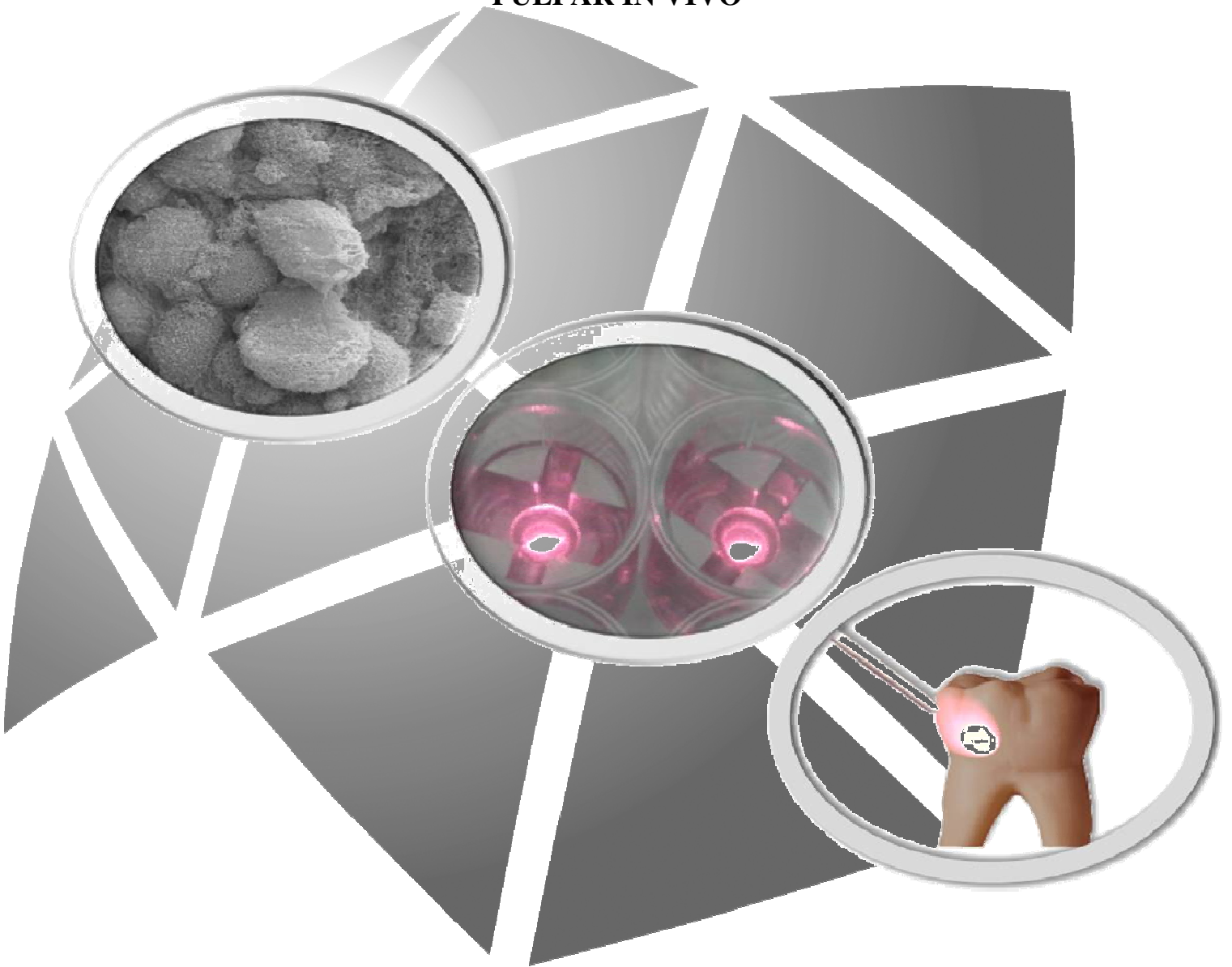




**CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE CÉLULAS  
ODONTOBLASTÓIDES IN VITRO E COMPLEXO DENTINO-  
PULPAR IN VIVO**



Araraquara  
2011

Oliveira, Camila Fávero de.

Efeito do laser de baixa intensidade sobre células odontoblastóides in vitro e complexo dentino-pulpar in vivo / Camila Fávero de Oliveira. – Araraquara: [s.n.], 2011.

146 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Fototerapia 2. Odontoblastos 3. Lasers 4. Polpa. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ceres Maria C. Galvão de Freitas, CRB-4612/8

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

**CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE CÉLULAS  
ODONTOBLASTÓIDES IN VITRO E COMPLEXO DENTINO-  
PULPAR IN VIVO**

COMISSÃO JULGADORA

DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof.Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

3º Examinador: Profa. Dra. Cristina Kurachi

4º Examinador: Prof. Dr. Edson Alves de Campos

5º Examinador: Profa. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio

:

Araraquara, 28 de março de 2011.

## DADOS CURRICULARES

### **CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA**

NASCIMENTO	14 de Julho de 1983 – São Paulo/SP
FILIAÇÃO	Antonio Carlos Oliva de Oliveira Maria Helena Fávero de Oliveira
2001/2004	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005/2006	Estágio de Atualização na Disciplina de Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2002/2005	Estágio de Atualização na Disciplina de Cirurgia e Traumatologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006/2008	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006/2008	Especialização em Odontopediatria. Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2008/2011	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Doutorado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

## **DEDICO ESSA TESE ...**

---

---

*"Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste." ( Sigmund Freud)*

### **À DEUS,**

por me fornecer a determinação e a esperança, me auxiliando e fortalecendo nos momentos necessários, sendo a luz guia e protetora nas incertezas e a força na decisão. O crescimento verdadeiro só é conquistado em sua presença. Somente perante o seu apoio o meu sonho se torna real.

### **AOS MEUS QUERIDOS PAIS,**

por me permitirem ser tudo o que sou hoje através de uma vida inteira de dedicação. Sempre compartilhando e participando integralmente de corpo e alma dos meus sonhos, lutas e conquistas. Certamente sem a presença dessas duas pessoas as glórias não teriam tanto valor, pois a presença deles torna-se essencial, à medida que eles são a força que nunca falta, o ar que motiva, a alegria que fortalece e a vida que busca. Não existem palavras suficientes para defini-los nem tampouco para agradecê-los. Meus pais serão sempre meus exemplos e ideais. Mãe e Pai, obrigada por me ensinarem a buscar sempre vãos maiores, mas preservando em tudo o respeito, à seriedade e a alegria de viver.

### **AO AMADO IRMÃO,**

por me ensinar o verdadeiro sentido de amar e com isso completar minha vida. Seu apoio emocional e psicológico foram essenciais nesses anos, nas longas noites de conversa e de broncas me trazendo para a realidade. Obrigada pela paciência dedicada, e amor dedicado diariamente, mesmo que distante. Você foi essencial para mais uma vitória. Simplesmente... te amo!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....

---

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação,  
Abraçar a vida com paixão,  
perder com classe e vencer com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito boa para ser insignificante.”*  
(Charles Chaplin)

Ao mestre e amigo **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pelos ensinamentos pacientemente transpassados ao longo de tantos anos. Por suportar meus desafios e me orientar não apenas na pesquisa, mas principalmente na vida acadêmica. Suas atitudes refletem o profissional determinado e batalhador ao qual aprendi a admirar e a respeitar.

As minhas professorinhas **Tia Jô e Tia Elisa**, pelos momentos e ensinamentos compartilhados. Por muitas vezes o carinho de mãe foi essencial para me dar suporte e trilhar o caminho.

Aos meus queridos **Tio Thomé e Tia Irene**, por me aceitarem como uma filha e cuidarem tão carinhosamente de mim, todos esses anos. A vida com vocês tornou-se mais preenchida em Araraquara. Respeito, admiração e amor refletem o que sinto por vocês!

Aos meus amigos, em especial ao **Matheus, Danilo, Bárbara, Júlia, Maíra e Sérgio**, um sentimento mágico e sincero. Por toda uma história traçada e conquistada ao longo desses anos....., muitas risadas, lágrimas, vitórias e desafios divididos e outros mais a serem compartilhados... O sucesso também é de vocês!

Aos **Padrinho** (in memoriam) e **madrinha** queridos tanto amor dedicado, todos os colos e beijos trocados..... A saudade fica, mas o carinho reina e torna a distancia irrisória em momento tão especiais..... Nossa ligação é divina e nosso amor está muito além desse mundo. Seus ensinamentos me auxiliaram a chegar até aqui!

Ao **Tio Mário** e a **Tia Marli**, um amor especial e diferente...., agradeço não a tia mas a amiga companheira que preenche minha existência. Seus ensinamentos e sua tolerância são importantes no trilhar da caminhada. Ao **Thiago** e ao **Matheusinho** agradeço as muitas horas de amor incondicional compartilhadas, vocês também são meus maninhos.....

Aos **meus tios**, pelo carinho e apoio dedicados em todos esses anos, muitas risadas e verdades surgiram nessa convivência.

Aos **meus avós** (in memorian), uma presença espiritual em todos os momentos da minha vida, de onde estiverem sei que intercedem por mim.....

A **Nancy** pela amizade compartilhada ao longo desses anos. Foi muito bom poder contar com nossas diversas aventuras, pelos finais de semana enfiados nos estudos, e principalmente com o respeito e o carinho.

À **Cristiane, Beatriz, Amanda, Margareth, Juliana Feltrin, Fabiano, Marília, Leticia (e seus filhos)** uma amizade construída diariamente com muito carinho e respeito. Nossas conversas foram essenciais e nosso companherismo mostrou o quanto se pode ser feliz quando se tem amigos..... Obrigada por todo carinho!!!

À **Vovo Bruna, Tio João, Tia Arlete** (in memorian), **Claúdia e Paulo**, por me apoiarem sempre, sendo para mim uma segunda família. Meu amor por vocês é imenso. Claúdia meus passos seguiram o caminho que você muitas vezes me ensinou..... Obrigada por tudo!!!!

Ao **Leandro e sua família**, seu carinho e respeito me apoiaram em mais uma conquista. Sua paciência foi primordial, mas o amor foi determinante. Adoro você!

## AGRADECIMENTOS.....

---

---

*“A gente não faz amigos  
reconhece-os”  
(Vinicius de  
Morais)*

À Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP, nas pessoas da ex-diretora **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio** e atual diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla e vice-diretora Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon .**

Aos professores do Departamento de Odontopediatria, pelos ensinamentos e motivações. Ao **Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu-e-Lima** pela convivência e ensinamento durante o estágio e ao **Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani** pelos conselhos e discussões cirúrgicas e de vida pessoal.

À minha turma do mestrado, **Laine, Hérica e Ana**, a convivência fortaleceu os traços de amizade, nossa amizade se tornou única e sincera..... Cada uma aprendeu a respeitar os limites alheio, espero que o tempo não apague essa conquista.

A **Fernanda Basso** que foi essencial não apenas na parte experimental desse projeto, mas como um amiga que soube me ajudar em muitos momentos da vida acadêmica.

Ao **Kina** pelo suporte psicológico, sua amizade é para uma vida

Aos amigos da pós-graduação **Juliana, Carmem, Simone, Juliana Feltrin, Fabiano, Marco, Marília, Leticia, Margareth, Beatriz, Amanda, Ana Paula, Luciana, Camila, Thalita** todo momento dividido promoveu o surgimento de uma lembrança sincera e verdadeira.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria **Soninha, D. Odete, Dulce, Cristina, Tânia, Pedrinho, Totó e Celinha** pela ajuda e colaboração diária.



À minha turma do CEPOF, **Merê, Orlando, Didi, Lili** essa amizade surgiu sem compromisso..... os desafios exigiram a convivência e essa rendeu frutos, vocês fazem parte de uma turminha chamada amigos. Orlando e Mere obrigada pela paciência e auxílio no desenvolvimento do meu sonho.

Aos co-orientadores **Prof. Dr. Vanderlei Bagnato e Cristina Kurachi** com muita paciência vocês me mostram como é possível traçar sonhos e conquistá-los. O aprendizado é diverso, a admiração magnífica e o carinho eterno. Obrigada por comporem meu quadro de mestres.

Aos amigos **Rosana e Lucas**, pelo carinho e atenção dedicados em uma parte experimental. Momentos divertidos, mas bem ajuizados.

À turminha do Laboratório **Ana Paula Turrioni, Nancy, Adriano, Kina, Fernanda, Ana Paula D. Ribeiro, Diana, Pedro e Luciana**, uma nova família que com muito respeito aprendeu a conviver e aceitar as doideiras de cada um.

A querida **Juliana Pirola**, pela paciência em ensinar repetidamente os mistérios da química e socorrendo sempre que preciso nas técnicas do laboratório. Sua amizade é auxílio nos momentos de dificuldade....

Aos **funcionários**, em especial à **Silvana, e professores do Departamento de Fisiologia e Patologia** por me receberem tão carinhosamente e por me apoiarem em todas as dificuldades, auxiliando com suas palavras e conhecimentos.

Aos amigos vigias e da portaria da faculdade **Eliezer, Euclides, Gea, Guiomar, Luis, Marta, Noêmia, Nunes, Rodrigo e Denilson** pelas horas de conversa, cuidados e preocupações, principalmente quando a noite virava dia, essa amizade preenchia a ausência da família.

Aos funcionários da Pós-Graduação, **Rosângela, Alexandre, Flávia** e em especial a **Mara** com seu jeito meigo e carinhoso sempre me ajudando a resolver os problemas mais impossíveis. Mesmo que você não saiba, tenho um carinho muito grande por ti.

A todos os funcionários da Biblioteca que me auxiliaram desde a graduação, em especial a *Ceres*, pelas correções na Tese. A amizade de vocês torna o ambiente mais prazeroso.

Aos funcionários da cirurgia, em especial ao *Toninho*, por me defender e me apoiar em tudo. Horas de conversa..... naqueles cafezinhos da cozinha ou na salinha dos prontuários.

Aos funcionários da manutenção, triagem, esterilização e emergência pelos socorros prestados, amizade e carinho dedicados nesses anos.

À todos os professores da Faculdade por me orientarem na formação profissional, me incentivarem no cuidado aos outros e me mostrarem o tratamento holístico.

Principalmente a *Fapesp* por viabilizar economicamente a execução desse projeto de pesquisa e desse meu sonho.

**A TODOS QUE FIZERAM PARTE DA MINHA VIDA POR UM LONGO OU  
CURTO PERÍODO DE TEMPO, PELOS QUE ME APOIARAM E ME  
INCENTIVARAM MEU SINCERO OBRIGADO.....**

*Um Belo Coração.*

*Autor Desconhecido (Tradução Livre de Iza Rocha)*

*"Há muito tempo, em algum lugar no meio das montanhas havia um vale muito especial. O mundo exterior não conhecia este vale nem sabia nada a respeito das pessoas que ali moravam, também elas muito especiais. Sabe, o que tornava aquele povo tão especial era o fato de elas terem o seu coração do lado de fora do peito, de maneira que todos o viam. Havia corações grandes e pequenos, uns eram bonitos outros, não tão belos.*

*Um dia um jovem no meio da cidade proclamava ter o coração o mais bonito de todo o vale. Uma grande multidão o cercou e todos admiravam seu coração, pois era absolutamente perfeito. Não havia uma única marca ou uma falha nele. Sim, concordavam todos, era realmente o mais belo coração que já tinham visto. O jovem estava orgulhoso, e anunciava cada vez mais alto o seu belo coração.*

*De repente, um homem muito mais velho apareceu do meio da multidão e disse "Como? Seu coração nem chega perto da beleza do meu." A multidão e o jovem olharam o coração do homem. Batia vigorosamente, mas estava coberto de cicatrizes; havia lugares onde pequenos pedaços tinham sido removidos e substituídos por outros, que não tinham encaixado direito e várias bordas irregulares. Havia ainda muitas fendas profundas onde faltavam pedaços.*

*As pessoas olhavam pasmadas – "como pode ele dizer que tem o coração mais bonito que o jovem?" pensavam. O jovem olhou o coração do velho, viu seu estado e riu. "Você deve estar brincando!" disse "compare seu coração com o meu, o meu é perfeito e o seu, uma confusão de cicatrizes e remedos".*

*"Sim, o seu está perfeito, mas eu jamais trocaria com você", disse o velho. "Veja, cada cicatriz representa uma pessoa a quem eu dei meu amor – eu tiro um pedaço do meu coração e dou-lhe. Frequentemente as pessoas dão um pedaço dos seus corações em troca, para colocar no buraco que ficou, mas porque os pedaços não são exatamente iguais, tenho algumas bordas ásperas, que eu estimo porque me lembram do amor que compartilhamos."*

*"Houve vezes que dei pedaços do meu coração e a outra pessoa não retribuiu. São as fendas vazias – dar amor é arriscar. Apesar destas fendas serem dolorosas, elas permanecem abertas lembrando-me o amor que tenho por elas também, e tenho esperança que um dia elas possam retribuir e completar o buraco que tenho à espera."*

*"Então, agora você vê o que é a verdadeira beleza?"*

*O jovem estava mudo, lágrimas correndo pelo rosto. Aproximou-se do velho e levou a mão ao seu coração jovem, bonito e perfeito. Tirou dele um pedaço e com mãos trêmulas ofereceu ao velho. O outro aceitou sua oferta, colocou-a no seu próprio coração e tirou um pedaço do seu, velho e cheio de cicatrizes, e colocou na ferida aberta no coração do jovem. Não encaixou perfeitamente, e as bordas ficaram meio irregulares. O jovem olhou seu coração, já não mais perfeito, mas mais bonito do que nunca, agora que o amor do mais velho fluía nele.*

*Abraçaram-se e caminharam lado a lado.*

*Não tenha medo de demonstrar seu amor às pessoas que lhe são importantes.*

*A vida é isso!*

*Nós todos perdemos oportunidades demais e lamentamos demais. Simplesmente pare de lamentar e crie novas oportunidades de partilhar seu amor com todos os que fazem a diferença na sua vida."*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 PROPOSIÇÃO .....	24
3 MATERIAL E MÉTODO .....	25
Experimento 1: Efeito direto do laser de baixa intensidade	
1 Determinação dos parâmetros do laser .....	25
2 Manutenção das células MDPC-23 em cultura .....	29
3 Experimento 1: Irradiação direta das células.....	30
4 Análise do metabolismo celular por meio da produção de Desidrogenase Succínica (MTT assay) .....	32
5 Dosagem da proteína total e análise da atividade de fosfatase alcalina .....	33
5.1 Dosagem da proteína total .....	33
5.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP) .....	34
6 Análise da morfologia celular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	35
Experimento 2: Efeito transdentinário (ação indireta) do laser de baixa intensidade	
1 Obtenção dos discos de dentina.....	36
2 Medição da condutância hidráulica .....	37
3 Experimento 2: Irradiação indireta das células .....	39
4 Avaliações do metabolismo celular, proteína total, fosfatase alcalina e morfologia das células .....	42
5 Expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I .....	43
5.1 Extração de RNA .....	43
5.2 RT- PCR.....	44
5.2.1 Síntese do cDNA.....	44
5.2.2 PCR .....	45
5.2.3 PCR quantitativo em tempo real .....	45
Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato	

1 Delineamento do estudo in vivo .....	47
2 Protocolos Experimentais .....	48
3 Avaliação histopatológica.....	50
4 RESULTADO .....	52
Experimento 1: Irradiação direta das células.....	52
Experimento 2: Irradiação indireta das células .....	72
Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato .....	85
5 DISCUSSÃO.....	94
Experimento 1: Irradiação direta das células.....	94
Experimento 2: Irradiação indireta das células .....	100
Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato .....	108
6 CONCLUSÃO.....	119
7 REFERÊNCIAS .....	120
8 ANEXO .....	135

Oliveira CF. Efeito do laser de baixa intensidade sobre as células odontoblastóides. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011.

## RESUMO

O laser de baixa intensidade (LBI) tem sido amplamente utilizado no tratamento da hipersensibilidade dentinária. Pesquisas in vivo demonstraram que o LBI pode promover um aumento na síntese de matriz de dentina e menor grau de inflamação pulpar. Entretanto, o mecanismo que rege este processo permanece desconhecido. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o metabolismo de células odontoblastóides em cultura quando submetidas à irradiação direta ou transdentinária (indireta) com LBI e seus efeitos sobre o complexo dentino-pulpar. Células odontoblastóides MDPC-23 foram cultivadas em placas de acrílico de 24 compartimentos ou sobre a superfície pulpar de discos de dentina, com 0,4 mm de espessura e obtidos de terceiros molares, adaptados em câmaras pulpares artificiais. As células foram irradiadas diretamente por 3 vezes (a cada 24 horas) com 2, 4, 10, 15 ou 25 J/cm<sup>2</sup> e submetidas a avaliação de metabolismo (MTT), síntese de proteína total e de fosfatase alcalina. Os dois melhores parâmetros de irradiação direta foram utilizados para o ensaio de irradiação transdentinária (indireta) das células. Como resultado da etapa direta de irradiação, foi demonstrado que tanto os valores do MTT quanto os níveis de proteína total e fosfatase alcalina apresentaram valores estatisticamente superiores nas doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup> (Mann-Whitney p<0.05). Assim, estas doses foram usadas no teste de irradiação indireta, obtendo-se aumento do metabolismo, síntese de proteína e fosfatase alcalina estatisticamente superior apenas para a dose de 25 J/cm<sup>2</sup> (Mann-Whitney p<0.05). Desta maneira, foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que os maiores valores de bio-estimulação das células MDPC-23 ocorreram quando estas foram

irradiadas com 25 J/cm<sup>2</sup>. Para avaliação dos efeitos do LBI sobre o complexo dentino-pulpar, foram confeccionadas cavidades de classe I nos primeiros molares superiores de ratos. Imediatamente após, as cavidades foram irradiadas com a dose de 25 J/cm<sup>2</sup> (Grupo Irradiado), ou seja, melhor parâmetro obtido no experimento transdentinário. Para o grupo controle, as cavidades foram preparadas, porém não submetidas a irradiação (Grupo Não Irradiado). Para ambos os grupos, as cavidades foram restauradas com cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável. Os segundos molares do Grupo Não Irradiado foram utilizados como Grupo Controle Íntegro. Decorridos os períodos de 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados e suas maxilas submetidas ao processamento laboratorial, o que permitiu avaliação microscópica da resposta do complexo dentino-pulpar a irradiação com LBI. Na análise histológica dos dentes, observou-se, no período inicial (7 dias), para os Grupos Irradiados ou Não Irradiados, discreta desorganização da camada de odontoblastos localizada abaixo do assoalho cavitário. Porém, para ambos os grupos e também para o Grupo Controle Íntegro, houve manutenção da integridade do complexo dentino-pulpar. No período de 30 dias, foi observado para os grupos que receberam preparos cavitários (Irradiados ou Não Irradiados), que a maioria dos dentes apresentava discreta deposição de dentina terciária na região mais superior do corno pulpar relacionado com a cavidade dentária, sem ocorrência de reação inflamatória. Porém, quando comparado aos grupos controle (Não Irradiado e Íntegro) os dentes pertencentes ao Grupo Irradiado apresentavam maior número de vasos sanguíneos dilatados e congestos tanto na polpa coronária quanto radicular. Estes achados histológicos caracterizaram uma maior vascularização nos dentes submetidos a irradiação com LBI (25 J/cm<sup>2</sup>).

**PALAVRAS – CHAVE:** Fototerapia; odontoblastos; lasers; polpa.

## **ABSTRACT**

Low level laser (LLL) has been widely used for treatment of dentin hypersensitivity. In vivo studies have shown increased synthesis of dentin matrix and less severe pulpal inflammation in teeth irradiated with LLL. However, the mechanisms that guide this process remain unknown. This study evaluated the metabolism of cultured odontoblast-like cells submitted to direct or transdentinal LLL irradiation as well as its effects on pulp tissue of first molars of rats. The odontoblast-like cells MDPC-23 were cultured ( $12,500 \text{ cells/cm}^2$ ) on either 24-well acrylic plates or the pulpal surface of dentin discs adapted to artificial pulp chambers. In the first experiment, the cells received direct irradiation for 3 times (every 24 hours) with the following energy doses:  $2 \text{ J/cm}^2$ ,  $4 \text{ J/cm}^2$ ,  $10 \text{ J/cm}^2$ ,  $15 \text{ J/cm}^2$ , and  $25 \text{ J/cm}^2$ . Then, the irradiated cells were evaluated concerning their metabolism, synthesis of total protein (TP) and alkaline phosphatase (ALP). The two best direct irradiation parameters obtained in this first protocol were selected to be used in the second experiment, in which the MDPC-23 cells were irradiated through 0.4mm dentin discs obtained from human teeth (indirect irradiation). For the direct assay, the MTT values as well as the TP and ALP levels were significantly higher at the doses of 15 and  $25 \text{ J/cm}^2$  (Mann-Whitney;  $p < 0.05$ ). When both of these energy doses were used for the indirect irradiation assay, it was observed a statistically significant increase in cell metabolism and synthesis of TP and ALP only for  $25 \text{ J/cm}^2$  (Mann-Whitney;  $p < 0.05$ ). Under the experimental conditions, it may be concluded that the highest biostimulation values were obtained when the MDPC-23 cells were irradiated with  $25 \text{ J/cm}^2$ . For evaluation of the effects of LLL on the pulp-



dentin complex, class I cavities were prepared in the first superior molars of rats. After this, the cavities were immediately irradiated with the dose of 25 J/cm<sup>2</sup> (Irradiated Group), which was the best energy dose determined in the previous transdental experiment. For the control group, the cavities were not submitted to irradiation (Non-Irradiated Group). For both groups, the cavities were restored with light-cured resin modified glass ionomer cement. The second molars of the non-irradiated group were used as Intact Control Group. After the periods of 7, 15 and 30 days, the animals were sacrificed and their jaws submitted to the laboratory processing. The stained sections were evaluated under light microscope. At 7-days period, it was observed for the Irradiated Groups and Non-Irradiated Groups a discrete disorganization of the odontoblasts related to the cavity floor. However, for these both groups and also for the Intact Control Group there was maintenance of the integrity for the pulp-dentin complex. At 30-day period, it was observed in those groups that received cavity preparation (Irradiated or Non-Irradiated), discrete deposition of the tertiary dentin in the pulp zone related to the cavity floor. No inflammatory reaction on time disorganization occurred in most of teeth evaluated. However, when compared to the Intact and Non-Irradiated Control Groups the teeth in which the cavities were irradiated with LLL exhibited a larger number of dilated and congested blood vessels in the pulp tissue. Therefore, the histological pulpal features observed in this study determined a greater vascularization in the teeth submitted to irradiation with LLL with 25/Jcm<sup>2</sup>.

**KEY-WORDS:** Phototherapy; odontoblast; Fototerapia; lasers; pulp.

# 1 INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade dentinária é uma condição sintomática comum na clínica odontológica e que causa muito desconforto ao paciente e pode resultar em inflamação pulpar (Pashley<sup>79</sup>, 1990, Dababneh et al.<sup>24</sup>, 1999, Schwarz et al.<sup>88</sup>, 2002). Tal patologia é caracterizada como uma dor transitória a partir da dentina exposta, em resposta a estímulos térmicos, táteis ou químicos (Friedmann et al.<sup>29</sup>, 1991, Dababneh et al.<sup>24</sup>, 1999).

Qualquer local de dentina exposta pode exibir tal acometimento, localizando-se, em geral, na região vestibulo cervical de caninos e pré-molares. A etiologia da exposição dentinária é considerada multifatorial envolvendo incorreta escovação, recessão gengival, dieta inapropriada (Tate et al.<sup>94</sup>, 2006) bem como forças oclusais excêntricas (Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000). A prevalência desta condição varia de 10% a 20%, dependendo do estudo e da população.

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar o mecanismo da hipersensibilidade dentinária, porém, nenhuma delas conduz a um perfeito entendimento de como os estímulos aplicados na superfície de uma dentina sensível são transmitidos para a polpa (Dababneh et al.<sup>24</sup>, 1999). Três teorias têm sido sugeridas para explicar este fenômeno: Terminações Nervosas, Odontoblástica e Hidrodinâmica. Esta última, a qual tem sido a mais aceita pela comunidade científica (Banfield et al.<sup>6</sup>, 2004), foi proposta por Brännström<sup>7</sup> (1986), e sugere que o rápido deslocamento do fluido no sentido da polpa ou em sentido contrário, em resposta à estímulo tátil, térmico, químico ou osmótico (Dababneh et al.<sup>24</sup>, 1999). Em geral, os tratamentos da hipersensibilidade de dentina visam obliterar os túbulos dentinários para reduzir a movimentação do fluido dentinário (Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000). Dentre eles, pode-se citar: aplicação tópica de

substâncias químicas na superfície da dentina; uso de dentifrícios contendo substâncias ativas; vedamento da dentina exposta com um material restaurador (West et al.<sup>103</sup>, 1998, Dababenh et al.<sup>24</sup>, 1999); e laser de baixa intensidade (LBI) (Villa et al.<sup>101</sup>, 2007).

O tratamento ideal da hipersensibilidade deve ser indolor, de fácil aplicação, com ação rápida e efetiva por um longo período, não ser irritante para o tecido pulpar ou induzir efeitos colaterais (Ciaramicoli et al.<sup>19</sup>, 2003). A aplicação do laser para o tratamento da hipersensibilidade dentinária tem sido muito pesquisada (Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000, Schwarz et al.<sup>88</sup>, 2002, Ciaramicoli et al.<sup>19</sup>, 2003).

Num estudo in vivo (Marsilio et al.<sup>64</sup>, 2003), foi demonstrado que o laser, no comprimento do vermelho, proporcionou redução na sensibilidade dolorosa em torno de 90%. Em outro estudo (Ladalaro et al.<sup>55</sup>, 2004) foi demonstrado que o comprimento no infra-vermelho próximo foi mais eficaz na faixa etária de 25-35 anos para as avaliações imediatas e tardia.

O efeito bioestimulante do laser de baixa intensidade sobre odontoblastos resulta em neoformação dentinária, através da produção de matriz de dentina reacional, a qual pode obliterar os túbulos dentinários (Dababenh et al.<sup>24</sup>, 1999, Villa et al.<sup>101</sup>, 2007). Além disso, existe um efeito analgésico concomitante, devido à liberação da endorfina na sinapse das terminações nervosas localizadas nos túbulos dentinários (Coombe et al.<sup>20</sup>, 2001).

Desde que o laser foi desenvolvido, vários pesquisadores têm estudado suas possibilidades de aplicação na área da saúde, sendo que especial atenção tem sido dispensada para a Odontologia. Segundo Parker<sup>78</sup> (2007), o primeiro laser foi desenvolvido por Mester e colaboradores, em 1960. Porém, as primeiras pesquisas com o laser na área Odontológica tiveram início apenas quatro anos depois (Kimura et al.<sup>50</sup>,

2000), sendo que a utilização dessa nova tecnologia pelos clínicos permanece limitada pelo fato de que os parâmetros específicos para cada tratamento não estão estabelecidos.

O laser interage com diferentes tipos de tecido causando diversas reações. Muitas pesquisas têm demonstrado que a foto-estimulação pelo laser de baixa intensidade (LLLT) além de causar um aumento na síntese de ATP (Lubart et al.<sup>59</sup>, 1992, Karu et al.<sup>42</sup>, 1995), aceleração do reparo tecidual (Koutná et al.<sup>51</sup>, 2003), desencadeamento da produção de ácido nucléico e aumento da divisão celular (Kikuchi et al.<sup>48</sup>, 1996). Alguns tipos específicos de laser apresentam também capacidade de estimulação da síntese e deposição de matriz de colágeno por fibroblastos (Nara et al.<sup>73</sup>, 1992, Romanos et al.<sup>85</sup>, 1995, Reddy et al.<sup>82</sup>, 1998), bem como o aumento na atividade mitocondrial (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996) e proliferação celular (Koutná et al.<sup>51</sup>, 2003). Também, foi demonstrado que o laser induz uma reação foto-química, ou seja, há uma direta indução na síntese de enzimas pela ação primária da luz sobre os lisossomos e mitocôndrias das células irradiados (Karu et al.<sup>40,42</sup>, 2005,1995).

A janela terapêutica do laser, específica para cada tipo de célula, ainda não foi determinada (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Coombe et al.<sup>20</sup>, 2001) e dessa maneira, diversos estudos in vitro têm sido desenvolvidos. Tem sido demonstrado que o laser infravermelho promove proliferação celular em culturas de osteoblastos (Ozawa et al.<sup>77</sup>, 1998) e aumento dos níveis de ATP mitocondrial e da adesão celular em células do tipo tumoral (HeLa) (Karu et al.<sup>40,42,44</sup>, 1995, 1996, 2005).

A irradiação com o laser infravermelho em culturas diversas tais como, queratinócitos, células endoteliais, osteoblastos e de mucosa de hamsters, induz à proliferação celular (Grossman et al.<sup>33</sup>, 1998, Khadra et al.<sup>46</sup>, 2005, Moore et al.<sup>69</sup>, 2005), diferenciação (Aihara et al.<sup>1</sup>, 2006) e aumento na síntese de DNA (Yamada et al.<sup>104</sup>, 1991) e de proteínas ósseas (Hamajima et al.<sup>34</sup>, 2003, Khadra et al.<sup>45</sup>, 2005, Stein

et al.<sup>92</sup>, 2005), bem como formação de tecido ósseo com ausência de danos genotóxicos ou mesmo citotóxicos (Kujawa et al.<sup>53</sup>, 2004).

Em estudo *in vivo*, a aplicação do laser infravermelho aplicado sobre o miocárdio de ratos infartados proporcionou aumento significativo na expressão de VEGF (vascular endothelial growth factor). Quando aplicado sobre os molares de rato, a irradiação induziu a formação de dentina terciária, sem causar danos significantes ao tecido pulpar (Tate et al.<sup>94</sup>, 2006). Em seres humanos, a aplicação do laser vermelho sobre dentina do assoalho cavitário causou bioestimulação dos odontoblastos, resultando em aumento na síntese de colágeno tipo III, tenastina e fibronectina (Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006). Todavia, os possíveis mecanismos de resposta dessas células odontoblásticas, em nível molecular, frente à irradiação com o laser, ainda permanece indefinido (Khadra et al.<sup>46</sup>, 2005).

Para o caso da irradiação no tratamento da hipersensibilidade dentinária, pode-se sugerir que os odontoblastos que revestem internamente a dentina relacionada com a área de exposição dos túbulos ao ambiente externo, estejam em condições contínuas de estresse químico (produtos bacterianos e outros) e/ou mecânico (movimentação do fluido dentinário dentro dos túbulos). Desta forma, os resultados clínicos positivos, relatados através da aplicação da laserterapia, poderiam estar relacionados com o estímulo transdentinário destes odontoblastos, os quais passariam a participar efetivamente do processo de reparo tecidual, através da síntese e expressão de algumas proteínas específicas da matriz dentinária, resultando em esclerose dos túbulos e/ou deposição de dentina terciária reacional intrapulpar.

Tem sido demonstrada a real propagação do laser através da dentina, a qual ocorre por dispersão da luz através da microestrutura dos túbulos dentinários (Kienle et al.<sup>47</sup>, 2006). Todavia, os dados científicos que caracterizam a propagação

transdentinária do laser e sua relação com a redução da hipersensibilidade dentinária através do aumento na atividade metabólica dos odontoblastos, bem como o mecanismo de resposta em nível molecular de células com fenótipo de odontoblasto, submetidas à irradiação com o laser infra-vermelho próximo, ainda permanece indefinido (Khadra et al.<sup>45</sup>, 2005; Oliveira et al.<sup>75</sup>, 2008). Assim, torna-se necessário, neste momento, determinar os efeitos de parâmetros específicos de laser que proporciona bioestimulação direta de células de linhagem odontoblástica.

Com a finalidade de observar e entender o metabolismo das células secretoras de matriz extracelular (ECM) na presença de substâncias sintéticas, biológicas ou estímulos externos, alguns pesquisadores desenvolveram modelos de estudo *in vitro* que mimetizam o funcionamento de tais células em situações fisiológicas (MacDougall et al.<sup>61</sup>, 1995, Kikuchi et al.<sup>48</sup>, 1996, Hanks et al.<sup>35</sup>, 1998). Destes modelos experimentais, os que têm maior reprodutibilidade de resultados e maior facilidade de manipulação, são os de células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura. Algumas linhagens estabelecidas deste tipo de célula estão sendo efetivamente descritas na literatura (MacDougall et al.<sup>61</sup>, 1995, Costa et al.<sup>22</sup>, 1999, He et al.<sup>36</sup>, 2004, Aihara et al.<sup>1</sup>, 2006). Todas estas linhagens apresentam evidências científicas de síntese de proteínas típicas dos odontoblastos, tais como sialoproteína e fosforina da dentina, e que estão diretamente associadas à alta atividade de fosfatase alcalina e síntese de proteínas de matriz de dentina (particularmente colágeno tipo I). Desta maneira, assim como todas as linhagens de células com fenótipo de odontoblastos disponíveis atualmente, a linhagem imortalizada MDPC-23 (Mouse Dental Papillae Cells-23) também apresenta características que permitem uma avaliação detalhada do efeito de fatores estimulantes (tal como o laser de baixa intensidade e proteínas bioativas), que podem sobre-regular sua atividade sintética e secretora. Estas células odontoblastóides

MDPC-23 estabelecidas por Hanks et al.<sup>35</sup> na Universidade de Michigan (EUA) são derivadas de uma linhagem imortalizada proveniente da papila dentária do molar de camundongo, as quais apresentam características semelhantes às células odontoblásticas in vivo, tais como alta atividade de fosfatase alcalina, formação de múltiplos nódulos e crescimento em multicamadas celulares, bem como a expressão de sialoproteína e fosfoforina de dentina (Hanks et al.<sup>35</sup>, 1998). Tais células têm sido alvo de intensas pesquisas para avaliação do metabolismo quando colocadas em diferentes situações de estímulo biológico ou de estresse (Costa et al.<sup>21,22,23</sup>, 1999, 2003, 2007, He et al.<sup>36</sup>, 2004, Aranha et al.<sup>4</sup>, 2006). Todavia, os dados científicos que caracterizam a resposta em nível molecular de células com fenótipo de odontoblasto, submetidas à irradiação com o laser infra-vermelho próximo, ainda permanece indefinido (Khadra et al.<sup>46</sup>, 2005; Oliveira et al.<sup>75</sup>, 2008) bem como o mecanismo da propagação transdentinária do laser e sua relação com a redução da hipersensibilidade dentinária através do aumento na atividade metabólica dos odontoblastos

Assim, torna-se necessário, neste momento, determinar os parâmetros de bioestimulação direta de células de linhagem odontoblástica mais adequados, para posteriormente estudar, através de pesquisas com câmaras pulpares in vitro, ou mesmo em dentes in vivo, a possível atividade transdentinária da laserterapia nas células odontoblastóides, e sendo assim, determinar de forma inovadora os reais efeitos dessa terapia nesse tipo celular.

## **2 PROPOSIÇÃO**

### **Proposição Geral:**

Avaliar o efeito do laser de baixa intensidade, em parâmetros específicos, sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 in vitro, bem como sobre o tecido pulpar in vivo.

### **Proposição Específica 1:**

Avaliar o efeito direto do laser de baixa intensidade em cinco doses de energia distintas sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 submetidas a diferentes condições de carência nutricional. Para isso será avaliado metabolismo e morfologia celular, bem como a regulação da síntese e expressão de fosfatase alcalina e o conteúdo de proteína total.

### **Proposição Específica 2:**

Avaliar o efeito transdentinário do laser de baixa intensidade nas duas melhores doses obtidas no experimento direto sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Para isso será avaliado metabolismo e morfologia celular, bem como a regulação da atividade enzimática (fosfatase alcalina) e o conteúdo de proteína total, complementado pela análise da expressão gênica de proteínas típicas da matriz de dentina que codificam para colágeno tipo I (Col-1) e fosfatase alcalina (FA).

### **Proposição Específica 3:**

Avaliar, o efeito da melhor dose de energia, determinada no experimento da ação transdentinária sobre células odontoblastóides in vitro, quando aplicada sobre o complexo dentino-pulpar de molares de rato. Para isso será realizado cortes histológicos dos dentes após 7, 15 e 30 do processo de irradiação.



### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### Experimento 1: Efeito direto do laser de baixa intensidade

##### 1 Determinação dos parâmetros do laser

Neste trabalho de pesquisa foi utilizado um dispositivo (LASERTable) desenvolvido pelo Grupo de Óptica (GO) do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP) sob coordenação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. Este dispositivo é composto por 12 diodos que emitem um comprimento de onda de 780 nm (Lubart et al.<sup>59</sup>, 1992, Grossman et al.<sup>33</sup>, 1998, Karu et al.<sup>44</sup>, 1996, Demidova-Rice et al.<sup>25</sup>, 2007, Gavish et al.<sup>30</sup>, 2008, Rochkind et al.<sup>84</sup>, 2009). Os diodos, do tipo InGaAsP (arseneto de índio gálio e fosfato), foram posicionados na LASERTable, de tal maneira que quando ativados simultaneamente, cada um deles irradiava, individualmente, um único compartimento do total de 12 presentes em placa de cultura de células com 24 compartimentos (Figura 1A/B).

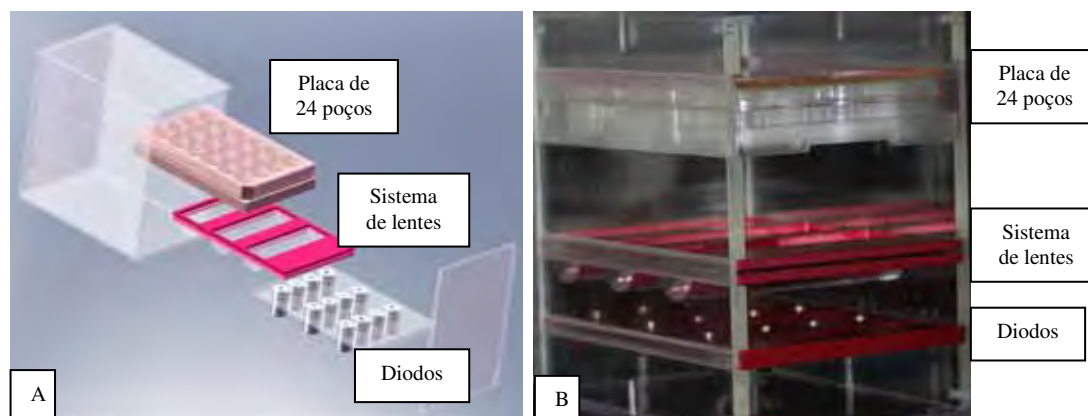


FIGURA 1 – A – Figura esquemática do Dispositivo de irradiação; B – Figura da LASERTable

Os parâmetros estabelecidos para este estudo foram os seguintes: Comprimento de Onda - 780 nm; e Densidade de Energia - 2 J/cm<sup>2</sup>; 4 J/cm<sup>2</sup>; 10 J/cm<sup>2</sup>; 15 J/cm<sup>2</sup>; e 25 J/cm<sup>2</sup> (Tabela 1). As densidades de energia avaliadas diretamente sobre

as células MDPC-23 foram estabelecidas de acordo com pesquisas prévias realizadas em diferentes culturas (Coombe et al.<sup>20</sup>, 2001, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003, Khadra et al.<sup>45,46</sup>, 2005,2005 Aihara et al.<sup>1</sup>, 2006). Baseado nos resultados obtidos nesta primeira etapa da pesquisa (Experimento 1: efeito celular direto do laser), foram selecionados os dois parâmetros mais efetivos para serem avaliados na segunda etapa da pesquisa (Experimento 2: efeito indireto transdentinário). Cada diodo foi posicionado a uma distância padronizada das células em cultura com o intuito de envolver, de forma uniforme, a área da base de cada compartimento (2,0 cm<sup>2</sup>). Em função do anteparo de acrílico (base da placa de 24 poços) as perdas de energia foram consideradas durante o processo de irradiação e desta maneira, a irradiância emitida pela LASERTable (22mW/cm<sup>2</sup>) era maior do que a que incidia na células(20mW/cm<sup>2</sup>), visando compensar essas perdas e garantir que os parâmetros incidentes nas culturas fossem previamente determinados para este estudo.

Tabela 1 – Tempo de Irradiação em função das Densidades de Energias proposta no projeto inicial (Parâmetros: Área = 2,0 cm<sup>2</sup>; Potência Ótica = 40 mW)

DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm <sup>2</sup> )	TEMPO DE IRRADIAÇÃO (s)
	Segundos (s)
2	100
4	200
10	500
15	750
25	1250

A potência total de irradiação da LASERTable era de 40 mW e a irradiância de 20 mW/cm<sup>2</sup>, levando-se em consideração a perda de potência óptica em cada compartimento devido a presença do acrílico (tampa da placa ou fundo do compartimento). A Figura 2 demonstra que a distribuição óptica tem um comportamento próximo do gaussiano, evidenciando que houve uma redução da divergência original do diodo na área do compartimento irradiado. A partir desses dados

e utilizando o valor da área de cada compartimento ( $2,0 \text{ cm}^2$ ), os tempos de irradiação, necessários para alcançar as densidades de energia propostas no presente projeto de pesquisa, puderam ser calculados.

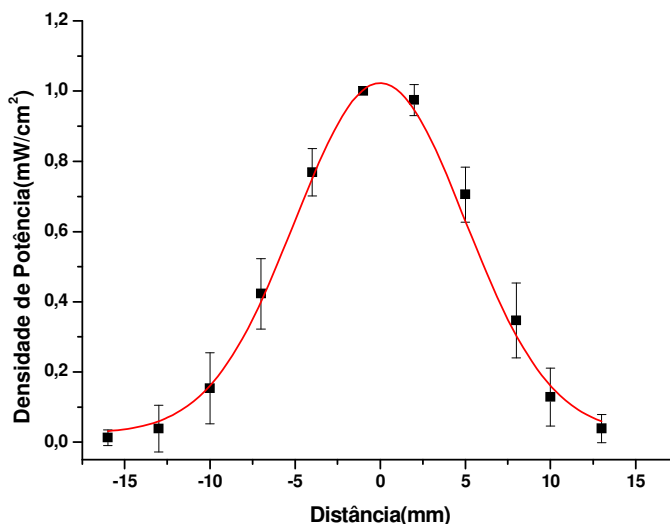


FIGURA 2 – Distribuição de potência óptica relativa ao longo do diâmetro de um compartimento da placa. O comportamento aproximadamente gaussiano enfatiza a correção da divergência do feixe LASER.

O meio de cultura utilizado nesse experimento foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co - St. Louis, MO, EUA) com corante, visto que a medição realizada por meio do espectrógrafo de transmitância USB2000 (Ocean Optics – Dunedin, FL, EUA), com uma interface elaborada no programa Lab View, revelou um baixo coeficiente de absorção desse corante (aproximadamente 5%) para a radiação infravermelha com pico em  $780 \pm 10$ -nm. A utilização de corante no DMEM é importante, pois ele permite detectar rapidamente qualquer contaminação pela variação em sua tonalidade decorrente da alteração do pH no meio. O resultado da avaliação do coeficiente de absorção do meio de cultura é apresentado na Figura 3.

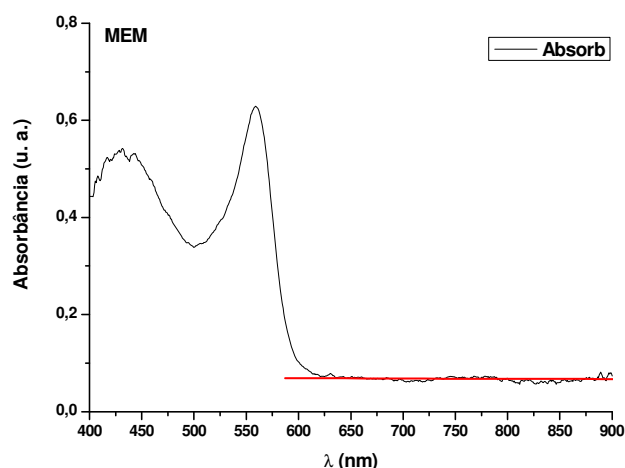


FIGURA 3 - Gráfico da absorvância do meio de cultura celular baseado em DMEM com corante.

O monitoramento da variação de temperatura do meio de cultura selecionado é de suma importância para a avaliação da resposta celular (Zach et al.<sup>105</sup>,1965, Kreisler et al.<sup>52</sup>, 2003, Mochizuki-Oda et al.<sup>67</sup>,2002, Kadhra et al.<sup>45</sup>,2005, Amano et al.<sup>3</sup>, 2006), visto que o aumento de temperatura para cerca de 42°C causar morte de células pulpares (Zach et al.<sup>105</sup>,1965). Dessa maneira, o uso de um multímetro e um termistor calibrado e fixado na base dos compartimentos da placa de acrílico, possibilitou a análise da variação de temperatura na base dos compartimentos preenchidos com meio de cultura com diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) (DMEM sem SFB; DMEM + 2% SFB; DMEM + 5% SFB e DMEM + 10% SFB). Após irradiação por um tempo total de 1300 segundos a maior variação de temperatura foi de 0,8°C, dado apresentado na Figura 4, reduzindo o risco de danos térmicos às células MDPC-23 em função da discreta elevação da temperatura que não é suficiente para causar morte celular.

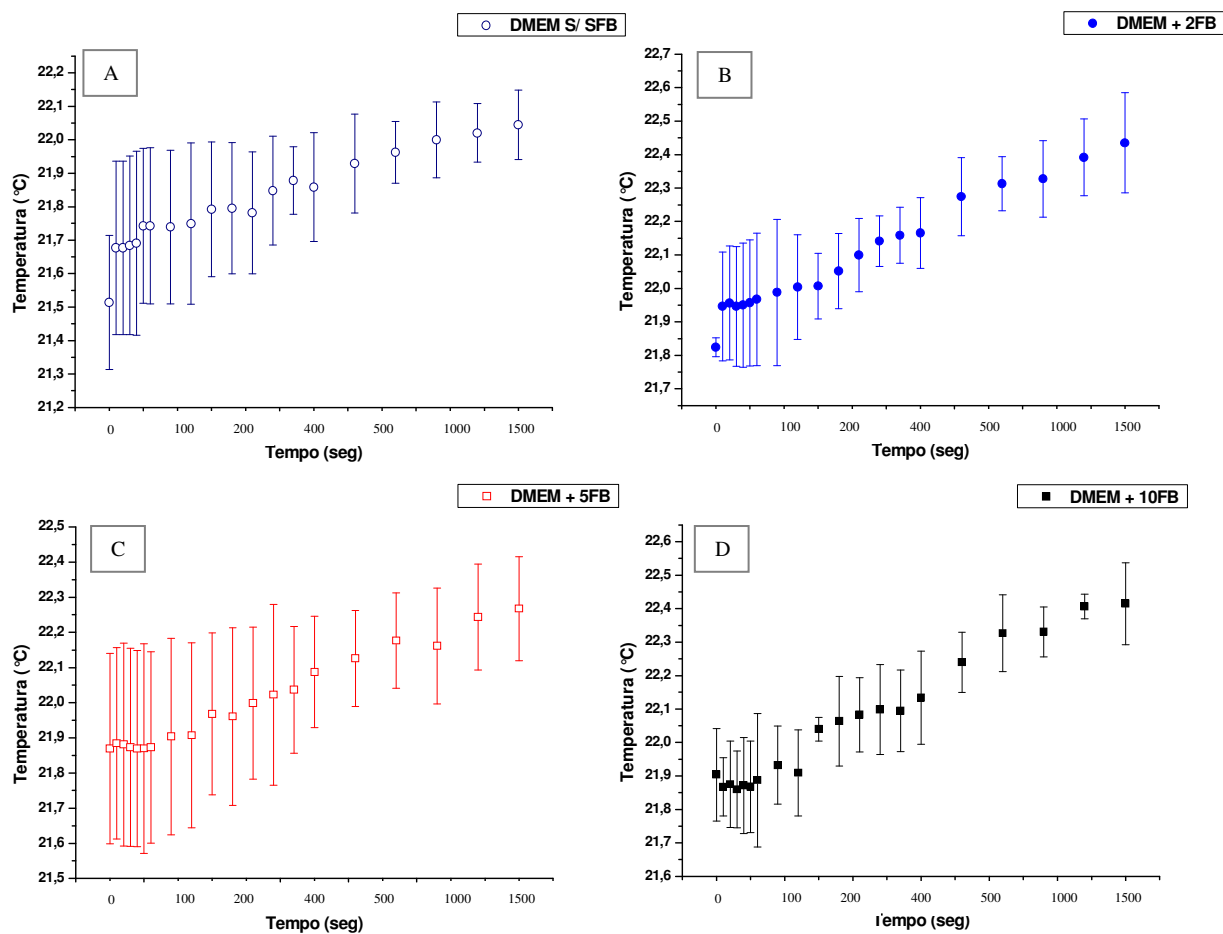


FIGURA 4 - Gráficos representativos da alteração de temperatura no DMEM em diferentes concentrações de SFB, quando irradiado pela LASERTable. **A** - DMEM sem SFB; **B** - DMEM + 2% SFB; **C** - DMEM + 5% SFB; **D** - DMEM + 10% SFB.

## 2 Manutenção das células MDPC-23 em cultura

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm<sup>2</sup> (Costar Corp. - Cambridge, MA, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co. - St. Louis, MO, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab - Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO - Grand Island, NY, EUA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias e mantidas em incubadora (Isotemp Fisher Scientific - Pittsburgh, PA, EUA) com atmosfera umedecida contendo

5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar e temperatura de 37°C, até que fosse obtido o número adequado de células para a pesquisa.

### **3 Experimento 1: Irradiação direta das células**

Células foram cultivadas (12.500 células/cm<sup>2</sup>) em 12 compartimentos de placas de acrílico esterilizadas com 24 compartimentos. Para esta cultura celular, foi utilizado DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO<sub>2</sub> na temperatura de 37°C, por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi aspirado, sendo novo DMEM, agora suplementado com 2%, 5% (indução de estresse) ou 10% de SFB, aplicado sobre as células por 24 horas. Imediatamente antes de iniciar a irradiação das células, os meios de cultura foram novamente trocados, mantendo a mesma concentração de soro fetal de acordo com os grupos experimentais e controles estabelecidos (2%, 5% ou 10% de SFB). Então, a luz proveniente da LASERTable foi aplicada na base de cada placa de acrílico, de acordo com os parâmetros já definidos.

A redução do soro fetal bovino (2% ou 5% de SFB) no meio de cultura foi baseada em pesquisas prévias, as quais demonstraram que células em cultura respondem de maneira mais efetiva a um estímulo quando submetidas a condições de estresse, tal como carência nutricional (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003, Jia et al.<sup>37</sup>, 2004, Stein et al.<sup>92</sup>, 2005).

As células em cultura foram irradiadas a cada 24 horas, num total de 3 aplicações durante três dias consecutivos (Grossman et al.<sup>33</sup>, 1998, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003, Hamajima et al.<sup>34</sup>, 2003, Kreisler et al.<sup>52</sup>, 2003, Jia et al.<sup>37</sup>, 2004). Após a última irradiação, as placas de 24 compartimentos permaneceram em incubadora pelo período de 3 horas ou 72 horas, totalizando um período de 6 dias ou 9 dias de cultura respectivamente (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996). Após este tempo, as células foram submetidas à

avaliação da atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH), expressão de proteína total e fosfatase alcalina, bem como análise da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura. Os grupos experimentais e controles estabelecidos de acordo com os parâmetros de aplicação do laser e condições de estresse estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Apresentação dos grupos experimentais e controles segundo parâmetros do laser e condições de estresse celular

DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB		
	10%	5%	2%
2	Grupo 1a	Grupo 1b	Grupo 1c
0	Controle 1a	Controle 1b	Controle 1c
4	Grupo 2a	Grupo 2b	Grupo 2c
0	Controle 2a	Controle 2b	Controle 2c
10	Grupo 3a	Grupo 3b	Grupo 3c
0	Controle 3a	Controle 3b	Controle 3c
15	Grupo 4a	Grupo 4b	Grupo 4c
0	Controle 4a	Controle 4b	Controle 4c
25	Grupo 5a	Grupo 5b	Grupo 5c
0	Controle 5a	Controle 5b	Controle 5c

\* N= 40 - total de amostras por grupo.

Para os grupos controle, os mesmos procedimentos de manipulação das células foram realizados, inclusive o posicionamento da LASERTable na base de cada placa de 24 compartimentos. Todavia, o laser não foi ativado, pois este procedimento de aplicação direta da luz sobre as células MDPC-23 em cultura ocorreu apenas para os grupos experimentais. Contudo, para o protocolo de irradiação, o tempo foi a única variável que modificada com o intuito de obter as doses de energia propostas. Assim, cada dose de energia apresentava seu respectivo controle, que permaneceu fora da incubadora o mesmo período dos grupos irradiados, eliminando, desta maneira, a variável tempo da análise.

## **4 Análise do metabolismo celular por meio da produção de Desidrogenase**

### **Succínica (MTT assay)**

Do total de quarenta amostras, dezoito de cada grupo experimental e de cada grupo controle foram utilizadas para a avaliação da produção da enzima desidrogenase succínica (SDH). Esta avaliação foi realizada por meio da aplicação do método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT Assay, Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), após 6 dias e 9 dias de cultura. Este método determina a atividade da SDH produzida pelas mitocôndrias presentes nas células, caracterizando o metabolismo celular. Para a preparação da solução de MTT, 25 mg do sal de metiltetrazolium foram pesados em balança analítica de alta precisão (AG 2000 GEHAKA - Diadema, SP, Brasil) e, posteriormente, adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), alcançando uma mistura final de concentração igual a 5mg/mL (Mosmann<sup>70</sup>, 1983).

Sobre as células cultivadas em placas de 24 compartimentos aplicou-se 900 µL de meio de cultura (DMEM), sem SFB, associado a 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL do sal metiltetrazolium em PBS). As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 700 µL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Este procedimento tem o objetivo de dissolver os cristais violeta resultante da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp. - Cambridge, MA, EUA). A viabilidade celular foi



avaliada de maneira proporcional à absorvância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE - Lês Ulis, França).

A absorvância foi expressa em valores numéricos, os quais foram submetidos à análise estatística para indicar o metabolismo das células irradiadas ou não.

## **5 Dosagem de proteína total e análise da atividade de fosfatase alcalina**

Do total de 40 amostras por grupo, 18 foram selecionadas para análise do metabolismo celular (MTT assay) e 4 para avaliação da morfologia celular (MEV). Assim, as 18 amostras restantes foram utilizadas para determinação da dosagem de proteína total, sendo que destas mesmas amostras foram obtidas alíquotas para análise da atividade de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 irradiadas ou não.

### **5.1 Dosagem da proteína total**

A dosagem de proteína total foi realizada para cada grupo experimental e controle, 6 dias e 9 dias de cultura, segundo protocolo de Read e Northcote<sup>81</sup> (1981). O meio de cultura foi aspirado e as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. A lise das células foi realizada adicionando-se 1,1 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma – Aldrich - St Louis, MO, EUA) em cada compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas e 1 mL de cada compartimento foi transferido para tubos Falcon (Corning Incorporated - Corning , NY, EUA) devidamente identificados (tubos testes), sendo que para o tubo representando o branco, foi acrescentado 1 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma – Aldrich - St Louis, MO, EUA) foi adicionado em todos os tubos, sendo agitados por 10 segundos em agitador de tubos (Phoenix AP 56 - Araraquara, SP, Brasil) e permanecendo por 20 minutos em temperatura ambiente.

Após esse período, acrescentou-se em cada tubo, 500 µL de Solução de Folin e Ciocalteau's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich - St Louis, MO, EUA) e novamente agitou-se por 10 segundos em agitador de tubos. Trinta minutos após, três alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader, Hercules, CA, EUA).

A dosagem de proteína total foi calculada multiplicando-se a absorbância do teste pelo fator de calibração.

## **5.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)**

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada 6 dias e 9 dias de cultura, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A. - Lagoa Santa, MG, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente (Roy<sup>86</sup>, 1970).

O meio de cultura foi aspirado e as amostras lavadas três vezes com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. A lise das células foi realizada adicionando-se 1,1 mL de Lauril Sulfato de Sódio 0,1% (Sigma – Aldrich - St Louis, MO, EUA) em cada compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. Enquanto isso, os tubos Falcon (testes, padrão e branco) foram devidamente identificados e 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit) foram adicionados em cada tubo. Apenas no

tubo padrão foi acrescentado 50 µL do padrão 45 U/L (reagente nº 4 do Kit). Decorridos os 40 minutos da lise celular, os tubos foram colocados no banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) a 37°C por 2 minutos. As amostras foram, então, homogeneizadas e 50 µL de cada compartimento foram transferidos para os tubos testes, mantidos em banho-maria e gentilmente agitados. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado 2 mL de Reagente de Cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit). A absorbância dos tubos testes, padrão e branco foi determinada em espectrofotômetro (Micronal B382 - São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda de 590 nm.

A atividade de fosfatase alcalina foi calculada multiplicando-se a absorbância do teste pelo fator de calibração. Em seguida, os valores obtidos foram normalizados pelo valor do padrão, dividindo-se o valor da ALP pelo valor obtido com o padrão ( $\mu\text{moltimolf/h}/\mu\text{g}$ ).

## **6 Análise da morfologia celular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para cada grupo do experimental e/ou controle, foram preparadas 4 amostras representativas para análise da morfologia das células MDPC-23 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para os grupos nos quais as células foram tratadas diretamente com o laser e para seus respectivos grupos controle, discos de vidro esterilizados foram posicionados na base de 4 compartimentos de cada placa antes de se proceder o cultivo celular. Para isto, as células tratadas diretamente com o laser foram fixadas por 2 horas em glutaraldeído a 2,5%.

Após fixação das células por 2 horas em glutaraldeído a 2,5%, estas foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem) e então pós-fixadas por 60 minutos em 200 µL de tetróxido de ósmio 1%. As amostras foram

desidratadas em trocas ascendentes de soluções de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 minutos em cada solução), sendo finalmente submetidas à secagem por meio do solvente de baixa tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, EUA) e mantidas em dessecador durante 12 horas. Finalmente, as amostras foram fixadas em “stubs”, metalizadas com ouro, e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – EUA Inc. - Peabody, MA, EUA).

## **Experimento 2: Efeito transdentinário (ação indireta) do laser de baixa intensidade**

### **1 Obtenção dos discos de dentina**

Sessenta terceiros molares humanos hígidos foram obtidos junto ao Banco de Dentes oficializado da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, para o desenvolvimento do presente estudo, tendo sido este aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo nº 41/06 – **ANEXO 1**). Os dentes foram imersos em etanol 70% por 5 dias e submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e debris aderidos à sua superfície. Da região central da coroa de cada dente foi obtido um disco de dentina com aproximadamente 0,4 mm de espessura, a qual foi determinada por meio da utilização de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. – São Paulo, SP, Brasil). Para obtenção destes discos de dentina, foi utilizado um disco de diamante (11-4254, 4”x 0,012”/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda. - Lake Bluf, IL, EUA) acoplado a uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda. - Lake Bluf, IL, EUA). As superfícies dos discos de dentina foram lixadas e regularizadas com lixas

d'água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda. - Jundiaí, SP, Brasil), sendo que durante este procedimento, os discos sofreram freqüentes avaliações, com o objetivo de se certificar que a espessura final seria de 0,4 mm (Lanza<sup>56</sup>, 2009).

Para desinfecção dos discos de dentina, estes foram imersos, de maneira individual, em 1 mL de glutaraldeído a 2,5% aplicado em placas de acrílico (Costar Corp. - Cambridge, MA, EUA), com 24 compartimentos (Lanza<sup>56</sup>, 2009). Após 6 horas, os discos foram lavados (3 trocas de 5 minutos cada) com tampão fosfato (PBS - pH 7,4). Uma solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada, por 2 minutos, sobre os discos de dentina com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer*, preparando os espécimes para o teste de permeabilidade. Além disso, este procedimento proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular. Após condicionamento da dentina, a solução de EDTA foi lavada das superfícies dos discos através da aplicação, por 60 segundos, de água deionizada esterilizada. Finalmente, os discos de dentina foram submetidos, individualmente, ao teste de condutância hidráulica.

## **2 Medição da condutância hidráulica**

A condutância hidráulica expressa a facilidade com que um fluido pode mover-se através de um determinado tecido com área conhecida e sob uma pressão específica, em um determinado espaço de tempo. Outhwaite et al.<sup>76</sup>, em 1974, desenvolveram um dispositivo para facilitar o estudo da permeabilidade dentinária, conhecido por *In Vitro Pulp Chamber* ou câmara de filtração.

Para a determinação da condutância hidráulica, foi utilizada, neste experimento, uma câmara de filtração que apresenta um compartimento superior e outro

inferior, os quais são adaptados por rosqueamento, sendo que entre eles é posicionado o disco de dentina a ser avaliado. O sistema começa a funcionar quando a válvula da coluna de água de uma altura de 1,8 m (correspondendo à pressão de 180 cm H<sub>2</sub>O ou 17,65 Kpa) é aberta e libera a água que exerce uma pressão hidrostática. Este reservatório ou coluna d'água é conectado diretamente a uma micropipeta através de capilares de polietileno siliconado com diâmetro de 18 Gauges (Embramed - São Paulo, SP, Brasil). A pressão é expressa em centímetros de água (cm H<sub>2</sub>O), ou então pode ser convertida para Kpa, onde 1 cm H<sub>2</sub>O = 0,098 Kpa. A micropipeta está justaposta a uma escala de medição em milímetros, a qual permite medir o deslocamento do líquido numa fração de tempo, conforme a velocidade de filtração dos discos de dentina. O deslocamento da água deionizada foi visualizado através da movimentação de uma microbolha criada por uma seringa acoplada a uma extensão capilar entre a micropipeta e a câmara de filtração. Esta câmara de filtração é a parte final do sistema que abriga os discos de dentina e fica conectada à coluna de pressão hidrostática por meio dos capilares de polietileno.

Para a correta interpretação dos resultados foi realizada a medição dos índices iniciais de filtração para todos os discos de dentina previamente ao início da aplicação do laser. Este cuidado permitiu reduzir a provável interferência da estrutura da dentina no resultado desta pesquisa, pois este tecido dentário pode ser anatomicamente variável. Após os teste de condutância hidráulica, os 60 discos de dentina foram distribuídos em 3 grupos de 20 discos cada, de modo que não houvesse diferença estatisticamente significativa entre os valores numéricos médios de condutância hidráulica para cada grupo estabelecido.

### 3 Experimento 2: Irradiação transdentinária das células

Os discos de dentina selecionados para este experimento sofreram redução da sua área total com ponta diamantada cilíndrica (número 1095 - KG Sorensen – Cotia, SP, Brasil) em alta rotação, com acabamento em baixa rotação, de tal forma que o diâmetro final dos discos foi de 8 mm. Este procedimento foi realizado com o objetivo de criar condições para posicionar estes discos, com sua superfície pulpar voltada para cima, numa câmara pulpar in vitro (CPIV) especialmente preparada para o desenvolvimento da presente pesquisa (Figura 5).

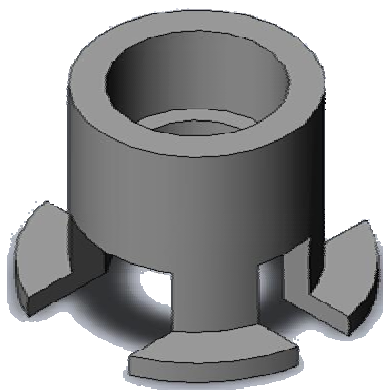


FIGURA 5 - Esquema ilustrativo da câmara pulpar in vitro.

Este recurso permitiu a aplicação do laser sobre a superfície oclusal dos discos, para então determinar a possível bioestimulação celular transdentinária. Os conjuntos disco de dentina/CPIV foram autoclavados individualmente em recipientes de vidro contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à 120°C e pressão de 1 Kgf, sendo posteriormente posicionados em placas de acrílico de 24 compartimentos. No interior de uma câmara de fluxo laminar (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), estes conjuntos disco/CPIV foram posicionados individualmente, de tal maneira a permitir que as células MDPC-23 fossem semeadas (30.000 células/cm<sup>2</sup>) sobre a superfície pulpar dos discos. As placas com os conjuntos disco/CPIV foram mantidas por 24 horas em incubadora com

atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. Após este período, o meio de cultura foi aspirado, sendo que para os grupos experimentais e controle, um novo meio de cultura, suplementado com duas diferentes porcentagens de soro fetal bovino (melhor porcentagem avaliada no Experimento 1 e 10% SFB) foi aplicado sobre as células por 24 horas. Imediatamente antes de iniciar a irradiação das células, os meios de cultura foram trocados, mantendo a mesma concentração de soro fetal de acordo com os grupos experimentais e controle estabelecidos. Então, o laser foi aplicado, através do uso da LASERTable na superfície oclusal dos discos de dentina (Figura 6), o qual estava voltado para baixo. Os parâmetros de laser aplicados neste Experimento 2 (células irradiadas indiretamente) foram àqueles que determinaram os melhores resultados de bioestimulação direta das células cultivadas (determinados no Experimento 1). Todavia, devido à presença do anteparo de dentina, ocorreram perdas de energia durante a irradiação numa intensidade de 10 vezes o valor da potência. Dessa maneira, para garantir que os parâmetros incidentes sobre as células cultivadas sobre a dentina fossem os mesmos que resultaram nos melhores índices de bioestimulação observados no Experimento 1, os parâmetros de irradiação emitidos pelos diodos foram ajustados de tal maneira que as células receberam, através da dentina, as mesmas densidades de energia determinadas como bioestimuladoras no experimento anterior. Essas foram determinadas à partir da potência que atravessou os discos de dentina e alcançou as células e que foram determinadas por meio de um medidor de potência, bem como pela área do disco que foi medida.



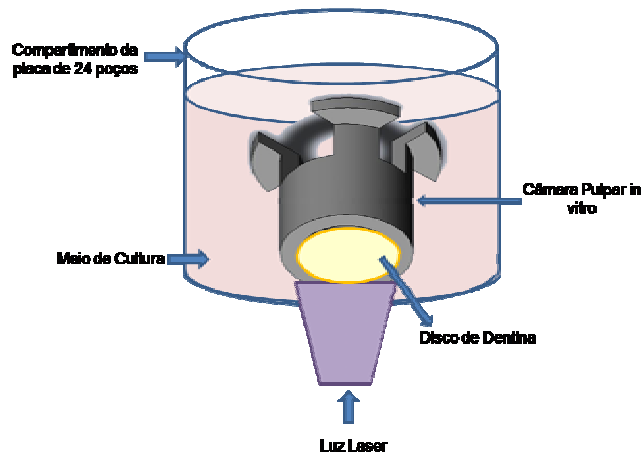


FIGURA 6 - Esquema ilustrativo do procedimento de irradiação utilizando a câmara pulpar in vitro. Observe que o disco de dentina é irradiado através da base dos compartimentos da placa de acrílico.

O procedimento de aplicação do laser através da LASERTable foi repetido a cada 24 horas, resultando em um total de 3 aplicações durante três dias consecutivos. Imediatamente após a última irradiação, as placas de acrílico com seus respectivos conjuntos disco/CPIV foram colocadas em incubadora, onde permaneceram pelo período mais favorável avaliado no primeiro experimento (6 dias e 9 dias de cultura). Após este tempo, as células foram submetidas à avaliação da produção de SDH, proteína total, fosfatase alcalina, avaliação da expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I pela técnica do RT-PCR, além da análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura.

Para os grupos controle 1a, 1b, 2a, e 2b, os mesmos procedimentos de manipulação das amostras foram realizados, inclusive com o posicionamento das placas sobre a LASERTable. Todavia, os diodos não foram ativados.

Os grupos experimentais e controle, estabelecidos de acordo com o número de discos de dentina e condições de estresse celular, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Apresentação dos grupos experimentais e controles de acordo com o tipo de tratamento dos discos de dentina

DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm <sup>2</sup> )	GRUPO (n=20)	
	Melhor condição estresse	10% SFB
15	Grupo 1 a	Grupo 1 b
Controle 1	Controle 1 a	Controle 1 b
25	Grupo 2 a	Grupo 2 b
Controle 2	Controle 2 a	Controle 2 b

#### **4 Avaliação do metabolismo celular, proteína total, fosfatase alcalina e morfologia das células**

As três primeiras avaliações que foram realizadas tiveram suas metodologias detalhadamente descritas no Experimento 1. Porém, para este Experimento 2 os volumes dos reagentes foram proporcionalmente ajustados de acordo com o volume máximo suportado pela câmara pulpar in vitro. Para a análise da morfologia celular em MEV, as células aderidas ao substrato dentinário foram primeiramente submetidas ao processo de fixação (glutaraldeído 2,5%). Após este procedimento, os discos de dentina foram cuidadosamente removidos das CPIVs e posicionados em compartimentos individuais de novas placas de 24 compartimentos com superfície oclusal, onde as células foram cultivadas, voltada para cima. Então, foi realizada a pós-fixação das células com tetróxido de ósmio e o processamento laboratorial de rotina, como anteriormente descrito. Todavia, para este Experimento 2, os próprios discos de dentina foram fixados nos “stubs”, metalizados com ouro, e levados para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – EUA Inc. - Peabody, MA, EUA).

Neste Experimento 2, foi realizado também a avaliação da expressão de fosfatase alcalina e o colágeno tipo I por meio da técnica do RT-PCR.

## **5 Expressão de fosfatase alcalina e colágeno tipo I**

### **5.1 Extração de RNA**

Em cinco compartimentos das placas de acrílico, para cada grupo controle e experimental, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 1 mL de Trizol (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA). Estas 5 amostras foram, então, homogeneizadas com o intuito de remover todas as células que permaneceram aderidas ao substrato dentinário. O Trizol, contendo as células, foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Para cada mL de Trizol utilizado na homogeneização foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V - Xalostoc, México). Os tubos serão agitados vigorosamente na mão por 15 segundos e incubados por 2 ou 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rcf (microcentrífuga Eppendorf modelo 5415R – Hamburg - Alemanha) por 15 minutos a 4° C. Depois da centrifugação, a mistura se dividiu em uma fase baixa correspondente ao trizol/ clorofórmio/DNA, uma interfase (proteína), e uma fase aquosa superior correspondente à fase onde está o RNA (água e RNA). O volume desta fase corresponde a 60% do volume de Trizol utilizado na homogeneização.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Para cada mL de Trizol utilizado na homogeneização foi adicionado 0,5 mL de isopropanol (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V - Xalostoc, México), para precipitar o RNA da fase aquosa. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Nessa etapa foi observada a formação de um pellet tipo gel no fundo do tubo.

Após a remoção do sobrenadante, o pellet de RNA foi seco brevemente colocando-se o tubo em uma posição invertida sobre um papel por 10 minutos. Para cada mL de Trizol foi adicionado 1 mL de etanol 75% (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V - Xalostoc, México). As amostras foram misturadas em agitador de tubos (Phoenix modelo AP-56 - Phoenix Ind. E Com. de Equipos Científicos Ltda – Araraquara, SP, Brasil) e centrifugadas a 7.500 rcf por 5 minutos a 4° C.

O sobrenadante foi novamente descartado para se proceder a secagem do pellet de RNA sobre um papel por 30 minutos. O RNA foi redissolvido em 10 µL de água ultrapura tratada com DEPC (BioAgency Laboratórios – São Paulo, SP, Brasil) por meio da técnica “up & down” com pipeta. As amostras foram, então, incubadas por 10 minutos a 55° C (Thermomixer Comfort – Eppendorf – Hamburg, Alemanha).

Uma alíquota do RNA total (1µL) foi diluída em água ultrapura tratada com DEPC na proporção de 1:50 para a realização da quantificação do RNA em biofotômetro (biophotometer Eppendorf – modelo Eppendorf RS – 232C– Hamburg, Alemanha).

## **5.2 RT- PCR**

### **5.2.1 Síntese do cDNA**

Para cada RNA total extraído das amostras de cada grupo, foi sintetizado o cDNA (DNA complementar obtido a partir de uma alíquota de mRNA) por meio da reação de RT-PCR. Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foi adicionado 1 µL de Oligo dT 100 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), 1µg de RNAtotal, 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura tratada com DEPC para completar um volume total de 13 µL de solução. A solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e então transferida imediatamente para o gelo. Após um “spin” em microcentrífuga, foi adicionado 4 µL de tampão First-Strand 5X (Invitrogen – Carlsbad,

CA, EUA) e 2  $\mu$ L de Ditioneitol (DTT 0,1M - Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA). A solução foi incubada à 42° C por 2 minutos e entãõ se adicionou 1  $\mu$ L (200UI) da enzima Superscript II (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA). A solução foi homogeneizada gentilmente com o auxílio de uma pipeta e incubada à 42° C por 50 minutos. Apõs este períoõo de incubação, a reação foi inativada à 70° C por 15 minutos.

### 5.2.2 PCR

Apõs a síntese do cDNA, será avaliado o efeito da irradiação com o laser sobre a expressãõ dos genes que codificam colágeno tipo-I (Col-1) e Fosfatase alcalina (ALP) e a  $\beta$  – actina como um “*housekeeping gene*”. Para cada um destes genes, primers específicos foram desenhados a partir da seqüência de mRNA (Tabela 4).

Tabela 4 - Seqüências e aplicações dos primers para *mus musculus* utilizados neste trabalho

Seqüências dos primers		Utilização
S: 5'- AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC - 3'	AS: 5' - CT CTC AGC TGT GGT GGT GAA - 3'	Amplificação de $\beta$ - actina
S: 5'- GCT GAT CAT TCC CAC GTT TT -3'	AS: 5' - CTG GGC CTG GTA GTT GTT GT - 3'	
S: 5'- ACG TCC TGG TGA AGT TGG TC - 3'	AS: 5' - CAG GGA AGC CTC TTT CTC CT - 3'	Amplificação de Col-1

### 5.2.3 PCR quantitativo em tempo real

Para o PCR em tempo real, foram utilizados os mesmos cDNAs sintetizados por transcrição reversa. Todas as reações de PCR em tempo real foram feitas no aparelho ABI Prism 7000 Sistema de Detecção de Seqüência (Step One - Applied Biosystems – Foster City, CA, EUA). O processo de ciclagem térmica consistiu de 2 minutos a 50°C, em seguida 2 minutos a 95°C e 40 ciclos no modo de dois passos:

95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos, onde no lugar do cDNA foi usado a mesma quantidade de RNA tratado com DNase que foi utilizada para a síntese do cDNA. Este procedimento exclui a possibilidade de contaminação por DNA genômico. As condições do PCR em tempo real foram otimizadas para cada mRNA alvo com concentrações ideais de oligonucleotídeos, ausência de formação de dímeros dos oligonucleotídeos e condições para obtenção de apenas um pico na curva de dissociação durante a amplificação em tempo real.

Para a reação do PCR em tempo real foi utilizado 7,5 µL do mix Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo específico para cada gene amplificado, 1 µL de cDNA das diferentes amostras (1 µL de cada cDNA diluído 10 vezes) e 5,5 µL de água Mili-Q estéril. Dos 15 µL de reação preparados, 10 µL foram utilizados em 2 poços diferentes da placa de 96 poços (5 µL/poço), portanto todos os dados de PCR em tempo real foram obtidos em duplicata. Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da Applied Biosystems, utilizando a  $\beta$ -actina como referência para normalização.

Os dados foram expressos usando o método de curva padrão, ou seja, as reações foram corridas no modo de quantificação absoluta e os Cts obtidos para as amostras experimentais foram comparados à curva padrão correspondente, dependendo do par de oligonucleotídeos utilizado. A curva padrão foi feita utilizando uma mistura de cDNAs das amostras dos diferentes grupos do experimento. Por diluição seriada, foram preparadas reações de modo que a mistura de cDNAs fosse utilizado sem diluição e diluído 2, 4, 8, 16, 32 e 64 vezes. Desta maneira pode-se ter uma idéia de quantas vezes o cDNA poderia ser diluído para ser usado nas reações experimentais. Quando a

qualidade dos primers era boa, os Cts destas reações geravam uma curva padrão confiável. Os valores obtidos para os genes alvos de cada amostra foram normalizados pelos valores de  $\beta$  - actina da mesma amostra e os gráficos foram plotados utilizando o software Prism GraphPad 4.02 (GraphPad - San Diego,CA, EUA).

### Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato

#### 1 Delineamento do estudo in vivo

Foram utilizados, nesta pesquisa in vivo, trinta e seis ratos (*Rattus norvegicus, albinus, holtzman*) machos, pesando em média 280g. Os dois primeiros molares superiores de cada animal do grupo controle foram utilizados no estudo, sendo que eles foram divididos para cada um dos três períodos 7, 15 e 30 dias estabelecidos para análise do complexo dentino-pulpar.

Os grupos experimentais e controle e os procedimentos executados estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Distribuição dos dentes nos Grupos Experimentais e Controle de acordo com os procedimentos de irradiação e período de avaliação

GRUPOS	DESCRIÇÃO	PERÍODOS			TOTAL
		7 dias	15 dias	30 dias	
GI	Cavidade de classe I com aplicação do laser e restauração com CIV (1° M D)	8	8	8	24
GCI	Cavidade de classe I + CIV (1° M D/E)	4	4	4	12
GCII	Dentes intactos e sem manipulação (2° M D/E)				

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com alimentação balanceada e água “*ad libitum*”.

## 2 Protocolos Experimentais

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular do anestésico Ketamina (Francotar ® 10 ml – uso veterinário. Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda – Jurubatuba, SP, Brasil), na dosagem de 0,08 ml para cada 100g de peso corporal do animal. Este procedimento foi associado à injeção do relaxante muscular Xylazina (Virbaxyl ® 2% - 10 ml – uso veterinário, Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda – Jurubatuba, SP, Brasil) na dosagem de 0,04 ml para cada 100 g de peso corpóreo do animal. As injeções dos agentes anestésico/relaxante muscular foram realizadas com seringas de insulina. Em seguida, os animais foram posicionados em mesa operatória, de modo a possibilitar a manutenção da cavidade bucal aberta durante a realização dos procedimentos operatórios.

O isolamento do campo operatório foi realizado utilizando-se um grampo adaptado (que envolveu todos molares superiores). Em seguida, foi realizada a anti-sepsia do campo operatório com álcool a 70%.

As cavidades foram confeccionadas na superfície oclusal dos primeiros molares superiores, os quais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos que recebiam ou não a irradiação com o laser de baixa potência. No final do procedimento clínico da preparação das cavidades, estas apresentavam aproximadamente 0,7 mm de profundidade. Para este procedimento de preparo cavitário foram usadas fresas do tipo cônica invertida (número 33 ½ - KG Sorensen – Cotia, SP, Brasil) em baixa rotação e sob irrigação constante. Essa profundidade equivale a uma cavidade profunda e possivelmente tal procedimento possa causar um estresse celular, o qual é relatado na literatura como importante para a resposta celular a laserterapia (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003, Jia et al.<sup>37</sup>, 2004, Stein et al.<sup>92</sup>, 2005). As cavidades foram lavadas com água destilada e em seguida secas com bolinhas de algodão esterilizadas.



Para o Grupo GI, na região mais proximal do assoalho cavitário, onde o remanescente dentinário é delgado, foi realizada a irradiação com o melhor parâmetro obtido no Experimento 2 ( $25\text{J}/\text{cm}^2$ ). A fonte de luz utilizada foi um diodo do tipo InGaAsP (arseneto de índio gálio fosfato) atuando a 780 nm, sendo que a irradiação era aplicada por meio de uma fibra de maneira pontual. Foram realizadas medidas prévias para determinar a potência que atingiria as células pulpares mais superficiais (odontoblastos), após sua difusão através da dentina do assoalho cavitário. Conseqüentemente, a dose de energia emitida pelo aparelho usado neste estudo foi estabelecida em  $30\text{ J}/\text{cm}^2$ , sendo que isto assegurava a chegada de  $25\text{J}/\text{cm}^2$  de luz para os odontoblastos relacionados com o assoalho cavitário. Imediatamente após a irradiação, as cavidades foram restauradas na sua base com cimento de ionômero de vidro modificado por resina, Vitrebond (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA), e uma camada superficial com ionômero de vidro modificado por resina Vitremer (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (Tanabe et al.<sup>93</sup>, 2002, Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006, Villa et al.<sup>101</sup>, 2007).

No Grupo Controle I (GCI), foi avaliado o estresse celular causado pelo procedimento de preparo cavitário e restauração. Para isso foi realizado o protocolo de anestesia, isolamento, preparo cavitário e restauração com ionômero de vidro nos primeiros molares, como descrito anteriormente, eliminando-se apenas o procedimento de irradiação. Para o Grupo Controle II (GCII) não foi realizado qualquer procedimento nos segundos molares, apenas a manipulação dos ratos para submetê-los a mesma condição de estresse dos grupos experimentais.

As restaurações foram vistórias semanalmente e decorridos os períodos de 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados por injeção intraperitoneal de uma sobredosagem de hidrato de cloral a 10 %. Os maxilares foram cirurgicamente removidos e imediatamente colocados em solução de formol tamponado

a 10%, onde permaneceram imersos por 48 horas. Em seguida, as peças foram lavadas por 24 horas em água corrente e desmineralizadas em solução de Morse (ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20%, em partes iguais), por meio de trocas da solução a cada três dias. Então, as peças foram submetidas às seguintes fases do processamento histológico de rotina:

1) Fase de desidratação em álcoois crescentes: Álcool 70% (24 horas); Álcool 80% (2 horas - 1 troca); Álcool 90% (2 horas - 1 troca); Álcool absoluto (24 horas - 3 trocas).

2) Fase de diafanização: Álcool /Xilol (1 hora); Xilol (6 horas); Fase de embebição em estufa a 60°C: Parafina (24 horas - 3 trocas).

3) Inclusão à vácuo em parafina e posterior confecção dos blocos: Os blocos de parafina foram posicionados em micrótomo rotatório (modelo Spencer, AOTEC 820, Buffalo, NY, EUA) onde obteve-se cortes histológicos de 5 µm de espessura no sentido mesio-distal dos dentes. Estes cortes histológicos montados em lâmina de vidro foram finalmente corados com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e pela técnica de Brown & Brenn para evidenciar bactérias.

### **3 Avaliação histopatológica**

As características histológicas do complexo dentino-pulpar após irradiação ou não das cavidades foram avaliadas em microscópio de luz (Carl Zeiss – Jenamed 2, Alemanha) estando o avaliador cego para tal procedimento. Fotomicrografias representativas de cada grupo avaliado foram obtidas, utilizando para isto um fotomicroscópio (Carl Zeiss 62774 – Jenamed, Alemanha). Como já descrito por Costa et al.<sup>23</sup> foi determinada através do exame histopatológico os seguintes eventos histológicos:

1) Resposta inflamatória celular; 2) Organização tecidual; 3) Deposição de dentina terciária; e 4) Presença de bactérias.

Tabela 6 - Eventos e escores histopatológicos sob o ponto de vista semi-quantitativo

Evento Histopatológico	Escore			
	0	1	2	3
Resposta Celular Inflamatória	Nenhuma ou poucas células inflamatórias abaixo do assoalho da cavidade, caracterizando tecido normal.	Discreto infiltrado de células inflamatórias englobando polimorfonucleares (PMNs) ou leucócitos mononucleares (MNLs)	Moderada quantidade de células inflamatórias agudas ou crônicas adjacente ao assoalho da cavidade.	Intensa quantidade de células inflamatórias agudas ou crônicas adjacente ao assoalho da cavidade, associado ou não à necrose ou abscesso
Desorganização Tecidual	Tecido Normal	Camada odontoblastica disorganizada mas a porção central normal.	Total desorganização da morfologia do tecido pulpar.	Necrose pulpar
Formação de Dentina Terciária	Intensa deposição de matriz dentinária envolvendo toda polpa coronária.	Moderada deposição de matriz dentinária atingindo até 2/3 da polpa coronária.	Discreta deposição de matriz dentinária na região da polpa relacionada com o assoalho da cavidade.	Ausência de deposição de matriz dentinária.
Bactérias Coradas	Ausência	Bactérias coradas nas paredes laterais do preparo cavitário	Bactérias coradas nas paredes laterais e assoalho da cavidade	Bactérias coradas nas paredes laterais, assoalho da cavidade e no interior dos túbulos dentinários.

## **4 RESULTADO**

### **Experimento 1: Efeito direto do laser de baixa intensidade**

#### **1 Análise do metabolismo celular por meio da produção de Desidrogenase Succínica (SDH)**

##### **1.1 Efeito do período decorrido entre o tratamento e a análise do metabolismo celular**

Para os grupos não irradiados (controles), a produção da enzima SDH foi estatisticamente maior após 9 dias da cultura das células MDPC-23 em comparação aos 6 dias (Tabela 7 - Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) para os diferentes períodos em que as células permaneceram fora da incubadora. Este procedimento foi realizado para simular o tempo de irradiação específico determinado para cada dose de energia, independentemente da concentração de SFB adicionada ao meio de cultura. Resultado semelhante também foi observado para os grupos irradiados, ou seja, maior produção da enzima SDH (maior metabolismo) ocorreu após 9 dias da irradiação das células, independentemente da dose utilizada e da concentração de SFB (Tabela 8).

Tabela 7 - Produção da enzima SDH, detectada pelo método de MTT nos grupos não irradiados (controles), após 6 ou 9 dias da cultura das células MDPC-23, em função das variáveis porcentagem de soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura (%SFB) e simulação do tempo (segundos).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
100	2%	0,495 (0,459-0,548) b	0,648 (0,552-0,755) a
	5%	0,446 (0,368-0,549) b	0,851 (0,705-1,039) a
	10%	0,462 (0,430-0,496) b	0,841 (0,709-0,963) a
200	2%	0,421 (0,399-0,604) b	0,661 (0,522-0,746) a
	5%	0,415 (0,332-0,671) b	0,877 (0,745-1,012) a
	10%	0,495 (0,402-0,640) b	0,835 (0,719-0,930) a
500	2%	0,421 (0,370-0,527) b	0,644 (0,491-0,825) a
	5%	0,397 (0,321-0,541) b	0,800 (0,673-1,053) a
	10%	0,436 (0,388-0,501) b	0,851 (0,713-0,977) a
750	2%	0,340 (0,308-0,457) b	0,590 (0,498-0,738) a
	5%	0,392 (0,317-0,471) b	0,855 (0,718-0,975) a
	10%	0,421 (0,387-0,522) b	0,829 (0,738-0,870) a
1250	2%	0,460 (0,364-0,496) b	0,678 (0,557-0,759) a
	5%	0,418 (0,295-0,504) b	0,877 (0,781-1,001) a
	10%	0,474 (0,354-0,530) b	0,820 (0,729-0,893) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05)

Tabela 8 - Produção da enzima SDH, detectada pelo método de MTT nos grupos irradiados, após 6 ou 9 dias da cultura das células MDPC-23, em função das variáveis porcentagem de soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura (%SFB) e dose de irradiação ( $J/cm^2$ ).

Dose de irradiação ( $J/cm^2$ )	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
2	2%	0,411 (0,281-0,615) b	0,717 (0,629-0,797) a
	5%	0,362 (0,258-0,502) b	0,887 (0,816-0,992) a
	10%	0,395 (0,309-0,513) b	0,933 (0,833-0,989) a
4	2%	0,408 (0,313-0,573) b	0,688 (0,601-0,748) a
	5%	0,381 (0,304-0,527) b	0,882 (0,780-0,989) a
	10%	0,415 (0,352-0,497) b	0,878 (0,823-0,941) a
10	2%	0,405 (0,304-0,603) b	0,737 (0,661-0,778) a
	5%	0,431 (0,264-0,529) b	0,866 (0,781-0,908) a
	10%	0,457 (0,346-0,563) b	0,856 (0,807-0,902) a
15	2%	0,519 (0,368-0,701) b	0,712 (0,630-0,782) a
	5%	0,498 (0,327-0,640) b	0,864 (0,837-0,963) a
	10%	0,505 (0,430-0,719) b	0,849 (0,801-0,909) a
25	2%	0,436 (0,300-0,670) b	0,663 (0,632-0,765) a
	5%	0,378 (0,265-0,624) b	0,825 (0,724-0,914) a
	10%	0,483 (0,378-0,607) b	0,821 (0,768-0,926) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )

## 1.2 Comparação das simulações do tempo para atingir as doses de irradiação e concentração de soro fetal bovino (SFB) para os grupos não irradiados (controles)

Quando os testes de MTT foram realizados após 6 dias da cultura das células, nenhuma influência da concentração de SFB foi observada para todos os tempos em que as células permaneceram fora da incubadora visando reproduzir o tempo necessário para a dose de irradiação. Entretanto, quando esses tempos foram

comparados entre si para cada concentração de SFB, foi observada influência significativa dessa variável na produção da enzima SDH, porém apenas para a concentração de 2% de SFB (Tabela 9).

Tabela 9 – Relação entre produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) detectada pelo teste de MTT nos grupos não irradiados (controles) após 6 dias de cultura celular, de acordo com as variáveis simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação ( $J/cm^2$ ) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB		
	2%	5%	10%
100	0,495 (0,459-0,548) a A	0,446 (0,368-0,549) a A	0,462 (0,430-0,496) a A
200	0,421 (0,399-0,604) abc A	0,415 (0,332-0,671) a A	0,495 (0,402-0,640) a A
500	0,421 (0,370-0,527) bdc A	0,397 (0,321-0,541) a A	0,436 (0,388-0,501) a A
750	0,340 (0,308-0,457) d A	0,392 (0,317-0,471) a A	0,421 (0,387-0,522) a A
1250	0,460 (0,364-0,496) c A	0,418 (0,295-0,504) a A	0,474 (0,354-0,530) a A

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ )

O inverso foi observado quando os testes de MTT foram realizados após 9 dias da cultura das células MDPC-23. Nesse período, apenas a concentração de SFB exerceu efeito significativo na produção da enzima SDH, sendo essa maior para as concentrações de 5% e 10%, sem diferença estatística entre elas, em comparação a concentração de 2%. O tempo de permanência das células fora da incubadora, entretanto, não influenciou o metabolismo celular (Tabela 10).

Tabela 10 - Relação entre produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) detectada pelo teste de MTT nos grupos não irradiados (controles) após 9 dias da cultura, de acordo com as variáveis simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação ( $J/cm^2$ ) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB		
	2%	5%	10%
100	0,648 (0,552-0,755) a B	0,851 (0,705-1,039) a A	0,841 (0,709-0,963) a A
200	0,661 (0,522-0,746) a B	0,877 (0,745-1,012) a A	0,835 (0,719-0,930) a A
500	0,644 (0,491-0,825) a B	0,800 (0,673-1,053) a A	0,851 (0,713-0,977) a A
750	0,590 (0,498-0,738) a B	0,855 (0,718-0,975) a A	0,829 (0,738-0,870) a A
1250	0,678 (0,557-0,759) a B	0,877 (0,781-1,001) a A	0,820 (0,729-0,893) a A
Total	0,643 (0,528-0,749)	0,846 (0,731-0,997)	0,829 (0,727-0,936)

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ )

### 1.3 Análise do efeito da dose de irradiação laser (9 dias) na produção da enzima SDH

Uma vez que, segundo os dados da Tabela 8 (colunas), o tempo de permanência das células MDPC-23 fora da incubadora, usado para simular o tempo necessário de irradiação nos grupos experimentais, não exerceu influência sobre a produção de SDH, os grupos controle foram compilados e transformados em um único controle (células não irradiadas,  $0 J/cm^2$ ,  $n = 80$ ). Os dados de produção da enzima SDH para esse grupo controle assim como para os grupos irradiados estão apresentados na Tabela 11.

Comparando-se o efeito da concentração de SFB adicionado ao meio de cultura, a menor produção da enzima SDH foi observada quando o meio de cultura foi suplementado com 2% de SFB (estresse). Os valores obtidos para esta concentração foram estatisticamente inferiores àqueles obtidos para as concentrações de 5% e 10%, as quais não diferiram entre si (2% SFB < 5% SFB = 10% SFB). Esses resultados



repetiram-se para todas as doses de irradiação e também para o grupo controle (Tabela 11, linhas).

Tabela 11 - Produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) detectada pelo teste de MTT no grupo não irradiado (controle\*) e grupos irradiados após 9 dias da cultura, em função das variáveis dose de irradiação ( $J/cm^2$ ) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Dose de Irradiação ( $J/cm^2$ )	% SFB		
	2%	5%	10%
2	0,717 (0,629-0,797) a B	0,887 (0,816-0,992) a A	0,933 (0,833-0,989) a A
4	0,688 (0,601-0,748) ab B	0,882 (0,780-0,989) a A	0,878 (0,823-0,941) ab A
10	0,737 (0,661-0,778) a B	0,866 (0,781-0,908) a A	0,856 (0,807-0,902) ab A
15	0,712 (0,630-0,782) ab B	0,864 (0,837-0,963) a A	0,849 (0,801-0,909) ab A
25	0,663 (0,632-0,765) ab B	0,825 (0,724-0,914) a A	0,821 (0,768-0,926) b A
0*	0,643 (0,528-0,749) b B	0,846 (0,731-0,997) a A	0,829 (0,727-0,936) b A

\* a ausência de irradiação ( $0 J/cm^2$ ) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Desde que esse tempo não exerceu influência na produção da enzima SDH, os controles foram compilados (n=80).

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=16 (exceção feita ao grupo controle, n=80). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ ).

Ausência de efeito significativo foi observada para a dose de irradiação quando o meio de cultura foi suplementado com 5% SFB. Dessa forma, nenhum dos grupos irradiados diferiu entre si, assim como do grupo controle (Tabela 11, colunas). Efeito significativo da dose de irradiação foi observado apenas quando da suplementação do meio de cultura com 2% e 10% SFB. Para a concentração de 2%, apenas os grupos irradiados com  $2 J/cm^2$  e  $10 J/cm^2$  produziram uma quantidade significativamente maior da enzima SDH (maior metabolismo celular) quando comparados ao grupo controle. Entretanto, comparando-se apenas os grupos irradiados, nenhuma diferença significativa foi identificada entre eles (Tabela 11, colunas). Quando a concentração de 10% de SFB foi adicionado ao meio de cultura, apenas o grupo irradiado com  $2 J/cm^2$  diferiu de

forma significativa do controle. Comparando-se os grupos irradiados, diferença estatística foi observada apenas entre os grupos irradiados com  $2 \text{ J/cm}^2$  e  $25 \text{ J/cm}^2$ , sendo a produção da enzima SDH maior no primeiro.

## **2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL**

### **2.1 Efeito do período decorrido entre o tratamento e a análise de proteína total**

Assim como para a produção da enzima SDH, também para a produção de proteína total, o efeito do tempo decorrido entre a irradiação e a aplicação do protocolo de detecção (método de Lowry) exerceu efeito significativo nos valores obtidos. Desta forma, tanto para os grupos controle (células não irradiadas, Tabela 12) como para os grupos irradiados (Tabela 13), quantidade significativamente maior de proteínas foi observada após 9 dias quando comparado ao período de 6 dias.

Tabela 12 – Relação entre produção de proteína total (PT), detectada pelo método de Lowry nos grupos não irradiados (controles), após 6 ou 9 dias da cultura das células MDPC-23, em função das variáveis concentração de soro fetal bovino (%SFB) e tempo de permanência das células fora da incubadora (segundos).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
100	2%	0,217 (0,174-0,231) b	0,791 (0,751-0,857) a
	5%	0,252 (0,183-0,270) b	0,904 (0,881-0,931) a
	10%	0,263 (0,212-0,306) b	0,925 (0,900-0,952) a
200	2%	0,197 (0,168-0,224) b	0,787 (0,763-0,840) a
	5%	0,203 (0,194-0,257) b	0,945 (0,902-0,973) a
	10%	0,267 (0,221-0,307) b	0,984 (0,926-1,010) a
500	2%	0,212 (0,150-0,287) b	0,800 (0,781-0,840) a
	5%	0,261 (0,213-0,321) b	0,929 (0,861-0,964) a
	10%	0,302 (0,219-0,352) b	0,965 (0,921-0,984) a
750	2%	0,216 (0,149-0,277) b	0,849 (0,727-0,933) a
	5%	0,263 (0,195-0,317) b	0,931 (0,874-1,040) a
	10%	0,306 (0,233-0,338) b	0,912 (0,833-1,015) a
1250	2%	0,193 (0,139-0,239) b	0,814 (0,800-0,863) a
	5%	0,241 (0,181-0,303) b	0,928 (0,889-0,979) a
	10%	0,224 (0,207-0,352) b	0,948 (0,905-0,983) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05)

Tabela 13 – Relação entre produção de proteína total, detectada pelo método de Lowry nos grupos irradiados, após 6 ou 9 dias da cultura das células MDPC-23, em função das variáveis concentração de soro fetal bovino (%SFB) e dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>).

Dose de irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
2	2%	0,202 (0,196-0,215) b	0,700 (0,664-0,761) a
	5%	0,244 (0,324-0,253) b	0,833 (0,779-0,864) a
	10%	0,248 (0,242-0,258) b	0,853 (0,789-0,925) a
4	2%	0,202 (0,158-0,218) b	0,730 (0,683-0,753) a
	5%	0,248 (0,207-0,264) b	0,802 (0,750-0,862) a
	10%	0,263 (0,228-0,275) b	0,841 (0,765-0,905) a
10	2%	0,189 (0,108-0,233) b	0,729 (0,667-0,752) a
	5%	0,219 (0,177-0,258) b	0,789 (0,769-0,822) a
	10%	0,246 (0,186-0,281) b	0,799 (0,778-0,852) a
15	2%	0,223 (0,202-0,233) b	0,842 (0,812-0,874) a
	5%	0,248 (0,229-0,270) b	0,936 (0,913-0,996) a
	10%	0,270 (0,232-0,286) b	0,983 (0,932-1,021) a
25	2%	0,186 (0,121-0,222) b	0,860 (0,832-0,897) a
	5%	0,227 (0,158-0,256) b	0,952 (0,932-1,032) a
	10%	0,223 (0,193-0,264) b	0,991 (0,953-1,036) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05)

## 2.2 Comparação das simulações do tempo para atingir as doses de irradiação e concentração de soro fetal bovino (SFB) para os grupos não irradiados (controles)

Para todas as porcentagens de SFB adicionadas ao meio de cultura, o tempo de permanência das células fora da incubadora (grupos controle, células não irradiadas) para simular o tempo necessário para atingir a dose de irradiação desejada nos grupos experimentais, não influenciou a produção de proteína total detectada após 9

dias da cultura das células MDPC-23 (Tabela 14, colunas). Por outro lado, a porcentagem de SFB adicionada ao meio de cultura exerceu efeito estatisticamente significativo na produção dessas proteínas. A menor produção foi observada para a suplementação feita com apenas 2% de SFB, enquanto que a maior produção foi obtida quando o meio foi suplementado com 10% SFB para os tempos referentes as doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>. Para os demais tempos, a produção de proteína total pelas células MDPC-23 mantidas em meios suplementados com 5% ou 10% de SFB não diferiu estatisticamente (Tabela 14, linhas).

Tabela 14 – Relação entre produção de proteína total detectada pelo método de Lowry nos grupos não irradiados (controles) após 9 dias da cultura celular, em função das variáveis simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB		
	2%	5%	10%
100	0,791 (0,751-0,857) a B	0,904 (0,881-0,931) a A	0,925 (0,900-0,952) a A
200	0,787 (0,763-0,840) a C	0,945 (0,902-0,973) a B	0,984 (0,926-1,010) a A
500	0,800 (0,781-0,840) a C	0,929 (0,861-0,964) a B	0,965 (0,921-0,984) a A
750	0,849 (0,727-0,933) a B	0,931 (0,874-1,040) a A	0,912 (0,833-1,015) a A
1250	0,814 (0,800-0,863) a B	0,928 (0,889-0,979) a A	0,948 (0,905-0,983) a A
Total	0,809 (0,766-0,862)	0,915 (0,886-0,964)	0,953 (0,905-0,985)

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

### 2.3 Análise do efeito da dose de irradiação laser (9 dias) na produção de proteína total

Uma vez demonstrado que o tempo de permanência das células MDPC-23 fora da incubadora não exerceu efeito significativo na produção de proteína total (Tabela 10), os grupos controle (não irradiados) dentro cada concentração de SFB foram compilados, de tal forma a formar um único grupo controle cujos valores de mediana

(percentil 25-percentil 75) estão apresentados na última linha da Tabela 14 e incluídos na Tabela 15 como valor zero de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>). Esses novos grupos foram utilizados para a inferência dos efeitos da dose de irradiação laser na produção de proteína total pelas células MDPC-23, como realizado para a produção da enzima SDH.

Tabela 15 – Relação entre produção de proteína total, detectada pelo método de Lowry no grupo não irradiado (controle\*) e grupos irradiados após 9 dias da cultura celular, em função das variáveis dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Dose de Irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB		
	2%	5%	10%
2	0,700 (0,664-0,761) c B	0,833 (0,779-0,864) c A	0,853 (0,789-0,925) c A
4	0,730 (0,683-0,753) c B	0,802 (0,750-0,862) c A	0,841 (0,765-0,905) c A
10	0,729 (0,667-0,752) c B	0,789 (0,769-0,822) c A	0,799 (0,778-0,852) c A
15	0,842 (0,812-0,874) a B	0,936 (0,913-0,996) b A	0,983 (0,932-1,021) b A
25	0,860 (0,832-0,897) a B	0,952 (0,932-1,032) a A	0,991 (0,953-1,036) a A
0*	0,809 (0,766-0,862) b B	0,915 (0,886-0,964) b C	0,953 (0,905-0,985) b A

\* a ausência de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Desde que esse tempo não exerceu influência na produção de proteínas totais, os controles foram compilados (n=80).

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=16 (exceção feita ao grupo controle, n=80). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Independente da dose de irradiação aplicada sobre as células MDPC-23, a menor produção de proteína total foi observada quando o meio de cultura foi suplementado com apenas 2% SFB. Ainda, para os grupos irradiados, nenhuma diferença significativa na produção dessas proteínas foi observada quando 5% ou 10% SFB foi adicionado ao meio de cultura. No grupo controle, entretanto, maior produção de PT foi observado quando da suplementação do meio de cultura com 10% SFB, seguido pela concentração de 5% (Tabela 15, linhas).

De maneira geral, para todas as concentrações de SFB, a irradiação das células MDPC-23 com 2 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> resultou em produção

significativamente inferior de proteína total quando comparada a produção do grupo controle, onde as células não foram irradiadas. Por outro lado, a irradiação celular com  $25 \text{ J/cm}^2$  resultou em maior produção de PT quando comparada àquela ocorrida no grupo controle, diferença esta estatisticamente significativa em todas as concentrações de SFB avaliadas neste estudo. As doses de  $2 \text{ J/cm}^2$ ,  $4 \text{ J/cm}^2$  e  $10 \text{ J/cm}^2$  não diferiram entre si para todas as concentrações de SFB testadas. A dose de  $25 \text{ J/cm}^2$  foi superior, do ponto de vista de estímulo a produção de PT, do que a dose de  $15 \text{ J/cm}^2$  somente quando o meio de cultura foi suplementado com 5% ou 10% SFB. Para o meio suplementado com apenas 2% SFB, essas doses de irradiação não diferiram entre si (Tabela 15, colunas).

### **3 PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA**

#### **3.1 Efeito do período decorrido entre o tratamento e a análise de fosfatase alcalina**

Resultados semelhantes àqueles de produção de SDH e de proteína total foi também observado para a produção de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23, ou seja, aumento estatisticamente significativo na produção dessa proteína foi detectado após 9 dias do tratamento das células em comparação aos 6 dias. Isso ocorreu tanto para os grupos controle (células não irradiadas, Tabela 16) quanto para os grupos experimentais (células irradiadas, Tabela 17).

Tabela 16 – Relação entre produção de fosfatase alcalina (FA) nos grupos não irradiados (controles), após 6 ou 9 dias da cultura celular, em função das variáveis concentração de soro fetal bovino (%SFB) e tempo de permanência (segundos) das células fora da incubadora.

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
100	2%	120,68 (110,80-130,57) b	629,99 (467,63-655,08) a
	5%	180,17 (143,78-191,58) b	814,59 (718,14-912,04) a
	10%	219,38 (203,35-229,35) b	984,84 (954,75-1099,20) a
200	2%	104,66 (101,34-118,64) b	603,92 (502,74-722,29) a
	5%	163,81 (158,35-185,03) b	852,13 (714,98-941,99) a
	10%	182,05 (157,07-194,92) b	990,00 (880,51-1079,43) a
500	2%	129,38 (101,34-159,80) b	708,25 (662,82-778,47) a
	5%	218,35 (169,00-240,43) b	863,31 (801,98-967,79) a
	10%	222,44 (149,49-263,01) b	1100,06 (1012,93-1178,89) a
750	2%	96,14 (78,75-107,73) b	575,26 (493,14-764,43) a
	5%	172,84 (158,52-190,91) b	761,82 (640,32-895,56) a
	10%	192,61 (177,44-196,19) b	969,03 (848,39-1109,24) a
1250	2%	102,78 (92,30-111,82) b	558,34 (420,05-609,51) a
	5%	174,89 (153,50-202,42) b	701,66 (574,11-741,78) a
	10%	205,57 (180,68-220,31) b	812,40 (688,90-882,52) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05)



Tabela 17 – Relação entre produção de fosfatase alcalina nos grupos irradiados, após 6 ou 9 dias da cultura das células MDPC-23, em função das variáveis concentração de soro fetal bovino (%SFB) e dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>).

Dose de irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB	Tempo	
		6 dias	9 dias
2	2%	93,73 (78,82-104,55) b	717,99 (583,71-835,37) a
	5%	141,16 (132,99-143,81) b	1186,91 (934,83-1321,77) a
	10%	157,79 (149,12-167,39) b	1226,18 (1008,77-1541,32) a
4	2%	82,41 (67,50-86,06) b	591,31 (519,79-714,70) a
	5%	120,96 (109,99-127,98) b	943,28 (788,13-1017,37) a
	10%	129,27 (124,11-135,57) b	980,54 (815,45-1245,53) a
10	2%	82,98 (66,43-103,47) b	600,19 (571,24-663,82) a
	5%	134,57 (114,58-149,98) b	912,61 (866,32-994,01) a
	10%	149,48 (127,26-162,09) b	1090,32 (974,81-1319,19) a
15	2%	87,99 (73,59-98,86) b	904,59 (622,41-1045,32) a
	5%	116,08 (87,13-147,40) b	1090,61 (952,45-1316,04) a
	10%	144,46 (124,47-166,96) b	1324,78 (1204,68-1550,06) a
25	2%	76,24 (64,42-88,57) b	737,77 (689,33-862,45) a
	5%	115,65 (97,31-127,19) b	1054,20 (986,56-1106,94) a
	10%	128,12 (114,36-135,43) b	1225,61 (1157,39-1323,06) a

<sup>a</sup> valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Nas linhas, valores seguidos de letras distintas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05)

### 3.2 Comparação das simulações do tempo para atingir as doses de irradiação e concentração de soro fetal bovino (SFB) para os grupos não irradiados (controles)

A concentração de SFB exerceu efeito estatisticamente significativo sobre a produção de fosfatase alcalina para todos os grupos controle (células não irradiadas), nos quais as células foram mantidas fora da incubadora pelo mesmo tempo equivalente aos grupos onde as células foram irradiadas. Maior produção de fosfatase alcalina foi

observada em função do aumento da concentração de SFB presente no meio de cultura. Desta forma, valores estatisticamente superiores foram obtidos com 10% SFB, seguidos dos valores obtidos para 5% e 2% de SFB (Tabela 18, linhas).

Contrário aos dados obtidos quando das análises de produção de SDH e proteína total pelas células em cultura, o período de tempo em que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora para simular o tempo necessário para atingir as doses de irradiação estabelecidas para este estudo exerceu efeito significativo nos valores da produção de fosfatase alcalina (Tabela 18, colunas). Isso ocorreu para todas as concentrações de SFB, embora o efeito desse tempo tenha sido variado dentro de cada concentração. Conseqüentemente, para permitir a subsequente comparação do efeito das doses de irradiação, os valores dos grupos experimentais (irradiados) e dos grupos controle foram transformados em porcentagem, considerando-se o valor da mediana de cada grupo controle como 100% de produção de fosfatase alcalina, tal como descrito anteriormente. Essa transformação foi realizada aplicando-se a regra de três simples e teve como objetivo eliminar o efeito exercido pelo tempo de permanência das células fora da incubadora.

Tabela 18 – Relação entre produção de fosfatase alcalina nos grupos não irradiados (controles) após 9 dias da cultura, em função das variáveis simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação ( $J/cm^2$ ) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB		
	2%	5%	10%
100	629,99 (467,63-655,08) c C	814,59 (718,14-912,04) b B	984,84 (954,75-1099,20) cA
200	603,92 (502,74-722,29) c C	852,13 (714,98-941,99) b B	990,00 (880,51-1079,43) cA
500	708,25 (662,82-778,47) a C	863,31 (801,98-967,79) b B	1100,06 (1012,93-1178,89) aA
750	575,26 (493,14-764,43) abc C	761,82 (640,32-895,56) ab B	969,03 (848,39-1109,24) cA
1250	558,34 (420,05-609,51) bc C	701,66 (574,11-741,78) a B	812,40 (688,90-882,52) bA

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ )

### 3.3 Análise do efeito da dose de irradiação laser (9 dias) na produção de fosfatase alcalina

Os valores de fosfatase alcalina transformados em porcentagem do controle estão apresentados na Tabela 19. O efeito da concentração de SFB variou em função da dose de irradiação, com exceção das doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e 15 J/cm<sup>2</sup>, onde nenhum efeito dessa concentração foi observado (Tabela 19, linhas). Para as doses de 2 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>, os maiores valores de produção de fosfatase alcalina foram observados quando o meio de cultura foi suplementado com 5% de SFB, seguido da suplementação com 10%, embora sem diferença estatística entre eles. Entretanto, quando 5% SFB foi comparado com 2% SFB, valor estatisticamente inferior de produção de fosfatase alcalina ocorreu para a última concentração. Para a dose de 25 J/cm<sup>2</sup>, maiores valores de produção de FA foram obtidos quando as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, os quais foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos com 2% de SFB (Tabela 19, linhas).

Tabela 19 – Relação entre porcentagem de produção de fosfatase alcalina no grupo não irradiado (controle\*) e grupos irradiados após 9 dias da cultura celular, em função das variáveis dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Dose de Irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB		
	2%	5%	10%
2	114.0 (92.7-132.6) b B	145.7 (114.8-162.3) a A	124.5 (102.4-156.5) b AB
4	97.9 (86.1-118.3) bc A	110.7 (92.5-119.4) b A	99.0 (82.3-125.7) c A
10	84.7 (80.7-93.7) d B	105.7 (100.3-115.1) b A	99.1 (88.6-119.9) c AB
15	157.2 (108.2-181.7) a A	143.2 (125.0-172.7) a A	136.7 (124.3-160.0) ab A
25	132.1 (123.5-154.5) a B	150.2 (135.7-156.6) a AB	150.9 (142.5-162.9) a A
0*	100.0 (86.9-111.4) c A	100.0 (84.5-111.2) b A	99.9 (91.1-109.8) c A

\* a ausência de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Após transformação em porcentagem, os controles foram compilados (n=80).

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=16 (exceção feita ao grupo controle, n=80). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Para todas as concentrações de SFB avaliadas neste estudo, a irradiação das células MDPC-23 com 2 J/cm<sup>2</sup>, 15 J/cm<sup>2</sup> e 25 J/cm<sup>2</sup> resultou na produção significativamente maior de fosfatase alcalina em relação ao grupo controle (Tabela 19, colunas). A irradiação celular com as doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> não exerceu efeito sobre a produção dessa proteína quando o meio de cultura foi suplementado com 5% ou 10% de SFB. Entretanto, quando apenas 2% de SFB foi adicionado ao meio de cultura, a irradiação das células com 10 J/cm<sup>2</sup> resultou em redução significativa da produção de fosfatase alcalina em relação ao controle (células não irradiadas) (Tabela 19, colunas).

#### **4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR (MEV)**

As células MDPC-23, colocadas em condição de estresse por restrição de SFB e que não foram submetidas a irradiação, demonstraram morfologia normal, tal como aquelas células odontoblastóides cultivadas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB (Figura 7A/B/C/D). Estas células, comumente organizadas em nódulos epitelióides, apresentavam amplo citoplasma, sendo que numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos, originados de sua membrana, pareciam aderi-las ao substrato de vidro. Mitoses ocorreram em todos os espécimes avaliados. Semelhantes características morfológicas foram observadas também para as células MDPC-23 irradiadas, quando submetidas à condição de estresse (2 e 5 % SFB).

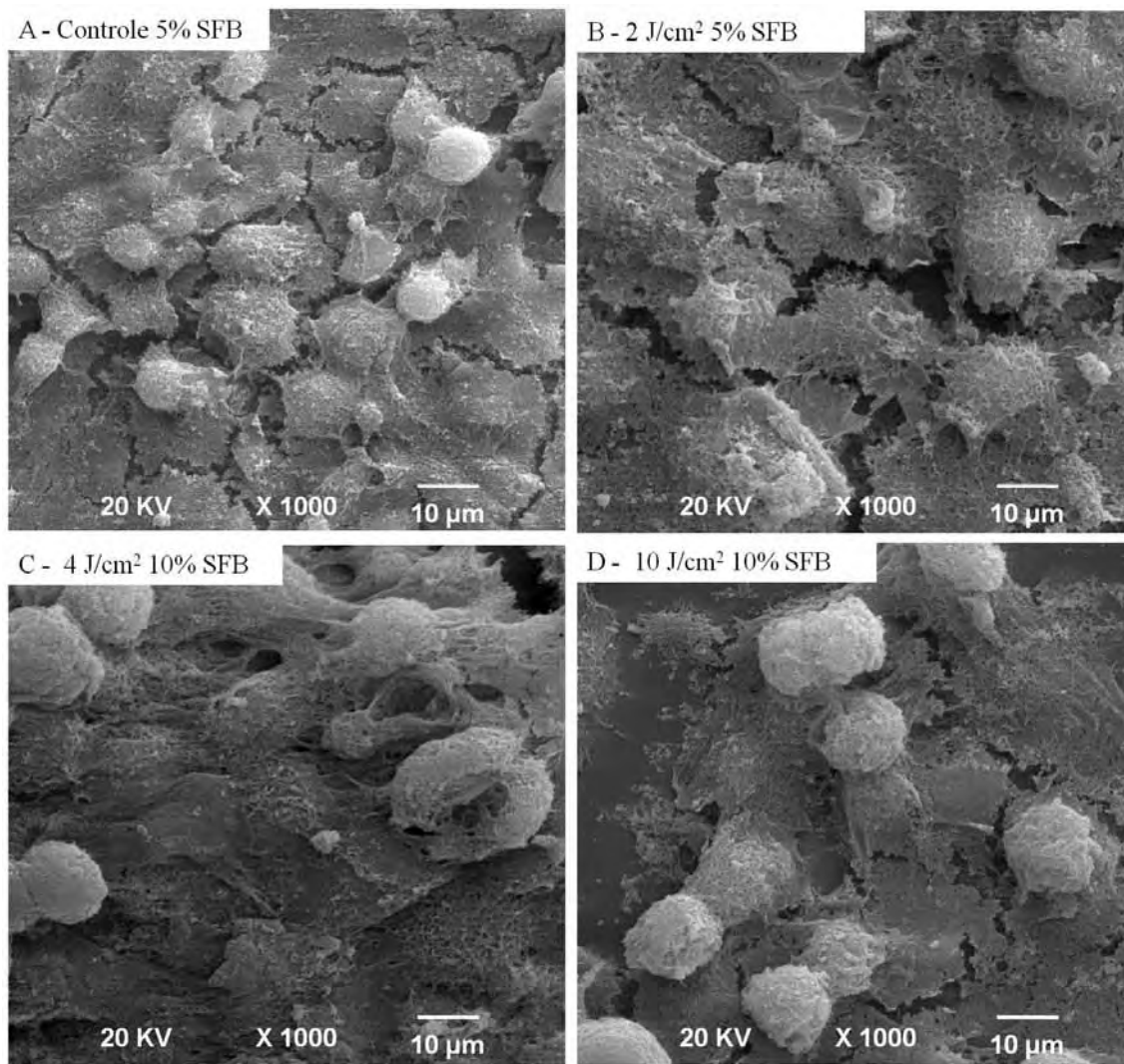


FIGURA 7 – A: (controle) Células MDPC-23 com amplo citoplasma e numerosos prolongamentos originados de sua membrana recobrem o substrato de vidro, caracterizando um nódulo epitelíóide. B – Células com morfologia normal, tal como observado na Figure 7A são observadas sobre o disco de vidro. C: Observe o nódulo epitelíóide denso, sendo que algumas células estão em mitose. D: Tal como observado para os demais grupos, o substrato de vidro está recoberto por células MDPC-23 com morfologia próxima da normalidade. MEV, magnificação original x 1000.

Nos grupos controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 2 % de SFB (estresse) ou 10% de SFB e mantidas por 750 segundos fora de incubadora (sem irradiação), o substrato de vidro estava quase que completamente recoberto por células MDPC-23 (Figura 8A/B). As células MDPC-23 submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas na dose de 15 J/cm<sup>2</sup> apresentavam-se organizadas em nódulos epitelíóides definidos, os quais recobriam

completamente o substrato de vidro (Figura 8C/D). Estas células apresentavam amplo citoplasma de onde eram originados numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. Para ambas as situações de normalidade ou estresse das células, mitoses foram freqüentemente observadas em todos os espécimes avaliados. Quando comparados aos outros parâmetros de irradiação utilizados nesta pesquisa, foi observado que um maior número de células permaneceu aderido ao substrato após irradiação com  $15 \text{ J/cm}^2$ .

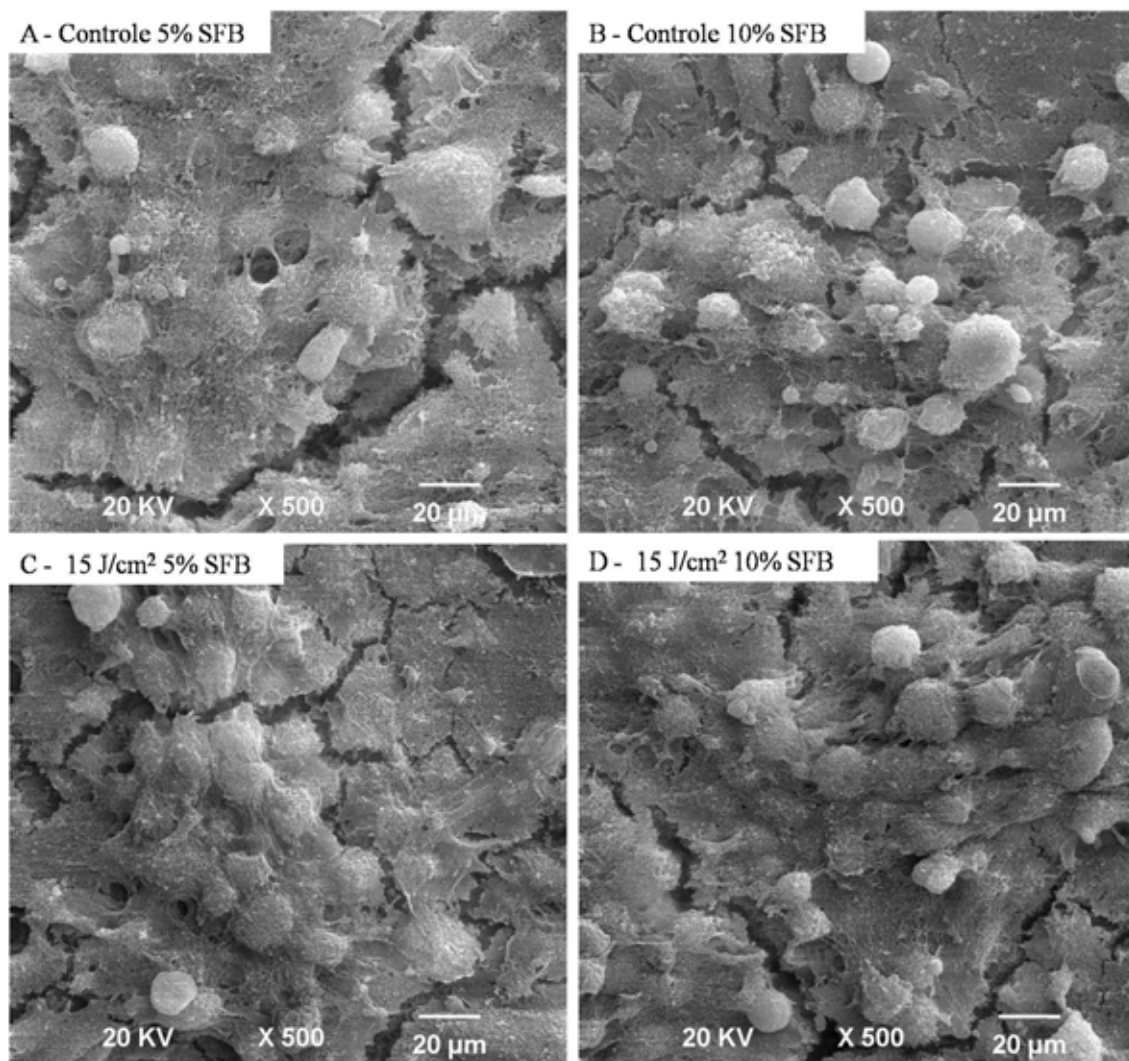


FIGURA 8 – A: (controle) Numerosas células MDPC-23, algumas em processo de mitose, apresentam morfologia normal e estão recobrando completamente o substrato de vidro. B: Grande parte do substrato de vidro está recoberto por numerosas células MDPC-23 organizada em nódulo epitelióide amplo. C e D: Note o detalhe de um nódulo epitelióide formado por um grupo denso de células odontoblastóides, as quais apresentam ampla membrana citoplasmática irregular de onde se originam numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. MEV, magnificação original x 500.

As células submetidas à condição de estresse por restrição de SFB e que foram mantidas na concentração ideal de SFB (10%) apresentavam morfologia normal e recobriam completamente o substrato de vidro (Figura 9A/B). As mesmas características morfológicas foram observadas para as células irradiadas na dose de 25 J/cm<sup>2</sup> (Figura 9C/D). Mitoses foram observadas em todos os grupos.

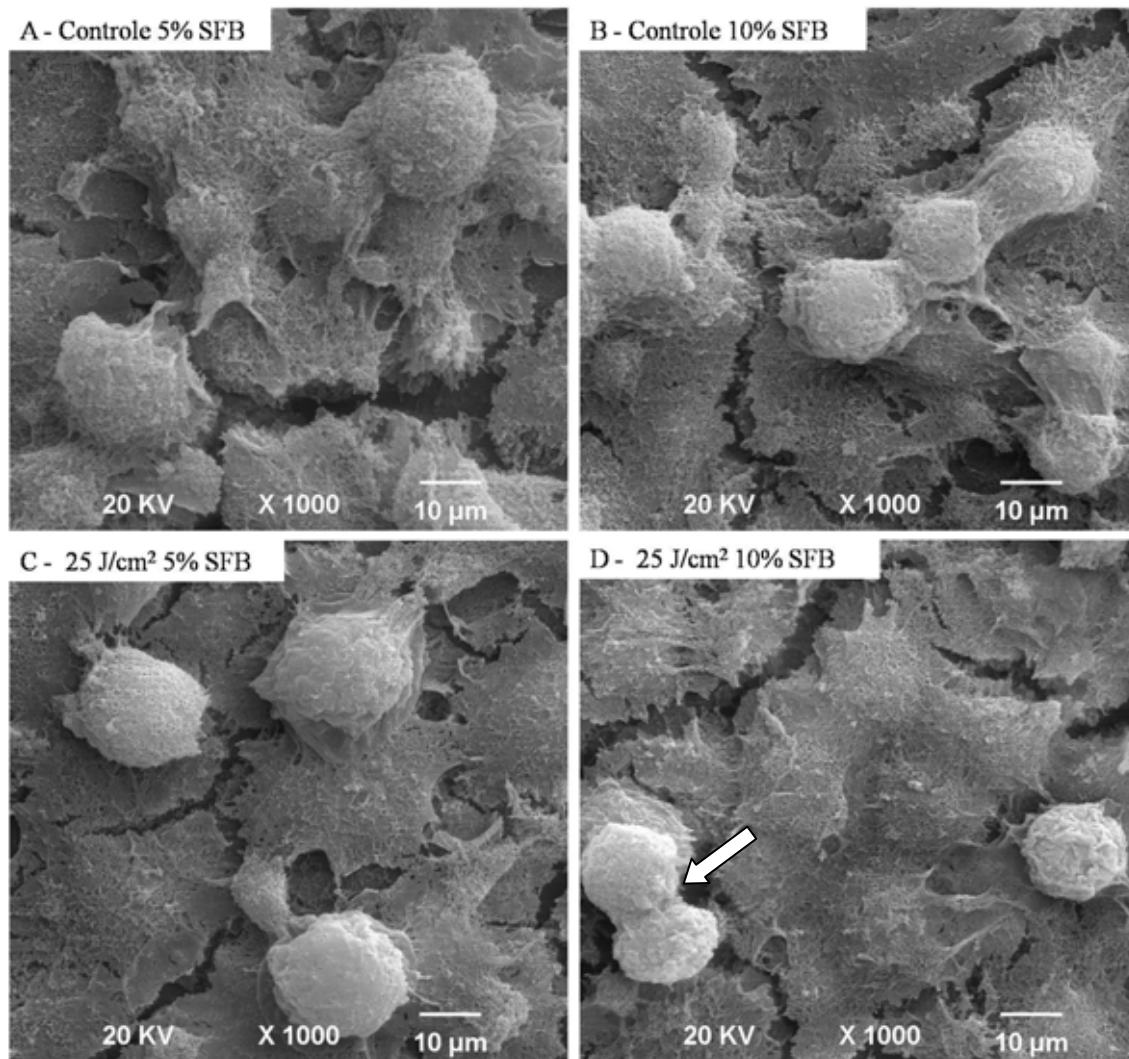


FIGURA 9 – A: (controle – 5%SFB) As células MDPC-23 exibem morfologia normal e estão recobrendo completamente o substrato de vidro. B: (controle – 10%SFB) As células MDPC-23 apresentam amplo citoplasma, do qual se originam numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos. C e D: Tal como observado para os demais grupos controle utilizados nesta pesquisa, grande parte do substrato de vidro está recoberto por células MDPC-23, as quais estão organizadas em densos nódulos epitelióides e com algumas mitoses evidentes (seta). MEV, magnificação original x 1000.

## **Experimento 2: Efeito transdentinário (ação indireta) do laser de baixa intensidade**

### **1 PRODUÇÃO DA ENZIMA SDH**

#### **1.1 Comparação das simulações do tempo para atingir as doses de irradiação e concentração de soro fetal bovino (SFB) para os grupos não irradiados (controles)**

Quando os testes de MTT foram realizados após 9 dias da cultura celular, para o grupo controle, no qual as células permaneceram fora da incubadora visando reproduzir o tempo necessário para aplicação das doses de irradiação estabelecidas neste estudo, não foi identificada influência da concentração de SFB para o tempo de 930 segundos. Para o tempo de 698 segundos, a dose de 10% de SFB foi superior (Tabela 20, linhas). Entretanto, quando comparou-se apenas a concentração de SFB nos diferentes tempos, foi possível identificar uma variação significativa apenas para a concentração de 10% no tempo de 930 segundos (Tabela 20, coluna).

Tabela 20 – Relação entre produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) detectada pelo teste de MTT nos grupos não irradiados (controles), em função das variáveis, simulação do tempo (segundos), doses de irradiação ( $J/cm^2$ ) e porcentagem de soro fetal bovino (%SFB) adicionado ao meio de cultura.

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	
	5%	10%
698	0.235 (0.225-0.245) a B	0.256 (0.243-0.286) a A
930	0.242 (0.234-0.264) a A	0.227 (0.198-0.253) b A

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ )

#### **1.2 Análise do efeito da dose de irradiação laser na produção de SDH**

Uma vez demonstrado que o tempo de permanência das células MDPC-23 fora da incubadora exerceu efeito significativo na produção de proteína SDH (Tabela



20), para permitir a subsequente comparação do efeito das doses de irradiação, os valores dos grupos experimentais (irradiados), assim como os valores dos grupos controle, foram transformados em porcentagem, considerando-se o valor da mediana de cada grupo controle como 100% de produção de SDH. Essa transformação foi realizada aplicando-se a regra de três simples e teve como objetivo eliminar o efeito exercido pelo tempo de permanência das células fora da incubadora.

Ausência de efeito significativo foi observada para as doses de irradiação quando se analisou a concentração de SFB (5% ou 10%). Dessa forma, nenhum dos grupos irradiados diferiu entre si, assim como do grupo controle (Tabela 21, linhas). Efeito estatisticamente significativo da dose de irradiação foi observado quando o meio de cultura foi suplementado com 5% de SFB e as células irradiadas com 15 e 25 J/cm<sup>2</sup>; porém, essa última dose não diferiu do grupo controle. Para a suplementação de 10% de SFB, o maior efeito de bioestimulação do metabolismo celular ocorreu para a dose de 25 J/cm<sup>2</sup> (Tabela 21, colunas).

Tabela 21 – Relação entre porcentagem de produção da enzima desidrogenase succínica (SDH) detectada pelo teste de MTT nos grupo não irradiados (controle\*) e grupos irradiados, após 9 dias da cultura, em função das variáveis dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Dose de Irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB	
	5%	10%
15	113,6 (101,9-123,0) a A	106,8 (102,1-117,2) b A
25	104,5 (83,4-129,5) ab A	129,1 (124,8-135,6) a A
0* (controle)	100,0 (96,7-109,1) b A	100,1 (93,2-111,2) b A

\* a ausência de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Uma vez que esse tempo exerceu influência na produção da enzima SDH, os controles foram considerados como 100% da produção de SDH e utilizados para o cálculo da porcentagem de produção de SDH nos grupos irradiados.

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=12 (exceção feita aos grupos controle, n=24). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

## 2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

### 2.1 Comparação das simulações do tempo para atingir as doses de irradiação e concentração de soro fetal bovino (SFB) para os grupos não irradiados (controles)

Para ambas as concentrações de SFB avaliadas neste estudo, o tempo de permanência das células fora da incubadora (grupos controle, células não irradiadas), com o objetivo de simular o tempo necessário para atingir as doses de irradiação estabelecidas no experimento, não influenciou a produção de proteína total detectada após 9 dias da cultura das células MDPC-23 (Tabela 22, colunas). Por outro lado, a concentração de SFB adicionada ao meio de cultura exerceu efeito estatisticamente significativo na produção dessas proteínas. A menor produção de proteína total foi observada para a suplementação feita com apenas 5% de SFB no tempo de 930 segundos. A maior produção foi obtida quando o meio de cultura foi suplementado com 10% SFB para o tempo referente a dose de 15 J/cm<sup>2</sup>, sendo que esse último não diferiu estatisticamente do grupo onde o meio continha 5% de SFB (Tabela 22, linhas).

Tabela 22 – Relação entre a produção de proteína total (PT) detectada pelo método de Lowry nos grupos não irradiados (controles), em função das variáveis, simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB).

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	
	5%	10%
698	0,606 (0,566-0,647) a A	0,662 (0,611-0,721) a A
930	0,602 (0,581-0,627) a B	0,659 (0,536-0,687) a A

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

### 2.2 Análise do efeito da dose de irradiação laser sobre a produção de proteína total

Uma vez demonstrado que o tempo de permanência das células MDPC-23 fora da incubadora exerceu efeito significativo na produção de proteína total, foi estabelecido que para permitir a subsequente comparação do efeito das doses de irradiação, os

valores dos grupos experimentais (irradiados), assim como os valores dos grupos controle, foram transformados em porcentagem, considerando-se o valor da mediana de cada grupo controle como 100% de produção de proteína total, como descrito anteriormente. Essa transformação foi realizada aplicando-se a regra de três simples e teve como objetivo eliminar o efeito exercido pelo tempo de permanência das células fora da incubadora.

Para a mesma dose de irradiação aplicada sobre as células MDPC-23 em cultura, não foi identificado diferença estatisticamente significativa com relação à concentração de SFB adicionado ao meio de cultura (Tabela 23, linhas). Entretanto para uma mesma porcentagem de SFB, a maior produção de PT foi observada quando as células foram irradiadas com 25 J/cm<sup>2</sup>.

Tabela 23 – Relação entre a produção de proteína total detectada pelo método de Lowry nos grupos não irradiados (controle\*) e grupos irradiados, em função das variáveis, dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB) adicionado ao meio de cultura.

Dose de Irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB	
	5%	10%
15	93,6 (72,9-102,1) b A	100,2 (93,2-105,7) b A
25	111,0 (103,8-119,0) a A	110,8 (102,7-116,6) a A
0* (controle)	100,0 (96,5-105,1) b A	100,1 (90,4-104,8) b A

\* a ausência de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Uma vez que esse tempo exerceu influência na produção da enzima SDH, os controles foram considerados como 100% da produção de SDH e utilizados para o cálculo da porcentagem de produção de SDH nos grupos irradiados.

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=12 (exceção feita aos grupos controle, n=24). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Para os grupos irradiados, nenhuma diferença significativa na produção de PT foi observada para a dose de 15 J/cm<sup>2</sup> com relação ao grupo controle onde 5% ou 10% de SFB foi adicionado ao meio de cultura. No grupo controle, entretanto, maior produção

de PT foi observado quando o meio de cultura foi suplementado com 10% de SFB, seguido pela concentração de 5% (Tabela 23, colunas).

### 3 PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA (FA)

#### 3.1 Efeito do período decorrido entre o tratamento e a análise da fosfatase alcalina

A porcentagem de SFB adicionada ao meio de cultura exerceu efeito estatisticamente significante sobre a produção de fosfatase alcalina para o grupo controle (células não irradiadas), onde as células foram mantidas fora da incubadora pelo mesmo tempo equivalente a dose de irradiação de  $15 \text{ J/cm}^2$ , sendo o menor valor observado para a concentração de 5% de SFB. Contudo, para o tempo de 930 segundos, não foi observado diferença estatisticamente significante (Tabela 24, linhas). Com relação a concentração de SFB usada na suplementação do meio de cultura, a única variação identificada foi para o grupo de 10% no tempo referente a dose de  $25 \text{ J/cm}^2$ . Desta forma, os valores para o grupo de 5% de SFB não diferiram estatisticamente (Tabela 24, colunas).

Tabela 24 – Relação entre produção de fosfatase alcalina (FA) nos grupos não irradiados (controles), em função das variáveis, simulação do tempo (segundos) para as doses de irradiação ( $\text{J/cm}^2$ ) e concentração de soro fetal bovino (%SFB) incorporado ao meio de cultura.

Tempo de irradiação (segundos)	% SFB	
	5%	10%
698	379,48 (320,03-447,27) a B	529,09 (322,59-617,96) a A
930	288,85 (240,43-348,64) a A	393,41 (385,74-442,59) b A

<sup>a</sup> Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=16. Grupos identificados com a mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p>0,05$ )

### 3.2 Análise do efeito da dose de irradiação laser (9 dias) na produção de fosfatase alcalina

Os valores de fosfatase alcalina transformados em porcentagem do controle estão apresentados na Tabela 24. O efeito da porcentagem de SFB adicionado ao meio de cultura não variou para a mesma dose de irradiação aplicada sobre as células MDPC-23 (Tabela 25, linhas). Contudo, quando foram comparados os diferentes grupos de irradiação para a mesma porcentagem de SFB no meio de cultura, foi possível observar uma maior produção de FA para a concentração de 5% de SFB associada a dose de irradiação de 25 J/cm<sup>2</sup>. A mesma concentração de SFB associada a dose de irradiação de 15 J/cm<sup>2</sup> não diferiu do controle. Entretanto, para a concentração de 10% de SFB não foi identificada diferença estatística para os grupos onde as células foram irradiadas com as doses de 15 J/cm<sup>2</sup> e 25 J/cm<sup>2</sup>. (Tabela 25, colunas).

Tabela 25 – Relação entre porcentagem de produção de fosfatase alcalina no grupo não irradiado (controle\*) e grupos irradiados após 9 dias da cultura, em função das variáveis, dose de irradiação (J/cm<sup>2</sup>) e concentração de soro fetal bovino (%SFB) adicionado ao meio de cultura.

Dose de Irradiação (J/cm <sup>2</sup> )	% SFB	
	5%	10%
15	99,2 (80,7-128,3) b A	100,0 (74,8-124,4) a A
25	116,8 (108,0-148,0) a A	110,1 (104,7-123,0) a A
0* (controle)	100,0 (84,3-117,9) b A	100,2 (90,6-114,1) a A

\* a ausência de irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) representa os grupos controle onde foi simulado o tempo que as células MDPC-23 permaneceram fora da incubadora referente a cada dose de irradiação. Uma vez que esse tempo exerceu influência na produção da enzima SDH, os controles foram considerados como 100% da produção de SDH e utilizados para o cálculo da porcentagem de produção de SDH nos grupos irradiados.

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25-percentil 75), n=12 (exceção feita aos grupos controle, n=24). Nas colunas, valores seguidos de letras minúsculas iguais, e nas linhas, de letras maiúsculas iguais, não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

#### **4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR (MEV)**

As células MDPC-23 cultivadas sobre a superfície pulpar dos discos de dentina, as quais foram submetidas a condição de carência nutricional (5% SFB) e receberam a dose de irradiação de  $15 \text{ J/cm}^2$  apresentavam-se organizadas em nódulos epitelióides definidos e recobriam completamente a superfície dentinária (Figura 10C). Este mesmo padrão morfológico e de distribuição celular também foi observado no grupo onde as células foram mantidas em meio de cultura com 10% de SFB (Figura 10D). Para ambas as situações de normalidade ou estresse das células, mitoses foram freqüentemente observadas em todos os espécimes avaliados. Quando comparados aos grupos controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 5% (estresse) ou 10% de SFB e mantidas por 698 segundos fora de incubadora (sem irradiação), um padrão morfológico celular semelhante ao descrito acima ocorreu. Nódulos epitelióides densos eram formados por células MDPC-23 compactadas, as quais apresentavam numerosos prolongamentos citoplasmáticos originados de sua membrana (Figura 10 A/B).

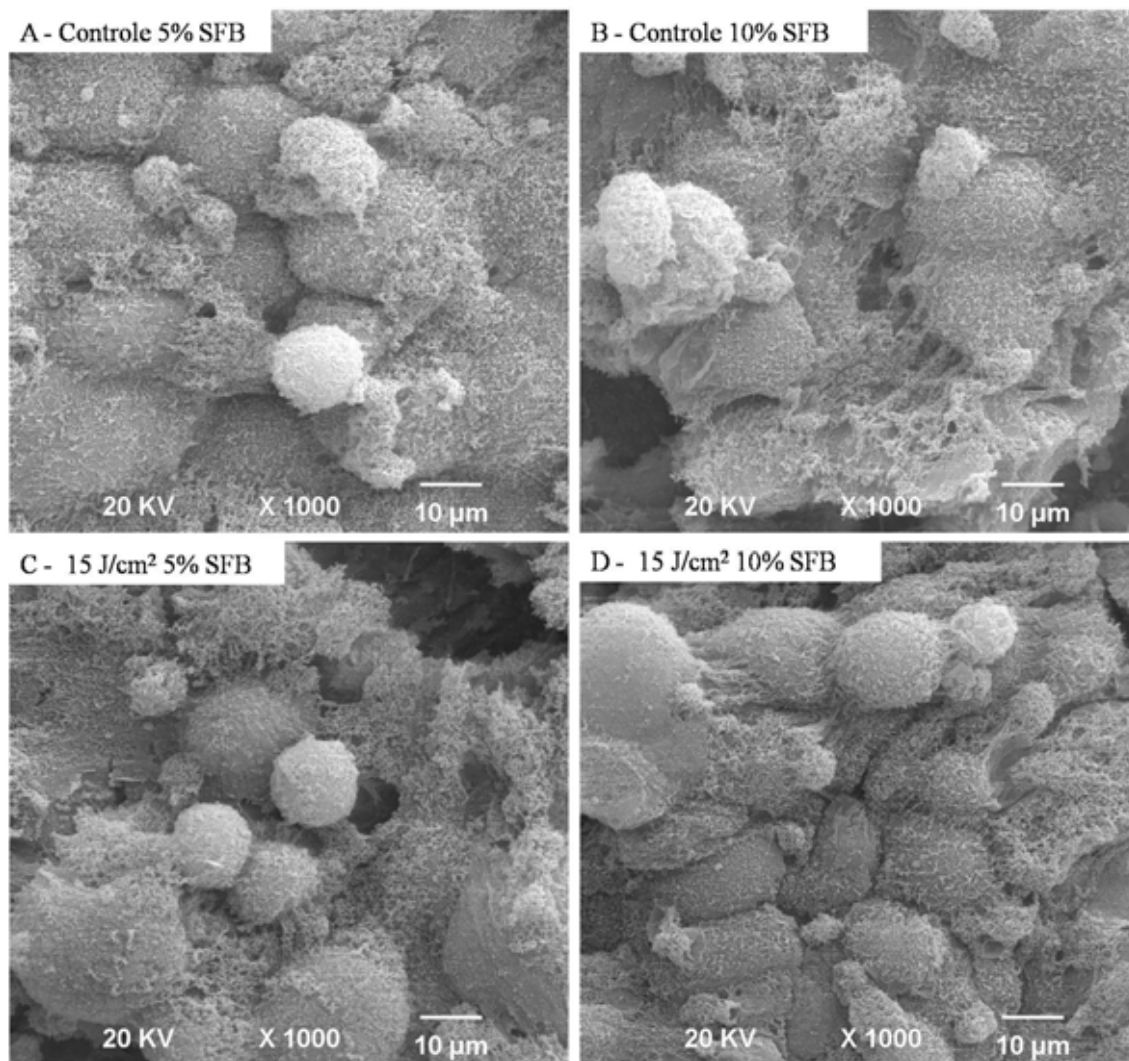


FIGURA 10 – A: (controle – 5%SFB) Células MDPC-23 com morfologia normal recobrem a superfície pulpar do disco de dentina. B: Grande quantidade de células odontoblastóides com numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos é observada, caracterizando a formação de um denso nódulo epitelióide. C: O padrão morfológico e de distribuição celular é muito semelhante àquele descrito para a figura 10B. D: Observe o substrato dentinário completamente recoberto por células MDPC-23 as quais parecem estar compactadas e com ocorrência de mitose. MEV, magnificação original x 1000.

Nos grupos controle, onde as células MDPC-23 foram cultivadas em meio de cultura com 5% de SFB (estresse) ou 10% de SFB e mantidas por 930 segundos fora da incubadora (sem irradiação), foi observado a permanência de um grande número destas células organizadas em nódulos epitelióides sobre o substrato dentinário (Figura 11 A/B). Com relação às células submetidas à irradiação, observou-se um aspecto semelhante ao grupo controle sendo possível identificar, também,

nódulos epitelióides densos e definidos (Figura 11 C/D). Para ambas as situações de normalidade ou estresse das células, mitoses foram frequentemente observadas em todos os espécimes avaliados, sendo que as células MDPC-23 não apresentavam alterações morfológicas nem redução numérica sobre o substrato dentinário.

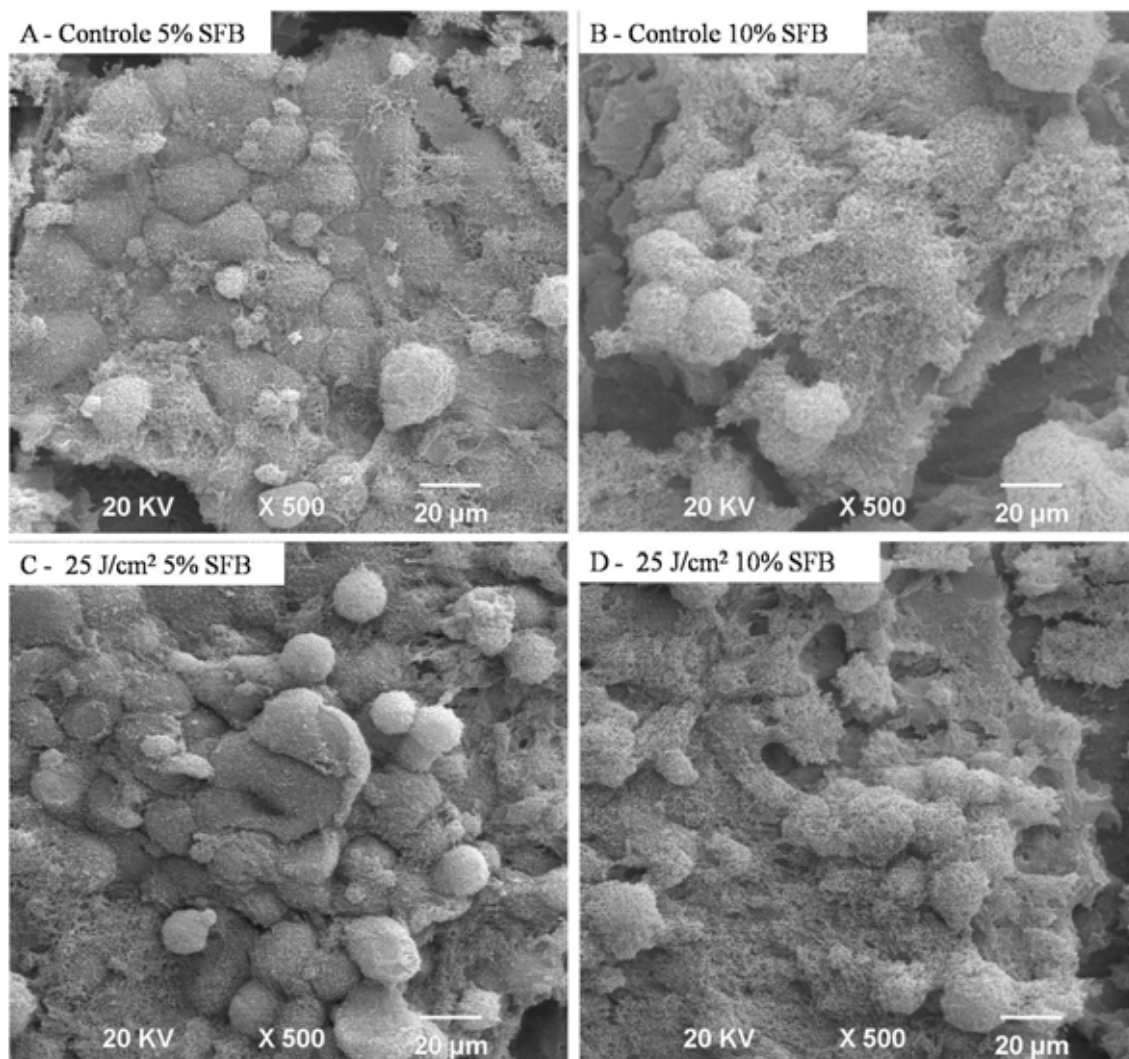


FIGURA 11 – A (controle – 5% SFB): Células MDPC-23 se organizaram para formar um denso nódulo epitelióide sobre a dentina. B (controle – 10% SFB): As células exibem ampla membrana citoplasmática irregular de onde se originam numerosos prolongamentos citoplasmáticos. C: Denso nódulo epitelióide formado por um grande grupo de células odontoblastóides compactadas, as quais apresentam morfologia normal. D: Tal como observado para os demais grupos controle demonstrados anteriormente, grande parte do disco de dentina está recoberto por numerosas células. MEV, magnificação original x 500.



## 5 EXPRESSÃO DE FOSFATASE ALCALINA E COLÁGENO TIPO I

De maneira geral, a análise da expressão gênica nas culturas de células odontoblastóides MDPC-23 após 9 dias da irradiação com a dose de  $15 \text{ J/cm}^2$ , demonstrou a não ocorrência de alterações nos níveis dos mRNAs de fosfatase alcalina (FA), quando os grupos irradiados foram comparados aos seus respectivos controles (Figura 12).

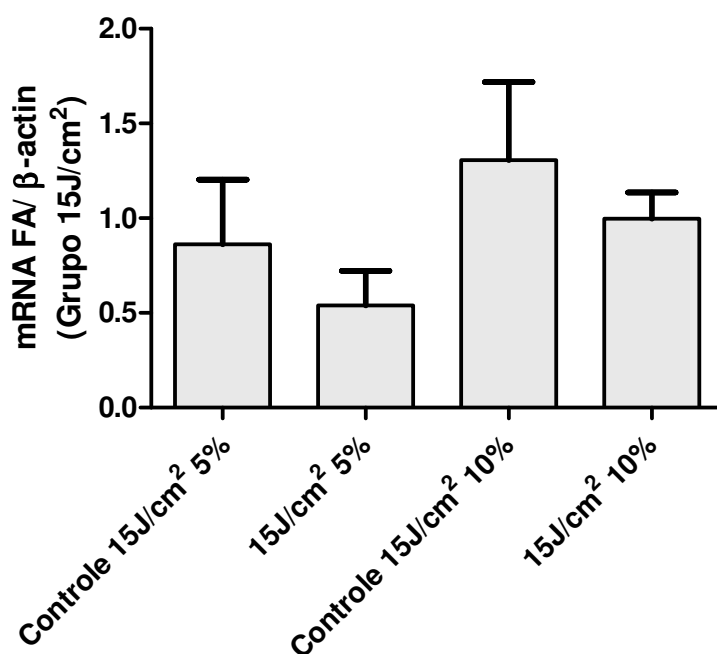


FIGURA 12 - Níveis de expressão dos mRNAs de ALP após o tratamento com laser na dose de  $15 \text{ J/cm}^2$ . Colunas representam o valor da média e barra de erro o desvio-padrão (n=6). Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA)

Na presente pesquisa, foi possível observar, também, que a irradiação transdentária das células mantidas em meio de cultura suplementado com 5% de SFB com a dose de  $25 \text{ J/cm}^2$  proporcionou um aumento na expressão de FA em cerca de 1 vez com relação ao seu respectivo controle. Contudo, para a concentração de 10% de SFB, não foi identificada qualquer alteração na expressão de FA quando as células MDPC-23 foram irradiadas com esta mesma dose (Figura 13).

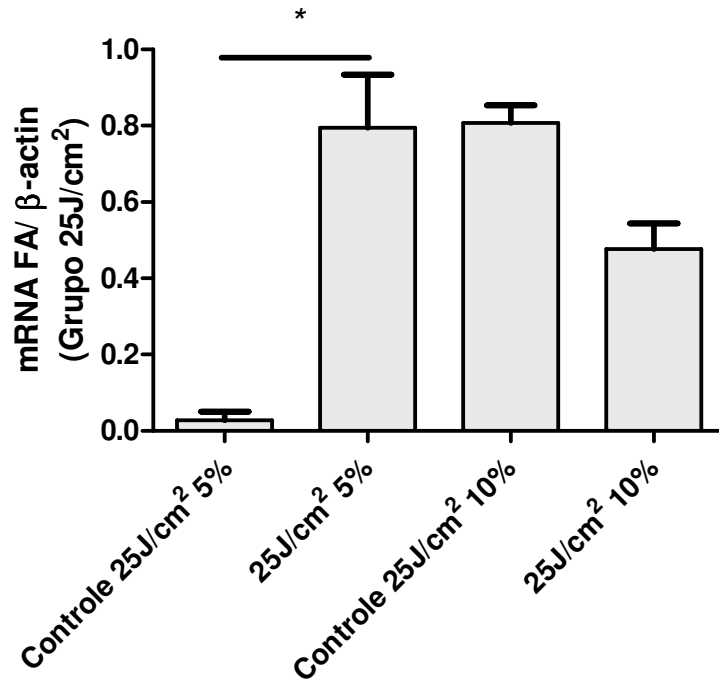


FIGURA 13 - Níveis de expressão dos mRNAs de ALP após o tratamento com laser na dose de 25 J/cm<sup>2</sup>. Colunas representam o valor da média e barra de erro o desvio-padrão (n=6). Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA)

Com base nos resultados obtidos após a irradiação das células com a dose de 15 J/cm<sup>2</sup>, foi possível identificar uma tendência a aumentar os níveis de expressão do mRNA para colágeno tipo I (Col-1) somente quando as células odontoblastóides foram mantidas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB em comparação ao seu respectivo controle. Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 14).

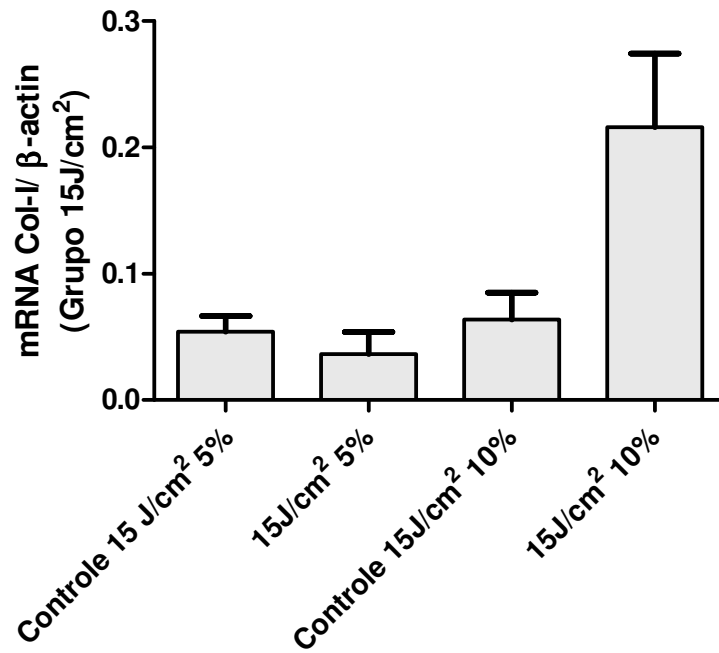


FIGURA 14 - Níveis de expressão dos mRNAs de Col-1 após o tratamento com laser na dose de 15 J/cm<sup>2</sup>. Colunas representam o valor da média e barra de erro o desvio-padrão (n=6). Não há diferença estatística entre os grupos (ANOVA)

Nas amostras de cDNAs analisadas após a irradiação com 25 J/cm<sup>2</sup>, os dados demonstram que uma diferença estatisticamente significativa ocorreu sendo possível visualizar um discreto aumento na expressão do mRNA para Col-1 quando se utilizou DMEM suplementado com 5% de SFB. Contudo, para a concentração de 10% de SFB, houve a redução de 1 vez na expressão do mRNA para Col-1 em relação ao seu respectivo controle (Figura 15).

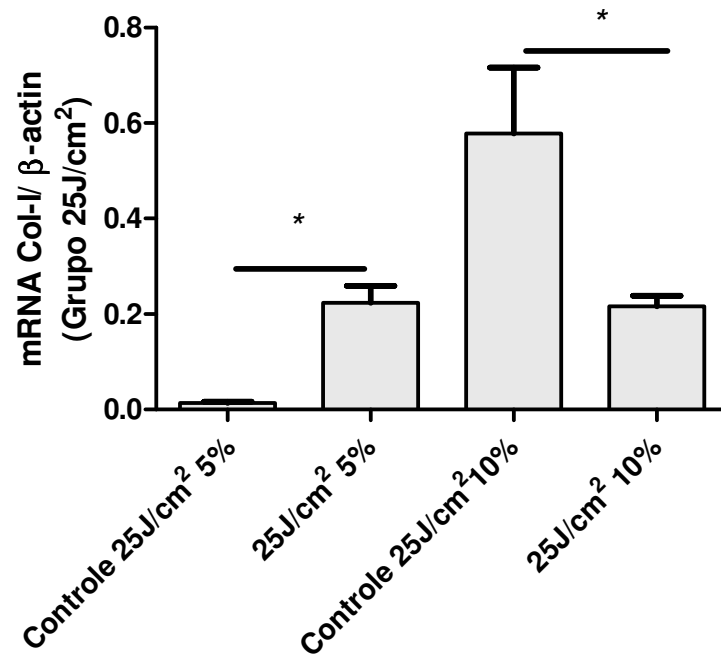


FIGURA 15 - Níveis de expressão dos mRNAs de Col-1 após o tratamento das células com laser na dose de 25 J/cm<sup>2</sup>. Colunas representam o valor da média e barra de erro o desvio-padrão (n=6). Há diferença estatística entre os grupos (ANOVA)

### Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato

Para os eventos histológicos avaliados, foram determinados, através de avaliação microscópica dos dentes submetidos ou não a preparos cavitários e irradiados ou não com laser de baixa intensidade, escores relacionados com a intensidade da resposta do complexo dentino-pulpar em diferentes períodos pós-tratamento e a possível contaminação bacteriana local. Estes escores estão demonstrados na Tabela 26.

Tabela 26 - Dados em porcentagem que caracterizam a relação entre eventos histopatológicos e intensidade dos escores de acordo com os grupos e períodos de avaliação.

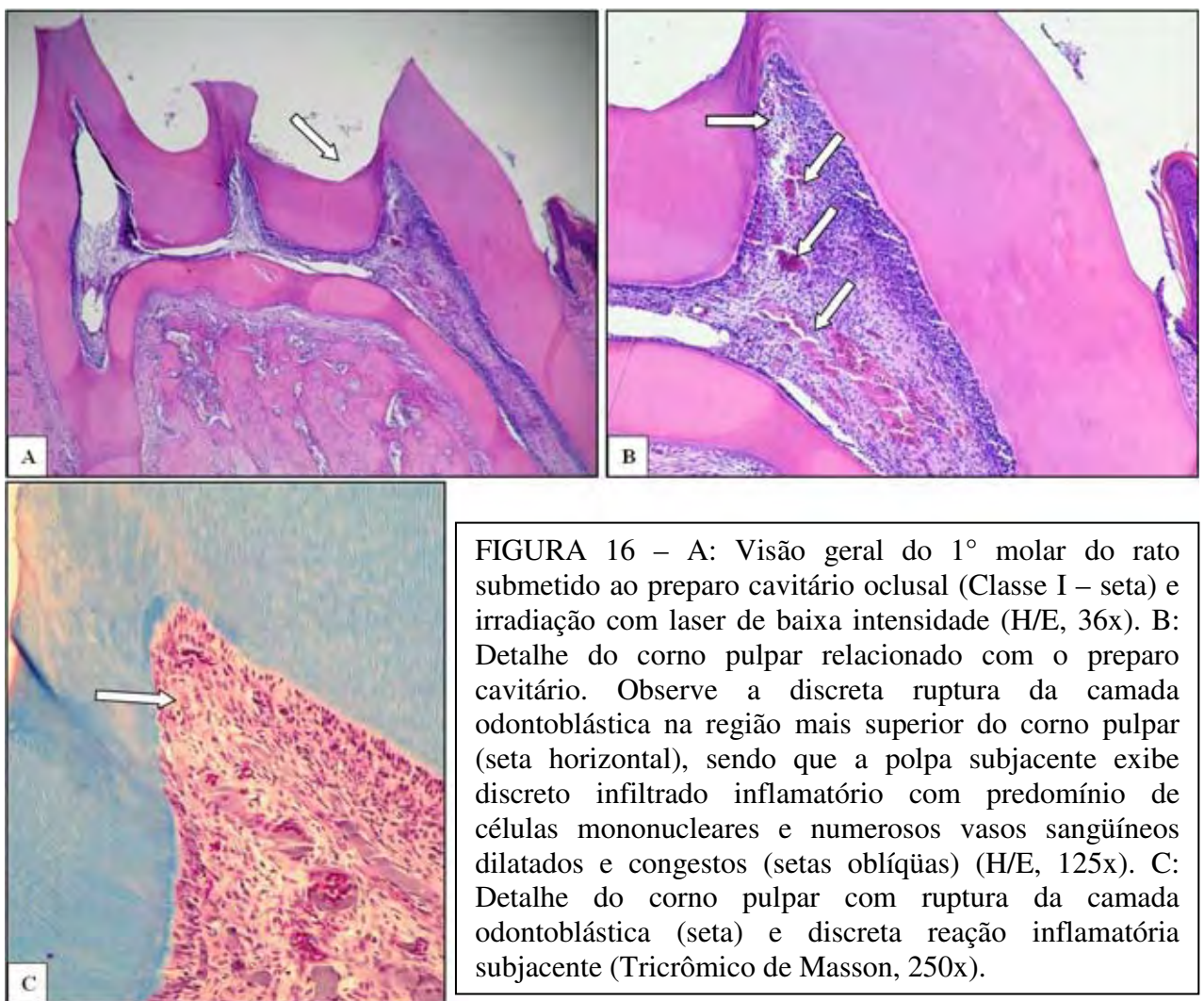
Evento histopatológico	Grupos	Períodos											
		7 dias				15 dias				30 dias			
		0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Resposta Celular Inflamatória	<b>Irradiado</b>	40	60	0	0	80	20	0	0	100	0	0	0
	<b>Controle</b>	40	60	0	0	80	20	0	0	100	0	0	0
Desorganização Tecidual	<b>irradiado</b>	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
	<b>controle</b>	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
Formação de Dentina Terciária	<b>irradiado</b>	0	0	60	40	0	0	80	20	0	10	60	30
	<b>controle</b>	0	0	60	40	0	20	80	0	0	0	60	40
Bactéria corada	<b>irradiado</b>	90	0	10	0	50	40	10	0	70	30	0	0
	<b>controle</b>	100	0	0	0	40	40	20	0	100	0	0	0

#### Grupo Irradiado (7 dias)

Os primeiros molares dos ratos que receberam preparos cavitários, os quais foram posteriormente submetidos a irradiação com laser de baixa intensidade, apresentaram, no período de 7 dias pós-tratamento, discreta ruptura da camada de odontoblastos localizada na região mais superior do corno pulpar, relacionado com a cavidade (Figura 16 A/B/C). Sessenta por cento dos espécimes exibiam deposição de discreta quantidade de dentina terciária na área, sendo que o tecido pulpar subjacente

apresentava discreta reação inflamatória com predomínio de células mononucleares em meio a numerosos vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 16 B/C). Todavia, o remanescente de polpa coronária e radicular apresentava características histológicas de normalidade.

Em apenas 10% das amostras, bactérias foram identificadas no assoalho da cavidade, porém sem penetração nos túbulos dentinários. Neste caso específico, não foi determinado exacerbação do quadro inflamatório.



### Grupo Controle - cavidades não irradiadas (7 dias)

Com relação ao grupo controle, onde as cavidades foram preparadas, porém não submetidas a irradiação com laser de baixa intensidade, 60% dos espécimes exibiam, aos 7 dias, discreta ruptura da camada odontoblástica na região mais superior do corno pulpar relacionado ao preparo cavitário (Figura 17 A/B/C). Observou-se também, discreta deposição de dentina terciária na área. O tecido pulpar subjacente exibia discreta reação inflamatória com predomínio de células mononucleares em meio à numerosos capilares. Bactérias não foram evidenciadas nos cortes histológicos corados com Brown & Brenn (Figura 17D).

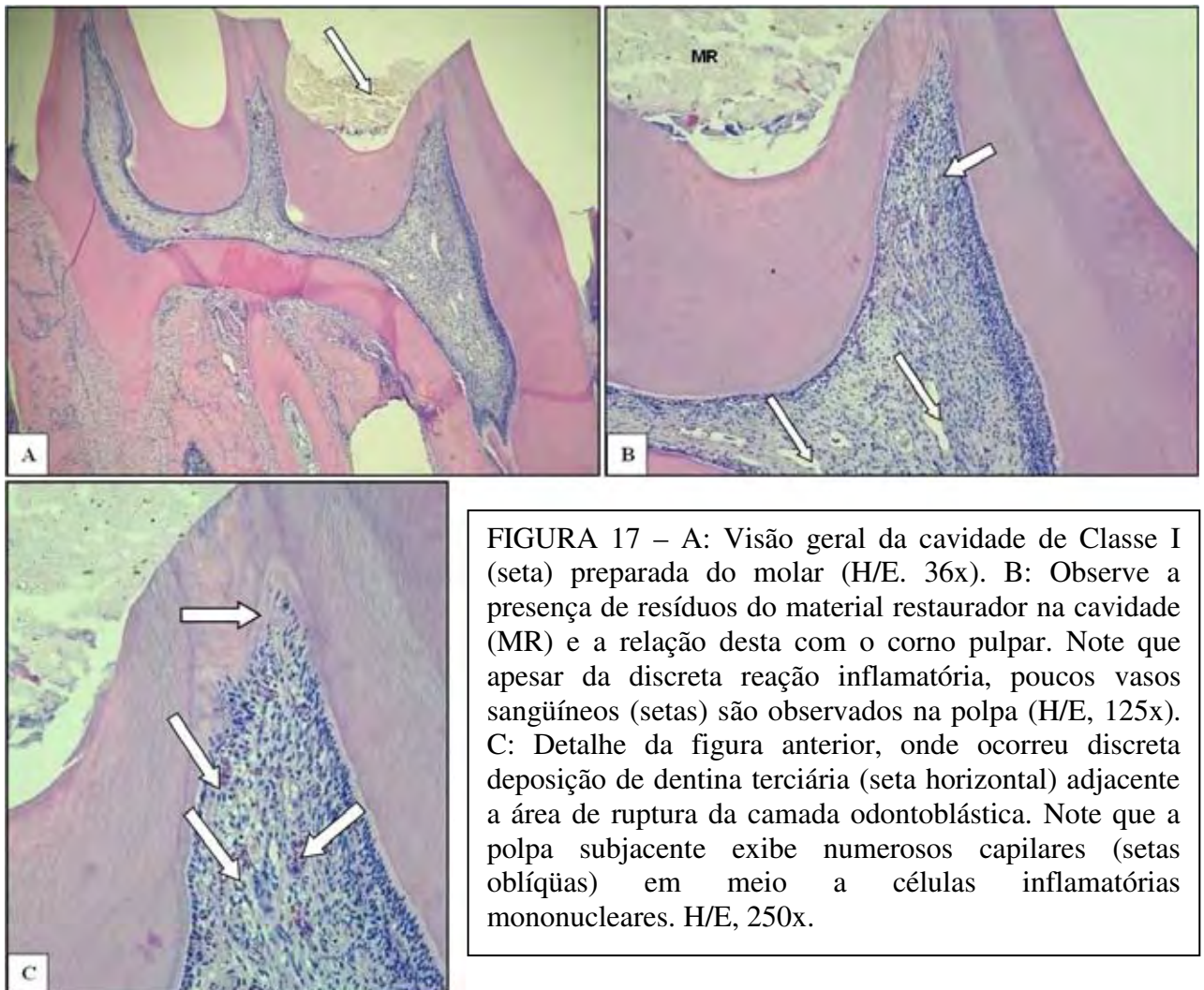


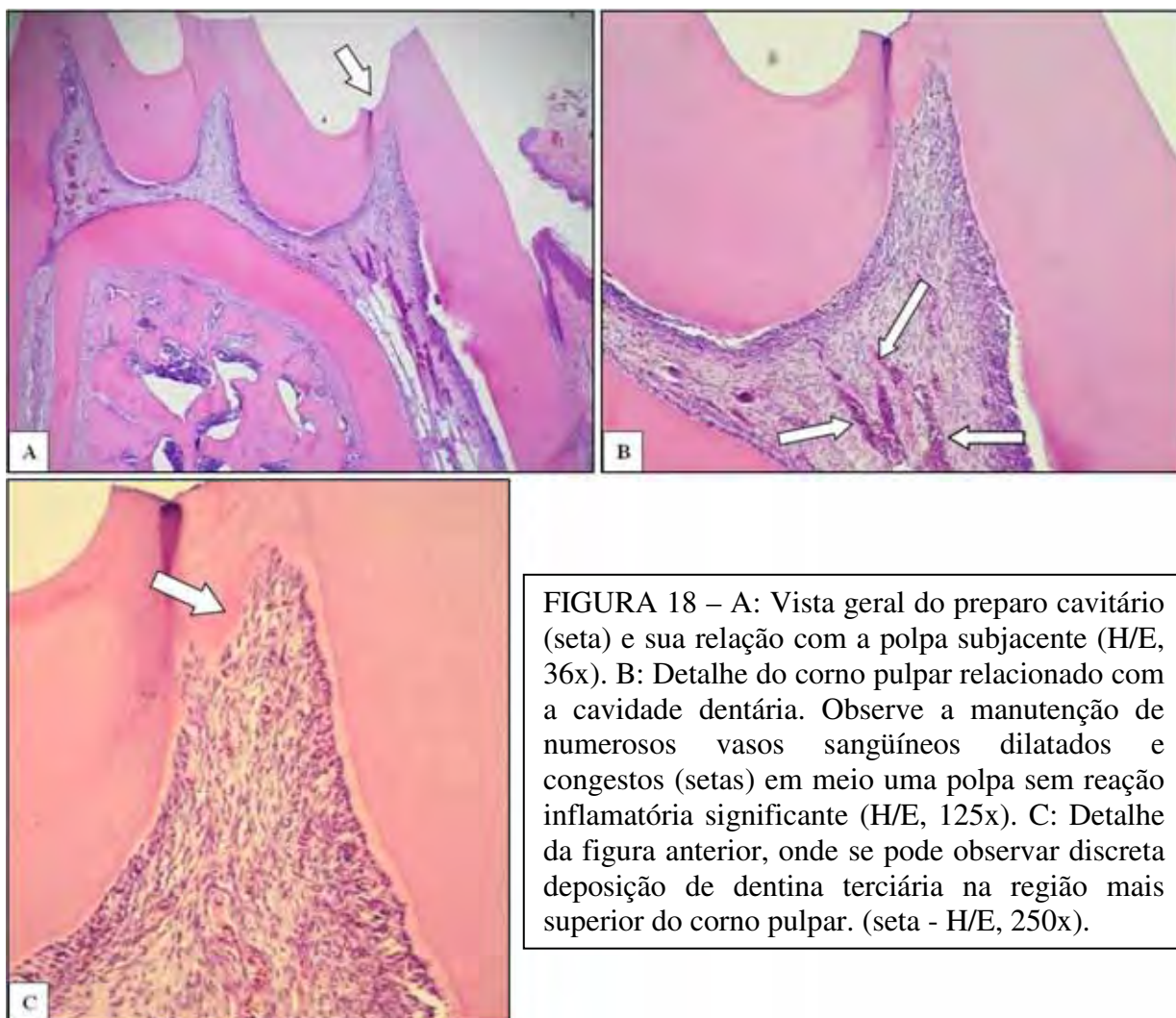


FIGURA 17 – D: Corte histológico onde pode-se observar a cavidade com resíduos de material restaurador (MR) e sua relação com a polpa subjacente. Note que não há sinais de presença de bactérias nas paredes cavitárias nem no interior dos túbulos dentinários (Brown e Brenn, 250x).

### **Grupo Irradiado (15 dias)**

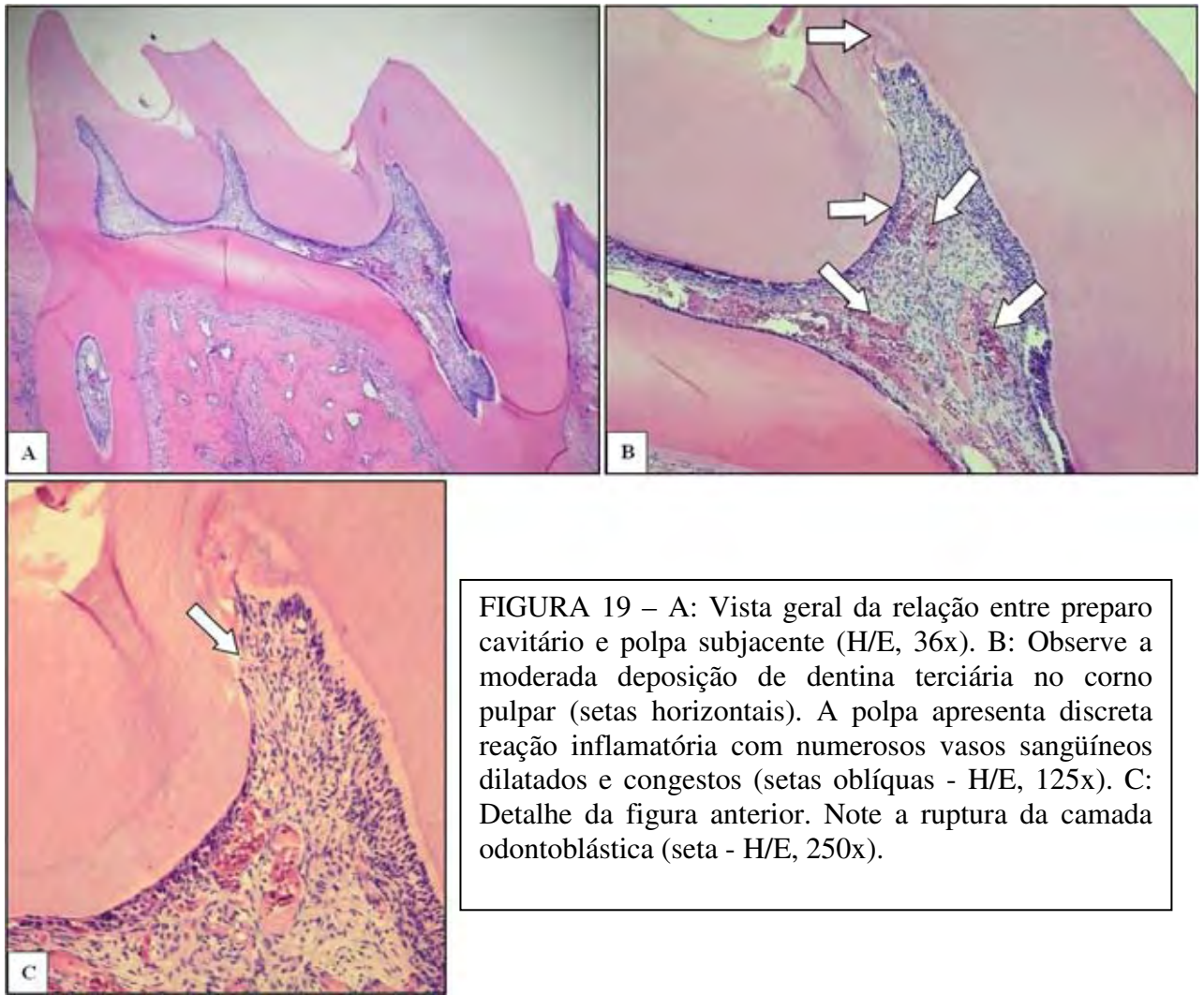
Neste período experimental, 80% dos espécimes cujas cavidades foram submetidas a irradiação com laser de baixa intensidade não apresentavam resposta inflamatória significativa. Porém, um grande número de vasos sanguíneos dilatados e congestos foi observado no tecido pulpar (Figura 18 A/B). Nestes espécimes, discreta quantidade de dentina terciária, depositada por odontoblastos organizados em monocamada, ocorreu na região mais superior do corno pulpar relacionado com a cavidade dentária (Figura 18 B/C). Estes odontoblastos apresentavam-se com morfologia cuboidal e amplo citoplasma. Os cortes histológicos corados com Brown & Brenn evidenciaram presença de bactérias nas paredes laterais e assoalho das cavidades em 50% dos espécimes. Porém, a maioria deles não apresentava qualquer alteração inflamatória pulpar.





### **Grupo Controle - cavidades não irradiadas (15 dias)**

Neste grupo controle, onde as cavidades dentárias de Classe I foram preparadas, porém não submetidas a irradiação, a resposta do tecido pulpar foi semelhante àquela observada para o grupo irradiado. Contudo, em 20% dos espécimes, onde bactérias foram evidenciadas nas paredes laterais e assoalho cavitário, ocorreu moderada deposição de dentina terciária no corno pulpar relacionado com o preparo cavitário (Figura 19 A/B/C), sendo que a polpa subjacente inflamada apresentava numerosos capilares além de vasos sanguíneos dilatados e congestos (Figura 19 B/C).



### Grupo Irradiado (30 dias)

Neste último período de avaliação, nenhum dos espécimes que receberam cavidades, as quais foram submetidas a irradiação, apresentaram significativa resposta inflamatória pulpar. Porém, 70% dos espécimes exibiam deposição de dentina terciária na região mais superior do corno pulpar relacionado com o preparo cavitário. Nestes espécimes, a matriz dentinária depositada estava mineralizada e a camada odontoblástica era contínua e homogênea. Bactérias foram evidenciadas nas paredes laterais de 30% dos espécimes pertencentes a este grupo experimental, os quais não apresentavam inflamação ou desorganização tecidual significantes.

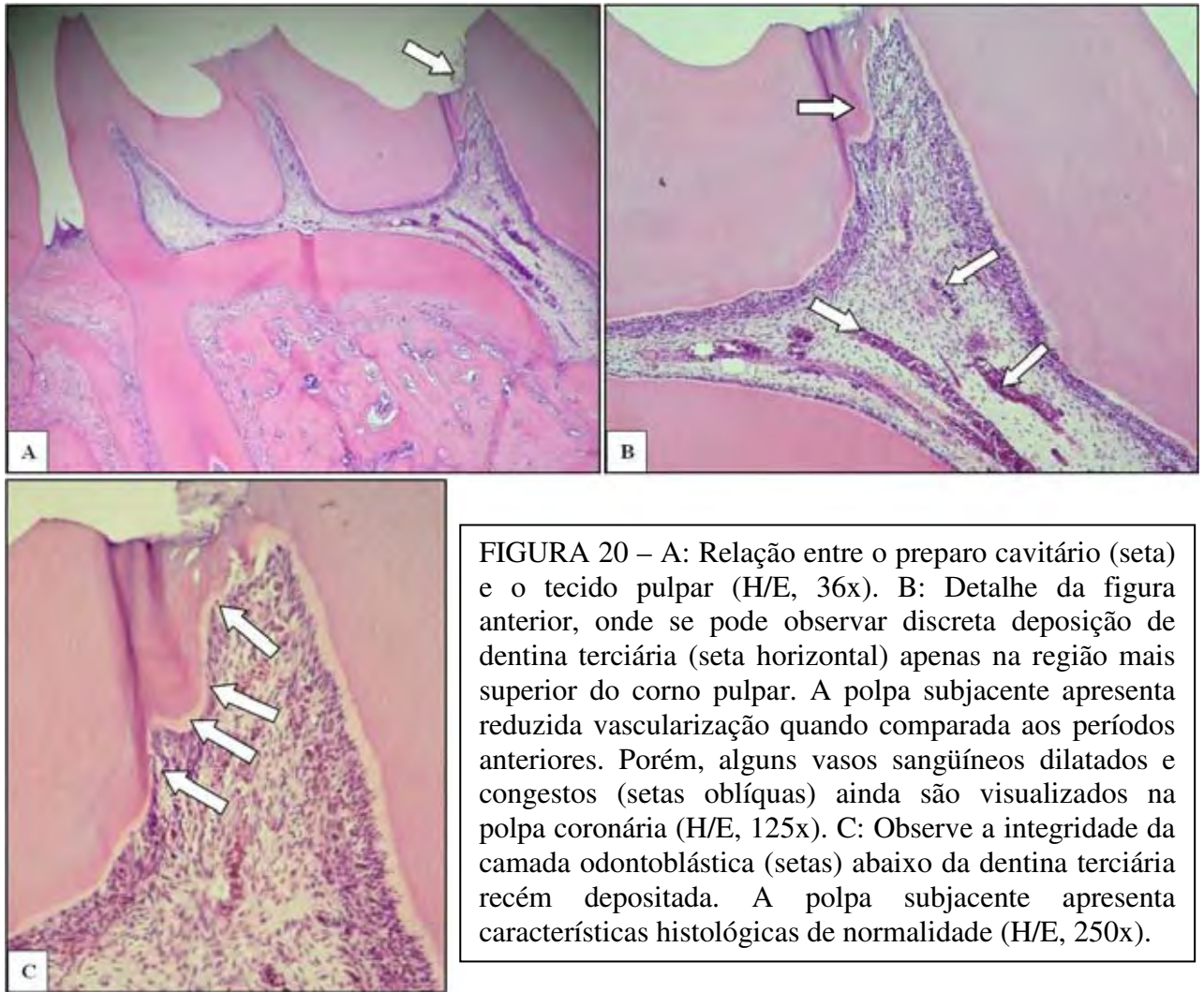
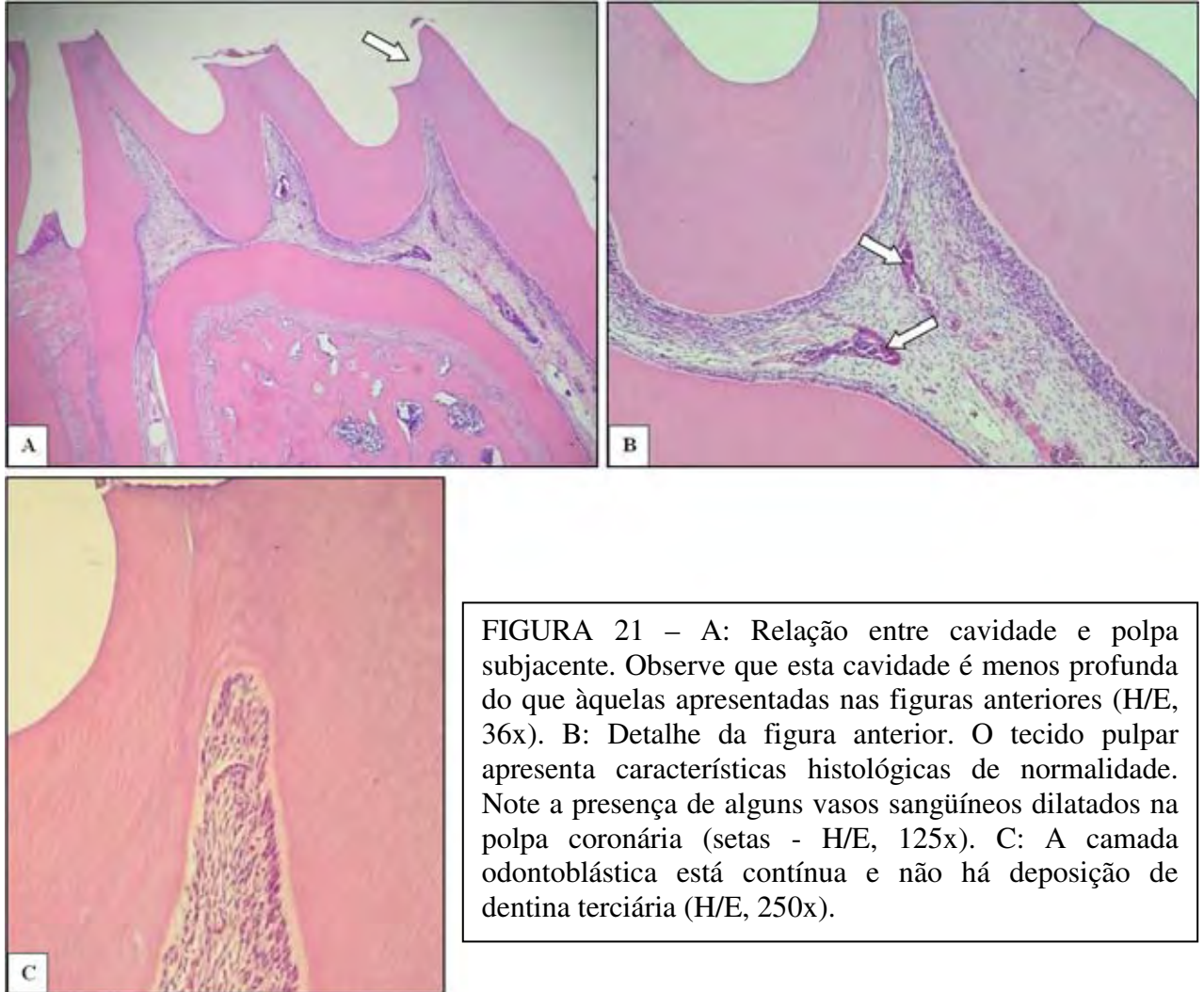


FIGURA 20 – A: Relação entre o preparo cavitário (seta) e o tecido pulpar (H/E, 36x). B: Detalhe da figura anterior, onde se pode observar discreta deposição de dentina terciária (seta horizontal) apenas na região mais superior do corno pulpar. A polpa subjacente apresenta reduzida vascularização quando comparada aos períodos anteriores. Porém, alguns vasos sanguíneos dilatados e congestionados (setas oblíquas) ainda são visualizados na polpa coronária (H/E, 125x). C: Observe a integridade da camada odontoblástica (setas) abaixo da dentina terciária recém depositada. A polpa subjacente apresenta características histológicas de normalidade (H/E, 250x).

### Grupo Controle - cavidades não irradiadas (30 dias)

A resposta do tecido pulpar ocorrida neste grupo controle, onde cavidades dentárias foram preparadas, porém não submetidas a irradiação com laser de baixa potência, foi semelhante àquela observada para o grupo irradiado. Para todos os espécimes avaliados, não houve reação inflamatória na polpa e nem desorganização tecidual. Dentro deste mesmo período de avaliação (30 dias), pode-se determinar que o número de vasos sanguíneos neste grupo controle não irradiado foi inferior àquele observado na polpa coronária dos espécimes pertencentes ao grupo irradiado. Dentina terciária depositada apenas na região mais superior do corno pulpar aconteceu mesmo

em 70 % dos espécimes. Porém, em 30% dos espécimes, cujas cavidades eram menos profundas, não ocorreu deposição de dentina terciária (Figura 21 A/B/C), sendo que o tecido pulpar apresentava características histológicas de normalidade.



### **Grupo Controle Integro – Segundos molares sem cavidades e sem irradiação**

Para o grupo controle íntegro foram utilizados os segundos molares dos animais, os quais não receberam preparos cavitários e nem foram submetidos a irradiação com laser de baixa intensidade. Assim, estes dentes apresentavam polpa com características histológicas de normalidade, ou seja, presença de camada odontoblástica íntegra revestindo toda polpa coronária e radicular, além de equilíbrio entre células

pulpaes, componentes da matriz extracelular e vasos sanguíneos. Este tecido pulpar apresentava-se organizado e livre de reação inflamatória e deposição de dentina terciária (Figura 22 A/B).

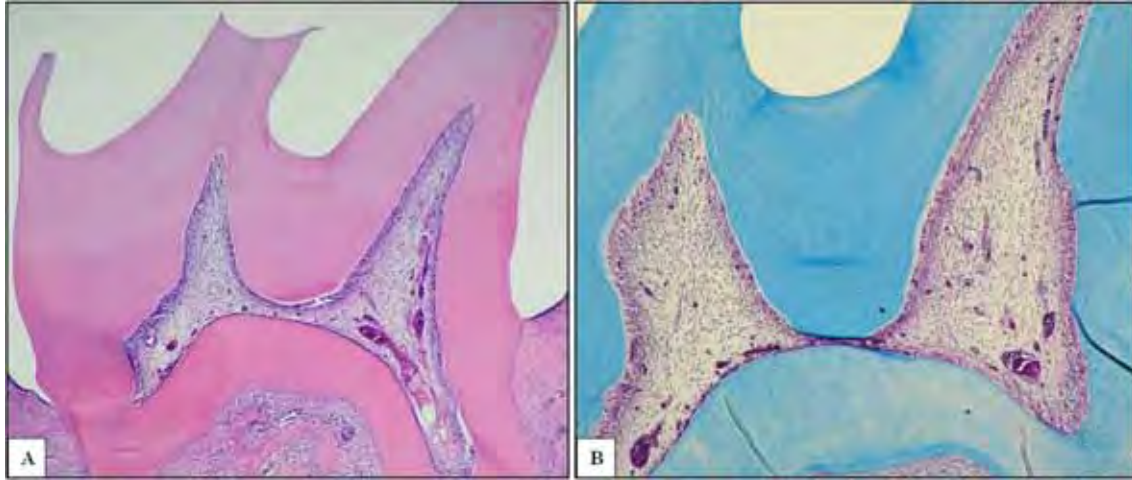


FIGURA 22 – A: Visão geral do 2º molar do grupo controle no qual nenhum procedimento foi realizado (H/E, 36x). B: Detalhe da distribuição das fibras colágenas bem como de vasos sanguíneos e células pulpaes (Tricrômico de Masson, 125x).

## 5 DISCUSSÃO

### Experimento 1: Efeito direto do laser de baixa intensidade

A terapia com laser de baixa intensidade tem sido aplicada nas diversas áreas da saúde. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de atuação do laser sobre as células (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996; Jia et al.<sup>37</sup>, 2004). Especula-se que, num primeiro momento, a luz seja absorvida pelo tecido e em seguida, essa energia seja transferida para componentes intracelulares, promovendo efeitos fotoelétricos que induzem a regulação do sistema celular por meio do processo, conhecido como biomodulação (Stein et al.<sup>92</sup>, 2005, Tuby et al.<sup>97</sup>, 2007). Este processo, o qual pode ser obtido pela irradiação com o laser vermelho e infra-vermelho, possui um limiar de penetração nos tecidos biológicos dependente do comprimento de onda, bem como das propriedades ópticas, espessura e reflectância do tecido irradiado (Mochizuki-Oda et al.<sup>67</sup>, 2002, Jia et al.<sup>37</sup>, 2004). Para o laser com comprimento de onda que se localiza no infra-vermelho, tal como aquele utilizado na presente pesquisa, a interação parece ocorrer com os cromóforos presentes na mitocôndria, estimulando assim as funções celulares (Karu et al.<sup>42</sup>, 1995). Dentre essas funções, as mais estudadas com relação a biomodulação são proliferação celular; reparação tecidual associada a liberação de proteínas e citocinas; e a síntese de matriz de colágeno (Kreisler et al.<sup>52</sup>, 2003, Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006, Matsui et al.<sup>65</sup>, 2007, Tuby et al.<sup>97</sup>, 2007).

Pesquisas com laser têm utilizado o protocolo de indução de déficit nutricional como forma de causar estresse em diferentes células em cultura (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003). Diante de tal fato, no presente experimento o meio de cultura completo (suplementado com 10% de SFB), onde as células MDPC-23 foram originalmente cultivadas, foi substituído, após 24 horas do cultivo, por um meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de SFB. A suplementação do

DMEM com 2% e 5% SFB para induzir o estresse celular está baseada em pesquisas anteriores, as quais demonstraram que células em cultura respondem de maneira mais efetiva quando submetidas a tal estímulo, visto que os mecanismos de resposta celular tornam-se mais sensíveis à absorção da irradiação (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Cagnie et al.<sup>16</sup>, 2003, Jia et al.<sup>37</sup>, 2004, Stein et al.<sup>92</sup>, 2005).

Como demonstrado por Almeida Lopes et al.<sup>2</sup>, em 2001, a não suplementação do meio de cultura com SFB interfere negativamente na proliferação dos fibroblastos em cultura por causar uma condição de estresse celular danosa. Contudo, a adição de 5% SFB proporcionou uma taxa de proliferação menor do que a ideal (10%), porém suficiente para induzir a uma condição de estresse in vitro. Da mesma maneira Oliveira et al.<sup>75</sup>, em 2008 não observou alteração no metabolismo celular após irradiação de células odontoblastóides mantidas em meio de cultura não suplementado com SFB. Entretanto, a escassez de dados científicos publicados com relação a influência das diferentes concentrações de SFB no meio de cultura sobre o metabolismo celular, não permite uma análise comparativa confiável dos resultados apresentados nesta pesquisa com aqueles já publicados, cuja maioria não padronizou tal parâmetro ou usaram diferentes linhagens celulares.

O presente trabalho de pesquisa avaliou os efeitos da suplementação do meio de cultura (DMEM) com as concentrações de 2%, 5% e 10% de SFB sobre o metabolismo de células odontoblastóides em cultura. Tais células responderam de forma mais favorável à concentração de 5% de SFB quando expostas à irradiação, com diferença estatística nas doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup> em relação aos demais grupos. Esse dado reforça os resultados obtidos por Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, em 2001. Neste estudo, os fibroblastos em cultura sob déficit nutricional apresentaram crescimento celular maior ou igual às células controle, quando expostos à irradiação. Pereira et al.<sup>80</sup> (2002)

também encontraram um aumento da proliferação de células NIH 3T3 colocadas em condição de estresse, porém o meio de cultura foi suplementado com apenas 2,5% de SFB. Dessa forma, pode-se sugerir que a concentração de SFB adicionado ao meio de cultura para gerar o estresse celular não danoso provavelmente é específico para cada tipo de célula. Assim, foi possível demonstrar, na presente pesquisa, que a alteração da concentração de SFB não danificou as células odontoblastóides, uma vez que elas, quando avaliadas em MEV, não apresentaram qualquer alteração morfológica, sendo que nos grupos irradiados, estas células mantiverem características semelhantes às aquelas observadas no controle.

Diversas pesquisas têm demonstrado que o efeito biomodulador do laser de baixa intensidade é específico para os diversos tipos celulares, dentre eles o macrófago, linfócito, queratinócito, célula endotelial, fibroblasto e osteoblasto (Grossman et al.<sup>33</sup>, 1998, Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Khadra et al.<sup>45</sup>, 2005, Moore et al.<sup>69</sup>, 2005). No caso das células com fenótipo de odontoblasto, a proliferação celular e a síntese de determinadas proteínas estão entre os efeitos biomoduladores mais desejados, pois estas atividades celulares participam diretamente do processo de reparação do tecido pulpar (Linde, 1993). Tem sido descrito que a irradiação de células com laser promove a excitação eletrônica de moléculas fotoceptoras presentes na cadeia respiratória, o que desencadeia respostas proliferativas juntamente com o aumento na expressão protéica (Karu et al.<sup>43</sup>, 2004). Na presente pesquisa, especificamente no grupo de irradiação direta, foi possível identificar uma proliferação celular mais evidente após 9 dias de cultura. As células irradiadas e mantidas em DMEM suplementado com 5 ou 10% de SFB aumentaram sua produção de SDH quando comparadas as células onde o DMEM foi suplementado com apenas 2% de SFB. Tal fenômeno também foi identificado na avaliação da síntese de proteína total. Dessa forma, pode-se afirmar que



a irradiação no comprimento de onda de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup> avaliado na presente pesquisa foi satisfatória para a linhagem de células MDPC-23.

O comprimento de onda infra-vermelho utilizado no presente experimento, quando aplicado em doses específicas, tais como de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup>, pode atingir a membrana mitocondrial da célula, sendo então absorvido pelos cromóforos. Tem sido demonstrado que essas estruturas celulares são fotossensíveis e englobam a classe das porfirinas, flavinas, citocromos mitocondriais, membrana plasmática e sistema NADH oxidase, o qual possui flavoproteínas e citocromo b (Kale et al.<sup>38</sup>, 1992, Fraikin et al.<sup>28</sup>, 1996, Edwards et al.<sup>26</sup>, 2001). Esse espectro, mais especificamente no comprimento de onda próximo ao 785 nm, é absorvido pela porção ferrosa heme a<sup>+2</sup><sub>3</sub> no citocromo c oxidase da mitocôndria (Karu et al.<sup>40</sup>, 2005), o que pode causar modificações rápidas da cascata de reações químicas e físicas no interior da célula, promovendo importantes alterações metabólicas (Karu et al.<sup>39</sup>, 1988). Essas modificações resultam dos elétrons absorvidos na irradiação pelo citocromo e transferidos, na respiração oxidativa, para o receptor Cu<sub>A</sub> e posteriormente conduzidos internamente dos receptores Cu<sub>A</sub> heme-a para o heme-a<sub>3</sub>/Cu<sub>B</sub> central, por meio de 7 reações de óxido-redução intermediárias, envolvendo as moléculas de ferro (Fe) e cobre (Cu). Esse processo resulta na redução da molécula de oxigênio e conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Karu et al.<sup>43</sup>, 2004, Tuby et al.<sup>97</sup>, 2007). Assim, a presença de ROS intracelular altera o estado REDOX da célula (Lubart et al.<sup>59</sup>, 2005), sendo que em concentrações inferiores ao limiar de dano celular, ocorre a produção de diversos efeitos benéficos para as células, tais como: proliferação, diferenciação e regulação de sua sobrevivência (Murrell et al.<sup>72</sup>, 1990, Burdon<sup>9</sup>, 1995, Burdon et al.<sup>10</sup>, 1995, Callaghan et al.<sup>17</sup>, 1996). Na presente pesquisa, as alterações de síntese protéica e de metabolismo foram estatisticamente significantes nas doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup>,

permitindo, desta maneira, especular novamente que os parâmetros do laser aplicados sobre as células MDPC-23 foram suficientes para ativar os cromóforos e assim produzir a quantidade de ROS necessária para promover modificações em toda a cascata de reações positivas sobre este tipo celular. Esta especulação se deve ao fato de que resultados semelhantes aos encontrados no presente experimento também foram demonstrados por outros pesquisadores (Rochkind et al.<sup>84</sup>, 2009), os quais descreveram a ocorrência de aumento na formação de redes com a migração celular, estimulando a formação de neurônios na dose de 6,7 J/cm<sup>2</sup>. Gavish et al.<sup>30</sup> (2008), ao irradiar monócitos/macrófagos com parâmetros específicos de laser, demonstraram uma redução na secreção de vários mediadores da inflamação, tais como IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-1 $\alpha$ , e IL-6, o que caracterizou a possível eficácia do laser na redução de processos inflamatórios. Por outro lado, a irradiação de cultura de células típicas de osteosarcoma com laser num comprimento de onda de 780 nm, promoveu proliferação celular (1, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>) sem alterar a síntese de ALP, demonstrando que esse tipo celular responde efetivamente a laserterapia.

O aumento do metabolismo e proliferação celular não são os únicos efeitos desejados na terapia com laser de baixa intensidade. No caso da célula odontoblastóide MDPC-23 utilizada na presente pesquisa, a biomodulação estimularia também a síntese de algumas proteínas típicas da matriz dentinária, tais como colágeno, fibronectina e fosfatase alcalina. Tem sido demonstrado que a fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima envolvida na mineralização dos tecidos (Stein et al.<sup>92</sup>, 2005, Matsui et al.<sup>65</sup> 2007) e em geral, sua ação está correlacionada com o processo inflamatório (Matsui et al.<sup>65</sup> 2007). Diversos tipos celulares, tais como fibroblastos, osteoblastos e até mesmo odontoblastos pulpares, podem sintetizar e liberar ALP quando devidamente estimulados (Tsukamoto et al.<sup>95</sup>, 1992). Numa pesquisa recente, Matsui et al.<sup>65</sup> (2007)

aplicaram o laser de GaAlAs sobre células pulpares. Os autores demonstraram a ocorrência de estímulo da atividade e expressão de fosfatase alcalina, a qual também é um marcador de diferenciação celular. Na presente pesquisa, a síntese de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 responderam aos efeitos do laser apenas nas doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup>, aumentando a expressão de ALP.

Desta maneira, nesta primeira etapa do projeto, onde variados protocolos de irradiação direta e cultivo celular em diferentes condições de estresse foram testados, foi possível determinar que as doses de energia de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup> foram as mais efetivas para estimular as células odontoblastóides MDPC-23 em cultura.

## **Experimento 2: Efeito transdutinário do laser de baixa intensidade**

Como já relatado anteriormente, os mecanismos de atuação direta ou indireta do laser de baixa intensidade sobre células ainda permanecem pouco conhecidos (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996; Jia et al.<sup>37</sup>, 2004). Especula-se que, num primeiro momento, a luz laser seja absorvida pelo tecido e em seguida, essa energia seja transferida para componentes intracelulares, promovendo efeitos fotoelétricos, os quais regulam o sistema celular por meio do processo conhecido como biomodulação (Stein et al.<sup>92</sup>, 2005, Tuby et al.<sup>97</sup>, 2007).

Na presente pesquisa, o enfoque foi direcionado para a possível atuação transdutinária da laserterapia sobre os odontoblastos pulpares, usando como modelo, uma linhagem imortalizada de células odontoblastóides (MDPC-23) cultivada sobre discos de dentina. Os odontoblastos são células altamente diferenciadas, as quais que têm como precursoras as células da crista neural. Após sua diferenciação, estas células tornam-se as principais responsáveis pela síntese e secreção de produtos da matriz

dentinária, a qual é posteriormente mineralizada (Goldberg et al.<sup>32</sup> 2004). Tal processo é especificamente controlado e regulado por tais células (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993).

A dentina, tecido que envolve toda câmara pulpar coronária e radicular, é uma estrutura tubular, onde 70% é constituída por minerais e apenas 20% constitui a parte orgânica (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993). Entretanto, este tecido dentário posicionado abaixo do esmalte, tem sido considerado como um tecido vital por possuir no interior de seus túbulos, prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos e terminações nervosas, os quais parecem estar envolvidos diretamente da sensibilidade dentária aos mais diferentes estímulos, e também apresentam potencial para participar do processo de reparo do complexo dentino-pulpar (Ruch et al.<sup>87</sup>, 1995).

Diante de algumas situações e condições específicas, tais como incorreta escovação dentária, recessão gengival, dieta inapropriada (Tate et al.<sup>94</sup>, 2006) e forças oclusais excêntricas (Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000), bem como a possível associação delas, pode ocorrer perda e/ou desgaste de parte do esmalte da área cervical dos dentes com conseqüente exposição dos túbulos dentinários subjacente. Esta exposição leva à movimentação (exsudação) de fluido dentinário através destes túbulos, o que pode ocasionar despolarização das terminações nervosas intra-tubulares, ocasionando a hipersensibilidade dentária associada ou não a danos de variada intensidade ao tecido pulpar (Friedmann et al.<sup>29</sup>, 1991, Dababenh et al.<sup>24</sup>, 1999).

A laserterapia tem sido amplamente utilizada com o objetivo de acelerar o processo de reparo tecidual, tratamento de sensibilidade dentária e regeneração óssea, bem como terapia auxiliar na formação de dentina terciária (Godoy et al.<sup>31</sup>, 2007). Assim, pesquisas utilizando protocolos que envolvem culturas celulares, modelos animais e clínicos têm sido desenvolvidas com o intuito de esclarecer os mecanismos

moleculares da laserterapia associada às condições do tecido conjuntivo pulpar (Kreisler et al.<sup>52</sup>, 2003).

Com o objetivo de simular uma condição clínica de exposição dentinária, independente de sua etiologia, no presente experimento foi proposta a irradiação celular indireta, ou seja, através da interposição de um disco de dentina entre a fonte de luz e as células em cultura. Para isto, foram utilizados dentes humanos íntegros extraídos por indicação profissional. Destes dentes, foram obtidos discos de dentina, os quais eram adaptados, individualmente, em câmaras pulpares artificiais. Diante deste protocolo, foi possível determinar o possível efeito do laser sobre células odontoblastóides, após propagação, através do processo de dispersão da luz através dos túbulos dentinários (Kienle et al.<sup>47</sup>, 2006). Para certificar que a irradiação seria suficiente para propagar até a superfície do disco onde as células foram cultivadas, foi realizada, nesta pesquisa, a avaliação do parâmetro do laser que alcançava a superfície pulpar dos discos de dentina, onde permaneceram aderidas as células MDPC-23. Esta medição prévia foi capaz de determinar o quanto de luz seria dissipada durante sua propagação através da dentina, visto que a irradiação foi realizada sobre a superfície oclusal dos discos. Com isso, foi possível realizar uma adaptação no processo de irradiação, de forma a garantir que as doses de luz que alcançaram as células odontoblastóides foram exatamente aquelas selecionadas através da realização do primeiro experimento, onde a cultura celular foi irradiada diretamente com variados parâmetros pré-estabelecidos.

No ano de 2006, Tate et al.<sup>94</sup> demonstraram, in vivo, que a deposição de dentina terciária ocorria de maneira dose-dependente, sendo que a presença deste padrão de dentina era mais evidente no período de 30 dias após a irradiação com laser. No ano seguinte (2007), Villa et al.<sup>101</sup> demonstraram um efeito positivo do laser, caracterizado pela formação de dentina reparadora quando dentes de porco foram submetidos a

irradiação com dose de 12,8 J/cm<sup>2</sup>. Na presente pesquisa, foi observado o aumento do metabolismo das células MDPC-23 quando as duas doses previamente selecionadas (15 e 25 J/cm<sup>2</sup>) foram testadas. Estes dados comprovaram que, independente da possível alteração no padrão da luz que alcançou as células após sua propagação através dos túbulos dentinários, esta irradiação foi capaz de bioestimular as células imortalizadas de linhagem MDPC-23, tal como demonstrado quando esta linhagem celular foi diretamente irradiada. Acrescenta-se a tal resultado positivo de estimulação do metabolismo celular, um aumento expressivo na síntese de proteína total, principalmente na dose de 25 J/cm<sup>2</sup>. Do ponto de vista clínico, tal efeito é de suma importância, desde que os odontoblastos, os quais revestem internamente a dentina, necessitam ser estimulados, através da irradiação laser, para que possam sintetizar e depositar proteínas típicas da matriz, tais como colágeno tipo I, fosfatase alcalina, fibronectina e outras que participam do processo de reparação pulpar. De maneira concomitante, diferentes tipos de metaloproteínas (MMPs) são sintetizadas com o intuito de remodelar a matriz que está sendo depositada. Para que tal processo tenha seqüência após um estímulo não letal aos odontoblastos, tem início a seqüência de eventos que culminam com a mineralização desta matriz. Assim, próximo ao fronte de mineralização são depositados núcleos de hidroxiapatita; porém, a clivagem dos íons fosfatos, com o intuito de processar a mineralização local, só tem início com a alcalinização do meio. Para que a mineralização seja completa é necessário que ocorra uma grande deposição de íons cálcio, sendo que isto ocorre através de diversos mecanismos trans-membrana, os quais permitem criar sistemas de transporte de cálcio pelos espaços inter-odontoblástico seguindo até a matriz dentinária (Butler et al.<sup>13</sup>, 1995, Butler<sup>11</sup>, 1998, Butler et al.<sup>15</sup>, 2002, Butler et al.<sup>14</sup>, 2003, Butler<sup>12</sup>, 2008).

Para que ocorra o processo de mineralização de uma matriz protéica recém depositada, é necessário a presença da fosfatase alcalina (FA), a qual também tem sido reconhecida e descrita como um marcador importante para odontoblastos. Ueda, Shimizu<sup>99</sup> (2003), aplicaram laser de GaAlAs sobre células do tipo osteoblastóides em cultura. Os autores observaram a ocorrência de estímulo na atividade de FA, bem como aumento de sua expressão. Todavia, outros pesquisadores verificaram que o laser não influenciou na atividade de FA (Coombe et al.<sup>20</sup>, 2001; Khadra et al.<sup>46</sup>, 2005). No presente trabalho de pesquisa, assim como demonstrado por Ueda, Shimizu<sup>99</sup>, a dose de 25 J/cm<sup>2</sup> foi capaz de estimular significativamente a atividade de fosfatase alcalina. Esses resultados in vitro são primordiais, visto que esta proteína é a principal componente das vesículas matriciais responsáveis pelo processo de calcificação, apesar de não se conhecer exatamente até o momento, todas as suas funções (Simão et al.<sup>89</sup> 2006). Contudo, no presente estudo, não foi detectada alteração na expressão do RNAm de FA quando as células odontoblastóides foram irradiadas com laser em ambos parâmetros analisados. A discrepância dos dados de atividade da enzima com a expressão do RNAm da mesma pode ter ocorrido em decorrência do tempo de avaliação do experimento de PCR em tempo real; ou ainda a proteína pode ter sido produzida sem necessariamente ter ocorrido um aumento na expressão do seu RNAm. A etapa de tradução (síntese da proteína a partir do RNAm) é posterior à etapa de transcrição (síntese do RNAm a partir do gene que codifica para a proteína). No presente estudo, quando a atividade de FA foi avaliada no meio de cultura, foi possível determinar a atividade de toda a proteína secretada até aquele momento, a qual é produto do aumento da transcrição e da tradução da mesma. Dessa maneira como dois mecanismos podem ocorrer: i) aumento da expressão do RNAm; ii) aumento da tradução, outros tempos de avaliação dos níveis de expressão de RNAm devem ser avaliados para que se confirme

que não houve um aumento na sua expressão, e caso isto ocorra, a não observação do aumento de expressão do RNAm não necessariamente indica que a quantidade e a atividade da enzima não estejam aumentadas. Portanto, os dados da presente pesquisa nos levam a concluir que o laser, na dose de  $25 \text{ J/cm}^2$  é capaz de induzir um aumento na atividade De FA. Avaliações de outros períodos de estimulação também são necessárias para que se saiba se este aumento é dependente ou não da transcrição do RNAm desta enzima.

Outra proteína típica da dentina é o colágeno, o qual é responsável pela característica altamente fibrosa das matrizes dentinária e óssea, sobre as quais cristais de apatita são depositados (Coombe et al.<sup>20</sup>, 2001, Marques et al.<sup>63</sup>, 2004, Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006). Durante o processo de reparação da polpa, ocorre a intensa síntese de matriz dentinária, a qual é basicamente composta por colágeno tipo 1. Esta matriz de dentina rica em colágeno pode ser depositada por fibroblastos, odontoblastos e/ou osteoblastos (Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006). Apesar de alguns autores relatarem o aumento na proliferação de fibroblastos in vitro após terem sido irradiados com laser infra-vermelho (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Pereira et al.<sup>80</sup>, 2002), Kreisler et al.<sup>52</sup> (2003) e Marques et al.<sup>63</sup> (2004) afirmaram que o aumento no número celular não significa aumento da atividade de síntese celular. Os autores demonstraram ainda, que a elevada densidade de energia aplicada sobre células do tipo fibroblastos em cultura, apesar de ativar a proliferação celular, pode reduzir a síntese de colágeno. Na presente pesquisa, a expressão de colágeno foi discretamente aumentada para o grupo de  $15 \text{ J/cm}^2$  na concentração de 5% de SFB. Tal fenômeno também se repetiu para a dose de  $25 \text{ J/cm}^2$ . Porém, para essa mesma dose na concentração de 10%, a expressão foi reduzida, corroborando com a pesquisa de Kreisler et al.<sup>52</sup> (2003) e Marques et al.<sup>63</sup> (2004).



No presente estudo laboratorial, tanto o colágeno quanto a FA foram avaliados por meio de expressão do RNAm. O sinal eletrônico proveniente da irradiação excita as moléculas fotoceptoras localizadas na mitocôndria. Tal sinal é amplificado e transduzido para o núcleo por meio de reações bioquímicas (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996), resultando na produção de enzimas, tais como: Na<sup>+</sup>-ATPase, K<sup>+</sup>-ATPase e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchangers (NHEs). Todas estas enzimas desempenham importantes funções na regulação de genes e nos sinais de transdução (Karu et al.<sup>44</sup>, 1996). O final dessas reações fotobiológicas ocorre no núcleo, o que pode ocasionar aumento da taxa de síntese de DNA e RNA (Karu et al.<sup>43</sup>, 2004). Hamajima et al.<sup>34</sup> (2003) ao irradiarem células odontoblastóides em cultura com laser em dose de 7,64 J/cm<sup>2</sup>, observaram uma expressão de osteoglicina aumentada em 2,3 vezes. Ao se analisar os genes que codificam para Col-I e FA na presente investigação, não foi detectado aumento estatisticamente significativo nos níveis de expressão de RNAm de FA e colágeno tipo-1, o que não indica que o nível de expressão das proteínas não esteja aumentado, uma vez que os demais experimentos compravam o aumento da atividade da FA, penas determina que não houve aumento na expressão do RNAm.

Dessa maneira, podemos concluir que o laser nos parâmetros avaliados e mediante a carência nutricional, foi capaz de estimular as células odontoblastóides MDPC-23 em cultura, principalmente nas doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup>. A presença do disco de dentina não foi fator limitante ao estímulo; contudo ajustes na potência do laser foram necessários, devido as perdas geradas pelas características estruturais da dentina, a qual bloqueou, mesmo que parcialmente, a passagem da luz e sua ação sobre as células cultivadas. Pesquisas futuras são necessárias, visto que num modelo in vivo de complexo dentino-pulpar, a laserterapia pode interagir com diferentes células ao mesmo tempo e desencadear diferentes vias relacionadas com a bioestimulação e/ou reparação

tecidual. Somente através do desenvolvimento destas e de outras pesquisas in vivo que se poderá aplicar, de maneira segura, a laserterapia em distintas situações clínicas.

### **Experimento 3: Irradiação in vivo em molares de rato**

Atualmente, o laser de baixa intensidade tem sido aplicado em diversas áreas da saúde. Entretanto, não há na literatura uma padronização das técnicas de aplicação, potência e fluência ideal para cada procedimento, fatores estes que podem interferir na resposta celular frente a uma terapia específica (Moore et al.<sup>69</sup>, 2005). Desta forma, a determinação dos seguintes parâmetros de irradiação: comprimento de onda, densidade de energia e irradiância, são essenciais para o delineamento de uma pesquisa científica confiável, uma vez que estes parâmetros podem interagir de distintas maneiras com diferentes tecidos, o que pode resultar em perda de energia (Moore et al.<sup>69</sup> 2005). Assim sendo, é importante estabelecer protocolos de laserterapia específicos para cada situação clínica, de tal maneira que a resposta do tecido submetido à irradiação seja exclusivamente decorrente da luz e não de outros fatores externos.

Há cerca de uma década, Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000 demonstraram que apenas o comprimento de onda do laser na região do vermelho é totalmente transmitido através da dentina para alcançar a polpa. Contudo, na presente pesquisa o comprimento de onda do laser avaliado foi o infra-vermelho próximo, uma vez que esse tipo específico de laser tem sido recomendado para tratamento da hipersensibilidade dentinária (Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000, Schwarz et al.<sup>88</sup>, 2002, Ciaramicoli et al.<sup>19</sup>, 2003). Assim, diante desta condição, tornou-se necessário realizar medidas para determinar a potência do laser infra-vermelho que atingiria as células pulpares mais superficiais (odontoblastos), após sua difusão através da dentina do assoalho cavitário. Conseqüentemente, a dose de energia emitida pelo aparelho usado neste estudo foi estabelecida em 30 J/cm<sup>2</sup>, sendo

que isto assegurava a chegada de  $25\text{J}/\text{cm}^2$  de luz para os odontoblastos relacionados com o assoalho cavitário.

A temperatura também é essencial para a manutenção dos odontoblastos em condições normais de metabolismo, sendo que uma variação de  $5,5^\circ\text{C}$  pode resultar na morte de células pulpares (Zach et al.<sup>105</sup>,1965). Dentro deste contexto, Kimura et al.<sup>50</sup>, 2000, relataram que potências que variam de 30 a 60 mW, no laser do tipo GaIAs, não proporcionam aumento significativo de temperatura capaz de gerar danos pulpares. Numa pesquisa recente, Mollo et al.<sup>68</sup> (2010) demonstraram que a irradiação de dentes com laser infra-vermelho próximo proporciona danos térmicos aos tecidos pulpares apenas em potência acima de 78 mW. Assim, pode-se sugerir que na presente pesquisa, a irradiação do assoalho cavitário com laser infra-vermelho próximo com potência de 40 mW não tenha gerado aumento de temperatura suficiente para ocasionar danos para a polpa dos animais. Desta maneira, a resposta pulpar analisada neste estudo seria causada especificamente pela irradiação local, particularmente quando os eventos histológicos dos dentes irradiados foram comparados com àqueles observados no grupo controle, onde as cavidades não foram submetidas à irradiação com laser.

A metodologia de pesquisa empregada neste estudo in vivo, a qual usou molares de ratos como modelo experimental, tem sido amplamente utilizada por outros pesquisadores para avaliar materiais dentários (Costa et al.<sup>21</sup>, 2003; Souza et al.<sup>91</sup>, 2007), sendo que algumas investigações recentes foram direcionadas a avaliação dos efeitos da laserterapia sobre os dentes de ratos (Tate et al.<sup>94</sup>, 2006; Kim et al.<sup>49</sup>, 2007).

Na presente pesquisa, optou-se pela confecção de cavidades dentárias de classe I para simular uma situação clínica onde as cavidades podem ser restauradas com diferentes materiais dentários. Dentro deste contexto, a própria ação mecânica de confecção do preparo cavitário poderia gerar um estresse nas células pulpares (Tate et

al.<sup>94</sup>, 2006). Assim, desde que a resposta celular frente à laserterapia pode ser positivamente influenciada pela condição de estresse das células (Almeida-Lopes et al.<sup>2</sup>, 2001, Marques et al.<sup>63</sup>, 2004, Khadra et al.<sup>45,46</sup>, 2005), a irradiação proposta nesta pesquisa poderia reduzir os danos iniciais para a polpa. Isto porque tem sido demonstrado que parâmetros específicos de laser podem apresentar efeito antiinflamatório (Villa et al.<sup>102</sup>, 1988, Utsunomiya<sup>99</sup>, 1998) e também, estimular e/ou acelerar o processo de reparação pulpar (Tate et al.<sup>94</sup>, 2006).

Tem sido descrito que dependendo da intensidade da agressão sobre o complexo dentino-pulpar, a qual pode estar relacionada a espessura do remanescente de dentina entre o assoalho da cavidade e a polpa e também a permeabilidade dentinária, a resposta deste complexo pode proporcionar tipos diferentes de síntese e deposição de matriz dentinária (Godoy et al.<sup>31</sup>, 2007). Em virtude da maior ou menor difusão, seja de produtos bacterianos ou mesmo de componentes do material restaurador, a inflamação no tecido pulpar pode se tornar irreversível e proporcionar a morte da camada de odontoblastos (Mjör et al.<sup>66</sup>, 1991; Tziafas et al.<sup>98</sup>, 2000; Tanabe et al.<sup>93</sup>, 2002,). Desta forma, a aplicação de estímulos acima do suportável pelos odontoblastos pode levar, inicialmente, a ruptura desta camada celular que reveste internamente a dentina, caracterizando a morte destas células. Na presente pesquisa, uma suave e limitada ruptura da camada de odontoblastos na região mais superior do corno pulpar relacionado com o assoalho cavitário, foi observada tanto no grupo experimental (irradiado), como no controle (não irradiado). Esta resposta pulpar comum aos dois grupos nos períodos iniciais de avaliação (7 e 15 dias), sugere que o preparo cavitário mecânico resultou em leve agressão para a polpa, porém com intensidade suficiente para causar uma discreta reação pulpar. Contudo, no período de 30 dias, a camada de odontoblastos, anteriormente desorganizada, estava quase que completamente

reconstituída em ambos os grupos, sendo que discreta deposição de matriz dentinária irregular na região foi observada. Este padrão de resposta do complexo dentino-pulpar decorre do fato de que após a morte dos odontoblastos primários, as células mesenquimais se diferenciam em células semelhantes a odontoblastos (células odontoblastóides), as quais repõem as células mortas (Linde et al.<sup>57</sup> 1993). Durante este processo de morte e renovação da camada de odontoblastos, ocorre a síntese e deposição local de uma matriz de dentina irregular e desorganizada, denominada de dentina terciária (Tziafas et al.<sup>98</sup>, 2000).

Ferreira et al.<sup>27</sup>, em 2006 demonstrou a ocorrência de áreas de odontogênese reacional em pré-molares humanos 42 dias após terem sido submetidos a irradiação com laser de baixa potência. Neste mesmo ano, Tate et al.<sup>94</sup> relataram a formação de uma dentina osteóide após irradiação de molares de rato com laser num comprimento de onda de 810 nm e potência entre 0,5 W e 1,5 W. Posteriormente, Villa et al.<sup>101</sup> (2007), observaram, ao irradiar cavidades profundas cervicais confeccionadas com alta rotação em dentes de porcos, uma aceleração no processo inicial de formação da dentina terciária quando se utilizou o laser de baixa potência na dose de 12,8 J/cm<sup>2</sup> e com comprimento de 780nm. Estes estudos demonstram que o laser utilizado para os casos de polpa submetida a injúria, tal como ocorre durante a confecção de preparo cavitário, proporciona a redução de processos inflamatórios (Villa et al.<sup>102</sup>, 1988, Utsunomiya<sup>100</sup>, 1998), acelerando a formação da barreira mineralizada em casos de exposição pulpar, e estimulando a deposição de matriz dentinária fibrosa associada ao aumentando da produção de proteínas colagenosas (Utsunomiya<sup>100</sup>, 1998, Ohbayashi et al.<sup>74</sup>, 1999).

Tal como previamente demonstrado, estes efeitos biomoduladores do laser de baixa potência podem ser resultado da absorção dos fótons do comprimento de onda no infra-vermelho próximo pela membrana celular, proporcionando a estimulação das

atividades enzimáticas ou mesmo das reações foto-químicas (Lubart et al.<sup>58</sup>, 1996; Lubart et al.<sup>60</sup>, 1997). Todavia, tanto para o grupo experimental (cavidades irradiadas) quanto controle (cavidades não irradiadas), foi observado discreta deposição de matriz de dentina já mineralizada no período de 30 dias após a irradiação, sendo que esta estrutura dentinária neo-formada estava presente apenas na região mais superior do corno pulpar relacionado com o assoalho cavitário. Este dado histológico confirma que a aplicação do laser nos parâmetros estabelecidos nesta pesquisa em cavidades preparadas em molares de ratos não causa danos ou estímulos para as células pulpares capazes de matar ou favorecer a síntese e deposição de matriz dentinária. Assim, pode-se considerar que a discreta inflamação (predomínio de células mononucleares) e desorganização tecidual superficial (ruptura da camada odontoblástica), observadas nos primeiros períodos de avaliação na maioria dos espécimes dos grupos experimental e controle, foram ocasionados pelo preparo cavitário. Porém, em alguns espécimes tanto do grupo experimental quanto controle, onde a cavidade de classe I era superficial, nenhuma resposta pulpar foi observada em todos os períodos propostos na presente pesquisa. Esta observação histológica está de acordo com os achados de Murray et al.<sup>71</sup>, 2000, os quais relataram que as alterações pulpares estão diretamente relacionadas a espessura do remanescente dentinário entre o assoalho cavitário e a polpa.

Na presente pesquisa, a alteração pulpar mais evidente observada em microscopia de luz no grupo experimental, quando comparado ao grupo controle (onde as cavidades não foram irradiadas), estava relacionada a vascularização do tecido pulpar. Um maior número de vasos sangüíneos foi observado, em todos os períodos analisados (7, 15 e 30 dias), para os dentes onde as cavidades foram submetidas à irradiação com laser. Num trabalho de pesquisa recente, Kim et al.<sup>49</sup> (2007) relataram a ocorrência de aumento na produção de VEGF (fator de crescimento vascular) ao irradiar

implantes de titânio instalados na fíbula de ratos. Sabe-se que a expressão do VEGF está relacionada à ativação da angiogênese, a qual participa diretamente do processo de remodelação e reparação tecidual (Kurz et al.<sup>54</sup>, 2003).

A angiogênese é de extrema importância para o processo de cicatrização e cura tecidual, bem como para a manutenção da homeostase em um organismo vivo (Kim et al.<sup>49</sup>, 2007). Na presente pesquisa, não foi avaliado a expressão de mediadores inflamatórios ou de citocinas após os procedimentos operatórios de preparo cavitário associado ou não a posterior irradiação. Porém, foi demonstrado a ocorrência de uma persistente proliferação vascular nos dentes irradiados, o que nos permite sugerir que o protocolo de irradiação empregado neste estudo foi responsável pelo aumento de vasos sanguíneos na polpa dos animais. Este importante dado histológico obtido neste estudo poderá direcionar futuras pesquisas, onde será interessante avaliar os mecanismos de ação do laser infra-vermelho próximo sobre células endoteliais e seus efeitos sobre distintos tecidos humanos.

Alguns autores também têm isolado da dentina alguns fatores proangiogênicos, principalmente o VEGF (Cassidy et al.<sup>18</sup>, 1997; Roberts-Clarks et al.<sup>83</sup>, 2000), além de fatores de crescimento e citocinas que permanecem aprisionadas na própria matriz de dentina por meio de interações com as proteoglicanas e outros componentes durante o processo de dentinogênese (Smith et al.<sup>90</sup>, 1998, Baker et al.<sup>5</sup>, 2009). No interior da dentina, os fatores de crescimento são responsáveis por proteger este tecido dentário contra sua degradação e proporcionar um reservatório de moléculas de sinalização que iniciam o processo de regeneração e/ou reparação tecidual. Grande parte destes fatores de crescimento são liberados da dentina durante a dissolução deste tecido devido a evolução do processo carioso, ou mesmo quando do corte da dentina durante o procedimento de preparação cavitária. Assim, poderia-se sugerir que na presente

pesquisa, o aumento da vascularização pulpar pudesse ter ocorrido pela ação de fatores angiogênicos liberados da dentina durante o preparo das cavidades dentárias. Porém, se isto fosse verdadeiro, um aumento persistente de vasos sanguíneos também deveria ter ocorrido no grupo controle onde os dentes não foram irradiados. Assim, pode-se especular que os fatores de crescimento liberados da dentina durante o preparo cavitário provavelmente não alcançaram a polpa ou atingiram as células pulpares numa concentração insuficiente para estimulá-las. Desta forma, parece haver uma importante relação entre o laser empregado nesta pesquisa e o aumento da vascularização do tecido conjuntivo pulpar dos ratos.

Outro fator a ser considerado neste momento, é que no presente estudo as cavidades foram restauradas com ionômero de vidro fotopolimerizável (CIVMR – Vitrebond), ou seja, um material odontológico que contém partículas resinosas como o HEMA ( 2-hidroxietil metacrilato) na sua composição química. Assim, pode ser sugerido que além da possível agressão causada pelo preparo cavitário mecânico, o material restaurador resinoso também participaria da discreta resposta inflamatória observada nos períodos iniciais de avaliação para a maioria dos espécimes dos grupos experimental e controle. Porém, pesquisas anteriores demonstraram que o CIVMR (Vitrebond), mesmo quando aplicado em cavidades muito profundas, não causam danos significativos para o complexo dentino-pulpar (Costa et al.<sup>21,22,23</sup>, 1999; 2003; 2003). Numa outra pesquisa, Mantellini et al.<sup>62</sup> (2006), demonstraram que células odontoblastóides MDPC-23 e macrófagos cultivados em contato com partículas resinosas, tal como o HEMA, são capazes de aumentar a expressão de VEGF. Assim, na presente pesquisa, a possível difusão de HEMA através da dentina do assoalho cavitário, poderia interagir com células pulpares, estimulando a expressão de VEGF no local, o que resultaria em aumento da vascularização tecidual. Porém, todas as



cavidades dos dentes pertencentes aos grupos experimental (irradiadas) e controle (não irradiadas) foram restauradas com CIVMR, sendo que aumento da vascularização ocorreu apenas no grupo experimental. Assim, novamente pode-se comprovar que o aumento da vascularização pulpar no grupo experimental está diretamente relacionado com a irradiação e não com outros fatores, tais como agressão gerada durante o preparo cavitário, liberação de fatores de crescimento da dentina ou difusão de componentes do material resinoso através dos túbulos dentinários.

Quanto aos efeitos de bactérias e seus produtos sobre o complexo dentino-pulpar, tem sido descrito que estes seriam os principais responsáveis pela inflamação da polpa quando da ocorrência de microinfiltração na interface dente/ restauração (Tsuneda et al.<sup>96</sup>, 1995). Na presente pesquisa, apenas alguns espécimes apresentaram bactérias nas paredes cavitárias. Porém, nestes espécimes não foram observadas reações inflamatórias ou desorganização tecidual mais significativas do que àquelas determinadas nos espécimes onde não ocorreu microinfiltração bacteriana. Estes achados histológicos demonstram a não interferência das bactérias nos resultados obtidos na presente pesquisa.

De maneira geral, o protocolo de irradiação avaliado neste estudo, onde um modelo animal foi empregado, resultou em discreto efeito transdentinário do laser sobre o tecido pulpar. Um fator importante que pode ter sido responsável por este limitado efeito do laser, talvez tenha sido a aplicação de uma única irradiação sobre o assoalho cavitário. Por outro lado, o protocolo de irradiação avaliado por Godoy et al.<sup>31</sup>, em 2007, demonstrou um efeito mais significativo do laser de baixa potência sobre o complexo dentino-pulpar, sendo que os autores realizaram três aplicações consecutivas do laser, com intervalos de 72 horas. Como descrito anteriormente, o protocolo de aplicação do laser estabelecido na presente pesquisa procurou simular uma situação

clínica comum, onde uma cavidade é preparada e imediatamente restaurada com materiais dentários. Assim, novos estudos deverão ser desenvolvidos relacionando os efeitos positivos do laser de baixa potência, porém levando em conta as necessidades clínicas requeridas pelos cirurgiões dentistas e seus pacientes.

A dose de irradiação é outro fator a ser considerado na presente pesquisa, pois a aplicação direta da dose de  $25 \text{ J/cm}^2$  foi capaz de estimular as células de linhagem odontoblastóide em cultura. Contudo, o mecanismo de resposta tecidual in vivo é muito mais complexo do que situações laboratoriais, onde um determinado número de células, mantidas em condições controladas são submetidas a irradiação padronizada. Assim, talvez outras doses de irradiação, além daquela avaliada neste estudo, possam ser pesquisadas num próximo estudo in vivo. Tal como demonstrado por Godoy et al.<sup>31</sup>, em 2007, altas doses de irradiação com laser infra-vermelho próximo, tal como  $89,7 \text{ J/cm}^2$ , não resultou em estimulação de células pulpares quando estas foram comparadas ao grupo controle não irradiado. Todavia, Tate et al.<sup>94</sup>, em 2006 relataram que altas doses de irradiação sobre os odontoblastos estimulam a produção da proteína Heat-shock 25, a qual está diretamente relacionada com a diferenciação de odontoblastos durante o processo de cura do tecido pulpar. Enfim, sabe-se que a literatura que correlaciona irradiações com laser de baixa potência no infra-vermelho com a resposta de diferentes tecidos humanos, particularmente tecido pulpar, é escassa. A maioria dos estudos têm avaliado apenas os efeitos da irradiação com laser vermelho (Ferreira et al.<sup>27</sup>, 2006; Godoy et al.<sup>31</sup>, 2007), o que não permite uma comparação direta com os dados observados na presente pesquisa, pois sabe-se que os efeitos da irradiação são diretamente dependentes do comprimento de onda utilizado (Godoy et al.<sup>31</sup>, 2007). Dessa forma, futuras pesquisas são necessárias para avaliar as possíveis respostas do complexo dentino-pulpar frente aos diferentes protocolos de irradiação associadas às

variadas doses de energia, para se verificar o real efeito sobre a angiogênese e o processo de reparação.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos dados científicos obtidos no presente estudo, o qual foi sub-dividido em 3 etapas, onde foram empregadas diferentes metodologias de pesquisa, pode-se concluir que o laser de baixa intensidade no infra-vermelho próximo foi capaz de bioestimular diretamente as células de linhagem odontoblástica MDPC-23 cultivadas em meio de cultura com 5 ou 10% de soro fetal bovino, quando as doses de 15 e 25 J/cm<sup>2</sup> foram aplicadas. Para o efeito transdentinário (indireto), a dose mais eficaz foi a de 25 J/cm<sup>2</sup>. Já para a avaliação do efeito in vivo do laser, foi possível identificar que a melhor dose de irradiação obtida in vitro (25 J/cm<sup>2</sup>), causou limitado efeito sobre o complexo dentino-pulpar, o qual foi caracterizado especificamente pelo aumento da vascularização pulpar.

## 11 REFERENCIAS\*

1. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK express in vitro. *Lasers Med Sci.* 2006; 21:24-33.
  2. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on culture irradiance an same fluency. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-84.
  3. Amano T, Muramatsu T, Amemiya K, Kubo K, Shimono M. Responses of rat pulp cells to heat stress in vitro. *J Dent Res.* 2006; 85: 432-5.
  4. Aranha AMF, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Effect of Curing Regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
  5. Baker SM, Sugars RV, Wendel M, Smith AJ, Waddington RJ, Cooper PR, Sloan AJ. TGF- $\beta$ /extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calc Tiss Int.* 2009; 85: 66-74.
  6. Banfield N, Addy M. Dentine hypersensitivity: development and evaluation of a model in situ to study tubule patency. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 325–35.
- \*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em:  
[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)
7. Brännström M. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod.* 1986; 12: 453-7.
  8. Bronckers AL, Lyaruu DM, Wöltgens JH. Imunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 1989; 22: 65-70.

9. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 775–94.
10. Burdon RH, Alliangana D, Gill V. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells. *Free Radic Biol Med.* 1995; 23: 471–86.
11. Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 204-10.
12. Butler WT. Macromolecules of extracellular matrix: determination of selective structures and their functional significance. *Connect Tissue Res.* 2008; 49: 383-90.
13. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol.* 1995; 39: 169-79.
14. Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res.* 2003; 44: 171-8.
15. Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD. Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation. *Connect Tissue Res.* 2002; 43: 301-7.
16. Cagnie EMVB, Cornelissen MJ, Declerecq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and power laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2003; 18: 95-9.
17. Callaghan GA, Riordan G, Gilmore WS, McIntyre IA, Allen JM, Hannigan BM. You have full text access to this content Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937. *Lasers Surg Med.* 1996; 19: 201-6.
18. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta(TGF- $\beta$ ) isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol.* 1997; 42: 219-23.

19. Ciaramicoli TM, Carvalho CRR, Eduardo PC. Treatment of cervical dentin hypersensitivity using Neodymium: Yttrium–Aluminum–Garnet laser. *Clinical evaluation. Lasers Surg Med.* 2003; 33: 358–62.
20. Coombe AR, Ho CTG, Darendeliler MA. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod.* 2001; 4: 3–14.
21. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent.* 2003; 28: 365-70.
22. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999; 25: 434-41.
23. Costa, CAS, Oliveira, MF, Giro, EMA , Hebling, J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J.* 2003; 36: 831-9.
24. Dababneh RH, Khouri AT, Addy, M. Dentine hypersensitivity— an enigma: a review of terminology, epidemiology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J.* 1999; 187: 606–61.
25. Demidova-Rice TN, Salomatina EV, Yaroslavsky AN, Herman IM, Hamblin MR. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 706-15.
26. Edwards AM, Silva E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J Photochem Photobiol. B* 2001; 63: 126–31.
27. Ferreira ANS, Silveira S, Genovese WJ, Cavalcante de Araújo V, Frigo L, DE Mesquita RA, et al. Effect of GaAIAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 358–65.

28. Fraikin GY, Strakhovskaya MG, Rubin AB. The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J Photochem Photobiol. B Biol.* 1996; 34: 129–35.
29. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol Biol.* 1991; 11: 87-95.
30. Gavish L, Perez LS, Reissman P, Gertz SD. Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. *Lasers Surg Med.* 2008; 40: 371-8.
31. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Núñez SC, Ribeiro MS. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 899-903.
32. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15:13-27.
33. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 212-8.
34. Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagama T, Kawahara M, Ohta M, et al. Effect of low-level irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2003; 18: 78-82.



35. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 3: 1-17.
36. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF –  $\beta$  activated leads to a Smad3 – mediated down – regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 911–8.
37. Jia YL, Guo ZY. Effect of Low-Power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Lasers Surg Med.* 2004; 34: 323-8.
38. Kale H, Harikuman P, Kulkarni SB, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin B. Effect of light. *Mutat Res.* 1992; 298: 17–23.
39. Karu T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1988; 2: 52-74.
40. Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effect of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 307-14.
41. Karu TI. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron.* 1987; 23: 1703-17.
42. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol Biol.* 1995; 27: 219-23.
43. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 211-6.
44. Karu TI, Pyatibrat, LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low - intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 171-7.

45. Khadra M, Lyngstadaas PS, Haanæs RH, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005; 26: 3503–9.
46. Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behavior of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2005; 16: 168–75.
47. Kienle A, Hibst R. Light guiding in biological tissue due to scattering. *Phys Rev Letters*. 2006; 97: 018104.1-018104.4.
48. Kikuchi H, Sawda T, Yanagisawa T. Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated, agar-coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Arch Oral Biol*. 1996; 41: 871-83.
49. Kim Y-D, Kim S-S, Hwang D-S, Kim G-C, Shin S-H, Kim U-K, Kim J-R, et al. Effect of low level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor: an experimental study in rats. *Laser Phys Lett*. 2007; 681-5.
50. Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *J Clin Periodontol*. 2000; 27: 715–21.
51. Koutná M, Janisch R, Veselska R. Effects of low-power irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica (BRNO)*. 2003; 76: 163-72.
52. Kreisler M, Christoffer AB, Willerstaussen B, d’Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2003; 30: 353-8.

53. Kujawa J, Zavodnik IB, Lapshina A, Labieniec M, Bryszewska M. Cell survival, DNA, and protein damage in b14 cells under low-intensity near-infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 504-8.
54. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci.* 2003; 18: 65-70.
55. Ladalardo TCCGP, Pinheiro A, Campos RAC, Brugnera Júnior A, Zanin F, Albernaz PLM, et al. Laser therapy in the treatment of dentine hypersensitivity. *Braz Dent J.* 2004; 15: 144-50.
56. Lanza CR, de Souza Costa CA, Furlan M, Alécio A, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
57. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 679-728.
58. Lubart R, Friedman H, Grossmann N, Adamer M, Shainberg A. The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation. *Laser Technol.* 1996; 6: 79-84.
59. Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, Lavie R, Breitbart H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol Biol.* 1992; 15: 337-41.
60. Lubart R, Friedman H, Sinykov A, Shiman N, Grossman N, Adamek M, et al. The effect of He:Ne Laser (633nm) radiation on intra-cellular  $Ca^{+2}$  concentration in fibroblasts. *Laser Therap.* 1997; 9: 115-20.
61. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast

- cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 97-103.
62. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mat.* 2006; 22: 434-40.
63. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers in Surg Med.* 2004; 34: 260–5.
64. Marsilio AL, Rodrigues JR, Borges AB. Effect of the clinical application of the GaAlAs laser in treatment of dentin hypersensitivity. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21: 291-6.
65. Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by GA-Al-As laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30: 27-31.
66. Mjör IA, Dahl E, Cox CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20: 496-501.
67. Mochizuki-Oda N, Kataoka Y, Cui Y, Yamada H, Heya M, Awazu K. Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. *Neurosci Lett.* 2002; 323: 207–10.
68. Mollo MA, Frigo L, Favero GM, Lopes-Martins RAB, Brugnera Jr A. In vitro analysis of human tooth pulp chamber temperature after low-intensity laser therapy at different power outputs. *Lasers Med Sci.* 2010; [Epub ahead of print]
69. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 8–12.

70. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
71. Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent*. 2000; 28: 277-85.
72. Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J*. 1990; 265: 659-65.
73. Nara Y, Tsukamoto Y, Fukutani S, Yamaguchi N, Mori M, Morioka T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. *Lasers Life Sci*. 1992; 4: 249-56.
74. Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 1999; 25: 30-3.
75. Oliveira CF, Hebling J, Souza PPC, Sacono NT, Lessa FR, Lizarelli RFZ, Costa CA. Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Phys*. 2008; 5: 680-5.
76. Outhwaite WC, Mickenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res*. 1974; 53: 1503.
77. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* . 1998; 22: 347-54.
78. Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J*. 2007; 202: 131-8.
79. Pashley DH. Mechanisms of dentine sensitivity. *Dent Clin North Am*. 1990; 34: 449-74.

80. Pereira SN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 31: 263–7.
81. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981; 116: 53-64.
82. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281-7.
83. Roberts-Clarks D, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 1013-6.
84. Rochkind S, El-Ani D, Nevo Z, Shahar A. Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy. *Lasers Surg Med.* 2009; 41: 277-81.
85. Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immuno-histochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med.* 1995; 16: 368-79.
86. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970; 16: 431-6.
87. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev. Biol.* 1995; 39: 51-68.
88. Schwarz F, Arweiler N, Georg T, Reich E. Desensitizing effects of an Er:YAG laser on hypersensitive dentine. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 211–5.

89. Simão AM, Beloti MM, Cezarino RM, Rosa AL, Pizauro JM, Ciancaglini P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 146: 679-87.
90. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in dentin matrix: ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.* 1998; 106: 179-84.
91. Souza, PPC, Fukada, SY, Cunha, FQ, Costa, CAS, Costa Neto, CM. Regulation of angiotensin II receptors levels during rat induced pulpitis. *Regul Pep.* 2007; 140: 27-31.
92. Stein A, Benayahu D, Maltz D, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 161-6.
93. Tanabe K, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M, Ozawa H. Immunohistochemical study on pulpal response in rat molars after cavity preparation by Er:YAG laser. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110: 237-45.
94. Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 50-7.
95. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 1045-55.
96. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Op Dent.* 1995; 39: 273-80.

97. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLL) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 373-8.
98. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28: 77-92.
99. Ueda Y, Shimizu N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21: 271-7.
100. Utsunomiya T. A histopathological study of the effects of low-power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. *J Endod.* 1998; 24: 187-93.
101. Villa GEP, Catirse ABCED, Lia RCC, Lizarelli RFZ. In vivo analysis of low-power laser effects irradiation at stimulation of reactive dentine. *Laser Phys Lett.* 2007; 4: 690-5.
102. Villa RG, Brugnera JrA, Aun CE. Estudo histológico da atuação do raio laser HeNe na neoformação dentinária em polpas de ratos. *Ann Braz Soc Odontol Res.* 1988; 4: 101.
103. West N, Addy M, Hughes J. Dentin hypersensitivity: the effects of brushing desensitizing toothpastes, their solid and liquid phases, and detergents on dentin and acrylic: studies in vitro. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 885-95.
104. Yamada K. Biological effects o low power laser irradiation on clonal osteoblastics cells (MTC3T3-E1). *J Jpn Orthop Assoc.* 1991; 65: 787-99.
105. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 19: 515-30.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



Comitê de Ética em Pesquisa

## Certificado

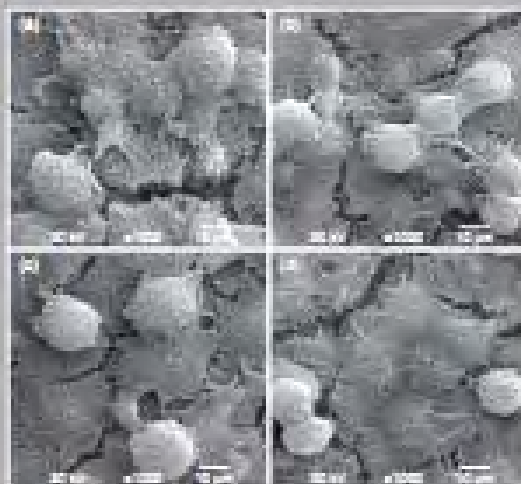
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOESTIMULADOR DIRETO E TRANSDENTINÁRIO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES EM CULTURA", sob o protocolo nº 41/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MIS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAR, com validade de 02 (dois) anos, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.

Certify that the research project titled "DIRECT AND TRANSDENTINARIAL EFFECTS OF LOW POWER LASER THERAPY ON THE ODONTOBLASTS-LIKE CELL BIOESTIMULATION", protocol number 41/06, under Dr CARLOS ALBERTO DE SOUZA COSTA responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MIS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAR-UNESP. Approval is granted for 02 (two) years when the final review of this study will occur.

Araraquara, 17 de novembro de 2006.

Profª Drª Mirian Aparecida Onofre  
Coordenadora

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the metabolism of odontoblast-like MDPC-23 cells subjected to direct LLT irradiation. The cells were seeded (20,000 cells/well) in 24-well plates and incubated for 24 hours at 37°C. After this period, the culture medium (DMEM) was replaced by fresh DMEM supplemented with 2 or 5% (osse induction by nutritional deficit) or 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were exposed to laser doses of 2, 4, 10, 15 and 25 J/cm<sup>2</sup> from a near infrared InGaAsP diode laser prototype (LASERTEC, TM200 rev, 400mW). One control group (sham irradiation) was established for each experimental condition (laser dose + FBS supplementation). Three and 72 hours after the laser irradiation, cells were analyzed with respect to metabolism, morphology, total protein expression and alkaline phosphatase (ALP) activity. Higher metabolism and total protein expression was observed 72 hours after the laser irradiation at the doses of 15 and 25 J/cm<sup>2</sup> (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). Higher ALP activity was observed with 5% FBS when the cells were irradiated with doses of 2 and 10 J/cm<sup>2</sup>. For the dose of 25 J/cm<sup>2</sup>, the highest ALP activity was observed with 10% FBS. It was concluded that the LLT parameters used in this study stimulated the metabolic activity of the MDPC-23 cells, especially at the doses of 15 and 25 J/cm<sup>2</sup>.



Panel of SEM micrographs representative of cell morphology in each group

© 2011 by Steiner

Published online by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

## In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells

C.F. Oliveira,<sup>1</sup> F.G. Barros,<sup>2</sup> E.C. Lima,<sup>3</sup> C. Karamali,<sup>4</sup> J. Hebling,<sup>1</sup> V.S. Bagatini,<sup>4</sup> and C.A. de Souza Costa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara School of Dentistry, Araraquara, SP 14801-903, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Piracicaba School of Dentistry, Piracicaba, SP 13414-903, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Federal do ABC (UFABC), Center of Engineering, Modeling, and Applied Social Sciences, Santo André, SP 09010-170, Brazil

<sup>4</sup> Universidade de São Paulo (USP), Physics Institute of São Carlos, São Carlos, SP 13560-970, Brazil

Received: 20 September 2010, Revised: 28 September 2010, Accepted: 1 October 2010

Published online: 7 December 2010

**Key words:** phototherapy; odontoblasts; lasers; cell metabolism

### 1. Introduction

Dentin hypersensitivity has long been a common symptomatic condition in dental practice, which causes great discomfort to the patient and may result in pulpal inflammation [1–3]. It is characterized by brief, sharp, pain arising from exposed dentin in response to tactile, evaporative, chemical or thermal stimuli, which cannot be attributed to any other dental defect or pathology [2,4,5]. Exposure of

dentin is closely related to dentinal hypersensitivity, and it most frequently occurs at the buccal cervical region of canines and premolars. Several factors can contribute to dentin exposure, such as toothbrush abrasion, gingival recession, acidic diet [6], and eccentric occlusal forces, causing abfraction lesions [7].

The ideal treatment of cervical dentin hypersensitivity should be painless, clinically feasible and should present an immediate, effective and lasting action, without being

\* Corresponding author; e-mail: caacosta@foc.usp.br

© 2011 by Steiner

Published online by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2011.

Camila Favero de Oliveira