células-tronco tem ganhado espaço na ciência em geral. Mais precisamente na Odontologia, são de interesse os estudos envolvendo células-tronco adultas obtidas a partir de dentes humanos, sejam esses decíduos ou permanentes. Nesse contexto, de forma a garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade entre nosso grupo e grupos de pesquisas internacionais, o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células. Para isso, tecido pulpar humano obtido a partir de um terceiro molar extraído por razões terapêuticas serão processados para obtenção de fibroblastos por explante (grupo controle). Outros 3 tecidos pulpares obtidos da mesma forma serão processados para obtenção das células-tronco (DPSC) por digestão enzimática. E finalmente, 3 tecidos pulpares humanos serão obtidos a partir da raspagem de molares decíduos exfoliados naturalmente e processados também por digestão enzimática para o isolamento das células-tronco (SHED). As células obtidas (fibroblastos, DPSC e SHED) serão submetidas a ensaios de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica com o uso de suplementos específicos em seus meios de cultivo, bem como estimuladas a diferenciação dentinogênica com o uso de BMP-2, de modo a serem caracterizadas como células-tronco. Dessa forma, espera-se constituir um banco validado de células-tronco pulpares para a execução de futuros experimentos na área de engenharia tecidual.

Objetivo da Pesquisa:

o objetivo deste estudo será o de isolar e caracterizar células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes e decíduos, bem como o de caracterizar o potencial de diferenciação destas células para garantir o avanço das pesquisas e equiparação das condições de competitividade frente os grupos de pesquisas internacionais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os participantes. Os dentes selecionados são dentes que seriam exfoliados/extraídos, tendo em vista os períodos de troca dentária (dentes decíduos) ou a necessidade terapêutica (terceiros molares inclusos). Os benefícios poderão ser observados na independência da Instituição de Pesquisa à qual o projeto está vinculado, de modo que de receptora de doações de linhagens, passaremos a doadores, técnica

dominada por poucos centros no Brasil. Além disso, o potencial de pesquisas com estes tipos celulares é altamente promissor, fazendo com que a expansão e arquivamento das linhagens permita a geração de pesquisa de alto impacto no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e está adequada para realização

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi atendido a solicitação de mudança do tele

Recomendações:

nada a declarar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido as considerações anteriores, o projeto está aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DOS CAMPOS, 28 de Junho de 2012

Assinado por:
JANETE DIAS ALMEIDA