

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JUNIOR

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ENERGIA FRACIONADA DO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES
DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS**

Alfenas/MG
2019

LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JUNIOR

**EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ENERGIA FRACIONADA DO LASER DE
BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES
DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS**

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: Biologia dos tecidos do complexo bucomaxilofacial
Orientador: Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Coorientadora: Profa. Dra. Nádia Carolina Teixeira Marques

Alfenas/MG
2019

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

A447e Almeida Junior, Luciano Aparecido de
Efeitos da fototerapia com energia fracionada do laser de baixa
intensidade em células-tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos
/ Luciano Aparecido de Almeida Junior. -- Alfenas/MG, 2018.
62 f.: il. --

Orientadora: Vivien Thiemy Sakai.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018
Bibliografia.

1. Células-Tronco. 2. Proliferação celular. 3. Terapia a Laser de Baixa
Intensidade. I. Sakai, Vivien Thiemy. II. Título.

CDD-617.6



LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JÚNIOR

EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM ENERGIA FRACIONADA DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS

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: 23/01/2019

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Vivien Thiemy Sakai

Profa. Dra. Ana Beatriz da Silveira Moretti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Ana Beatriz da Silveira Moretti

Profa. Dra. Gérsika Bitencourt Santos
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS

Assinatura: Gérsika Bitencourt Santos

Dedico esta conquista...

À Deus, Nossa Senhora Aparecida, São Bento, Santa Apolônia, Santa Edwiges, pelas inúmeras graças alcançadas, momentos de superação, alegrias e vitórias. A fé que move toda a minha caminhada e trajetória.

Aos meus amados pais, Eliane Esteves de Almeida e Luciano Aparecido de Almeida, um exemplo de determinação, competência, carinho e amor. Sempre me incentivando à lutar pelos meus sonhos e nunca desistiram da minha carreira. A melhor estrutura familiar que um filho poderia ter.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

O momento é de dizer obrigado, pois no mundo em que vivemos sempre precisaremos de outras pessoas para nos ajudar a alcançar nossos objetivos. Sei que é difícil demonstrar mesmo que resumidamente todo meu sentimento gratidão a todas as pessoas que participaram desta caminhada durante o meu crescimento profissional. A todos os meus familiares, amigos, colegas de trabalho, que estão presentes em vida ou já foram morar com Deus.

Dificuldades ao longo desses 2 anos apareceram, porém longe de obstruir o caminho brilhante que estava por vir. As alegrias, os afetos, a dedicação, profissionalismo, diversão e ensinamentos ficarão sempre na minha memória.

As minhas Avós, por toda cumplicidade, humildade, e amor. Pelo afeto delicioso, que só avó sabe demonstrar.

A minha madrinha Valéria Aparecida Fernandes, pelos ensinamentos, luta, auxílio, carinho, amizade, afeto e amor pelo seu afilhado. Sempre apoiando em todas as decisões de minha vida.

Aos meus familiares, por participarem dos momentos importantes, e torcerem pela minha felicidade.

Aos meus Afilhados Henrique e Samuel, por me mostrarem a preciosidade do sorriso de uma criança.

A Prof^a. Dr^a. Vivien Thiemy Sakai, por toda dedicação na orientação deste trabalho. Sinônimo de competência, atenção, carinho, profissionalismo. Obrigado por ter me aceito como aluno, por compartilhar todos os seus conhecimentos, ter paciência para me ensinar, instigar a pesquisar, refletir, discutir, questionar cientificamente e torcer à cada dia por minhas conquistas. Serei eternamente grato por fazer parte e permitir que o meu sonho se torne realidade.

A Prof^a. Dr^a. Nádia Carolina Teixeira Marques, por todo apoio, companheirismo, desenvolvimento científico, pelos momentos alegres, em que tudo caminhava bem, e momentos triste, que serviam de aprendizado. Por acreditar em minha capacidade, e não me deixar desistir jamais.

A Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz da Silveira Moretti, por todos os conselhos, ensinamentos, as alegrias, sempre ao dispor de esclarecimento de dúvidas. Exemplo de profissionalismo e amor a profissão.

A Prof^a. Dr^a. Gérsika Bitencourt Santos, pela valiosa colaboração na minha formação, carisma, talento científico, e ensinamentos. Por acreditar que eu sou capaz.

A Prof^a. Arislane Andrade Baldim, pelo empenho, aprendizado, orações, e amizade. Sempre me aconselhando, e ajudando a buscar o melhor para minha trajetória.

A Profª. Drª. Maristela Soares Swerts Pereira, exemplo de determinação, fonte inspiradora para minha caminhada, auxílio, humildade e gratidão.

Ao Prof. Dr. Fábio Antonio Colombo, pela utilização do laboratório de biologia molecular.

A Profª. Drª. Thais Marchini de Oliveira, pela humildade, conhecimento específico da área, e participação do estudo.

Ao Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira e a Profª. Drª. Roberta Bessa Veloso Silva, pelo ensinamentos da bioestatística, esclarecimento de dúvidas na estatística do estudo.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, ao qual promoveram ambiente agradável para execução do experimento.

As funcionárias Luzia, Paloma, Jane, Patrícia e Mônica pela demonstração de profissionalismo, atendimento de qualidade e amizade.

Aos pacientes por permitir grande aprendizado profissional.

Aos membros da banca examinadora, meu muito obrigado - ainda que antecipadamente – pelas sugestões e críticas que tenderão a acrescentar a qualidade deste trabalho.

Aos meus colegas de turma, que estiveram sempre ao meu lado, na alegria e na tristeza, nas confraternizações, e principalmente nos estudos, seminários, e aulas. A dedicação de cada um de vocês, o empenho, as lutas, críticas, contribuíram muito para este momento.

Ao Instituto Marcelo Pedreira, que compreensivelmente, permitiu que conseguisse conciliar o mestrado e a especialização em ortodontia.

A Faculdade de Odontologia de Alfenas na pessoa Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior, e do senhor coordenador do programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo apoio financeiro concedido durante a realização do estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que embora não nomeados, abrilhantaram em distintos momentos com seu apoio, talento e experiências vividas.

Tenham todos o meu muitíssimo Obrigado!!!

RESUMO

A terapia de irradiação com laser de baixa intensidade (LBI) pode ser capaz de induzir a proliferação e a diferenciação de diversos tipos celulares, com efeitos consideráveis no processo de reparo tecidual, diminuição da inflamação e analgesia. Para o reparo pulpar após procedimentos conservadores, as células-tronco pulpares apresentam potencial de diferenciação em odontoblastos e de produção de dentina, necessitando de um estímulo específico para iniciar este processo. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* se o LBI aplicado com energia total fracionada (múltiplas irradiações) ou com irradiação única estimula eventos associados à regeneração (viabilidade e proliferação) em células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED). As células foram irradiadas com LBI (InGaAlP – 660 nm) de acordo com os seguintes grupos experimentais: GI (irradiação única: 2,5 J/cm², 10 s, 0,10 J), GII (irradiação única: 5,0 J/cm², 20 s, 0,20 J), GIII (irradiação única: 7,5 J/cm², 30 s, 0,30 J), GIV (2 irradiações: 2,5 J/cm², 10 s, 0,20 J), GV (3 irradiações: 2,5 J/cm², 10 s, 0,30 J) e GVI (não irradiado). A viabilidade celular foi analisada pelos métodos MTT e de exclusão do azul de tripan (EAT), enquanto que a proliferação celular foi avaliada pelos ensaios cristal violeta (CV) e sulforrodamina B (SRB) após 24, 48 e 72 horas da primeira irradiação. Pelo ensaio MTT, não houve diferença entre os grupos às 24 e 72 horas. Às 48 horas, os grupos de múltiplas irradiações (GIV e GV) apresentaram maiores taxas de viabilidade celular. As porcentagens médias de células viáveis para todos os grupos pelo método EAT foram de 91,04%, 96,63% e 97,48% às 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Pelo ensaio CV, às 24 e 48 horas não houve diferença significativa entre os grupos; já às 72 horas, GII, GIII e GV obtiveram maior proliferação celular. Pelo SRB, GI e GIV apresentaram menores índices de proliferação celular em todos os períodos. Quando comparados os grupos de mesma energia total, GII (0,20 J) apresentou menores taxas de viabilidade celular e maiores níveis de proliferação celular em relação a GIV; já GIII (0,30 J) demonstrou resultados semelhantes aos de GV, com maior viabilidade e proliferação celular. Conclui-se que a aplicação do laser com energia total fracionada (2 ou 3 aplicações de 2,5 J/cm²) induziu maior viabilidade celular às 48 horas, enquanto que a irradiação única de 2,5 J/cm² reduziu a viabilidade celular neste período e a proliferação celular ao longo do tempo. Já as

doses únicas de 5,0 e 7,5 J/cm² e 2,5 J/cm² em 3 aplicações mantiveram a viabilidade e estimularam a proliferação das SHED às 72 horas.

Palavras-chave: Células-Tronco. Proliferação celular. Terapia a Laser de Baixa Intensidade.

:

ABSTRACT

Low-level laser irradiation (LLL) therapy may be able to induce proliferation and differentiation into several cellular types, with remarkable effects in the process of tissue repair, inflammation decrease and analgesia. For pulp repair after conservative procedures, pulp stem cells have the potential to differentiate into odontoblasts and to produce dentine, requiring a specific stimulus to trigger this process. The present study aimed to evaluate *in vitro* whether the LLL delivering fractionated total energy (multiple irradiation) or single irradiation stimulates regeneration-associated events (viability and proliferation) in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). Cells received LLL irradiation (InGaAlP – 660 nm), according to the following experimental groups: GI (single irradiation: 2.5 J/cm², 10 s, 0.10 J), GII (single irradiation: 5.0 J/cm², 20 s, 0.20 J), GIII (single irradiation: 7.5 J/cm², 30 s, 0.30 J), GIV (2 irradiations: 2.5 J/cm², 10 s, 0.20 J), GV (3 irradiations: 2.5 J/cm², 10 s, 0.30 J) and GVI (non-irradiated). Cell viability was assessed by MTT and trypan blue exclusion (TBE) methods, while cell proliferation was evaluated by crystal violet (CV) and sulforhodamine B (SRB) assays after 24, 48 and 72 hours after the first irradiation. By MTT, there was no difference between groups at 24 and 72 hours. At 48 hours, the groups with multiple irradiation (GIV and GV) presented higher cell viability rates. The mean percentages of viable cells for all groups by TBE method were 91.04%, 96.63% and 97.48% at 24, 48 and 72 hours, respectively. By CV, there was no significant difference between groups at 24 and 48 hours; at 72 hours, GII, GIII and GIV presented higher cell proliferation. By SRB, GI and GIV presented lower proliferation rates in all the periods. When the groups presenting the same total energy were compared, GII (0.20 J) presented lower cell viability rates and higher cell proliferation rates in comparison to GIV; GIII (0.30 J) presented similar results to those of GV, with higher cell viability and proliferation. In conclusion, the application of laser delivering fractionated total energy (2 or 3 applications of 2,5 J/cm²) induced higher cell viability at 48 hours, while the 2.5 J/cm² single irradiation decreased cell viability in such period and proliferation over time. The 5.0 and 7.5 J/cm² single doses and the 3 applications of 2.5 J/cm² maintained cell viability and stimulated proliferation of SHED at 72 hours.

Key words: Stem cells. Cell Proliferation. Low-Level Light Therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Layout do plaqueamento das células em placas de 96 poços de acordo com os grupos experimentais I a VI. <i>BK</i> refere-se ao poço contendo apenas meio de cultura sem células para normalização dos resultados.....	31
Figura 2 -	Layout do plaqueamento celular na placa de 24 poços de acordo com os grupos experimentais I ao VI.....	31
Figura 3 -	Demonstração dos cinco pontos de irradiação na placa de 24 poços em vermelho. Em azul, observa-se que o espaço entre os poços é semelhante ao diâmetro do poço da placa de 96 poços.....	31
Figura 4 -	Dispositivo preto posicionado para irradiação da placa.....	33
Figura 5 -	A) Posicionamento da ponta ativa do dispositivo do laser no fundo da placa para irradiação das células. B) Dispositivo preto confeccionado com cartolina negra, com orifícios localizados na posição dos poços experimentais para armazenamento da placa durante a irradiação.....	33
Figura 6 -	Aparelho laser Twin Flex Evolution MMOptics®.....	34
Figura 7 -	Fotografia tirada pelo programa ToupView durante o processo de contagem das células no hemocitômetro. Letra A indica células não viáveis, caracterizado pela marcação do azul de tripan no interior da célula. Letra B demonstra células viáveis.....	35
Gráfico 1 -	Avaliação da viabilidade celular entre os grupos com densidades de energia diferentes após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	39
Gráfico 2 -	Avaliação da viabilidade celular em relação ao tempo de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação, pelo ensaio MTT.....	39

Gráfico 3 -	Avaliação da indução e inibição da viabilidade celular após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	40
Gráfico 4 -	Avaliação da proliferação celular nos grupos irradiados com diferentes densidades de energia após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	42
Gráfico 5 -	Avaliação da viabilidade celular em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação, pelo ensaio CV.....	42
Gráfico 6 -	Avaliação da indução e inibição da proliferação celular após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	43
Gráfico 7 -	Avaliação da proliferação celular nos grupos de diferentes densidades de energia após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	44
Gráfico 8 -	Avaliação da proliferação celular na média dos grupos de diferentes densidades de energia após o ensaio SRB após a primeira irradiação.....	44
Gráfico 9 -	Avaliação da proliferação celular após o ensaio SRB em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação..	45
Gráfico 10	Avaliação da indução e inibição da proliferação celular após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estudos prévios entre 2008 e 2018 relacionando a irradiação com LBI em diversas densidades de energia e células-tronco da polpa dentária.....	25
Tabela 2 -	Grupos irradiados com laser vermelho (comprimento de onda: 660 nm) programado com diferentes densidades de energia e o controle positivo.....	30
Tabela 3 -	Porcentagem de células viáveis pelo método de exclusão azul de Tripan, nos períodos 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação do laser de baixa intensidade com diferentes parâmetros de irradiação.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
BMMSC	Células mesenquimais derivadas da medula óssea
CD4+	Linfócitos T auxiliares
CD8+	Linfócitos T citotóxicos
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CO₂	Dióxido de carbono
cm²	Centímetros quadrado
CS	Sulfato de condroitina
CV	Cristal violeta/ <i>Crystal violet</i>
DFSC	Células-tronco de folículo dentário
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPSC	Células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes
DS	Sulfato de dermatan
EAT	Exclusão do azul de tripan
ESC	Células-tronco embrionárias
EUA	Estados Unidos da América
g	Força gravitacional

h	Hora(s)
HS	Sulfato de heparano
IDPSC	Células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes imaturos
InGaAlP	Índio-gálio-alumínio-fósforo
J	Joules
J/cm²	Joule por centímetro quadrado
LBI	Laser de baixa intensidade
mM	Molaridade
MEMα	<i>Minimum essential medium Eagle alpha modification</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
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
NY	Nova York
°C	Graus Celsius
P	Nível de significância
PBS	<i>Phosphate buffered saline / Tampão fosfato-salino</i>
PDLSC	Células-tronco de ligamento periodontal dentário
s	Segundo
SCAP	Células-tronco da papila apical dentária

SHED	Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
TA	Temperatura ambiente
TBE	Trypan Blue Exclusion
UNESP	Universidade Estadual Paulista
W/cm²	Watts por centímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1	CÉLULAS-TRONCO.....	17
1.2	POLPA DENTÁRIA.....	19
1.3	LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI).....	21
1.4	IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PULPARES.....	24
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS.....	29
3.2	IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE.....	30
3.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	34
3.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN (EAT).....	35
3.5	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA (CV).....	36
3.6	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO SULFORODAMINA B (SRB).....	36
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE OS GRUPOS E VARIÁVEIS.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT.....	38
4.2	VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO EAT.....	40
4.3	PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CV.....	41
4.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO SRB.....	43
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO.....	60

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

A odontologia moderna busca restaurar ou regenerar os tecidos dentários para o restabelecimento da vitalidade, função e estética de estruturas dentárias perdidas ou danificadas, minimizando a utilização de materiais odontológicos, que apresentam resistência e durabilidade restrita, necessitando de reparo ou troca. Além disso, grande parte dos dentes restaurados podem apresentar inflamação e necrose, requerendo tratamento endodôntico radical, restauração protética ou extração (MARQUES et al., 2018; SANTANA et al., 2017; SILVA et al., 2018).

A engenharia tecidual, neste contexto, tem como objetivo promover a regeneração de vários tecidos e órgãos *in vitro*, sendo que para que ela ocorra é necessária a escolha do tipo celular apropriado, da matriz para suporte e dos fatores de crescimento para sinalização celular (AMORIN et al., 2017; FAREA et al., 2014). Este avanço baseia-se em princípios de que as células-tronco, também denominadas células indiferenciadas, respondem a uma específica sinalização que induzem a migração, proliferação e diferenciação em linhagens celulares especializadas. As células-tronco apresentam graus variados de potência e plasticidade, bem como capacidade de autorrenovação e diferenciação multipotencial em diversas linhagens celulares (AMORIN et al., 2017; DING; LIU; NIU, 2015; FERNANDES et al., 2016; HONG et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; MOSTAFAVINIA et al., 2017; SOARES et al., 2007; VOLPONI et al., 2010).

1.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco podem ser de origem embrionárias (ESC) ou mesenquimais (MSC). A grande vantagem das ESC é a sua capacidade de proliferação e diferenciação em qualquer tipo celular do organismo. Porém, sua utilização é limitada por questões éticas. Já as células-tronco mesenquimais (MSC) estão presentes na maioria dos órgãos e tecidos do corpo humano, como por exemplo, medula óssea, pele, cérebro, tecido adiposo, tecido sinovial, folículo capilar, músculo esquelético, tecido ósseo, tonsila palatina, polpa dentária, entre outros (AMORIN et

al., 2017; DING; LIU; NIU, 2015; FERNANDES et al., 2016; GINANI et al., 2017b; HONG et al., 2017; KWACK et al., 2016; MOREIRA et al., 2017; MOSTAFAVINIA et al., 2017; SOARES et al., 2007; VOLPONI et al., 2010; ZACCARA et al., 2015). As MSC constituem a linhagem celular mais favorável para engenharia tecidual.

As células-tronco derivadas da polpa dentária são altamente promissoras para a engenharia tecidual devido à facilidade de isolamento e acessibilidade, sem promover desconforto ou lesão aos pacientes doadores (XU et al., 2017; XU et al., 2018). Quando isoladas dos tecidos dentários ou adjacentes, as MSC são denominadas de: células-tronco de dentes permanentes imaturos (IDPSC); células-tronco do ligamento periodontal dentário (PDLSC); células-tronco da papila apical dentária (SCAP); e células-tronco de folículo dentário (DFSC). E quando são isoladas do tecido pulpar dentário se denomina: células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes (DPSC), células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) (AMORIN et al., 2017; CASAGRANDE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2011; GRONTHOS et al., 2000; KWACK et al., 2016; MARQUES et al., 2016; MIURA et al., 2003; MOURA-NETTO et al., 2016; ROMBOUTS et al., 2016; SAKAI et al., 2010; TELLES et al., 2011).

As DPSC apresentam altas taxas de proliferação celular e de formação de tecidos mineralizados, além de serem capazes de se diferenciarem em osteoblastos, células musculares lisas, adipócito, células neurais, odontoblastos e células endoteliais (AMORIN et al., 2017; HE et al., 2008; KWACK et al., 2016; XU et al., 2018). Todavia, as DPSC em condições fisiológicas são geralmente quiescentes para manter a homeostasia, e apenas algumas destas células participam do processo de diferenciação e apoptose (HE et al., 2008). As SHED, quando comparadas às DPSC, revelam maiores índices de proliferação celular, diferenciação, secreção de fatores de crescimento e integridade celular (AMORIN et al., 2017; CASAGRANDE et al., 2010; CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2011; GINANI et al., 2017^a; GRONTHOS et al., 2000; MARQUES et al., 2016; MIURA et al., 2003; MOURA-NETTO et al., 2016; ROMBOUTS et al., 2016; SAKAI et al., 2010; TELLES et al., 2011). As SHED também possuem maior capacidade proliferativa em relação às MSC derivadas da medula óssea (BMMSC) (XU et al., 2017). Outra vantagem é que as SHED podem ser obtidas de maneira mais simples e conveniente, ocasionando pouco ou nenhum trauma, visto que o processo de esfoliação dentária natural é comum em todas as crianças (ARORA; ARORA;

MUNSHI, 2009; CORDEIRO et al., 2008; FAREA et al., 2014; GINANI et al., 2017a). Estudos sugerem a possível utilidade do uso de células-troncos pulpares diferenciadas para o reparo ósseo, cartilaginoso, de células neurais, adipócitos e até mesmo do próprio tecido pulpar (FAREA et al., 2014; GINANI et al., 2017^a; HARA et al., 2011; SOARES et al., 2007). A procura de evidências para que esta estratégia possa ser utilizada rotineiramente na prática clínica é significativa no avanço da odontologia (DEMARCO et al., 2011; NÖR, 2006).

1.2 POLPA DENTÁRIA

O dente é formado por diversas estruturas orgânicas e inorgânicas, como esmalte, dentina, cemento e polpa. O esmalte, dentina e cemento são formados por tecido mineralizado, que promovem um suporte mecânico e proteção pulpar contra agentes microbianos presentes na cavidade oral (GOLDBERG; HIRATA, 2017; YU; ABBOTT, 2007). A polpa dentária deriva de células da crista neural, cuja proliferação e condensação levam à formação de uma papila dentária. A polpa dentária desempenha funções como nutrição, defesa e sensorial; é rica em inervações e vascularização, sendo um tecido altamente especializado e caracterizado pela presença de odontoblastos periféricos e células subodontoblásticas, presentes nas laterais da polpa. Na região central, além de fibroblastos, macrófagos e linfócitos T, a polpa dentária possui alta quantidade de nervos sensoriais e rede capilar (BIDAR et al., 2016; DEMARCO et al., 2011; GOLDBERG; HIRATA, 2017; LIN et al., 2017; MARQUES et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; YU; ABBOTT, 2007;). Sua sensibilidade térmica a estímulos externos é bem reconhecida. Independente do meio que seja o agressor (trauma, cárie, mudanças de temperatura ou mecânica), a polpa registra uma sensação comum, a dor (YU; ABBOTT, 2007).

Os odontoblastos regulam a formação da dentinogênese. Contudo, podem morrer caso haja uma lesão grave ao tecido dentário. Assim, é necessário que as células-tronco da polpa dentária participem do processo de reparo, de tal forma que estas células migrem para o local da lesão e se diferenciem em odontoblastos, para induzir a dentinogênese (SERITA et al., 2017; SHAO et al., 2011).

Os fibroblastos presentes na polpa sintetizam colágeno tipo I, fibronectina, osteonectina e também estão envolvidos na mineralização de tecidos duros. Em cultura, os fibroblastos da polpa sintetizam o colágeno tipo III. *In vitro*, os proteoglicanos são sintetizados e degradados por fibroblastos adultos. Identificados como sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatan (DS) e sulfato de heparano (HS), DS e CS são os principais glicosaminoglicanos associados às camadas celulares. Após 15 dias, os fibroblastos cultivados produzem nódulos mineralizados. O FGF-2 e o VEGF são expressos em fibroblastos de polpa dentária humana. A expressão é aumentada após a lesão. Fatores de angiogênese são necessários para a cicatrização da polpa, especialmente no local da lesão pulpar (GOLDBERG; HIRATA, 2017).

A polpa dentária é composta por um material semelhante à gelatina (proteoglicanos e outras glicoproteínas), reforçado por fibras de colágeno entrelaçadas e irregularmente dispostas. A principal função dos capilares pulpares é fornecer oxigênio e nutrientes às células constituintes da polpa dentária. Eles também fornecem uma rota de saída para os resíduos metabólicos do tecido. Os produtos residuais são removidos da polpa por vênulas, recolhendo a linfa nos gânglios e o sangue circulante em grandes vasos (GOLDBERG; HIRATA, 2017; YU; ABBOTT, 2007).

Devido à limitação estrutural da polpa, danos por irritantes químicos, térmicos, mecânicos ou microbianos ativam vários tipos de resposta inflamatória envolvendo o complexo vascular, linfático e reações locais. O sistema imune da polpa dentária é mediado por linfócitos B e linfócitos T. Os linfócitos B produzem anticorpos contra antígenos específicos após a formação, proliferação e maturação de plasmócitos. Os linfócitos T são divididos em células T auxiliares (CD4 +) e células T citotóxicas (CD8 +). Após a ativação, eles secretam várias citocinas, um grupo de moléculas biologicamente ativas que regulam a intensidade e/ou a duração da resposta imunológica (BIDAR et al., 2016; DEMARCO et al., 2011; GOLDBERG; HIRATA, 2017; MARQUES et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; YU; ABBOTT, 2007;).

A procura por soluções e materiais ideais para serem utilizados no tratamento pulpar de dentes decíduos deve ser direcionada para a indicação de medicamentos e terapias biocompatíveis, visando à ocorrência do processo de reparo e proporcionando a regeneração do tecido pulpar (GONÇALVES et al., 2016; MARQUES et al., 2015; MARQUES et al., 2017; MORETTI et al., 2008).

1.3 LASER DE BAIXA INTENSIDADE (LBI)

Recentemente, uma alternativa para terapia pulpar convencional, no restabelecimento da vitalidade tecidual é o uso do 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; MOURA-NETTO et al., 2016; SANTANA et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Clinicamente, o LBI possui a capacidade de promover o reparo tecidual acelerado, analgesia e regressão de edema devido a sua ação anti-inflamatória (FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; SOUZA et al., 2018).

A palavra LASER é o acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (COLUZZI, 2004; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014). A radiação são ondas de luz produzidas pelo laser em forma específica de energia eletromagnética. O espectro eletromagnético é toda a coleção de energia das ondas (COLUZZI, 2004). 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; PANDESHWAR et al., 2016). Existem algumas teorias referente ao mecanismo de ação do laser com as células, o LBI não causa aquecimento nos tecidos, o que significa, que a energia do laser é absorvida e utilizada para produzir efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos. (RIBEIRO et al., 2011). Segundo Karu (1999), luz visível é absorvida produzindo mudanças fotoquímicas e fotoabsorvedoras das mitocôndrias, alterando o metabolismo celular, transportando a energia de um local para o outro (transdução), incluindo as membranas, que produzem uma biomodulação. Iniciando uma cascata de eventos na cadeia respiratória, das mitocôndrias provavelmente sendo por fotoativação de enzimas. Smith (1991), sugere que a interação do laser, devido suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, inicie a alteração do metabolismo celular através da liberação dos canais de cálcio, aumentando os níveis de cálcio no interior das células.

Alguns autores citam que os efeitos ocasionados da luz monocromática, tanto vermelho como infravermelho, é devido a absorção da luz pela enzima citocromo c oxidase. E que pode existir cinco mecanismos primários para fotoexcitação celular: mudanças nas propriedades redox da cadeia respiratória após a excitação, liberação

de óxido nítrico do centro catalítico do citocromo c oxidase, formação de oxigênio singlete, aquecimento transitório local de cromóforos absorvedores e aumento na produção do ânion de superóxido (GROSSMAN et al., 1998; KARU, 1999; MARQUES et al., 2018; SMITH, 1991; PARSONS; PARSONS 2004; POLO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2011).

Os comprimentos de onda inferiores a 300 nm são denominados ionizantes. Entretanto, comprimentos de onda maiores que 300 nm têm menos fótons de energia e podem causar excitação e aquecimento do tecido com o qual o laser interage (COLUZZI, 2004; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014).

Os lasers são classificados de acordo com a interação do tecido-alvo e possuem quatro diferentes maneiras de interação, dependendo das propriedades ópticas do tecido. A primeira e mais considerável interação é a absorção da energia do laser pelo tecido-alvo, que depende de algumas características como, pigmentação, quantidade de líquido, comprimento de onda do laser e modo de emissão. O LBI oferece baixa densidade de energia, favorecendo a absorção em tecidos pigmentados e elementos do sangue, para que a célula-alvo a utilize de maneira a estimular membranas ou organelas, induzindo a biomodulação, ou seja, estado em que a célula procura restabelecer a normalidade da região afetada (CAPRIOGLIO; GENOVESE; OLIVI, 2009; COLUZZI, 2004; THEOCHARIDOU et al., 2017). A segunda interação é a transmissão da energia do laser diretamente através do tecido sem causar efeitos. A terceira é a reflexão, em que o feixe se redireciona para fora da superfície, não tendo efeito sobre o tecido-alvo. Finalmente, a quarta é o espalhamento do laser, enfraquecendo a energia pretendida e possivelmente não produzindo nenhum efeito biológico útil (COLUZZI, 2004).

O meio ativo do LBI pode ser sólido semi-condutores (diodos de arseneto de gálio-alumínio, arseneto de gálio, índio-gálio-alumínio-fósforo) ou gasosos (hélio-neônio) (CAPRIOGLIO; GENOVESE; OLIVI, 2011; COLUZZI, 2003; COLUZZI, 2004).

A amplificação é uma parte do processo que ocorre no interior do laser, identificando os componentes do instrumento do laser que é útil para o entendimento de como a luz é produzida. O termo “emissão estimulada” é a base da teoria quântica de física, introduzido em 1900 pelo físico alemão Max Planck (COLUZZI, 2004).

A bioestimulação conseguida pelo LBI é dependente dos parâmetros de irradiação do laser utilizados como: comprimento de onda, potência (capacidade de concluir o trabalho ao longo do tempo, medido em watts), energia (capacidade de executar o trabalho, expressado em Joule ou Milijoule), densidade de energia (ou fluência, definida em J/cm^2), densidade de potência (ou irradiância, expressa em W/cm^2 , sendo que as duas densidades expressam a concentração dos fótons em uma única área), tempo de aplicação e diâmetro do feixe que interage com o ponto alvo no tecido (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; BASSO et al., 2012; MARQUES et al., 2016; PEREIRA et al., 2002; SOUZA et al., 2018). Contudo, não há consenso na literatura sobre a dose de energia e a irradiância ideais para produzir algum estímulo benéfico em determinados tipos celulares (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; COLUZZI, 2004; GINANI et al., 2015; MARQUES et al., 2017).

Estudos comprovam que diferentes tipos de células sob estresse possuem condições mais sensíveis para os efeitos biomoduladores da irradiação do LBI, e que o déficit nutricional causado pela diminuição da concentração do SFB no meio de cultura pode ser eficaz para ocasionar o estresse celular (SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; TAGLIANI et al., 2010). Além disso, é encontrado na literatura que efeitos de múltiplas irradiações demonstram melhores resultados de viabilidade e proliferação celular devido ao efeito cumulativo do tecido irradiado. Esse efeito pode ser explicado em relação ao ciclo celular (FERNANDES et al., 2018; MENEGUZZO et al., 2008; NG et al., 2004). Durante a terapia do laser, a população celular que sofreu a primeira irradiação entra em divisão celular e as células filhas serão submetidas a nova irradiação resultando um maior número de células em comparação às culturas celulares que sofreram apenas única irradiação (MENEGUZZO, et al., 2008; TUNER, HODER, 1999). Desta forma, várias aplicações do laser podem resultar em crescimento celular a curto prazo quando comparado com única irradiação (FERNANDES et al., 2018; KARU, 1989; MENEGUZZO, et al., 2008). A desvantagem das múltiplas aplicações reside no possível efeito inibitório causado pela alta dose de energia. Ademais, o tempo de aplicação não pode ser suficientemente longo pois o efeito acumulativo pode inibir a proliferação celular ao invés de estimulá-la (FERNANDES et al., 2018; HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006). Porém as irradiações também não podem ser muito próximas

para que a dose acumulada não ultrapasse a faixa bioestimulatória até a bioinibitória (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2006).

Os aparelhos de laser odontológicos possuem comprimento de onda de 500 nm até 10.600 nm, podendo ser laser visível vermelho ou invisível não ionizante infravermelho (COLUZZI, 2003; COLUZZI, 2004). Diferentes LBI, com diferentes comprimentos de onda e dosimetrias, têm sido utilizados para a reparação de tecidos comprometidos. Além disso, linhagens celulares variadas podem apresentar respostas diferentes após a irradiação com LBI, gerando resultados conflitantes na literatura (GINANI et al., 2015; PELOW; CHUNG; BAXTER, 2010). Por esta razão, é fundamental que seja investigada a correta combinação dos parâmetros de irradiação com os diferentes tipos celulares, a fim de que efeitos clínicos desejados possam ser alcançados com segurança (FERREIRA et al., 2009; MARQUES et al., 2017). A bioestimulação induzida pelo LBI regula diferentes fatores relacionados ao complexo processo de reparo, como hemostasia, inflamação, angiogênese, migração, diferenciação, proliferação e remodelação celular (GÓRALCZYK et al., 2015; SANTANA et al., 2017; TOMASZEWSKA, 2013). Estudos *in vitro* têm mostrado a capacidade do LBI em estimular a síntese de proteínas estruturais (MARQUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2002) e induzir a produção de fatores de crescimento (DAMANTE et al., 2009).

1.4 IRRADIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PULPARES

Na literatura, podemos encontrar alguns trabalhos relacionados à utilização do laser de baixa intensidade sobre as células-tronco presentes no tecido pulpar. Conforme apresentado na Tabela 1, estudos utilizando a fototerapia com LBI em DPSC e SHED, no período de 2008 a 2018, com diferentes densidades de energia e alterações do tempo de irradiação, demonstram uma variação nos resultados encontrados e, por isto, a necessidade de mais pesquisas sobre o assunto.

Tabela 1 - Estudos prévios entre 2008 e 2018 relacionando a irradiação com LBI em diversas densidades de energia e células-tronco da polpa dentária

Autor	Células	Laser/ λ	Parâmetros	Energia Total	Tempo	Resultados
EDUARDO et al., 2008	DPSC	InGaAIP 660 nm	20 mW/3 J/cm ²	0,12 J	6 s	A irradiação com 20 mW apresentou maiores taxas de viabilidade celular às 72 horas. Às 24 horas após a primeira irradiação, as células cultivadas com SFB 10% aumentaram sua viabilidade celular.
			40 mW/3 J/cm ²	0,12 J	3 s	
ZACCARA et al., 2015	DPSC	InGaAIP 660 nm	30 mW/0,5 J/cm ²	Irradiação 0/48 horas		Às 72 horas, os grupos irradiados obtiveram maior proliferação celular em relação ao grupo controle. Às 96 horas, o grupo irradiado com 1,0 J/cm ² possuiu maiores índices de proliferação celular em relação aos demais grupos.
			30 mW/1,0 J/cm ²			
FERNANDES et al., 2016	SHED	InGaAIP 660 nm	5 mW/1,2 J/cm ²	0,05 J	10 s	As irradiações com 1,2 e 5,0 J/cm ² apresentaram maiores taxas de viabilidade celular no período de 24 horas em relação ao grupo controle. Pelo CV, as SHED irradiadas com 3,7 J/cm ² demonstrou maior proliferação celular do que 1,2; 2,5 e 5,0 J/cm ² . No SRB, uma taxa maior de proliferação celular com 1,2 e 2,5 J/cm ² , até 48 horas.
			10 mW/2,5 J/cm ²	0,10 J	10 s	
			15 mW/3,7 J/cm ²	0,15 J	10 s	
			20 mW/5,0 J/cm ²	0,20 J	10 s	
			25 mW/6,2 J/cm ²	0,25 J	10 s	
MOURA-NETTO et al., 2016	SHED	InGaAIP 660 nm	30 mW/0,5 J/cm ²	0,48J	16 s	A irradiação com 1,0 J/cm ² estimulou o maior aumento de proliferação celular no período de 48 e 72 horas, em relação aos demais grupos.
			30 mW/ 1,0 J/cm ²	0,99 J	33 s	
					0/48 h	

Tabela 1 - Estudos prévios entre 2008 e 2018 relacionando a irradiação com LBI em diversas densidades de energia e células-tronco da polpa dentária

Autor	Células	Laser / λ	Parâmetros	Energia Total	Tempo	Resultados
GINANI et al., 2017a	SHED	InGaAIP 660 nm	30 mW/0,5 J/cm ²	0,48 J	16 s	A irradiação com 1,0 J/cm ² estimulou um aumento da proliferação celular no período de 48 e 72 horas, em relação aos demais grupos.
			30 mW/1,0 J/cm ²	0,99 J	0/48 h 33 s 0/48 h	
MARQUES et al., 2018	SHED	InGaAIP 660 nm GaAIAs 780 nm	10 mW/1,2 J/cm ²	0,05 J	05 s	5,0 J/cm ² aplicado pelo laser vermelho induziu altas taxas de viabilidade e proliferação celular, enquanto que a mesma dose no laser infravermelho obteve efeitos negativos. A irradiação com 1,2 e 2,5 J/cm ² foi prejudicial as SHED independentemente do tipo de laser.
			10 mW/2,5 J/cm ²	0,10 J	10 s	
			10 mW/5,0 J/cm ²	0,20 J	20 s	
			10mW/ 7,5 J/cm ²	0,30 J	30 s	
SILVA et al., 2018	SHED 1%;10% SFB	InGaAIP 660 nm	10 mW/2,5 J/cm ²	0,10 J	10 s	Os grupos com 1% de SFB obtiveram uma diminuição da taxa de liberação de LDH em comparação aos grupos com 10% SFB. A redução do SFB à 1% antes da irradiação aumentou a viabilidade das SHED às 24 horas após a irradiação.
			20 mW/5,0 J/cm ²	0,20 J	10 s	
			30 mW/7,5 J/cm ²	0,30 J	10 s	
SOUZA et al., 2018	SHED	InGaAIP 660 nm	5 mW/1,2 J/cm ²	0,05 J	10 s	A dose de 1,2 J/cm ² foi menos favorável para biomodulação com o LBI. O estudo sugere que há diferença no estímulo das SHED quando mantidas sob déficit nutricional em relação às condições de normalidade.
			10 mW/2,5 J/cm ²	0,10 J	10 s	
			15 mW/3,7 J/cm ²	0,15 J	10 s	
			20 mW/5,0 J/cm ²	0,20 J	10 s	
			25 mW/6,2 J/cm ²	0,25 J	10 s	

Visto que a cárie, trauma dentário ou procedimentos restauradores sem refrigeração causam prejuízos à saúde pulpar e risco de exposição da polpa dentária, bem como podem desencadear necrose do tecido pulpar e infecção, a engenharia de tecidos pode ser uma alternativa ao tratamento endodôntico convencional a fim de promover a regeneração de dentes desvitalizados (CORDEIRO et al., 2008; DEMARCO et al., 2011; LIN et al., 2017; MARQUES et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; MOURA-NETTO et al., 2016; PAULY et al., 2011; SAKAI et al., 2010; SAKAI et al., 2011; TELLES et al., 2011). Aliado a isto, o esclarecimento dos efeitos da irradiação fracionada da energia laser em comparação à irradiação única visa alcançar os melhores efeitos da aplicação clínica desta tecnologia. Portanto, a compreensão destes processos é fundamental para que estratégias clínicas guiadas de regeneração biológica do complexo dentino-pulpar possam ser estabelecidas.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* os efeitos de múltiplas irradiações em comparação a dose única do LBI em SHED.

Os objetivos específicos foram:

- A) Analisar a viabilidade das SHED, após uma única irradiação ou múltiplas irradiações;
- B) Verificar a proliferação das SHED, após uma única irradiação ou múltiplas irradiações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), fornecidas pela Prof.^a Dr.^a Thais Marchini Oliveira Valarelli (Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição (protocolo número CAAE: 88330218.6.0000.5417), foram mantidas em meio de cultura Meio Essencial Mínimo Modificado Alfa (MEM α - Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen) e solução de penicilina e estreptomicina 1% (Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada dois dias. Foram seguidos os protocolos para a cultura de células conforme estabelecido por Sakai et al., 2010. Para todos os experimentos, as SHED foram utilizadas entre a 5^a e 7^a passagem.

3.1 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS

Os grupos foram divididos de acordo com a variação da densidade de energia em função do tempo de irradiação, e da energia em função da quantidade de sessões de aplicação do LBI, empregadas para cada grupo experimental, conforme descrição a seguir (TABELA 2):

Tabela 2 – Grupos irradiados com laser vermelho (comprimento de onda: 660 nm) programado com diferentes densidades de energia e o controle positivo.

Grupo	Densidade de Energia (J/cm ²)	Potência (mW)	Aplicação	Tempo (s)	Tempo Total (s)	Energia Total (J)
I	2,5	10	1x	10	10	0,10
II	5,0	10	1x	20	20	0,20
III	7,5	10	1x	30	30	0,30
IV	2,5	10	2x	10	20	0,20
V	2,5	10	3x	10	30	0,30
VI	Controle	_____	_____	_____	_____	_____

Fonte: Do Autor

3.2 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, num total de 4×10^4 células por poço, para o experimento de exclusão do azul de tripan (EAT) ou em placas de 96 poços, num total de 1×10^4 células por poço, para os experimentos de MTT, cristal violeta (CV) e sulforrodamina B (SRB). Considerando a característica de espalhamento do laser, para as placas de 96 poços, o plaqueamento foi realizado de modo que não fossem utilizados poços adjacentes para os grupos em que seria aplicado o laser, deixando sempre um poço livre entre os poços contendo células (FIGURA 1). Para as placas de 24 poços, apenas não foram utilizados poços adjacentes no sentido vertical e horizontal, mas sim no transversal (FIGURA 2), visto que a distância entre os poços neste sentido é semelhante ao diâmetro de um poço da placa de 96 poços (FIGURA 3). As células foram plaqueadas em triplicata nas placas de 96 poços (FIGURA 1) e em duplicata nas placas de 24 poços (FIGURA 2), e os experimentos descritos abaixo foram repetidos três vezes (DAMANTE et al., 2009; FERNANDES et al., 2018; FRESHNEY 2000; SOUZA et al., 2018; VOLPATO et al., 2011).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												BK
B												BK
C												BK
D	I		II		III			IV		V		
E												
F	I		II		III			IV		V		VI
G												VI
H	I		II		III			IV		V		VI

Figura 1 - Layout do plaqueamento das células em placas de 96 poços de acordo com os grupos experimentais I a VI. BK refere-se ao poço contendo apenas meio de cultura sem células para normalização dos resultados.

Fonte: Do autor.

	1	2	3	4	5	6
A	I		III		V	
B		II		IV		VI
C	I		III		V	
D		II		IV		VI

Figura 2 - Layout do plaqueamento celular na placa de 24 poços de acordo com os grupos experimentais I ao VI.

Fonte: Do autor.

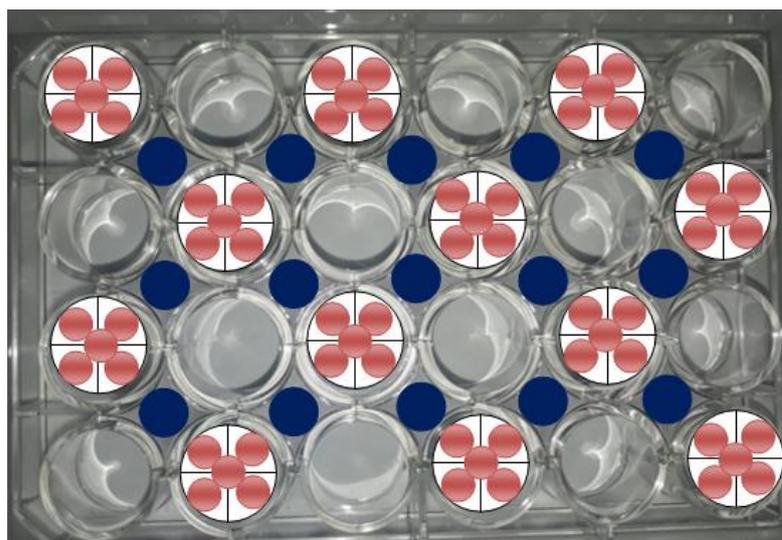


Figura 3 - Demonstração dos cinco pontos de irradiação na placa de 24 poços em vermelho. Em azul, observa-se que o espaço entre os poços é semelhante ao diâmetro do poço da placa de 96 poços.

Fonte: Do autor.

Após o plaqueamento com meio de cultura convencional, as células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ durante a noite para se aderirem ao fundo do poço. Depois deste período, para a primeira irradiação, todos os poços receberam meio suplementado com SFB a 1% durante 1 hora para que as células estivessem em estado de quiescência no momento da irradiação (SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018). Após a irradiação, o meio de cultura de todos os grupos foi trocado para o meio convencional, e os experimentos descritos a seguir foram realizados nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Sabendo-se que a distância entre a fonte do laser e o caminho percorrido até a superfície de aplicação é crítica, nos experimentos propostos, o laser foi aplicado através do fundo das placas de 24 e 96 poços transparentes. Desta forma, o feixe de laser não transpôs o meio de cultura, sendo aplicado diretamente sobre as células, seguindo a metodologia adotada em estudos prévios (EDUARDO et al., 2008; MARQUES et al., 2004; MARQUES et al., 2017; PEREIRA et al., 2002; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; VOLPATO et al., 2011;). Foram utilizadas placas fabricadas em poliestireno (Corning, Estados Unidos). 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; FERNANDES et al., 2018; MARQUES et al., 2017; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; VOLPATO et al., 2011). As placas de cultura foram posicionadas de modo que a ponta ativa do laser ficasse totalmente em contato com o fundo do poço irradiado (FIGURAS 4 e 5A). A irradiação na placa de 24 poços foi realizada de modo que o laser cobrisse toda a área de crescimento celular, com cinco pontos determinados, um central e quatro nas extremidades (FIGURA 3).

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 que permitiu que apenas o orifício do poço que estava sendo irradiado permanecesse aberto, enquanto todos os outros foram mantidos ao abrigo da luz (FIGURA 5B). Os orifícios da máscara das placas de 96 poços possuíam o diâmetro compatível com a ponta ativa do dispositivo do laser (MARQUES et al., 2016; MARQUES et al., 2017; VOLPATO et al., 2011).

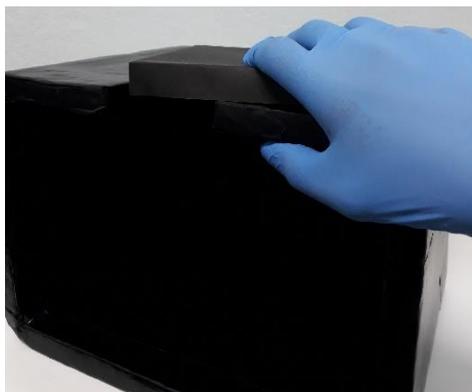


Figura 4 - Dispositivo preto posicionado para irradiação da placa.

Fonte: Do autor.

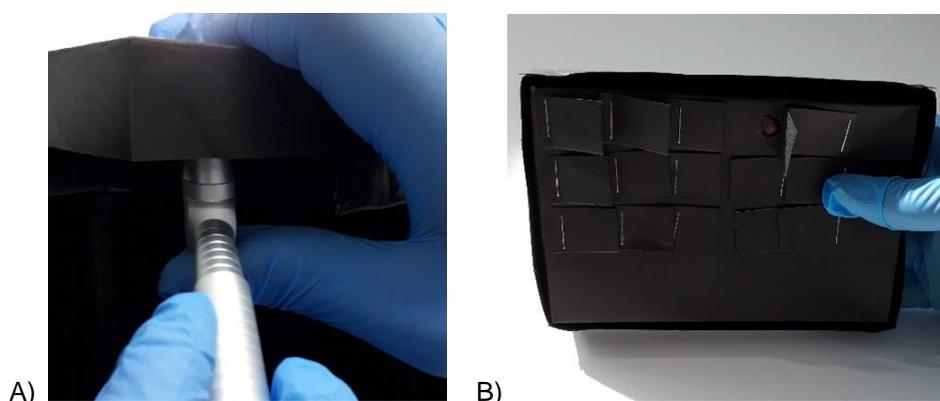


Figura 5 – A) Posicionamento da ponta ativa do dispositivo do laser no fundo da placa para irradiação das células.

B) Dispositivo preto confeccionado com cartolina negra, com orifícios localizados na posição dos poços experimentais para armazenamento da placa durante a irradiação.

Fonte: Do autor.

Em todos os grupos, a irradiação foi realizada com o LBI com meio ativo de Índio-gálio-alumínio-fósforo (InGaAlP) (Twin Flex Evolution MMOptics® – São Carlos, Brasil – FIGURA 6) no comprimento de onda (λ) de 660 nm (vermelho); potência de 10 mW; área do feixe de saída - 0,04 cm²; variando a densidade de energia em função do tempo de irradiação e a energia em função da quantidade de sessões de aplicação do LBI empregada para cada grupo experimental. Previamente às irradiações, a potência da emissão do laser foi aferida por um medidor de potência (Laser Check – MMOptics® – São Carlos). Nos grupos de múltiplas irradiações, estas foram realizadas a cada 6 horas (FERNANDES et al., 2018; PEREIRA et al., 2002). As células do grupo controle permaneceram fora da incubadora o mesmo tempo 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 como em estudos prévios (DAMANTE et al., 2009; MARQUES et al., 2017; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018; VOLPATO et al., 2011).



Figura 6 – Aparelho laser Twin Flex Evolution MMOptics®.

Fonte: Do autor.

3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Para o ensaio MTT, ao final da incubação nos períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados com PBS 1x (200 μ L), logo após uma solução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi adicionada, em que os sais de tetrazólio são reduzidos pela enzima oxidoreductase, marcadora da atividade mitocondrial (LI; SONG, 2007). 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), sendo incubada por 4h a 37°C em 5% de CO₂. Em seguida, foi removido a solução de MTT, e acrescentado dimetil sulfóxido (DMSO – Fisher Scientific, Hampton, VA, EUA; 200 μ L/poço) e mantido por 30 minutos, em temperatura ambiente, para dissolver completamente os cristais de formazan (LI, SONG., 2007; BARAL et al. 2015). A leitura da absorbância foi determinada em aparelho de espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 570 nm.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN (EAT)

Para este ensaio, o meio de cultura foi removido de cada poço e reservado para a posterior neutralização da tripsina do poço correspondente. Em seguida, realizou-se a lavagem com PBS 1X e a adição 250 µl de tripsina-EDTA 0,25%, por 5 minutos, sendo posteriormente neutralizada com o sobrenadante reservado. Realizou-se uma centrifugação por 5 minutos em 100 x g, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi ressuspendido com 100 µl de MEMα puro e 100 µl de azul de tripan 0,4% deixado 3 minutos em temperatura ambiente. As células viáveis e não viáveis foram contadas em hemocítômetro (FIGURA 7). O cálculo da porcentagem de células viáveis foi realizado utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{Número de células viáveis por mL da alíquota}}{\text{Número de células por mL da alíquota} \times 100}$$

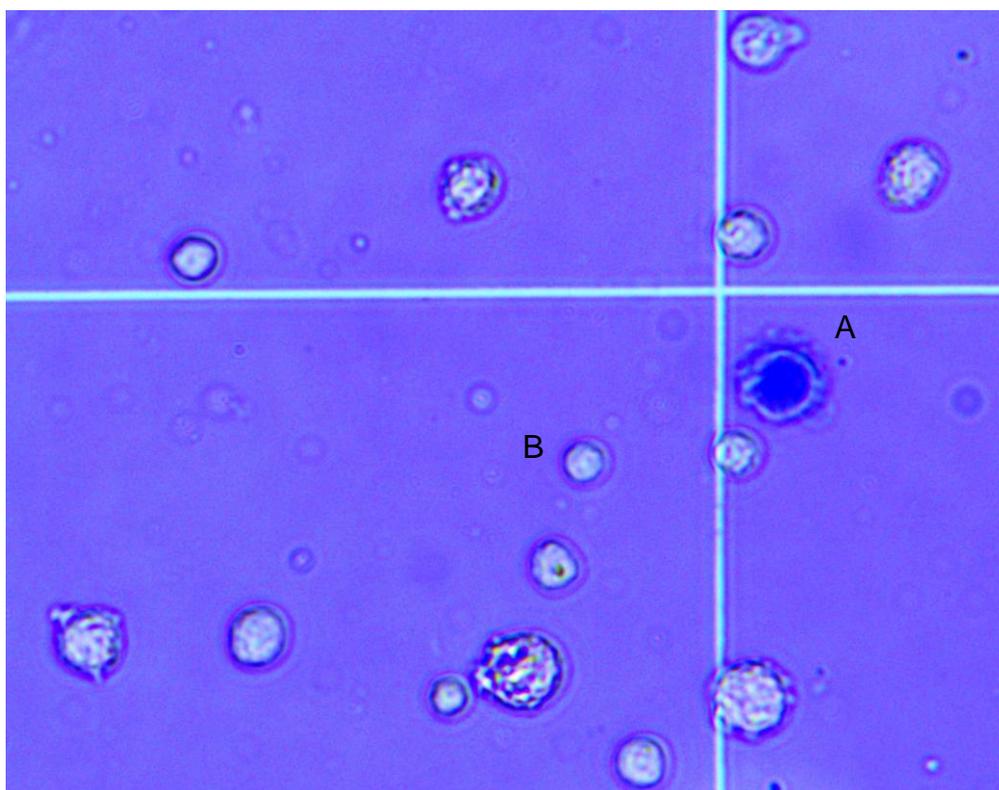


Figura 7 – Fotografia tirada pelo programa ToupView durante o processo de contagem das células no hemocítômetro. Letra A indica células não viáveis, caracterizado pela marcação do azul de tripan no interior da célula. Letra B demonstra células viáveis.

Fonte: Do Autor.

3.5 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA (CV)

Para o ensaio de proliferação CV, nos respectivos períodos experimentais após as irradiações, os sobrenadantes foram descartados, lavados com solução PBS 1x, e uma solução de CV, responsável por corar o ácido desoxirribonucléico (DNA) celular, foi adicionada nos poços. Para tanto, após o descarte dos sobrenadantes e lavagem com PBS 1x, foi adicionado aos poços 200 µL 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 CV, adicionada aos poços (200 µL) por 3 minutos. Após a remoção da solução, os poços foram novamente lavados com solução PBS 1x por 2 vezes. Então, após lavagem, 200 µL de solução de citrato de sódio 0,05 mol.L foi adicionado em cada poço por 10 minutos para leitura da absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

3.6 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO SULFORODAMINA B (SRB)

Para o ensaio SRB, após cada período experimental, as células 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 em temperatura ambiente 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 em comprimento de onda de 565 nm.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA ENTRE GRUPOS E VARIÁVEIS

Após a coleta dos dados, os resultados foram analisados através do programa "R Statistical Software". Os valores obtidos em duplicata e triplicata foram analisados pelo método ANOVA a 2 critérios, seguido pelo teste de Scott Knott. Foi adotado nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

A determinação dos grupos experimentais foi realizada de acordo com as densidades de energia do laser vermelho (GI, GII, GIII, GIV, GV), sendo que para os três primeiros grupos foi realizada apenas uma aplicação do laser com energia total de 0,10J, 0,20J e 0,30J, respectivamente, enquanto que para os dois últimos grupos, foram realizadas duas ou três aplicações, com energia total de 0,20J e 0,30J, respectivamente. Assim, as taxas de viabilidade e proliferação das SHED foram comparadas em relação à irradiação com diferentes densidades de energia, assim como em relação à irradiação do laser com energia total fracionada (múltiplas irradiações) ou em dose única. Todos os grupos experimentais também foram comparados ao controle positivo (GVI) constituído de células não irradiadas.

4.1 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO MTT

No período de 24 horas após a irradiação, não houve diferença estatisticamente significativa na viabilidade das células dos diferentes grupos. Às 48 horas, GIV e GV obtiveram maior viabilidade celular quando comparados a GII, GIII e GVI ($P < 0,001$). As células em GI estavam significativamente menos viáveis do que as dos demais grupos ($P < 0,001$). No período de 72 horas, não houve diferença estatísticas entre os grupos (GRÁFICO 1). Quando comparados os grupos em relação ao tempo, todos os grupos apresentaram um aumento significativo na atividade metabólica mitocondrial ao longo do tempo ($P < 0,001$), ou seja, às 48 horas houve maior viabilidade celular do que às 24 horas e 72 horas maior viabilidade do que às 48 horas, com exceção de GI em que não se observou diferença significativa entre os períodos de 24 e 48 horas ($P > 0,05$), mas às 72 horas houve maior viabilidade celular em comparação a 24 e 48 horas ($P < 0,001$, GRÁFICO 2).

Quando os resultados foram normalizados em relação ao grupo controle, no período de 24 horas, não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$). Já às 48 horas, GIV e GV apresentaram indução da viabilidade celular em comparação aos demais grupos ($P < 0,05$) e GI demonstrou maior inibição da viabilidade celular

em comparação a GII e GIII ($P < 0,05$). Às 72 horas, não houve diferença estatística, sendo que todos os grupos apresentaram uma tendência de inibição da viabilidade celular ($P > 0,05$, GRÁFICO 3).

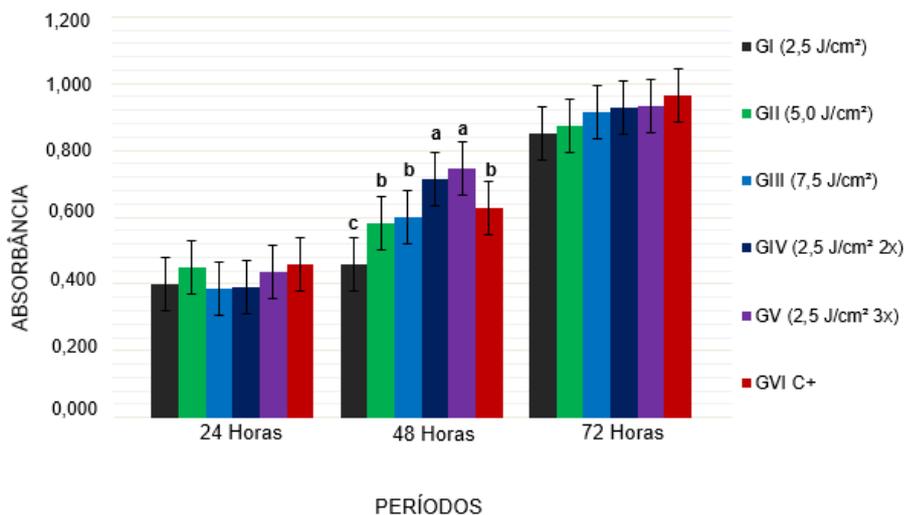


Gráfico 1 – Avaliação da viabilidade celular entre os grupos com densidades de energia diferentes após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos para um mesmo período experimental ($P < 0,001$).

Fonte: Do Autor

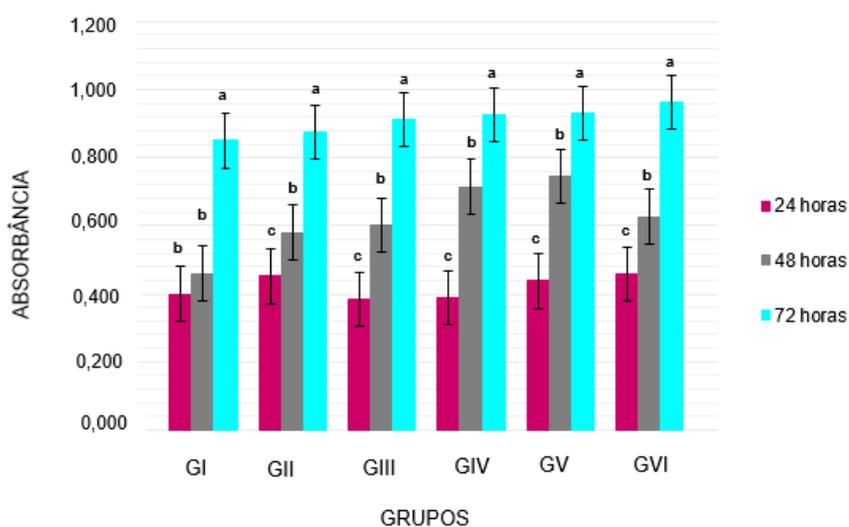


Gráfico 2 – Avaliação da viabilidade celular em relação ao tempo de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação, pelo ensaio MTT.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os tempos para um mesmo grupo experimental ($P < 0,001$).

Fonte: Do Autor.

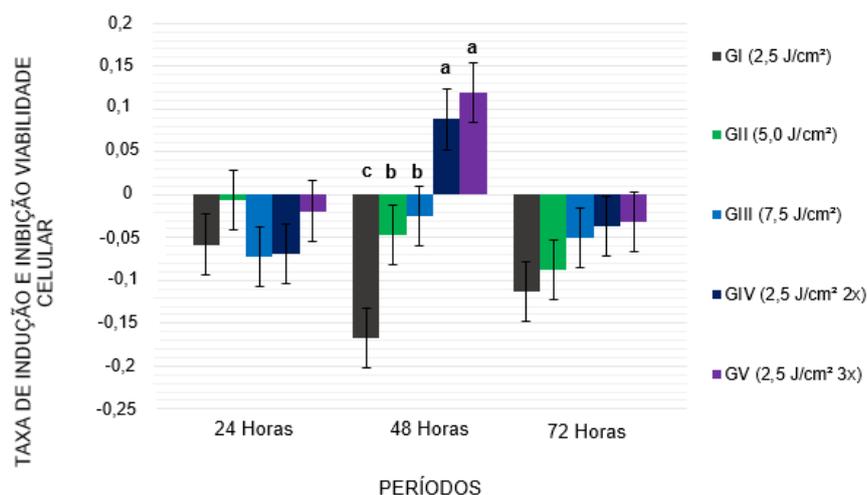


Gráfico 3 – Avaliação da indução e inibição da viabilidade celular após o ensaio MTT nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos para um mesmo período de avaliação ($P < 0,05$).

Fonte: Do Autor.

4.2 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO EAT

As porcentagens médias de células viáveis nos grupos foram de 91,04%, 96,63% e 97,48% às 24, 48 e 72 horas, respectivamente, com diferença significativa entre 24 horas e os demais períodos ($P < 0,001$). Não houve diferença significativa na viabilidade das SHED entre os grupos para cada tempo experimental ($P > 0,05$; TABELA 3).

Tabela 3 - Porcentagem de células viáveis pelo método de exclusão azul de tripan, nos períodos 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação do laser de baixa intensidade com diferentes parâmetros de irradiação ($P < 0,05$).

(continua)

Grupo	24 Horas		48 Horas		72 Horas	
	Viáveis (%)	Desvio Padrão	Viáveis (%)	Desvio Padrão	Viáveis (%)	Desvio Padrão
GI	86,25	1,77	93,58	0,83	97,22	0,16
GII	89,16	7,47	95,16	2,15	98,55	1,79

Tabela 3 - Porcentagem de células viáveis pelo método de exclusão azul de tripan, nos períodos 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação do laser de baixa intensidade com diferentes parâmetros de irradiação ($P < 0,05$).

(conclusão)						
	24 Horas		48 Horas		72 Horas	
Grupo	Viáveis (%)	Desvio Padrão	Viáveis (%)	Desvio Padrão	Viáveis (%)	Desvio Padrão
GIII	92,82	3,41	97,17	0,58	97,16	0,18
GIV	91,82	1,90	96,99	0,33	97,77	0,45
GV	90,14	6,77	96,92	0,52	97,19	0,52
GVI	91,26	1,89	96,93	0,23	96,71	0,23
Média	91,04^b		96,63^a		97,48^a	

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os períodos de avaliação para os grupos experimentais. A análise de variância para essa variável foi feita utilizando a transformação do arco seno para atender as pressuposições da análise.

Fonte: Do Autor.

4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO CV

Para o ensaio CV, não houve diferença estatística entre os grupos às 24 e 48 horas após a irradiação ($P > 0,05$). Já no período de 72 horas, GI, GIV e GVI tiveram menor proliferação celular em relação a GII, GIII e GV ($P < 0,05$, GRÁFICO 4). Observou-se um crescimento contínuo das células de todos os grupos experimentais ao longo do tempo, com diferenças significativas nas taxas de absorvância de GI, GIV e GVI às 24 horas em relação aos demais períodos ($P < 0,001$), de GII às 72 horas em relação aos demais períodos ($P < 0,001$) e de GIII e GV entre todos os períodos de avaliação ($P < 0,001$, GRÁFICO 5).

Quando os dados foram normalizados em relação ao grupo controle, observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos às 24 e 48 horas; já às 72 horas, GII, GIII e GV apresentaram indução da proliferação celular, enquanto GI mostrou inibição da proliferação celular, em comparação a esses grupos ($P < 0,05$; GRÁFICO 6).

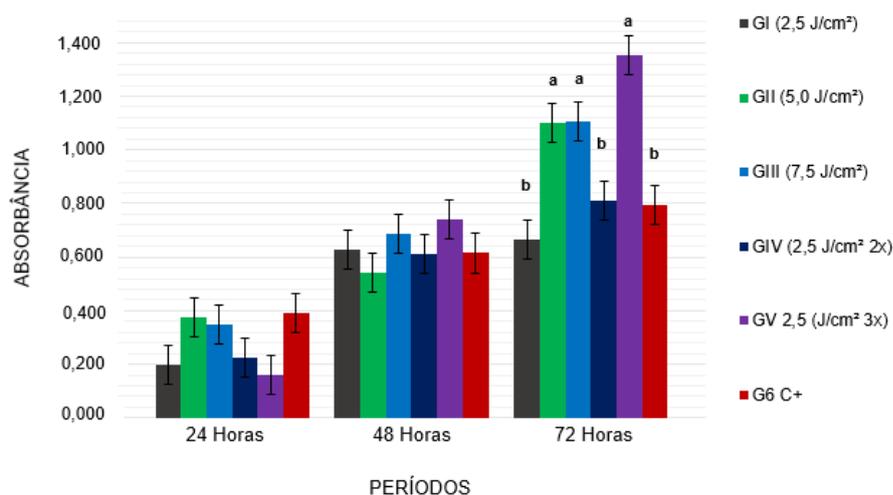


Gráfico 4 - Avaliação da proliferação celular nos grupos irradiados com diferentes densidades de energia após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos para um mesmo período experimental ($P < 0,05$).

Fonte: Do Autor

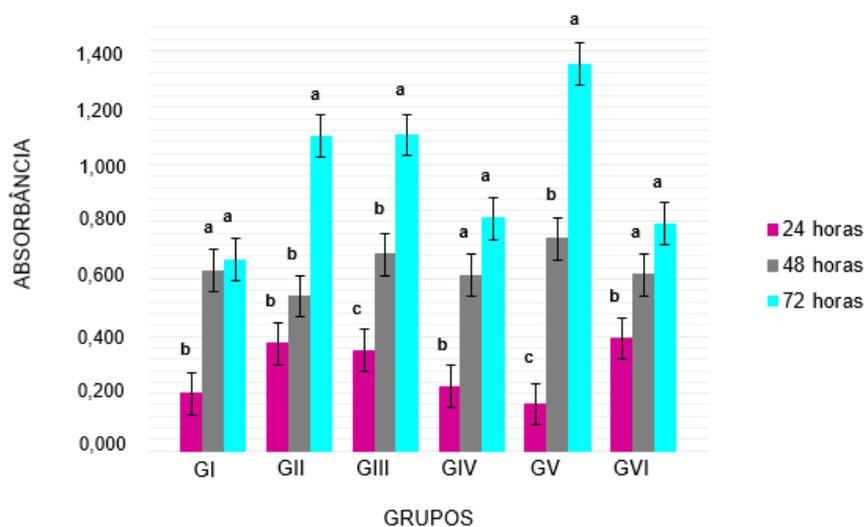


Gráfico 5 – Avaliação da proliferação celular em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação, pelo ensaio CV.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os tempos para um mesmo grupo experimental ($P < 0,001$).

Fonte: Do Autor

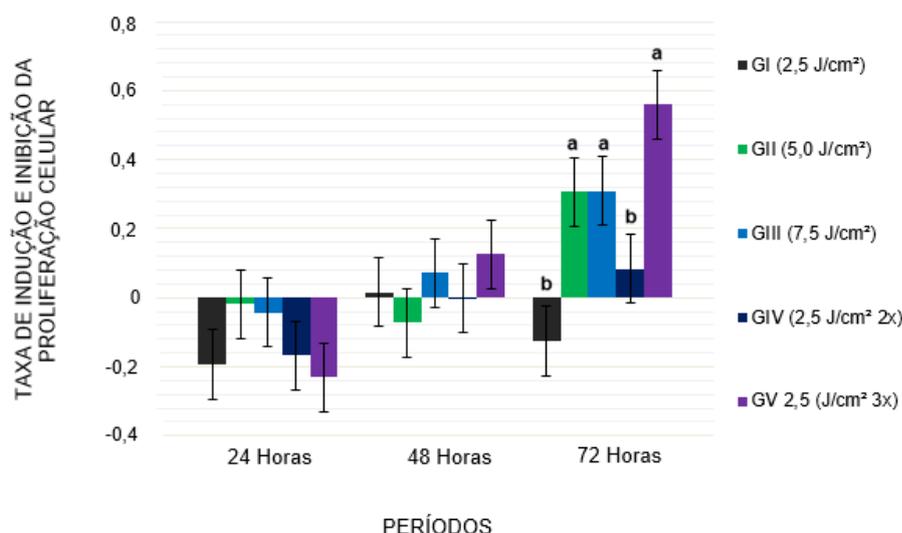


Gráfico 6 – Avaliação da indução e inibição da proliferação celular após o ensaio CV nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos para um mesmo período de avaliação ($P < 0,05$).

Fonte: Do Autor

4.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO SRB

Não houve interação entre grupo e tempo na análise estatística dos dados referentes à proliferação celular pelo método SRB ($P < 0,05$; GRÁFICO 7). Nos três períodos, houve menor proliferação celular em GI e GIV em comparação a GII, GIII, GV e GVI ($P < 0,05$, GRÁFICO 8). Além disso, para todos os grupos, observou-se um aumento na proliferação celular, sendo maior às 72 horas e menor às 24 horas ($P < 0,001$, GRÁFICO 9).

Quando os valores de absorvância de todos os grupos foram normalizados em relação ao grupo controle, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$), embora haja uma tendência de inibição da proliferação no período de 24 horas em todos os grupos, e de indução de proliferação às 72 horas exceto no grupo GI (GRÁFICO 10).

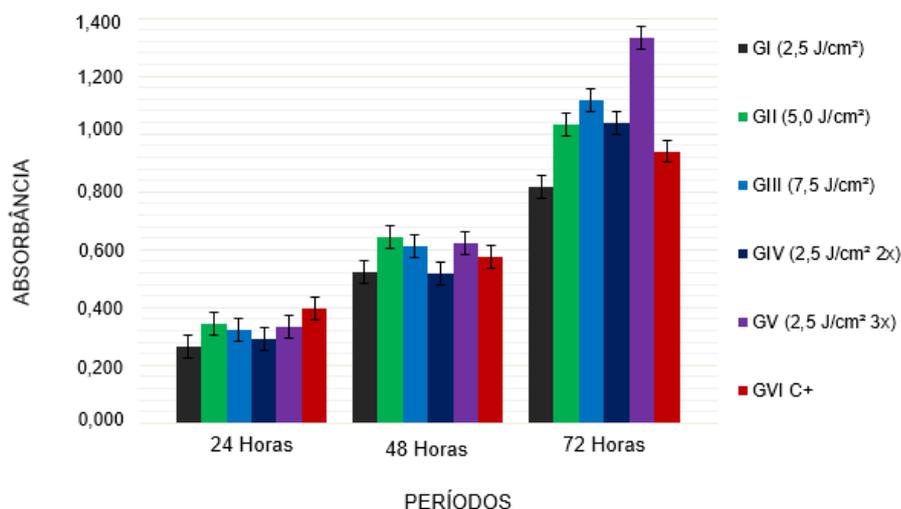


Gráfico 7 - Avaliação da proliferação celular nos grupos de diferentes densidades de energia após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: A análise de variância para essa variável foi feita utilizando a transformação de raiz quadrada para atender as pressuposições da análise. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Fonte: Do Autor.

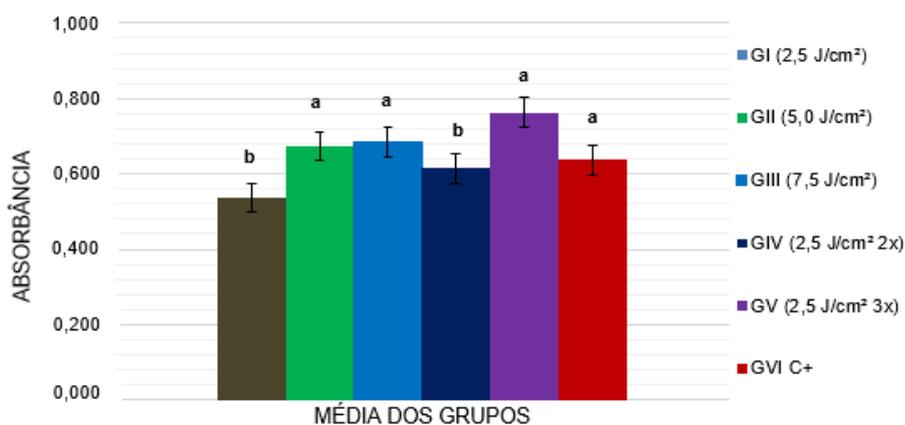


Gráfico 8 - Avaliação da proliferação celular na média dos grupos de diferentes densidades de energia após o ensaio SRB após a primeira irradiação.

Nota: A análise de variância para essa variável foi feita utilizando a transformação de raiz quadrada para atender as pressuposições da análise. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Fonte: Do Autor.

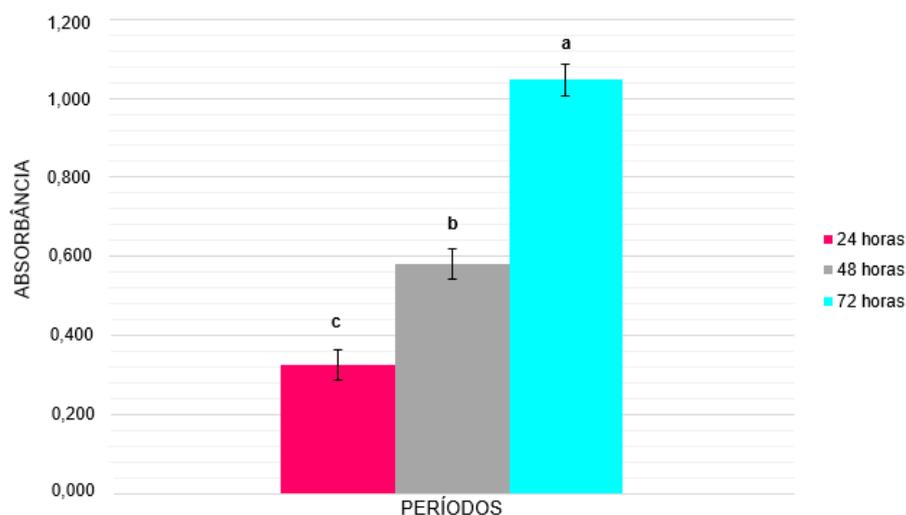


Gráfico 9 – Avaliação da proliferação celular após o ensaio SRB em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: A análise de variância para essa variável foi feita utilizando a transformação de raiz quadrada para atender as pressuposições da análise. Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença entre os tempos para um mesmo grupo experimental ($P < 0,001$).

Fonte: Do Autor.

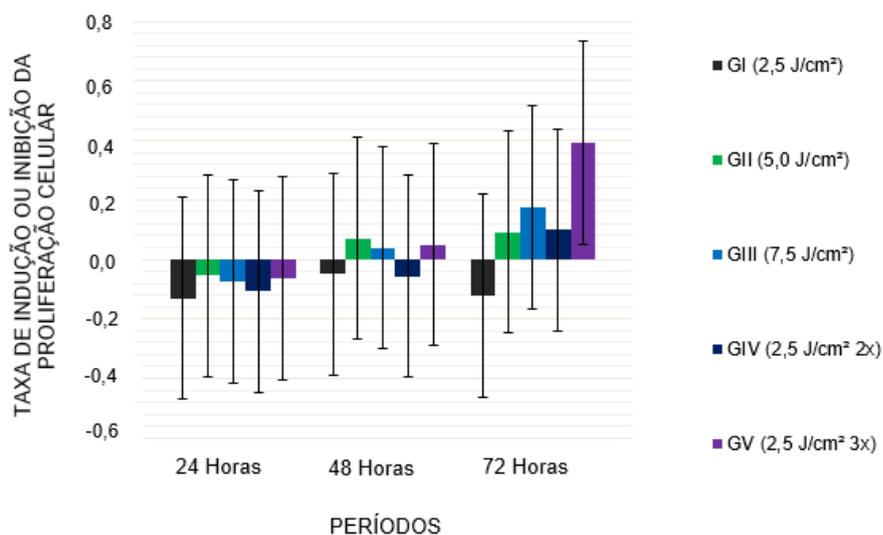


Gráfico 10 – Avaliação da indução e inibição da proliferação celular após o ensaio SRB nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a primeira irradiação.

Nota: A análise de variância para esta variável foi feita utilizando a transformação de \log_{10} ao quadrado para atender as pressuposições da análise ($P > 0,05$).

Fonte: Do Autor.

5 DISCUSSÃO

Na atualidade, a laserterapia tem emergido como uma ferramenta para auxiliar na analgesia e na regressão de edema e para acelerar a reposta reparadora de diversos tecidos após procedimentos odontológicos, proporcionando, conseqüentemente, maior conforto aos pacientes (MOURA-NETTO et al., 2016; SANTANA et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Para torná-la efetiva e acessível a pacientes e profissionais, previamente às indicações clínicas, são necessárias pesquisas para se determinar protocolos de irradiação para as diversas finalidades.

Considerando que a bioestimulação conseguida pelo LBI depende dos parâmetros de irradiação e que existem divergências na literatura quanto à dose de energia capaz de produzir estímulos benéficos nas células (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; COLUZZI, 2004; GINANI et al., 2015; MARQUES et al., 2017), neste trabalho, o LBI de InGaAIP foi utilizado no comprimento de onda de 660 nm (vermelho), potência de 10 mW e área do feixe de saída de 0,04 cm², variando a densidade de energia e quantidade de aplicações (GI: 2,5 J/cm²; GII: 5,0 J/cm²; e GIII 7,5 J/cm² em uma única irradiação; GIV: 2,5 J/cm² em duas irradiações; e GV: 2,5 J/cm² em três irradiações), o que resultou também em energias totais distintas (GI: 0,10 J; GII e GIV: 0,20 J; GIII e GV: 0,30 J). A utilização desses parâmetros baseou-se em estudo prévio (FERNANDES et al., 2018) e teve como principal objetivo, comparar os efeitos de densidades de energia iguais com diferentes quantidades de aplicações (comparação entre GI, GIV e GV) e de energias totais iguais, variando a densidade de energia e o número de aplicações (comparação entre GII e GIV e entre GIII e GV) em SHED. Diferentes densidades de energia também foram comparadas entre si (comparação entre GI, GII e GIII).

Para que o laser produza algum efeito biológico nas células é necessário que haja absorção de luz, em um comprimento de onda específico, pelos fotorreceptores, causando alterações metabólicas em resposta à luz (KARU, 1999). O principal fotorreceptor do LBI é o citocromo c oxidase, uma enzima terminal da mitocôndria que transporta elétrons para produção de energia. A absorção dos fótons pelo citocromo c oxidase determina um processo de excitação, estimulando a cadeia respiratória por aumentar reações de transferências de elétrons nas moléculas (GINANI et al. 2017^a; HUANG, 2009). Este processo desencadeia dois

tipos de reações: primárias e secundárias. A primária ocorre durante o momento da irradiação (na presença de luz) e resulta em alterações moleculares e da função do fotorreceptor. Reações secundárias ocorrem horas ou dias após a irradiação, obtendo alterações na sinalização e funções celulares (FARIVAR et al., 2014; GINANI et al., 2017^a; KARU, 1999; SCHINDL et al., 2000). Sendo assim, neste estudo, os períodos experimentais foram estabelecidos às 24, 48 e 72 horas, permitindo a avaliação das reações secundárias do LBI nas SHED, importantes no processo de reparo tecidual, como a viabilidade e a proliferação celular.

Cada uma dessas reações foi avaliada por dois métodos distintos; a viabilidade celular foi avaliada pelos ensaios MTT e EAT, enquanto que a proliferação foi avaliada pelos ensaios CV e SRB. Estes métodos apresentam princípios distintos, mas a interpretação de seus resultados podem trazer informações complementares ou confirmatórias. O ensaio MTT é usado para determinar o nível de atividade metabólica em células eucarióticas; ele é dependente da respiração mitocondrial e indiretamente serve para avaliar a capacidade de energia de uma célula (FERNANDES et al., 2018; MOSMANN, 1983; SLIWKA et al., 2016). O método de EAT é usado para determinar o número de células viáveis em uma suspensão celular; ele se baseia no princípio de que células vivas possuem membrana celular intacta que excluem certos corantes, como o azul de tripan (STROBER, 2015). O CV é um ensaio não enzimático, cujo corante tem afinidade pela superfície externa da dupla hélice do DNA. A quantidade de corante absorvido depende do conteúdo total de DNA na cultura, sendo diretamente proporcional à biomassa celular (FERNANDES et al., 2018; SLIWKA et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Finalmente, o método SRB se baseia na propriedade de ligação estequiométrica do corante a proteínas sob condições levemente ácidas e posterior extração sob condições básicas; assim, a quantidade de corante ligado pode ser usada como uma representante da biomassa celular e, então, extrapolada como uma medida da proliferação celular (ORELLANA, KASINSKI, 2016; SAKAI et al., 2010). Como a fototerapia pode estar associada ao processo de aumento de viabilidade e proliferação celular (KARU, 1989), os ensaios realizados são considerados adequados para o objetivo proposto (FERNANDES et al., 2018; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

Vale ressaltar que, no presente estudo, o intervalo de tempo entre as irradiações múltiplas foi de 6 horas, de acordo com o tempo estabelecido por

Fernandes et al. (2018). Alguns autores citam que devido ao efeito acumulativo do laser, se as irradiações acontecerem em intervalos muito próximos, pode ocorrer efeitos danosos às células irradiadas; por outro lado, se ocorrerem em intervalos muito longos, pode causar um efeito inibitório indesejado (HAUKINS, ABRAHAMSE, 2006; MENEGUZZO et al., 2008). Com base nos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular, o intervalo de tempo entre as irradiações pareceu adequado, visto que as SHED nos grupos de múltiplas irradiações (GIV e GV) apresentaram elevada atividade metabólica às 48 horas, sendo que as células de GV apresentaram também elevada taxa de proliferação às 72 horas. Os resultados encontrados nesses períodos estão diretamente associados ao tempo de duplicação das SHED, que ocorre, em média, às 41,3 horas (SUCHANEK et al., 2010).

Mester et al. (1985) afirmam que doses menores com períodos de tempo adequados entre as irradiações são mais eficazes do quando administradas de única vez. Para fibroblastos pulpares, Meneguzzo et al. (2008) encontraram que a viabilidade celular foi maior nos grupos que receberam múltiplas irradiações em comparação àqueles que receberam uma única irradiação. Fernandes et al. (2018) também demonstraram que tais células irradiadas com energia total de 0,30 J, fracionada em três aplicações de 2,5 J/cm², apresentam maior viabilidade do que aquelas que receberam uma única irradiação de 7,5 J/cm². Tal fato também foi observado em nosso estudo, visto que a energia total de 0,20 J foi mais efetiva para a indução da atividade metabólica das SHED quando realizadas duas aplicações do laser com densidade de energia de 2,5 J/cm² do que apenas uma aplicação com 5,0 J/cm². Da mesma maneira, a energia total de 0,30 J induziu maior atividade metabólica quando três aplicações de 2,5 J/cm² foram realizadas em comparação a apenas uma irradiação de 7,5 J/cm².

Em relação à proliferação celular avaliada pelo método CV, observou-se que uma única aplicação de 5,0 e 7,5 J/cm², bem como três aplicações de 2,5 J/cm² induziram maiores taxas de proliferação do que aquelas observadas para as células não irradiadas ou com uma ou duas aplicações de 2,5 J/cm² às 72 horas. Tais resultados corroboram aqueles observados por Fernandes et al. (2018) no estudo com fibroblastos pulpares, visto que os autores concluíram que uma única aplicação de 5,0 J/cm² induziu maior proliferação de fibroblastos pulpares do que duas irradiações com 2,5 J/cm².

Importante considerar que a ausência de diferenças significativas entre a resposta das células em GII e GIII (uma única irradiação com 5,0 e 7,5 J/cm², respectivamente) em todos os experimentos realizados pode ser explicada pelo fato de terem sido utilizadas densidades de energia muito próximas, causando reações celulares similares. Isso porque, embora a fotobiomodulação seja dependente da dose aplicada, existem diferentes janelas terapêuticas para a fotoestimulação efetiva, em que cada tipo celular possui seu próprio pico de irradiação ideal (BAXTER, 1997; LOW, REED, 2001; MENEGUZZO et al., 2008; TIPHLOVA, KARU, 1987). Assim, para que respostas celulares diferentes possam ser observadas possivelmente sejam necessárias irradiações com densidades de energia mais discrepantes, como realizado no estudo de Meneguzzo et al. (2008), que avaliaram as densidades de 6,3, 12,6 e 18,9 J/cm².

Além disso, a viabilidade média de SHED de 95% ao longo do período experimental foi superior àquela encontrada por Suchanek et al. (2010) que isolou e cultivou as SHED até a 19ª passagem (sem qualquer estímulo), obtendo uma viabilidade média de 90.6% (86.0-94.0%).

Devido à grande variabilidade dos parâmetros de irradiação nos diversos estudos envolvendo a terapia do LBI, torna-se difícil a comparação de nossos resultados com o de outros estudos (GINANI et al., 2015; PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; SILVA et al., 2018). Ademais, resultados de estudos *in vitro* como este devem ser interpretados com cautela, pois não podem ser extrapolados diretamente para aplicações clínicas, uma vez que a interação do laser com o tecido-alvo do organismo não pode ser reproduzida em cultura (FERNANDES et al., 2018; MARQUES et al. 2017; MOURA-NETTO et al., 2016). Portanto, mais estudos com diferentes parâmetros de irradiação tanto *in vitro* como *in vivo* deverão ser realizados para que sejam obtidos efeitos clínicos de maneira previsível após a utilização da terapia a laser em SHED.

6 CONCLUSÃO

A irradiação do laser de baixa intensidade com energia total fracionada induziu uma maior taxa de viabilidade das SHED em comparação a de única irradiação, enquanto que 2,5 J/cm² em única aplicação promoveu inibição da viabilidade celular no período de 48 horas após a primeira irradiação. Já a irradiação com doses únicas de 0,20 J e 0,30 J estimularam a proliferação celular, assim como a energia total fracionada de 0,30 J em três aplicações de 2,5 J/cm², às 72 horas.

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.**, London, v. 27, n. 1, p. 237-249, Jan. 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.**, New York, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2001.

AMORIN, B. R. et al. Mesenchymal stem cells in periodontics: new perspectives. **RGO, Rev. Gaúch. Odontol.**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 254-259, Jul.-Sept., 2017.

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

BARAL, S. et al. Effects of gastrodiae rhizoma on proliferation and differentiation of human embryonic neural stem cells. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, Heidelberg, v. 8, n. 10, p. 792-797, Oct. 2015.

BASSO, F. G. et al. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. **Int. J. Dent.**, Cairo, v. 2012, 719452, 2012.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1997.

BIDAR, M. The effect of low level laser therapy on direct pulp capping in dogs. **J. Lasers Med. Sci.**, Tehran, v. 7, n. 3, p.177-183, 2016.

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

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

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

COLUZZI, D. J. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 48, n. 4, p.751-770, Oct. 2004.

COLUZZI, D. J. Laser in dentistry - Wonderful instruments or expensive toys?. **Int. Congr. Ser.**, Amsterdam, v. 1248, p. 83-90, May 2003.

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

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

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

DING, G.; NIU, J.; LIU, Y. Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor-b1. **Hum. Cell**, Tokyo, v. 28, n. 2, p. 81-90, Apr. 2015.

EDUARDO, F. P. et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 40, n. 6, p. 433-438, Aug. 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.**, London, v. 2, n. 1, p. 16, May 2006.

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

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

FERNANDES, A. et al. Cellular response of pulp fibroblast to single or multiple photobiomodulation applications. **Laser Phys.**, Lawrence, v. 28, n. 6, p. 065604, Jun. 2018.

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

FERREIRA, M. P. P. et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 27, n. 6, p. 901-906, Dec. 2009.

FRESHNEY R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**, 6 ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2000.

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

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

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

GOLDBERG, M.; HIRATA, A. The dental pulp: composition, properties and functions. **JSM Dent.**, San Diego, v. 5, n. 1, 1079, 2017.

GONÇALVES, L. F. et al. Effect of EDTA on TGF- β 1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. e131, Dez. 2016.

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

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 97, n. 25, p. 13625-12630, Dec. 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**, London, v. 22, n. 4, p. 212-218, 1998.

HAWKINS, D. ABRAHAMSE, H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 24, n. 6, p.705-714, Dec. 2006.

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.**, Chicago, v. 37, n. 12, p. 1647-1652, Dec. 2011.

HE, H. et al. Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. **Cell Biol. Int.**, London, v. 32, n.7, p. 827-834, Mar. 2008.

HONG, J. W. Immune tolerance of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells mediated by CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T-cells and induced by TGF-β1 and IL-10. **Yonsei Med. J.**, Seoul, v. 58, n. 5, p. 1031-1039, Sept. 2017.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low-level light therapy. **Dose Response**. Amherst, v. 7, p. 358–383, Sept. 2009.

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

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochem. Photobiol. B**. Lausanne, v. 49, p. 1-17, Mar. 1999.

KWACK, K. H. et al. Human dental pulp stem cells suppress alloantigen-induced immunity by stimulating T-cells to release transforming growth factor beta. **J. Endod.**, Chicago, v.43, n.1, p. 100-108, 2016.

LI, J. SONG, L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). **Phycologia**, Berkeley, v. 46, n. 5, p. 593-599, Sept. 2007.

LIN P. S. et al. Transforming growth factor beta 1 increases collagen content, and stimulates procollagen I and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production of dental pulp cells: Role of MEK/ERK and activin receptor-like kinase-5/Smad signaling. **J. Formos. Med. Assoc.**, Taipei, v. 116, n. 5, p. 351-358, May. 2017.

LOW, L. REED, A. “**Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática**”. 3ª ed., Barueri: Ed. Manole Ltda, 2001.

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

MARQUES, M. M. et al. Photobiomodulation of dental derived mesenchymal stem cells. **Photomed Laser Surg.**, Larchmont, v. 34, n. 11, p. 500-508, Nov. 2016.

MARQUES, N. C. et al. Low-level laser therapy as an alternative for pulpotomy in human primary teeth. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 30, n. 7, p. 1815-1822, Sept. 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.**, London, v. 32, n. 7, p. 1621-1628, Sept. 2017.

MARQUES, N. P. et al., A preliminary comparison between the effects of red and infrared laser irradiation on viability and proliferation of SHED. **Lasers Med. Sci.** London, Aug. 2018.

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

MENEGUZZO, D. T. et al. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. **Proc. SPIE**, Bellingham, v. 6846 A-1, 2008.

MESTER, E. MESTER, A. F. MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

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

MOREIRA, M. S. et al. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. **J Photochem. Photobiol. B.**, Lausanne, v. 166, p. 166-180, Jan. 2017.

MORETTI, A. B. et al. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. **Int Endod J**, Oxford, v. 41, n. 7, p. 547-555, Jul. 2008.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

MOSTAFAVINIA, A. et al. Effect of in vivo low-level laser therapy on bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ovariectomy-induced osteoporosis of rats. **J Photochem Photobiol B**, Lausanne, v. 175, p. 29-36, Oct. 2017.

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

NG, G. Y. F. et al. Comparison of Single and Multiple Applications of GaAIIAs Laser on Rat Medial Collateral Ligament Repair. **Lasers Surg. Med.**, London, v. 34, p. 285-289, 2004.

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

ORELLANA, E. A. KASINSKI, A. L. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. **Bio. Protoc.**, Sunnyvale, v. 6, n. 21, Nov. 2016.

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

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

PAULY, K. et al. Insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor- β stimulate cystine/glutamate exchange activity in dental pulp cells. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, n. 7, p. 943-947, Jul. 2011.

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.**, Larchmont, v. 28, n. 1, p. 33-40, Aug. 2010.

PEREIRA, A. N. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg. Med.**, London, 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**, New York, v. 257, n. 3, p. 753-758, 1999.

RIBEIRO, M. S. et al. **Laser em baixa intensidade: Técnicas e Procedimentos Terapêuticos**. 2011.

ROMBOUTS, C. et al. Dental pulp stem cell recruitment signals within injured dental pulp tissue. **Dent. J.**, Basel, v. 4, n.2, Mar. 2016.

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

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

SANTANA, D. A. et al. Effect of low-level laser therapy (λ 780 nm) on the mechanically damaged dentin-pulp complex in a model of extrusive luxation in rat incisors. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 32, n. 9, p. 1995-2004, Dec. 2017.

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

SERITA, S. et al. Transforming growth factor- β -induced gene product-h3 inhibits odontoblastic differentiation of dental pulp cells. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 78, p. 135-143, Jun. 2017.

SHAO, M. Y. Et al. β -Catenin and Rho GTPases as downstream targets of TGF- β 1 during pulp repair. **Cell Biol. Int.**, London, v. 35, n. 2, p. 105-109, Feb. 2011.

SILVA, P. C. S. et al. Laser treatment contributes to maintain membrane integrity in stem cells from human exfoliated deciduous teeth (shed) under nutritional deficit. **Lasers Med. Sci.**, London, Jul. 2018.

SLIWKA, L. et al. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. **PLoS One**. San Francisco, v. 11, n. 5, p. 1-17, May. 2016.

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

SOARES, A. P. et al. Células-tronco em odontologia. **R. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 33-40, Jan.-Fev. 2007.

SOUZA, L. M. Effect of photobiomodulation on viability and proliferation of stem cells from exfoliated deciduous teeth under different nutritional conditions. **Laser Phys.**, Lawrence, v. 28, n. 2, 2018.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr. Protoc. Immunol.**, New York, v.111, p. 1-3, Nov. 2015.

SUCHANEK, J. et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth – isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. **Acta Med.**, Hradec Králové, v. 53, n. 2, p. 93-99, 2010.

TAGLIANI, M. M. et al. Nutritional stress enhances cell viability of odontoblast-like cells subjected to low level laser irradiation. **Laser Phys. Let.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 247-251, 2010.

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

THEOCHARIDOU, A. et al. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg-based bioceramic scaffolds under low-level laser treatment. **Lasers Med. Sci.**, London, v. 32, n. 1, p. 201-210, Jan. 2017.

TIPHLOVA, O. A. KARU, T. I. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of E. coli. **Microbiol.**, Moscow, v. 60, p.626-630, 1987.

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

TUNER, J. HODE, L. Low level laser therapy. **Clinical practice and scientific background**. Sweden: Prima Books, 1999.

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.**, Bellingham, v. 16, n. 7, p. 1-6, Jul. 2011.

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

XU, J. G. et al. Inhibition of TGF- β signaling in SHED enhances endothelial differentiation. **J. Dent. Res.**, Mumbai, v. 97, n. 2, p. 218-225, Feb. 2018.

XU, J. G. et al. TGF- β 1-induced differentiation of SHED into functional smooth muscle cells. **Stem Cell Res. Ther.**, London, v. 8, n. 1, p. 10, Jan. 2017.

YU, C.; ABBOTT, P. V. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. **Aus. Dent. J.**, Sydney, v. 52, n. 1, p. 4-16, Mar. 2007.

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

ANEXO

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão gênica e síntese proteica de células derivadas da polpa de dentes decíduos após o uso do Laser de Baixa Intensidade

Pesquisador: Mariel Tavares de Oliveira Prado

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88330218.6.0000.5417

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.768.173

Apresentação do Projeto:

Trata-se de versão 2 para correção de pendências.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente projeto será avaliar o efeito de diferentes densidades de energia do Laser de Baixa Intensidade: Na viabilidade e proliferação de células-tronco derivadas da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados e células pulpares de dentes decíduos humanos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um Projeto de Doutorado, parece interessante e bem delineado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram corrigidos e agora encontram-se adequados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram resolvidas. Projeto deve ser aprovado.

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

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP**



Continuação do Parecer: 2.768.173

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 04/07/2018, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1107652.pdf	19/06/2018 16:14:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao2.pdf	19/06/2018 16:10:32	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mariel_versao2.pdf	19/06/2018 16:09:58	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Outros	Regulamento_Biorrepositorio.pdf	19/06/2018 16:09:29	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Outros	Of_Pendencia.pdf	19/06/2018 16:08:53	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_cessao_dentes.pdf	18/04/2018 23:27:27	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Assentimento_5a9anos.pdf	18/04/2018 23:25:58	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/04/2018 23:25:46	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	QuestionarioTecnicoPesquisador.pdf	18/04/2018 23:25:21	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU DA
USP



Continuação do Parecer: 2.788.173

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mariel.pdf	18/04/2018 23:24:10	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoCompromissoPesquisadorRe sultadosPesquisa.pdf	18/04/2018 23:23:31	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	cep_docs_proj_pesquisa_carta_de_enc aminhamento_termo_de_aquiescencia.p df	18/04/2018 23:22:36	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	18/04/2018 23:22:03	Mariel Tavares de Oliveira Prado	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BAURU, 12 de Julho de 2018

Assinado por:
Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador)