



UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA – UNESP
Faculdade de Odontologia
de Araraquara



LIEGE ALDROVANDI MONTORO

Fotobiomodulação da Expressão e Produção de Mediadores Inflamatórios por Células Pulpaes Irradiadas com LED Infravermelho



Araraquara • 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



LIEGE ALDROVANDI MONTORO

Fotobiomodulação da Expressão e Produção de Mediadores Inflamatórios por Células Pulpaes Irradiadas com LED Infravermelho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas -Área de Concentração: Odontopediatria, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josimeri Hebling

Montoro, Liege Aldrovandi

Fotobiomodulação da expressão e produção de mediadores inflamatórios por células pulpares irradiadas com LED infravermelho / Liege Aldrovandi Montoro.-- Araraquara: [s.n.], 2013.
96 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling

1. Fototerapia 2. Citocinas 3. Cultura primária de células 4.
Estresse oxidativo 5. Polpa dentária I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

Faculdade de Odontologia de Araraquara



LIEGE ALDROVANDI MONTORO

Fotobiomodulação da Expressão e Produção de Mediadores Inflamatórios por Células Pulpaes Irradiadas com LED Infravermelho

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e OrientadorProf^a. Dr^a. Josimeri Hebling

2º ExaminadorProf. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

3º ExaminadorProf. Dr. Adriano Fonseca de Lima

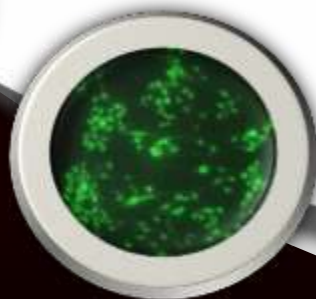
Araraquara, 16 de dezembro de 2013

DADOS CURRICULARES

LIEGE ALDROVANDI MONTORO

NASCIMENTO	26 de outubro de 1979 - Catanduva/SP
FILIAÇÃO	Edson Rui Montoro Mirnei Aldrovandi Montoro
1998/2003	Curso de graduação em Odontologia Universidade Federal do Maranhão - UFMA
2005/2006	Especialização em Odontologia do Trabalho Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic
2011/2013	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS



"Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver."

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pela minha vida, por estar ao meu lado todos os dias, me guiando, me auxiliando e me dando forças para enfrentar os desafios.

Aos meus pais,

Pelo apoio e amor incondicional, por terem me ensinado tudo o que sei e o que sou. Por terem me incentivado a ir em busca dos meus sonhos. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada por tudo o que vocês sempre fizeram por mim, sempre com muita sabedoria, discernimento e muito amor. Amo muito vocês e acho que nunca terei palavras para expressar a minha gratidão e o meu amor.

Ao meu irmão,

Obrigada Flavio, pelo seu apoio e pelo seu companheirismo. Agradeço a Deus todos os dias por ter me dado um irmão como você. Tenho certeza que ele não poderia ter escolhido outro melhor. Te amo, sempre.

"Algumas pessoas a gente nem imaginava que existiam, mas, meu Deus, que agrado bom é para a alma descobrir que vivem. Que estão por aqui conosco. Pessoas que fazem muita diferença na nossa jornada..."

Ana Jácomo

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Profª Drª Josimeri Hebling**, por ter me recebido tão bem, desde o primeiro momento e ter me orientado esses anos, sempre atenciosa, me auxiliando com muita paciência e com muita dedicação.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto**, obrigada por ter aberto as portas do laboratório para mim, por ter me dado a oportunidade de desenvolver minha pesquisa.

A minha querida amiga e companheira **Pops**, por ter me acolhido e me ajudado desde o primeiro dia, por ter me auxiliado em tudo, principalmente no desenvolvimento da minha pesquisa. Saiba que você é um exemplo a ser seguido, sempre com muita dedicação, determinação e doçura. Acho que nunca conseguirei te agradecer o suficiente. Muito obrigada mesmo, do fundo do meu coração, por tudo e saiba que pode contar comigo para sempre, com tudo o que você precisar.

Aos meus amigos de turma **Luana, Carol, Diego e Manuel** muito obrigada pela amizade, pelo companheirismo e pelos momentos maravilhosos que passamos. Muito obrigada por terem feito os meus dias mais felizes.

As amigas da pediatria **Thamires, Camila e Thalita** obrigada pela convivência, pelas conversas e pela amizade.

As minhas amigas **Rosa e Leo** pela parceria, pelo companheirismo e por estarem sempre ao meu lado.

A **Fer**, por ter me auxiliado no desenvolvimento da minha pesquisa, sempre com muita dedicação e paciência e sempre disposta a ajudar em tudo.

Ao **Pedro**, pela ajuda fundamental com o planejamento do projeto e com os experimentos.

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – UNESP nas pessoas do atual diretor **Prof. Dr. Júlio Cezar Durigan** e atual vice-diretora **Prof^a. Dr^a. Marilza Vieira Cunha Rudge**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas da atual diretora **Prof^a. Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon** e atual vice-diretora **Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pelo coordenador **Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior** e pela vice-coordenadora **Prof^a. Dr^a. Lidia Parsekian Martins**.

Aos **Professores do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP pelos ensinamentos e pelas oportunidades de crescimento profissional.

Aos colegas do **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**.

Ao **Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica**, da USP-São Carlos que sempre foram atenciosos e dispostos a contribuir.

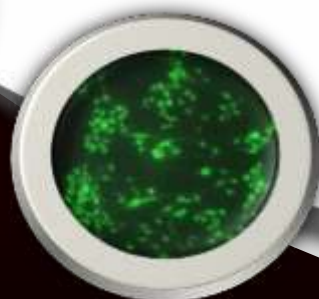
A todos os **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, por fazerem parte do meu dia a dia e sempre estarem dispostos a me ajudar

À **FAPESP** por viabilizar economicamente, por meio da bolsa (2011/16529-5) e do auxílio (2012/09502-6), o desenvolvimento da minha pesquisa.

"Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho
que se tem.....Quem acredita sempre alcança"

Renato Russo

RESUMO



Montoro LA. Fotobiomodulação da expressão e produção de mediadores inflamatórios por células pulpares irradiadas com LED infravermelho. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

RESUMO

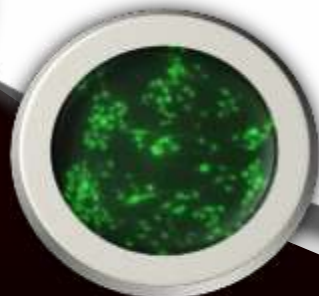
Objetivo: Avaliar o efeito do LED infravermelho (855 nm), aplicado em diferentes doses de energia, na produção e expressão de mediadores inflamatórios por células pulpares humanas (HDPC) em cultura. **Metodologia:** HDPC obtidas de dentes decíduos foram semeadas (10^5 células/well) e após 24 h foram colocadas em contato com LPS (10 μ g/mL α -MEM) ou TNF- α (25 ng/mL α -MEM). Em seguida, as células foram submetidas a uma única irradiação com LED infravermelho (855 nm) nas diferentes doses de energia: 2, 4, 8, 15 ou 30 J/cm². Grupos não irradiados, com e sem LPS/TNF- α , serviram como controles. Decorridas 24 h, as células estimuladas com LPS foram avaliadas quanto à produção de óxido nítrico (NO), de espécies reativas de oxigênio (EROs) e viabilidade celular (ensaio de MTT) (n=8 por grupo). As células estimuladas com TNF- α foram avaliadas quanto à produção de citocinas pelos métodos de *antibody array* e q-PCR (n=5 por grupo). Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **Resultados:** O contato com LPS resultou em aumento significativo da produção de NO sem causar qualquer dano ao metabolismo respiratório das células. Independentemente da dose de energia aplicada, a produção de NO foi significativamente reduzida quando as células foram irradiadas. O melhor efeito foi observado para a dose de 15 J/cm². A irradiação também promoveu uma diminuição na produção de EROs, enquanto o metabolismo das HDPC não foi alterado. Nas células em contato com TNF- α verificou-se que as citocinas mais produzidas foram: GRO α , IL-6, IL-8, TNF- α ,

MCP-1 e Serpin E1. Na análise por q-PCR redução foi observada para a expressão de IL-1 β , quando as células foram irradiadas com 4 J/cm².

Conclusão: O estresse oxidativo de HDPC pode ser biomodulado por uma única dose de irradiação com LED infravermelho. Quanto a expressão de citocinas inflamatórias, a irradiação com 4 J/cm² foi capaz de reduzir a expressão gênica de IL-1 β .

Palavras chave: Fototerapia, citocinas, cultura primária de células, estresse oxidativo, polpa dentária.

ABSTRACT



Montoro LA. Photobiomodulation of the expression and production of inflammatory mediators by pulp cells irradiated with an infrared LED. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

ABSTRACT

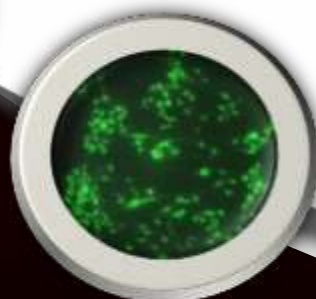
Aim: To investigate the effect of infrared light emitting diode (LED) irradiation (855nm), at different energy doses, on the production and expression of inflammatory mediators by cultured human dental pulp cells (HDPC).

Methodology: HDPC were harvested from sound, near-exfoliation primary teeth. Cells were seeded (10^5 cells/well) using α -MEM supplemented with 10% FBS and after 24h, were exposed to LPS (10 μ g/mL α -MEM) or TNF- α (25ng/mL α -MEM). Then, HDPC were submitted to a single irradiation with an infrared LED (855 nm) delivering different doses of energy: 0, 2, 4, 8, 15 or 30 J/cm². Non-irradiated cells, with and without LPS/TNF- α , served as controls. Followed 24h, the cells stimulated with LPS were tested for nitric oxide (NO) quantification, cell viability (MTT assay), and reactive oxygen species (ROS) production (n=8 *per* group). Cells stimulated with TNF- α were analyzed regarding cytokine production and expression using antibody array and q-PCR (n=5 *per* group). Data were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$). **Results:** LPS-induced stress resulted in significant increase in NO production by HDPC without causing any damage to cell respiratory metabolism. Irrespective of the energy dose delivered, NO production was significantly reduced when LPS-stressed cells were irradiated. The best effect was observed when 15 J/cm² were delivered to cells. Infrared LED irradiation also promoted decrease in ROS production, while HDPC metabolism was not significantly affected. The most produced cytokines in cells stimulated with TNF- α were: GRO α , IL-6, IL-8, TNF-

α , MCP-1 and E1 Serpin. qPCR analysis showed a decrease in expression of IL-1 β when the cells were irradiated with the dose of 4 J/cm². **Conclusion:** The oxidative stress of HDPC can be biomodulated by a single irradiation of an infrared LED. Regarding the expression of inflammatory cytokines, the delivery of 4 J/cm² was capable of reducing the gene expression of IL-1 β .

Key words: Cytokines, dental pulp, oxidative stress, phototherapy, primary cell culture.

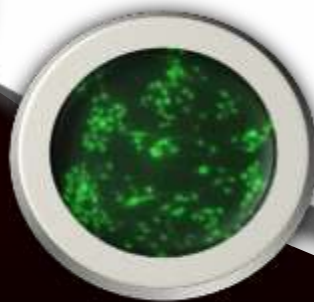
SUMÁRIO



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 PROPOSIÇÃO.....	26
3 MATERIAL E MÉTODO	28
<i>ESTUDO 1: Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells</i>	<i>30</i>
<i>ESTUDO 2: Fotobiomodulação da expressão e produção de citocinas por células pulpares irradiadas com LED infravermelho</i>	<i>57</i>
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
5 REFERÊNCIAS	87
6 APÊNDICE	92
7 ANEXO	95

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

O tecido pulpar desempenha funções primordiais no desenvolvimento e manutenção dos tecidos dentários, atuando como órgão neurosensorial, formativo da matriz dentinária e de defesa. Assim como outros tecidos conjuntivos, o primeiro mecanismo de defesa do tecido pulpar frente a uma agressão, seja de origem química, física ou mecânica, é o estabelecimento de uma reação inflamatória (Silva et al.²², 2009). Entretanto, como característica única, a polpa está confinada entre paredes mineralizadas de dentina, inextensíveis, que não permitem o extravasamento do edema inflamatório. Além disso, a circulação colateral e o sistema de drenagem linfática estão comprometidos, uma vez que tanto os vasos sanguíneos e linfáticos aferentes e eferentes chegam ao interior do tecido via pequenos forames apicais (Bletsa et al.⁴, 2006).

Devido a essas características, o grau de inflamação do tecido pulpar pode atingir proporções de difícil controle intrínseco, a despeito do fato deste tecido apresentar mecanismos inerentes para tal finalidade, como formação de dentina intratubular e de dentina terciária no intuito de impedir a progressão do agente agressor (Tziafas et al.²⁴, 2000).

Adicionalmente, vários tipos celulares localizados na polpa dental expressam e produzem citocinas que desempenham importante papel na ativação e no controle do processo inflamatório (Silva et al.²², 2009). Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune. A produção de citocinas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas atuam na comunicação entre as células, promovendo a

indução ou regulação da resposta imune e seu efeito se dá após a ligação ao seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula (Cooper et al.⁵, 2010).

Os odontoblastos, por exemplo, participam ativamente da resposta inflamatória pulpar por estarem localizadas na periferia da polpa, sendo as primeiras células a entrar em contato com o agente agressor, como produtos de origem bacteriana e/ou de materiais dentários. Além de promover uma barreira para proteger o tecido subjacente da invasão bacteriana, estas células também são imunocompetentes e possuem a capacidade de orquestrar a resposta inflamatória (Veerayutthwilai et al.²⁶, 2007). Até o presente momento não existe uma alternativa de tratamento não invasiva efetiva com o objetivo de modular a reação inflamatória local do tecido pulpar e eliminar a dor quando o elemento dentário é submetido a algum tipo de agressão, seja ela de origem química, decorrente dos produtos bacterianos e/ou de materiais, ou física, decorrente de um trauma ou de preparos cavitários.

A fototerapia utilizando diodos emissores de luz (LED) é considerada um tratamento não invasivo e vem sendo utilizada em diversas áreas da saúde devido a sua capacidade de modular a inflamação e acelerar o processo de cicatrização (da Costa Santos et al.⁶, 2013; Dall Agnol et al.⁷, 2009; Kim et al.¹², 2013; Lim et al.¹⁴, 2007). Mais especificamente no campo da odontologia, o LED vem sendo investigado como coadjuvante no tratamento da hipersensibilidade dentinária (Lizarelli et al.¹⁵, 2007), mucosite (Sacono et al.²¹, 2008) e candidíase (Mima et al.¹⁶, 2010).

O LED é um diodo semicondutor que quando energizado emite luz visível ou infravermelha. Possui algumas características como apresentar uma luz não

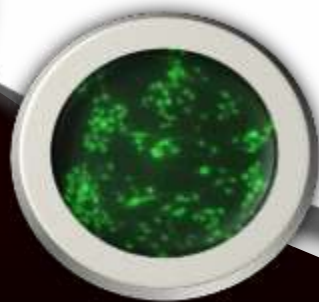
coerente e não colimada, os diodos possuem longa durabilidade, apresenta baixo custo, os circuitos eletrônicos são mais simples e confiáveis, apresenta geração mínima de calor quando em baixa potência e baixa irradiância e também apresenta uma alta eficiência energética, ou seja, quase toda a energia fornecida para o LED é transformada em luz (Desmet et al.⁸, 2006).

A luz modula algumas vias de sinalização intracelular, atuando no metabolismo oxidativo da cadeia respiratória mitocondrial, estimulando a atividade do citocromo c oxidase e aumentando a síntese de ATP (Karu et al.¹¹, 2004). Alguns efeitos celulares e teciduais também têm sido observados em resposta à exposição de algumas células ao LED, como aumento da produção de ATP, aumento do fluxo sanguíneo, da proliferação e migração celular (Bastos et al.³, 2009; Dall Agnol et al.⁷, 2009; Xavier et al.²⁹, 2010). Além disso, tem sido descrito que a fototerapia pode modular a expressão de citocinas, a expressão de fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios (Barolet², 2008).

Especificamente, no que se refere ao comprimento de onda no espectro infravermelho, estudos demonstraram que o LED pode exercer efeito antiinflamatório (Ablon¹, 2010), aumentar o metabolismo celular (Vinck et al.²⁸, 2003), auxiliar no reparo de tecidos lesionados (Bastos et al.³, 2009) e melhorar a atividade muscular (Leal Jr et al.¹³, 2009; Vinck et al.²⁷, 2006), auxilia na formação óssea após expansão rápida da maxila (Rosa et al.²⁰, 2013), e foi investigado como coadjuvante no tratamento da dermatite atópica (Kim et al.¹², 2013) e do herpes zoster (Park et al.¹⁹, 2013). Além disso, o LED infravermelho é muito pesquisado por possuir uma maior penetração no tecido e um menor espalhamento de luz comparado aos demais comprimentos de onda (Neupane et al.¹⁷, 2010).

Apesar dos estudos existentes para avaliar a ação da luz no processo inflamatório, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação da irradiação LED sobre a modulação inflamatória tecidual, principalmente no tecido pulpar. Somando-se as características positivas desse tipo de fonte de luz, mencionadas anteriormente, aos seus promissores efeitos desejáveis sobre diferentes linhagens celulares, é relevante investigar se a aplicação do LED no comprimento infravermelho poderia, amenizar ou eliminar os efeitos indesejáveis causados por microrganismos e/ou procedimentos restauradores.

PROPOSIÇÃO



2 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito do LED infravermelho (855 nm), aplicado em diferentes doses de energia (2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm², 15 J/cm² e 30 J/cm²), sobre o estresse oxidativo e sobre a produção e expressão gênica de citocinas inflamatórias por células pulpares humanas (HDPC) em cultura.

Objetivos Específicos:

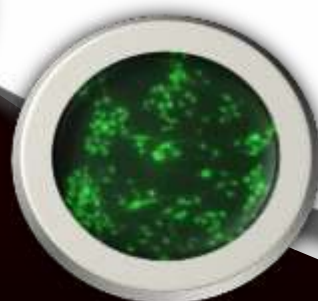
Estudo 1:

Investigar o efeito da irradiação com LED infravermelho (855 nm) sobre a viabilidade celular, produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio por células HDPC.

Estudo 2:

Investigar o efeito da irradiação do LED infravermelho (855 nm) sobre a produção de citocinas inflamatórias e sobre a expressão gênica de IL-1 β e IL-6 por HDPC.

MATERIAL E MÉTODO

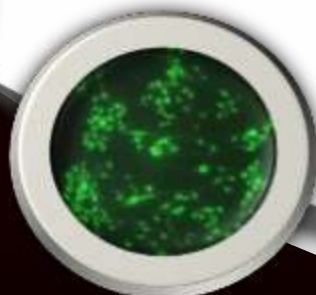


3 MATERIAL E MÉTODO

Este capítulo da dissertação é composto por dois estudos independentes, descritos a seguir como estudo 1 e estudo 2.

ESTUDO 1

INFRARED LED IRRADIATION PHOTOBIO-MODULATION OF OXIDATIVE STRESS IN HUMAN DENTAL PULP CELLS



ESTUDO 1

INFRARED LED IRRADIATION PHOTOBIO-MODULATION OF OXIDATIVE STRESS IN HUMAN DENTAL PULP CELLS

LA Montoro Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

APS Turrioni Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP - Univ. Estadual Paulista Araraquara, SP, Brazil

FG Basso Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

CA de Souza Costa Department of Physiology and Pathology, School of Dentistry, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

J Hebling Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

Running title: Photobiomodulation of dental pulp cells oxidative stress

Key words: cells cultured, lipopolysaccharides, nitric oxide, phototherapy, reactive oxygen species, spectrophotometry infrared.

Corresponding author:

Prof. Dr. Josimeri Hebling

jhebling@foar.unesp.br

Rua Humaitá, 1680

Araraquara-SP Brazil; Postal code: 14801-903

Phone: +55 16-3301-6334; Fax: +55 16 3301-6329

O artigo foi formatado segundo as normas do periódico International Endodontic Journal (junho de 2013)

ABSTRACT

Aim To investigate the effect of infrared light emitting diode (LED) irradiation on the oxidative stress induced in Human Dental Pulp Cells (HDPC) by lipopolysaccharide (LPS).

Methodology HDPC were harvested from sound primary teeth that were near-exfoliation. Cells were seeded (10^5 cells/well) using α -MEM supplemented with 10% FBS and after 24h, were placed in contact with LPS (10 μ g/mL of culture medium). Immediately afterwards, HDPC were subjected to a single irradiation with an infrared LED (855 nm) delivering different doses of energy (0, 2, 4, 8, 15 or 30 J/cm²). For each dose, there was a control group without LPS application. Twenty-four-hours after irradiation, groups were tested for nitric oxide (NO) quantification, cell viability (MTT assay) and qualitative assessment of reactive oxygen species (ROS). Data were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ($\alpha=0.05$).

Results LPS-induced stress resulted in significant increase in NO production by HDPC without causing damage to cell respiratory metabolism. Irrespective of energy dose delivered, NO production was significantly reduced when LPS-stressed cells were irradiated with infrared LED (2 J/cm², $p=0.003$; 95% CI=5.84 – 27.71; 4 J/cm², $p=0.001$; 95% CI=7.52 – 26.39; 8 J/cm², $p=0.0195$; 95% CI=2.86 – 16.01; 15 J/cm², $p=0.0001$; 95% CI=12.10 – 30.96; 30 J/cm², $p=0.007$; 95% CI=5.84 – 24.71). The highest decrease in NO production was observed when 15 J/cm² were delivered to cells. Infrared LED irradiation resulted in a decrease in ROS production, while HDPC metabolism was not significantly affected.

Conclusion Biomodulation of oxidative stress of HPDC can be achieved by irradiation with a single dose of infrared LED. Within the range investigated, 15 J/cm² resulted in the least production of NO.

INTRODUCTION

Recently, phototherapy has been used as treatment for modulating inflammation in epithelial and conjunctive tissues (Lim *et al.* 2007, Dall Agnol *et al.* 2009). Among the existing light sources, light emitting diodes (LED) have shown promising results such as in the improvement of tendon healing, inflammatory modulation and an increase of immune system cells (Lim *et al.* 2007, Bastos *et al.* 2009, Lim *et al.* 2009). Positive effects, such as an increase in adenosine triphosphate (ATP) production, increase in blood flow and in cell proliferation and migration, have been demonstrated in response the exposure of tissues and some cell lines to LED (Bastos *et al.* 2009, Dall Agnol *et al.* 2009, Xavier *et al.* 2010). Moreover, it has been stated that phototherapy could modulate the expression of cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators (Barolet 2008).

Infrared LED is extensively used as a therapy to control pain (Vinck *et al.* 2006) because it has greater penetration into tissue, and less light scattering (Neupane *et al.* 2010). Studies have demonstrated that light at the wavelength in the infrared region could exert an anti-inflammatory effect (Ablon 2010), increase cell metabolism (Vinck *et al.* 2003, Oliveira *et al.* 2010), help in the repair of injured tissues (Bastos *et al.* 2009) and improve muscular activity (Vinck *et al.* 2006, Leal Jr *et al.* 2009). However, in spite of these studies that evaluated the

action of light on the inflammatory process, little is known about the mechanism of action of LED irradiation on oxidative stress, particularly in pulp tissue.

During the inflammatory process, the immune system cells, such as macrophages, produce nitric oxide (Carr *et al.* 2000, Min *et al.* 2006), a highly reactive free radical derived from L-arginine, in a process catalyzed by isoenzymes denominated NO synthases (NOS) (Kröncke *et al.* 1997, Kendall *et al.* 2001). At high concentrations, such as in an acute inflammatory response, this radical may have toxic effects on tissues (Kendall *et al.* 2001). Therefore, NO as well as other free radicals of reactive oxygen species (ROS) have been used as a nonspecific marker of *in vitro* induction of the inflammatory process (Filipov *et al.* 2005, Min *et al.* 2006).

Considering the biostimulatory effects of LED, which have been demonstrated in various cell lines, the ease of use and low cost, and since there is no information about the response of pulp cells irradiated with this light source, the aim of the present study was to investigate the action of infrared LED on pulp cells as regards the production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS), molecules that are directly related to cellular stress. The null hypothesis was that infrared LED irradiation, irrespective of the dose delivered, has no effect on the oxidative stress induced in HDPCs by LPS.

MATERIAL AND METHODS

CELL CULTURE AND LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED STRESS

After approval by the ethics committee (Process N° 81/11), primary HDPC cultures of three primary teeth in an advanced stage of root resorption, between

the fifth and sixth passage, were seeded (10^5 cells/well) in 24 well plates (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) in α -MEM (Gibco, Langley, OK, USA) supplemented with 5 mM of sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (Gibco, Langley, OK, USA), 100 units of penicillin/mL, 0.23 mg of streptomycin/mL (Gibco, Langley, OK, USA), and were incubated in an atmosphere of 5% CO₂ and temperature of 37°C. When seeded, the cells were inserted in alternate wells with the purpose of not having any possibility of interference of light among the wells at the time of irradiation. After 24 h the culture medium was changed to α -MEM (Gibco) without fetal bovine serum (Gibco), followed by the induction of inflammatory mediator expression by means of lipopolysaccharide application (LPS, *Ultra-pure grade*, Escherichia coli O111:B4, InvitroGen, San Diego, CA, USA), in the concentration of 10 μ g per 1 mL of culture medium. After treatment with LPS (InvitroGen), the cells were immediately submitted to a single irradiation dose via an infrared LED at the following energy doses: 2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm², 15 J/cm² or 30 J/cm².

IRRADIATION DEVICE

The irradiation device (LEDTable) has 24 diodes with the wavelength established at 855 ± 10 nm (infrared). The diodes, of the InGaN (Indium gallium nitride) type, are positioned so that when they are activated simultaneously, each of them individually irradiates a compartment of a 24-well cell culture plate (Figure 1). The irradiance (measure of power) emitted by each LED was 40 mW/cm², so that the total power of irradiance was determined, taking into consideration the loss of optical power in each compartment, due to the presence

of acrylic (bottom of the compartment). Each diode is located at a standardized distance from the culture plate (1.4 cm) with the intention of involving the entire area of the base of each acrylic compartment (2 cm²) in a uniform manner. From these values, and using the value of the area of each compartment, the irradiation times required for safe application of the energy densities were calculated. Thus, to attain the pre-defined energy dose of 2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm², 15 J/cm² or 30 J/cm², the HDPC were irradiated continuously for 50 s, 1 min 20 s, 3 min 20 s, 6 min 15 s and 12 min 30 s, respectively. Cells without being in contact with LPS and irradiated with the same doses served as controls.

QUANTIFICATION OF NITRIC OXIDE (NO) PRODUCTION

NO was quantified spectrophotometrically 24 h after irradiation, by the accumulation of nitrite in the supernatant of the cell culture, by means of the diazotization reaction with Griess reagent, composed of 1 g of sulfanilamide (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany), 0.1 g of dichloride N (1-naphthyl) ethylenediamine (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany), 2.5 mL of orthophosphoric acid (Mallinckrodt Chemical, Saint-Louis, MO, USA) and deionized water qsp 100 mL. In a 96-well plate (Costar Corp, Cambridge, MA, USA) 50 µL aliquots of the supernatant of each of the eight samples were placed, in triplicate; and the same quantity of Griess reagent (Green *et al.* 1982, Lee *et al.* 2003). After 10 minutes of incubation at ambient temperature, sheltered from the light, the absorbance was determined in visible/UV with a 540 nm filter, in a spectrophotometer (Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, China).

REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION

ROS production was evaluated qualitatively by means of a fluorescent oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (InvitroGen, San Diego, CA, USA). Three samples of the culture obtained from each primary tooth were seeded (10^5 cells/cm²) in the bottom of compartments of 24-well acrylic plates. After 24 h, the culture medium was removed and the solution containing the fluorescent probe in PBS (5 μ M) was added (300 μ L). After 1 h, inflammatory mediator expression was induced by means of lipopolysaccharide application (10 μ g/mL) (InvitroGen), as previously described. Immediately after treatment with LPS, the cells were submitted to a single irradiation with infrared LED at the different energy doses. Once again, after 24 h, the culture medium was removed and the samples were analyzed and photographed in an inverted light microscope (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)

CELL VIABILITY ANALYSIS (MTT ASSAY)

This evaluation was performed by applying the colorimetric method of methyl tetrazolium (MTT Assay), 24 h after irradiation, to determine pulp cell viability after treatment with LPS and irradiation.

The MTT solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) was added to the culture medium without fetal bovine serum (5 mg/mL) and kept in contact with the cells for 4 h at 37 ° C. After this period, the MTT solution was aspirated and replaced by 700 μ L of acidified isopropanol solution (0.04 N de HCl) with the

objective of dissolving the violet crystals resulting from the cleavage of the ring of methyl tetrazolium salt by the succinic dehydrogenase enzyme of the mitochondria existent in the viable cells (Basso *et al.* 2013). After homogenization of the solutions, three aliquots of 100 μ L from each well were transferred to a 96-well plate (Costar Corp). Cell viability evaluation was performed proportionally to absorbance (570 nm) in an ELISA reader (Thermo Plate, Nanshan District, Shenzhen, China).

STATISTICAL ANALYSIS

The NO production data and cell viability (MTT assay) data were transformed into percentages of the control (cells not stimulated by LPS and not irradiated) that were considered as 100%. The transformed data were then submitted to the Kruskal-Wallis non parametric test, complemented by the Mann-Whitney test for paired comparison of the groups. All the statistical tests were considered at the pre-established level of significance of 5%.

RESULTS

Quantification of nitric oxide (NO) production

The values of NO produced by HDPC considering the energy dose and stimulation by LPS are presented in Table 1. In the absence of stimulation by LPS, irradiation of the HDPC at the doses of 2 J/cm² (p=0.021; 95% CI=-3.21 – 12.45), 8 J/cm² (p=0.0105; 95% CI=-5.11 – 10.54) and 15 J/cm² (p=0.0001; 95% CI=4.21 – 19.86) resulted in significant reduction of NO production in comparison

with the control group. For the groups previously stimulated with LPS, all the doses were capable of significantly diminishing NO production, when this production was compared with that of the group in which the cells were stimulated with LPS, but not irradiated (2 J/cm², p=0.003; 95% CI=5.84 – 27.71; 4 J/cm², p=0.001; 95% CI=7.52 – 26.39; 8 J/cm², p=0.0195; 95% CI=-2.86 – 16.01; 15 J/cm², p=0.0001; 95% CI=12.10 – 30.96; 30 J/cm², p=0.007; 95% CI=5.84 – 24.71). The greatest reduction (21.7%) was observed for the dose of 15 J/cm² (Table 1, columns). Contact of the cells with LPS, without subsequent irradiation resulted in a significant increase in NO production (p=0.001; 95% CI=7.83-26.52). The same was observed when the HDPCs were irradiated with 2 J/cm² (p=0.007; 95% CI=2.12 – 10.93), 8 J/cm² (p=0.0001; 95% CI=9.69 – 16.94) and 15 J/cm² (p=0.0001; 95% CI=5.11 – 10.27). However, irradiation of the HDPCs stimulated by LPS with 4 J/cm² (p=0.527; 95% CI=-3.25 – 6.08) and 30 J/cm² (p=0.901; 95% CI=-8.65 – 9.73) prevented the increase in NO production (Table 1, lines).

Reactive oxygen species (ROS) production

According to the images generated by the application of the DCFH-DA probe (Figure 2), contact of the HDPCs with LPS, without irradiation resulted in a significant increase in ROS production when compared with the group without stimulation by LPS and also not irradiated (control). In general, irradiation of the HDPCs stimulated by LPS (Figure 2, column on the right), irrespective of the dose used, appears to have reduced ROS production in comparison with the group that was stimulated and not irradiated. Even for the HDPCs that did not

come into contact with LPS (Figure 2, column on the left), the images indicate that the irradiation with infrared LED was capable of reducing the quantity of ROS produced by the cells, with the exception of the dose of 30 J/cm².

Cell viability analysis (MTT assay)

The viability of the HDPCs, determined by MTT assay, is presented in Table 2, considering the energy dose and stimulation by LPS. In the absence of stimulation by LPS, all doses were capable of increasing cell viability when compared with the control group (2 J/cm², p=0.010; 95% CI=4.23 – 63.62; 4 J/cm², p=0.010; 95% CI=-4.08 – 55.30; 8 J/cm², p=0.010; 95% CI=-5.17 – 54.22; 15 J/cm², p=0.0001; 95% CI=-4.97 – 54.42; 30 J/cm², p=0.002; 95% CI=-13.52 – 45.87) (Table 2, columns). When HDPCs were irradiated with infrared LED after being stimulated by LPS, no change in their viability was observed, irrespective of the energy dose applied to the cells (Table 2, columns). Furthermore, it was observed that when non irradiated HDPCs were in contact with LPS, it was not sufficient to alter their viability (p=0.091; 95% CI=1.67 – 27.68). The same was observed for the irradiated groups; that is to say, for the same energy dose there was no difference in viability when cells previously stimulated by LPS and non-stimulated cells were compared (Table 2, lines).

DISCUSSION

Light sources have been investigated as promoters of biostimulation on different tissues and cell types (Mester *et al.* 1985, Basso *et al.* 2012) and irradiation by means of light emitting diodes (LED) have shown promising results

(Bastos *et al.* 2009, Lim *et al.* 2009) such as a biomodulating effect on the inflammatory process (Lim *et al.* 2007, Sacono *et al.* 2008). However, the mechanism of action of this type of light source on oxidative stress of HDPCs has not yet been elucidated. In the present study, HDPC irradiated with LED in the infrared wavelength produced lower quantities of NO and ROS.

For this study, pulp cells were isolated from primary teeth because it is suggested that these cells show a better response when compared to permanent teeth (Wang *et al.* 2012). Previous studies comparing HDPCs from permanent teeth and primary teeth showed a higher rate of proliferation and mineralization, an increased differentiation ability, in addition greater number of stem cells and increased expression of cytokines such as IL-6 for primary teeth (Wang *et al.* 2012). Moreover, no studies have elucidated the effects of LED in HDPCs from primary teeth. Previous studies (Holder *et al.* 2012) also investigated the effect of LED on HDPCs, however the authors selected permanent teeth as the source of the cells, also achieving biostimulatory effects. However, the diversity of methods and parameters used such as the wavelength, irradiance and power density hampers the comparison of results obtained in both studies. Further studies are necessary to be evaluated in a standardized way the response of pulp cells from primary and permanent teeth using infrared LED irradiation.

NO is a gaseous free radical related to the inflammatory process (Carr *et al.* 2000, Min *et al.* 2006). This radical is produced by the enzyme NO synthases (NOS), which can be classified into three types: neuronal, endothelial and induced. The first two are constitutive, and the third, iNOS, is increased when the cells are in contact with bacterial products, such as LPS and cytokines, such as IL-1 and TNF- α (Lee *et al.* 2003, Korhonen *et al.* 2005, Filipov *et al.* 2005,

Gutiérrez-Venegas *et al.* 2005). The results of the present study ratified the increase in NO production when the HDPCs were maintained in contact with LPS. In moderate concentrations, this free radical may present positive effects, such as: (1) a vasodilator effect during the first vascular response to inflammation (Liew & Cox 1991), (2) stimulating effect on cytokine expression (Szabó 1995), important for the modulation of inflammation and consequently for the repair and (3) stimulatory effect on cell differentiation (Teixeira *et al.* 2005, Yasuhara *et al.* 2007). However, an exacerbated increase in NO synthesized by iNos has a cytotoxic effect (Cui *et al.* 1994, Messmer *et al.* 1996) and may damage the tissue, making the tissue repair process difficult.

NO, produced by iNOS, binds (reversibly) to the site of cytochrome c oxidase, inhibiting mitochondrial electron transport, and according to Borutaite *et al.* (2000) halogen light is capable of promoting the dissociation of the bond, reverting the effects of NO. However, in extreme situations of high concentrations of NO, pro-apoptotic enzymes may be activated, leading to cell death. Although the light source used in the present study differs from that used in the above-mentioned study, one could suggest that the mechanism of action could be similar.

All the energy doses significantly reduced NO production, with the dose of 15 J/cm² being the most effective. In the present study, the effect of irradiation with infrared LED was investigated in the presence of extracellular NO produced by iNOS. The reduction in this oxidant agent was considered positive. However, irradiation of HDPC with a similar light source, but at another wavelength (red), was capable of increasing NO production via cytochrome c oxidase (CCO) (Holder *et al.* 2012). The intracellular increase in this free radical produced by this

pathway may have a positive effect, because it is related to the stimulation of cell differentiation and collagen matrix production (Holder *et al.* 2012). CCO was recently been demonstrated to be an alternative source of intracellular NO, as a part of that produced would act within the cells and function in hypoxia signaling, while the other part released would function as an extracellular signaler and vasodilator (Ball *et al.* 2011).

LPS-induced cellular stress also resulted in an increase in ROS production, as has been demonstrated in other studies (Yu *et al.* 2009, Kim *et al.* 2012). Depending on their concentration, these oxidant agents may have adverse effects such as reduction in proliferation, induction of apoptosis, interference in the cellular cycle and modulation of cell differentiation (Slater *et al.* 1995, Allen & Tresini 2000, Shackelford *et al.* 2000). As the relative oxygen species are highly reactive, they may also cause cellular damage, such as protein and lipid oxidation, and breakage of DNA bonds (Wiseman & Halliwell 1996, Shaikh & Nicholson 2008). It has been reported that red light irradiation enhances the ability of the cellular antioxidant system, increasing the expression of two important antioxidant genes, selenoprotein W and ATX1 antioxidant protein 1, which may provide a molecular insight into the increase in antioxidant ability (Zhang *et al.* 2003). This therapy also increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), leading an acceleration of angiogenesis and may prove to be an useful alternative tool in wound healing (Lim *et al.* 2011). Although it is reported that the effect of the red and infrared spectrum can be similar (Karu, 2008), further studies specifically evaluating the action of the infrared LED in the regulation of genes and proteins related to the production of ROS are required.

In the present study, the fluorescent oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used for the qualitative evaluation of intracellular ROS, and it was verified that in all the energy doses used, LED was capable of reducing the quantity of ROS in the HDPCs stimulated by LPS (+LPS) when compared with the group + LPS, however, without irradiation. Although no studies have evaluated photobiomodulation of oxidative stress in pulp cells with regard to ROS production, light was capable of diminishing the ROS levels in other types of cells, such as neuronal cells, human gingival fibroblasts and osteoblastoid cells (Lim *et al.* 2007, Liang *et al.* 2008, Saracino *et al.* 2009). When in small quantities, the reactive oxygen species may act as secondary messengers, inducing lipid peroxidation and increasing the production of aldehydes, such as 4-hydroxynonenal. The aldehydes derived from lipid peroxidation may affect the activity of important enzymes, such as ATPase, 50-nucleotidase and phospholipase C (Saracino *et al.* 2009).

Cell viability analysis allowed one to affirm that the alterations observed in NO and ROS production resulted from cell stimulation by LPS. In the non-irradiated cells, as well as in those irradiated with any of the doses investigated, there was no reduction in the viability of the HDPC in culture. These results demonstrated that the reduction in NO and ROS production when irradiated with LED was not caused by a reduction in cell viability, but by the photomodulation of this production. Another interesting fact detected in the study was that in the group not stimulated by LPS, there was a significant increase in cell viability at all the energy doses used, when compared with its control, which probably occurred due to the biostimulating effect of light.

In the absence of cellular stress promoted by LPS, a reduction in ROS production was observed (except at the dose of 30 J/cm²) and in NO (at the doses of 2, 8 and 15 J/cm²), which may be explained by the biostimulating characteristic of light. In spite of these cells not having been stimulated by LPS, and the fact that cells respond more effectively in a situation of stress (Almeida-Lopes *et al.* 2001, Stein *et al.* 2005), 24 h before the time of evaluation they were in an α -MEM culture medium without fetal bovine serum, simulating nutritional stress (Almeida-Lopes *et al.* 2001, Cagnie *et al.* 2003, Jia & Greo 2004, Stein *et al.* 2005). Moreover, the mere fact of manipulating these cells, added to the time of irradiation during which the cell remained out of the incubator may have caused stress, which made them respond positively to irradiation. Furthermore, in the groups not simulated by LPS, an increase in ROS production was observed for the group irradiated with 30 J/cm² in comparison with the control group, although the same was not observed for NO production (there was no difference from the control group). It may be suggested that there was an overdose transmitted to the cells; that is to say, irradiation with 30 J/cm² may have generated a cellular overload, increasing the oxidative stress. There are no previous studies evaluating the effect of infrared LED on the modulation of oxidative stress in HDPC, and therefore, it is important for specific physical parameters to be defined.

With the favorable results found in the present study, associated with easy application and low cost, the clinical use of LED light can be considered as a future tool for biomodulation of the inflammatory process in pulp tissue, favoring tissue repair.

CONCLUSION

Biomodulation of oxidative stress in HDPC may be achieved with a single irradiation dose with LED at the infrared wavelength (855 nm). Among the energy doses investigated, 15 J/cm² was the most effective. The results encourage further investigation of biomodulation by means of infrared LED, of cytokines other than NO and ROS, in *in vitro* studies in the presence of the dentine barrier, simulating the transmission of light through the dentin and *in vivo* studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” - FAPESP (Grants 2012/09502-6 and BP-MS: 2011/16529-5) and the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” (Grants 130839/2009-4 and 305204/2010-6) for the financial support received.

REFERENCES

- Ablon G (2010) Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**, 141-6.
- Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine* **28**, 463–99.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on culture irradiance and same fluency. *Lasers in Surgery and Medicine* **29**, 179-84.

Ball KA, Castello PR, Poyton RO (2011) Low intensity light stimulates nitrite-dependent nitric oxide synthesis but not oxygen consumption by citocromo c oxidase: Implications for phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **102**, 182-91.

Barolet D (2008) Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* **27**, 227-38.

Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA (2013) Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers in Medical Science* **28**, 367-74.

Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA (2012) In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *International Journal of Dentistry* **1**, 1-6.

Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto NA (2009) Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser Physics* **19**, 1925-31.

Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC (2000) Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol- induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochimica et Biophysica Acta* **1459**, 405-12.

Cagnie EMVB, Cornelissen MJ, Declerecq HA, Cambier DC (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and power laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine* **18**, 95-9.

Carr AC, McCall MR, Frei B (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **20**, 1716-23.

Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE (1994) Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Research* **54**, 2462-7.

Dall Agnol MA, Nicolau A, de Lima CJ, Munin E (2009) Comparative analysis of coherent action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers in Medical Science* **24**, 900-16.

Filipov NM, Seegal RF, Lawrence DA (2005) Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicological Sciences* **84**, 139-48.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JK, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite and ¹⁵N in biological fluids. *Analytical Biochemistry* **126**, 131-6.

Gutiérrez-Venegas G, Maldonado-Frías S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cárdenas P (2005) Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sciences* **20**, 60-73.

Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR (2012) Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *Journal of Dental Research* **91**, 961-6.

Jia YL, Greo ZY (2004) Effect of low-power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine* **34**, 323-8.

Karu TI (2008) Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochemistry and Photobiology* **84**, 1091-9.

Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM (2001) Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases* **7**, 2-10.

Kim JC, Lee YH, Yu MK *et al.* (2012) Anti-inflammatory mechanism of PPAR γ on LPS-induced pulp cells: Role of the ROS removal activity. *Archives of Oral Biology* **57**, 392-400.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, Moilanen E (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current Drugs Targets Inflammation and Allergy* **4**, 471-9.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V (1997) Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? *Nitric Oxide* **1**, 107-20.

Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Rossi RP *et al.* (2009) Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers in Surgery and Medicine* **41**, 572-7.

Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG (2003) Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-and COX-2 expression by saquinone effects on I- κ Ba phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal of Pharmacology* **139**, 11-20.

Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MT (2008) Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience* **153**, 963-74.

Liew FY, Cox FE (1991) Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology Today* **12**, 17–21.

Lim JH, Lee J, Choi J *et al.* (2009) The effects of light-emitting diode irradiation at 610 nm and 710 nm on murine t-cell subset populations. *Photomedicine and Laser Surgery* **27**, 813-8.

Lim W, Lee SG, Kim I *et al.* (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing cox inhibitors. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**, 614-21.

Lim WB, Kim JS, Ko YJ *et al.* (2011) Effects of 635nm light-emitting diode irradiation on angiogenesis in CoCl₂-exposed HUVECs. *Lasers in Surgery and Medicine* **43**, 344-52.

Messmer UK, Reimer DM, Reed JC, Brune B (1996) Nitric oxide induced poly (ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *Febs Letters* **384**, 162-6.

Mester E, Mester AF, Mester A (1985) The biomedical effects of laser application. *Lasers in Surgery and Medicine* **5**, 31-9.

Min KS, Hwang YH, Ju HJ *et al.* (2006) Heme oxygenase-1 mediates cytoprotection against nitric oxide-induced cytotoxicity via the cGMP pathway in human pulp cells. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology* **102**, 803-8.

Neupane JBE, Ghimire S, Shakya S, Chaudhary L, Shrivastava VP (2010) Effect of light emitting diodes in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **7**, 44-9.

Oliveira CF, Basso FG, Lins EC *et al.* (2010) Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Physics* **20**, 1659-66.

Sacono NT, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FC (2008) Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers in Surgery and Medicine* **40**, 625-33.

Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G (2009) Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers in Surgery and Medicine* **41**, 298-304.

Shackelford RE, KaufmannWK, Paules RS (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology & Medicine* **28**, 1387-404.

Shaikh S, Nicholson LF (2008) Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of α -synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *Journal of Neuroscience Research* **86**, 2071-82.

Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology Letters* **82**, 149-53.

Stein A, Benayahu D, Maltz D, Oron U (2005) Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**, 161-6.

Szabó C (1995) Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizons* **3**, 2–32.

Teixeira CC, Ischiropoulos H, Leboy PS, Adams SL, Shapiro IM (2005) Nitric oxide–nitric oxide synthase regulates key maturational events during chondrocyte terminal differentiation. *Bone* **37**, 37-45.

Vinck EM, Cagnie BJ, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier DC (2006) Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. *Lasers in Medical Science* **21**, 11-8.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC (2003) Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in Medical Science* **18**, 95-9.

Wang X, Sha XJ, Li GH *et al.* (2012) Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology* **57**, 1231-40.

Wiseman H, Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical Journal* **313**, 17–29.

Xavier M, David DR, de Souza RA *et al.* (2010) Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on Achilles tendinitis in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **42**, 553-8.

Yasuhara R, Suzawa T, Miyamoto Y *et al.* (2007) Nitric oxide in pulp cell growth, differentiation, and mineralization. *Journal of Dental Research* **86**, 163-8.

Yu MK, Lee JC, Kim JH, Lee YH, Jeon JG, Jhee EC (2009) Anti-inflammatory effect of peroxisome proliferator activated receptor gamma on human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*

35, 524-8.

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M (2003) cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *Journal of Investigative Dermatology* **120**, 849-57.

Table 1 – NO production by dental pulp cells irradiated with infrared LED (855 nm) after stimulation by LPS.

Energy dose	Application of LPS	
	Without LPS	With LPS
Control	100.00 (98.37-105.43) b A*	117.39 (109.24- 131.52) a A
2 J/cm ²	95.65 (93.48- 99.46) b C	102.17 (100.00-108.15) a C
4 J/cm ²	104.35 (97.83-106.52) a A	101.09 (100.00-102.17) a C
8 J/cm ²	97.83 (96.20-100.00) b B	111.96 (108.70- 115.22) a B
15 J/cm ²	89.13 (86.96-90.76) b D	95.65 (95.65-99.46) a D
30 J/cm ²	102.17 (98.37-112.50) a A	103.26 (98.37- 108.15) a C

Values are medians (percentile 25–percentile 75), n=8. *Capital letters allow comparisons in the columns, and lower case letters allow comparisons in the lines. Groups identified by equal letters do not differ statistically between them (Mann-Whitney, $p>0.05$).

Table 2 – Cell viability values (% of control) detected by the MTT assay method, considering energy dose and stimulation by LPS.

Energy dose	Application of LPS	
	Without LPS	With LPS
Control	99.02 (94.75- 104.76) a B*	105.72 (97.81-129.03) a AB
2 J/cm ²	130.90 (103.95- 165.43) a A	116.07 (102.38-121.33) a AB
4 J/cm ²	125.66 (102.51-147.20) a A	130.94 (101.18-154.51) a AB
8 J/cm ²	122.72 (101.98-147.41) a A	131.08 (105.13-154.51) a A
15 J/cm ²	124.57 (110.09-138.05) a A	119.50 (102.18-142.15) a AB
30 J/cm ²	116.47 (104.74-125.84) a A	102.01 (87.12-125.70) a B

Values are medians (percentile 25–percentile 75), n=8. *Capital letters allow comparisons in the columns, and lower case letters allow comparisons in the lines. Values with equal letters do not differ statistically between them (Mann-Whitney, $p>0.05$).

Figure 1 – Irradiation Device (LEDtable). (a) Side view of LEDtable with culture plate in position. (b) Top view of LEDtable highlighting location of the 24 LEDs and their collimators, so that one diode (arrows) completely irradiated the base of one single compartment of the plate, in a simultaneous manner.

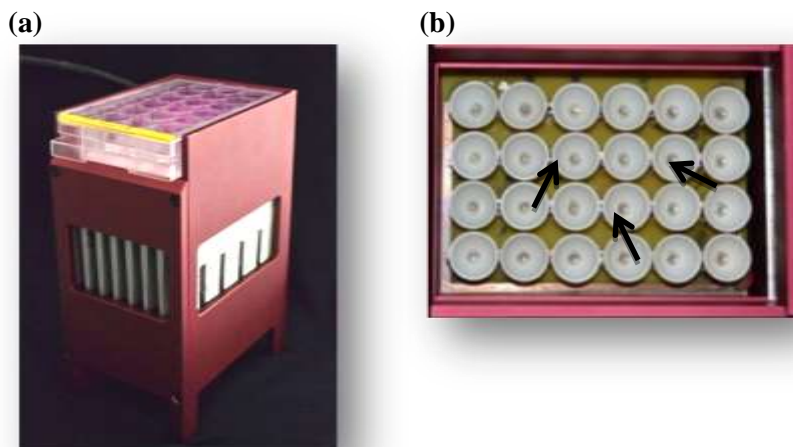
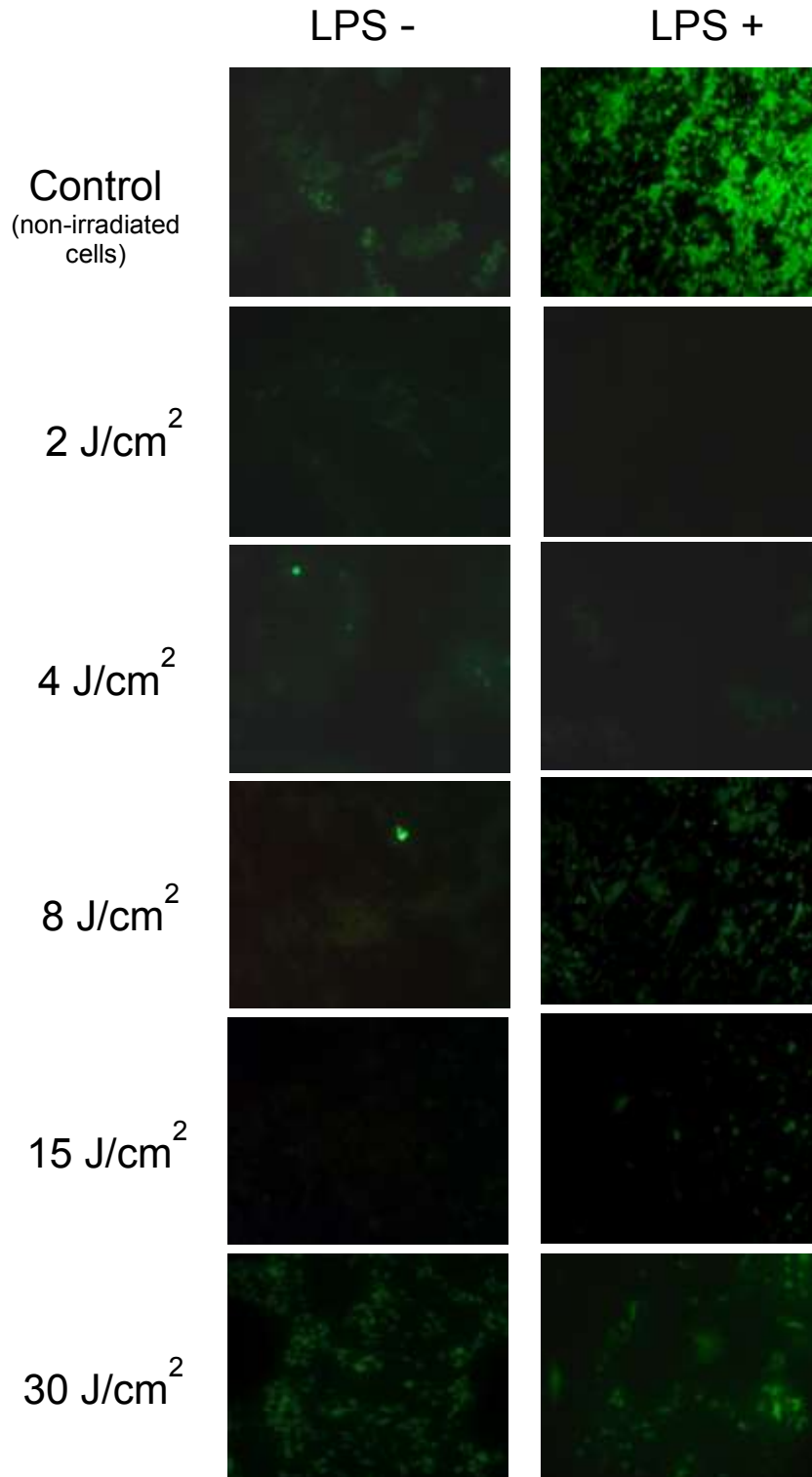
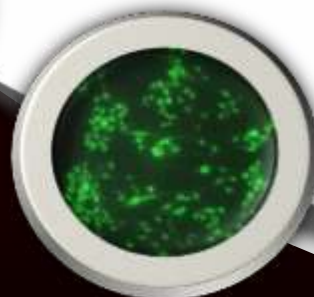


Figure 2 - Images representative of ROS production by pulp cells irradiated with different energy doses (J/cm^2), by LED in the infrared wavelength (855 nm). Images in the column on the left represent the groups in which the cells were not stimulated by LPS before the application of LED light, while in the images in the column on the right, the cells were kept in contact with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of culture medium) before irradiation. The intensity of fluorescence emitted by the DCFH-DA probe, qualified the ROS production in such a manner that the higher the fluorescence the higher the production of these oxidant agents (Nikon TS100F Inverted Epifluorescence Microscope, X40)



ESTUDO 2

FOTOBIMODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS PULPARES IRRADIADAS COM LED INFRAVERMELHO



ESTUDO 2

FOTOBIMODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CÉLULAS PULPARES IRRADIADAS COM LED INFRAVERMELHO

LA Montoro Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

PPC Souza Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

APS Turrioni Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista Araraquara, SP, Brasil

FG Basso Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

CA de Souza Costa Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

J Hebling Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia, UNESP - Univ. Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

Palavras chave: Fototerapia, cultura primária de células, citocinas, polpa dentária.

Autor correspondente:

Profa. Dra. Josimeri Hebling

jhebling@foar.unesp.br

Rua Humaitá, 1680

Araraquara, São Paulo, Brasil; CEP 14801-903

Fone: +55 16-3301-6334; Fax: +55 16 3301-6329

RESUMO

Objetivo: Investigar o efeito da irradiação com LED infravermelho sobre a produção e expressão gênica de citocinas por células da polpa dental humana (HDPC). **Metodologia:** HDPC obtidas de um dente decíduo foram semeadas (10^5 células/well) em α -MEM. Após 24 h, as células foram colocadas em contato com TNF- α (25 ng/mL de meio de cultura) para a indução de produção de mediadores inflamatórios. Em seguida, as células foram submetidas a uma única irradiação com LED infravermelho (855 nm) nas seguintes doses de energia: 2, 4, 8, 15 ou 30 J/cm². Grupos não irradiados, com e sem TNF- α serviram como controles (n=5 por grupo). Decorridas 24 h, as citocinas produzidas em cada grupo foram detectadas por *antibody array* e o teste de q-PCR foi utilizado para a quantificação da expressão gênica das citocinas IL-1 β e IL-6. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **Resultados:** As citocinas mais produzidas foram: GRO α , IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1 e Serpin E1. Na análise por q-PCR houve diminuição da expressão de IL-1 β quando as HDPC foram irradiadas com 4 J/cm², sendo observada ausência de efeito da irradiação na expressão de IL-6. **Conclusão:** A expressão da citocina IL-1 β pode ser biomodulada com uma única irradiação de LED no comprimento de onda do infravermelho (855 nm) na dose de 4 J/cm².

Palavras chave: Fototerapia, cultura primária de células, citocinas, polpa dentária.

INTRODUÇÃO

Em algumas doenças infecciosas, como por exemplo a cárie dentária, várias citocinas desempenham uma importante função em regular a duração e a intensidade da resposta imune contra agentes potencialmente patógenos (Nagaoka et al.²⁹, 1996). Algumas células, como os fibroblastos localizados na polpa dental, produzem citocinas em resposta a estímulos bacterianos (Hosoya, Matsushima¹⁵, 1997; Matsushima et al.²⁶, 1998). Esses fibroblastos, são componentes constitutivos do tecido pulpar e se apresentam como uma barreira física e estrutural contra a agressão de agentes patógenos, sendo essas células importantes no recrutamento de células do sistema imune para ajudar no combate ao processo inflamatório (Yang et al.⁴⁵, 2003).

Células da polpa dentária, como odontoblastos e fibroblastos, são capazes de gerar respostas imune inata e adaptativa em várias condições inflamatórias (Hahn, Liewehr¹³, 2007) e particularmente, as citocinas conhecidas como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) desempenham um papel relevante no processo inflamatório (D'Souza et al.¹⁰, 1989). A citocina IL-1 β tem um papel central na inflamação e pode ser produzida por vários tipos celulares, como macrófagos, monócitos, leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos e células endoteliais (Hosoya, Matsushima¹⁵, 1997). Além disso, a IL-1 β induz a expressão de TNF- α e IL-6, outras citocinas envolvidas no processo inflamatório (Agarwal et al.³, 1995).

TNF- α e IL-1 β partilham muitas atividades biológicas. Assim como a IL-1 β , TNF- α estimula o crescimento de fibroblastos e a produção de colagenase, prostaglandina E2, e interferon- β por fibroblastos (Le et al.²¹, 1987), e principalmente, desempenham papéis sinérgicos e essenciais na proteção do

tecido pulpar contra patógenos (Coil et al.⁷, 2004). Apesar de ser conhecido que estas citocinas estão relacionadas com a modulação do processo inflamatório da polpa dental (Coil et al.⁷, 2004; Kim et al.¹⁹, 2010), os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a agressão bacteriana em células pulpares humanas (HDPC) ainda não estão completamente esclarecidos (Kim et al.¹⁹, 2010). Além disso, ainda não existe um tratamento não invasivo efetivo para eliminar a dor e modular o processo inflamatório no tecido pulpar quando este é invadido por bactérias e seus bioprodutos, ou mesmo por componentes tóxicos oriundos dos materiais restauradores.

Uma proposta de tratamento para a modulação da inflamação, a qual tem apresentando resultados promissores é a fototerapia utilizando diodos emissores de luz (LED) (Ablon¹, 2010; Dall Agnol et al.¹¹, 2009; Kim et al.¹⁸, 2013; Lim et al.²⁴, 2007). A fototerapia utilizando LED pode ser considerada uma alternativa de tratamento por apresentar efeitos bioestimuladores, gerando um aumento da produção de ATP, aumento do fluxo sanguíneo, da proliferação e migração celular (Bastos et al.⁶, 2009; Dall Agnol et al.¹¹, 2009; Xavier et al.⁴⁴, 2010), modulação da expressão de citocinas, de fatores de crescimento e de outros mediadores inflamatórios (Barolet⁵, 2008).

A luz no comprimento de onda do infravermelho possui uma grande penetração nos tecidos e um menor espalhamento (Neupane et al.³⁰, 2010). Além disso, tem sido relatado que pode exercer efeito antiinflamatório (Ablon¹, 2010), aumentar o metabolismo celular (Vinck et al.⁴², 2003), auxiliar no reparo de tecidos lesionados (Bastos et al.⁶, 2009) e melhorar a atividade muscular (Leal Jr et al.²², 2009; Vinck et al.⁴¹, 2006), auxiliar na formação óssea após expansão rápida da maxila (Rosa et al.³⁵, 2013) e foi investigada como

coadjuvante no tratamento da dermatite atópica (Kim et al.¹⁸, 2013) e do herpes zoster (Park et al.³³, 2013).

Apesar dos resultados favoráveis obtidos com a fototerapia do LED infravermelho, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação desta irradiação sobre a modulação inflamatória do tecido pulpar. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do LED 855 nm, aplicado em diferentes doses de energia, na produção e expressão gênica de citocinas em células da polpa dental humana em cultura.

MATERIAL E MÉTODO

CULTURA CELULAR

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (processo 81/11-Anexo) foi coletado um dente decíduo com avançado estágio de rizólise. O dente foi doado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento (Apêndice). Imediatamente após a extração, o dente foi inserido em um tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de meio de cultura basal α -MEM (Gibco, Langley, OK, EUA) e encaminhado ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da FOAr/UNESP para extração da polpa dental em condições assépticas (no interior de uma capela de fluxo laminar vertical). A polpa foi mecanicamente removida do interior da câmara pulpar com o uso de uma colher de dentina afiada e esterilizada e imersa por 1 h na temperatura de 37°C, em uma solução contendo 3 mg/mL de colagenase tipo I (Worthington, Lakewood, New Jersey, EUA) e 4 mg/mL de dispase (Worthington, Lakewood, New Jersey, EUA). Após este período, a solução, contendo células e restos de estruturas pulpares digeridas, foi centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos. O *pellet* formado

no fundo do tubo Falcon foi ressuspendido em α -MEM (Gibco) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (Gibco, Langley, OK, EUA), 100 unidades de penicilina/mL, 0,23 mg de streptomicina/mL (Gibco, Langley, OK, EUA), sendo que as células obtidas foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² e incubadas a 37°C em atmosfera umidecida contendo 5% CO₂ por 4 dias (Gronthos et al.¹², 2000). Os repiques ocorreram quando as células apresentavam-se em sub-confluência (ca. 80%) até que houvesse um número de células suficiente para iniciar o experimento.

As células foram utilizadas entre a quinta e oitava passagem, e semeadas (10⁵ células/well) em placas de 24 compartimentos em α -MEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). No momento do plantio, foram utilizados compartimentos alternados com e sem células, com o intuito de, no momento da irradiação, não haver possibilidade de interferência da luz entre os compartimentos. Após 24 h foi realizada a troca do meio de cultura por α -MEM (Gibco) com apenas 1% de soro fetal bovino (Gibco), seguido da indução da expressão de mediadores inflamatórios por meio da aplicação de uma citocina recombinante humana, TNF- α (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA), na concentração de 25 ng para 1 mL de meio de cultura. Logo após o tratamento com TNF- α , as células foram submetidas a uma única irradiação com LED infravermelho com as seguintes doses de energia: 2 J/cm², 4 J/cm², 8 J/cm², 15 J/cm² ou 30 J/cm² (n=5). Células com e sem contato com o TNF- α , porém não irradiadas, serviram como controle.

DISPOSITIVO DE IRRADIAÇÃO

O dispositivo de irradiação, denominado de LEDTable, possui 24 diodos com comprimento de onda estabelecido em 855 ± 10 nm (infravermelho). Os diodos, do tipo InGaN (nitreto de índio e gálio), estão posicionados de tal maneira que quando ativados, simultaneamente, cada um deles irradia, individualmente, um compartimento de uma placa de cultura celular de 24 compartimentos. A irradiância (dose de potência) emitida por cada LED foi de 40 mW/cm^2 , sendo que a potência total de irradiação foi determinada levando-se em consideração a perda de potência óptica em cada compartimento devido à presença do acrílico (fundo do compartimento). Cada diodo está localizado a uma distância padronizada da placa de cultura (1,4 cm) com o intuito de envolver, de forma uniforme, toda área da base de cada compartimento da placa (2 cm^2). A partir desses dados e utilizando o valor da área de cada compartimento, os tempos de irradiação necessários para aplicação segura das densidades de energia foram calculados. Assim sendo, para atingir-se a dose de energia pré-definida de 2 J/cm^2 , 4 J/cm^2 , 8 J/cm^2 , 15 J/cm^2 e 30 J/cm^2 , as HDPC foram irradiadas ininterruptamente por 50 s, 1 min 20 s, 3 min 20s, 6 min 15 s e 12 min 30 s, respectivamente.

ANÁLISE DE CITOCINAS - *Antibody Array (Proteome Profiler™ Array)*

Para análise das citocinas produzidas pelas HDPC em contato com TNF- α seguidas da irradiação com LED infravermelho, foi utilizado o *kit Human Cytokine Array Panel A Proteome profiler™ array* (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Vinte e

quatro horas após a irradiação, o sobrenadante da cultura de HDPC foi coletado e feito um *pool* entre 5 amostras de cada grupo investigado (1 mL). Para cada um dos 7 grupos, foi utilizada uma membrana, a qual é revestida com anticorpos específicos para cada uma das 36 citocinas presentes no *kit*. As membranas foram colocadas em contato com um reagente quimioluminescente e reveladas no Universal Hood III (Bio Rad, Philadelphia, PA, EUA). Por fim, os sinais positivos de marcação das citocinas foram identificados com a sobreposição de uma transparência representativa da imagem matriz (Figura 1), 12 horas após o contato com o sobrenadante.

EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

O RNA das HDPC, de cinco amostras de cada um dos 7 grupos investigados, foi extraído por meio do Kit RNAqueous[®]-4PCR (InvitroGen, San Diego, CA, EUA) segundo orientações do fabricante. Para cada amostra de RNA obtida foi sintetizado o cDNA, para a realização do qPCR. Esse protocolo foi realizado utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

PCR quantitativo (qPCR)

Após a síntese do cDNA, foi avaliado o efeito da irradiação com o LED sobre a expressão dos genes que codificam para as citocinas IL-1 β , IL-6, e os controles endógenos B2M (beta-2-microglobulina) e Beta-actina (Tabela 2). Todos os genes relacionados estão envolvidos na sinalização celular para modulação inflamatória do tecido pulpar (Cooper et al.⁸, 2010). As reações foram

preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real adicionado dos conjuntos de primers para cada gene - PCR taqMan® Fast Universal Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT (*cycle threshold*), foi referente ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atingisse o limiar de detecção, e então normalizados de acordo com a expressão do gene endógeno Beta-actina, uma vez que não houve variação entre os controles endógenos utilizados. A seguir, as concentrações de RNAm de cada gene alvo foram avaliadas estatisticamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a produção de citocinas, determinada pelo *antibody array*, foi realizada uma avaliação qualitativa. Os dados da expressão gênica por qPCR foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Mann-Whitney para comparação dos grupos aos pares. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que

apresentaram o p-valor inferior a 0,05. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA).

RESULTADOS

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Foram detectados os sinais positivos para seguintes citocinas em todos os grupos: GRO- α , IL-6, IL-8, Serpin E1, MCP-1 (Figura 2) que podem ser identificadas pela Tabela 1. As citocinas TNF- α , C5, RANTES, IP-10 e GM-CSF foram detectadas apenas nos grupos estimulados por TNF- α não irradiado e irradiados nas diversas doses de energia (Figura 2). Pode-se observar visualmente que o grupo irradiado com a dose de 4 J/cm² apresentou, no geral, uma menor produção de citocinas (Figura 2d).

qPCR

Os dados da expressão gênica das citocinas IL-1 β e IL-6 pelas HDPC, obtidos 24 h após a irradiação com as diferentes doses de energia estão apresentados graficamente na Figura 3. Foi observado aumento significativo da expressão de ambas as citocinas, IL-1 β e IL-6, quando as células foram estimuladas por TNF- α . Nenhuma dose de irradiação exerceu efeito sobre a expressão gênica de IL-6 pelas HDPC quando comparadas ao controle+TNF- α ou quando comparadas entre si (Figura 3a).

Das doses investigadas, apenas a de 4 J/cm² foi capaz de se manter igual ao controle negativo da expressão gênica de IL-1 β , de tal forma que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre ambos. Entretanto, este

mesmo grupo também não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle+TNF- α (Figura 3b).

DISCUSSÃO

A utilização de fontes de luz, como o LED, tem sido sugerida como forma de terapia em diversas áreas da saúde, particularmente por apresentar efeitos positivos na melhora da contração muscular (Leal Jr et al.²², 2009), ação anti-inflamatória (Lim et al.²⁴, 2007), regeneração de tecidos lesionados (Bastos et al.⁶, 2009, Dall Agnol et al.¹¹, 2009) e melhora na cicatrização (da Costa Santos et al.⁹, 2013; Kim et al.¹⁸, 2013). Especificamente na odontologia, o LED vem sendo investigado como tratamento coadjuvante da hipersensibilidade dentinária (Lizarelli et al.²⁵, 2007), mucosite (Sacono et al.³⁶, 2008) e candidíase (Mima et al.²⁷, 2010). Apesar de se ter conhecimento que a luz atua no metabolismo oxidativo da cadeia respiratória mitocondrial, estimulando a atividade do citocromo c oxidase e aumentando a síntese de ATP (Karu et al.¹⁶, 2004) ainda não se sabe qual é o real mecanismo de ação do LED em HDPC.

Com relação aos parâmetros de irradiação utilizados neste estudo, encontrou-se dificuldade em determinar a irradiância e a dose de energia ideais para estimulação da cultura celular, devido à falta de padronização nos estudos já existentes. De acordo com a revisão de literatura, as doses de energia do LED utilizadas para bioestimulação variaram de 0,093 J/cm² (Kim et al.¹⁷, 2009) a 162 J/cm² (Aihara et al.², 2006), sendo que a dose mais utilizada na literatura foi a de 4 J/cm² (Barolet et al.⁴, 2009, Wong-Riley et al.⁴³, 2005). No presente estudo foram utilizadas diversas doses de energia, todas localizadas dentro do intervalo

das doses anteriormente investigadas, para tentar estabelecer um protocolo de irradiação para a bioestimulação celular.

O método escolhido neste estudo para a indução da produção e expressão de citocinas inflamatórias foi a estimulação com a citocina recombinante humana TNF- α . Apesar da aplicação de LPS ser um método bastante utilizado pela literatura (Hosoya e Matsushima¹⁵, 1997, Lee et al.²³, 2011, Nagaoka et al.²⁹, 1996, Sakurai et al.³⁷, 2000), também há relatos da utilização do TNF- α (Kim et al.¹⁹, 2010, Souza et al.⁴⁰, 2012, Souza et al.³⁹, 2013). Além disso, estudos piloto demonstraram que as HDPC não tem sua expressão e produção de citocinas aumentada quando em contato com LPS de *E. coli*. Esse achado coincide com o de Coil et al.⁷ (2004), que não encontraram aumento da expressão de IL-1 e TNF- α em fibroblastos de células pulpares *in vitro* estimuladas com LPS de *E. Coli*.

As citocinas produzidas pelas HDPC foram GRO- α , IL-6, IL-8, Serpin E1, MCP-1, TNF- α , C5, RANTES, IP-10 e GM-CSF. Estas citocinas geralmente são produzidas transitoriamente e estão envolvidas na regulação da intensidade e duração da resposta imune e das diversas fases do processo inflamatório (Seymour e Gemmell³⁸, 2011). No presente estudo, pôde-se verificar visualmente através das marcações positivas das citocinas (Antibody Array), que de uma maneira geral, a dose de 4 J/cm² causou uma discreta diminuição na produção das citocinas evidenciadas, sugerindo que a luz possa modular o processo inflamatório, por meio de uma bioestimulação conforme achados em estudos com o mesmo tipo celular investigado (Holder et al.¹⁴, 2012) e outros diversos, como fibroblastos, células odontoblastóides e células mesenquimais (Oliveira et al.³¹, 2010, Peng et al.³⁴, 2012, Vinck et al.⁴², 2003).

As citocinas IL-6 e IL-1 β tiveram sua expressão gênica detectada, porém somente a IL-6 foi produzida. A produção de IL-1 β pode não ter sido detectada devido ao fato de ser sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β), que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1, além de possuir uma meia-vida plasmática de apenas 6 minutos (de Oliveira et al.³², 2011).

As citocinas, em concentrações moderadas, são mediadores necessários para conduzir o processo inflamatório ao local da lesão e conseqüentemente promover o reparo tecidual (Laraia et al.²⁰, 2012), por isso, seria interessante encontrar uma forma de tratamento que consiga modular sua concentração, facilitando o processo de cura do tecido pulpar. No presente estudo, o LED infravermelho foi capaz de manter a expressão da citocina IL-1 β igual ao controle negativo em apenas uma dose investigada (4J/cm²), enquanto ausência de efeito da irradiação observado para a expressão gênica de IL-6.

A possibilidade de controlar a quantidade de citocinas inflamatórias, no caso específico da citocina IL-1 β , e conseqüentemente de seus efeitos nocivos ao processo de reparo tecidual encoraja a realização de novos estudos, para que se tente estabelecer um protocolo de irradiação que possa ser utilizado clinicamente para a biomodulação do processo inflamatório do tecido pulpar, conseqüentemente favorecendo o reparo tecidual. Adicionalmente, foi demonstrado que a irradiação de HDPC com LED infravermelho é capaz de reduzir o estresse oxidativo por meio da biomodulação da síntese de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Montoro et al.²⁸, 2013). A fototerapia apresenta um baixo custo e uma fácil aplicação e a luz poderia ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outras terapias locais com o intuito

de reduzir os danos pulpares causados por lesões cáries, traumas, preparos cavitários e pelos próprios materiais restauradores.

CONCLUSÃO

A expressão da citocina IL-1 β pode ser biomodulada com apenas uma única irradiação de LED no comprimento de onda do infravermelho (855 nm) na dose de 4 J/cm².

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” - FAPESP (auxílio à pesquisa 2012/09502-6 e bolsa de mestrado: 2011/16529-5) e “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” (processos 130839/2009-4 e 305204/2010-6) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS *

1. Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 141-6.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

2. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expressin vitro. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(1): 24-33.
3. Agarwal S, Baran C, Piesco NP, Quintero JC, Langkamp HH, Johns LP, et al. Synthesis of proinflammatory cytokines by human gingival fibroblasts in response to lipopolysaccharides and interleukin-1 β . *J Periodontol Res.* 1995; 30(6): 382-9.
4. Barolet D, Roberge CJ, Auger FA, Boucher A, GermainL. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(12): 2751-9.
5. Barolet, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27(4): 227-38.
6. Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto, NA. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser Phys.* 2009; 19(9): 1925-31.
7. Coil J, Tam E, Waterfield D. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. *J Endod.* 2004; 30(2): 88-91.
8. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010; 38(9): 687-97

9. da Costa Santos VB, Ramos SP, Milanez VF, Corrêa JCM, Alves RIA, Dias IFL, et al. LED therapy or cryotherapy between exercise intervals in Wista rats: anti-inflammatory and ergogenic effects. *Lasers Med Sci.* 2013 Jun 19. Epub ahead of print.
10. D'Souza R, Brown LR, Newland JR, Levy BM, Lachman LB. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 1989; 34(5): 307-13.
11. Dall Agnol MA, Nicolau A, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(6): 900-16.
12. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97(25): 13625-30.
13. Hahn L, Liewehr FR. Update on the adaptative immune responses of the dental pulp. *J Endod.* 2007; 33(7): 773-81.
14. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res.* 2012; 91(10): 961-6.
15. Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 β production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod.* 1997; 23(1): 39 – 42.

16. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(2): 211-6.
17. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Kim DO, Park SJ, Chung JY, et al. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(2):214-22.
18. Kim CH, Cheong KA, Lee AY. 850 nm light-emitting-diode phototherapy plus low-dose tacrolimus (FK-506) as combination therapy in the treatment of dermatophagoides farina-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Dermatol.* 2013; 72(2): 142-8.
19. Kim YS, Min KS, Lee SI, Shin SJ, Shin KS, Kim EC. Effect of proinflammatory cytokines on the expression and regulation of human beta-defensin 2 in human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36(1): 64-9.
20. Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dos Reis FA, Albertini R, de Almeida P, et al. Effect of low-level laser therapy (660nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendo in rats. *Photochem Photobiol.* 2012; 88(6): 1546-50.
21. Le J, Weinstein D, Guber U, Vilek J. Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J Immunol.* 1987; 138(7): 2137-42.

22. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, de Godoi V, et al. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med.* 2009; 41(8): 572-7.
23. Lee SI, Min KS, Bae WJ, Lee YM, Lee SY, Lee ES, et al. Role of SIRT1 in heat stress-and lipopolysaccharide-induced immune and defense gene expression in human dental pulp cells. *J Endod.* 2011; 37(11): 1525-30.
24. Lim W, Lee SG, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing cox inhibitors. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(7): 614-21.
25. Lizarelli RFZ, Miguel FAC, Villa GEP, de Carvalho Filho E, Pelino JEP, Bagnato VS. Clinical effects of low-intensity laser vs light-emitting diode therapy on dentin hypersensitivity. *J Oral Laser Application.* 2007; 7(2): 129-36.
26. Matsushima K, Ohbayashi E, Takeuchi H, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki. Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from *Lactobacillus casei*. *J Endod.* 1998; 24(4): 252-5.
27. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 2010; 109(3): 392-401.

28. Montoro LA, Turrioni APS, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J. Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2013 Nov 11. Epub ahead of print.
29. Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H, Kawagoe M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in culture stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *J Endod*. 1996; 22(1): 9-12.
30. Neupane JBE, Ghimire S, Shakya S, Chaudhary L, Shrivastava VP. Effect of light emitting diodes in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Photodynamic Photodyn Ther*. 2010; 7(1): 44-9.
31. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS et al. Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys*. 2010; 20(7): 1659-66.
32. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011; 61(2): 255-63.
33. Park KY, Han TY, Kim IS, Yeo IK, Kim BJ, Kim MN. The effects of 830 nm light-emitting diode therapy on acute herpes zoster ophthalmicus: a pilot study. *Ann Dermatol*. 2013; 23(2): 163-7.
34. Peng F, Wu H, Zheng Y, Xu X, Yu J. The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2012; 27(3): 645-53.

35. Rosa CB, Habib FAL, de Araújo TM, Aragão JS, Gomes RS, Barbosa AFS, Silveira Jr L, Pinheiro ALB. Effect of the laser and light-emitting diode (LED) phototherapy on midpalatal suture bone formation after rapid maxilla expansion: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci*. 2013 Feb 21. Epub ahead of print.
36. Sacono NT, Costa CAS, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FCB. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg Med*. 2008; 40(9): 625-33.
37. Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*. 2000; 108(1): 29-34.
38. Seymour GJ, Gemmelle C. Cytokines in periodontal disease: where to from here. *Acta Odontol Scand*. 2011; 59(3): 167-73.
39. Souza PPC, Brichter AB, Reis RI, Costa CAS, Lundberg P, Lerner UH. IL-4 and IL-13 inhibit IL-1 β and TNF- α induced kinin B1 and B2 receptors through a STAT6-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2013; 169(2): 400-12.
40. Souza PPC, Palmqvist P, Lundberg P, Lundgren I, Hanstrom L, Souza JAC, et al. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol Immunol*. 2012; 49(4): 601-10.

41. Vinck EM, Cagnie BJ, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier DC. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(1): 11-8.
42. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2): 95-9.
43. Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem.* 2005; 280(6): 4761-71.
44. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 553-8.
45. Yang LC, Huang FM, Lin CS, Liu CM, Lail CC, Chang YC. Induction of interleukin-8 gene expression by black-pigmented *Bacteroides* in human pulp fibroblasts and osteoblasts. *Int Endod J.* 2003; 36(11): 774-9.

Tabela 1 - Tabela de referência de coordenadas para *Human Cytokine Array Panel A*.

Coordenada	Alvo/Controle	Nomenclatura Alternativa
A1, A2	Reference spot	
A3, A4	C5/C5a	Complement component 5/5a
A5, A6	Cd40 Ligand	CD154
A7, A8	G-CSF	CSF β , CSF-3
A9, A10	GM-CSF	CSF α , CSF-2
A11, A12	GRO α	CXCL1
A13, A14	I-309	CCL1
A15, A16	sICAM-1	CD54
A17, A18	IFN- γ	Type II IFN
A19, A20	Reference spot	
B3, B4	IL-1 α	IL-1F1
B5, B6	IL-1 β	IL-1F2
B7, B8	IL-1ra	IL-1F3
B9, B10	IL-2	
B11, B12	IL-4	
B13, B14	IL-5	
B15, B16	IL-6	
B17, B18	IL-8	CXCL8
C3, C4	IL-10	
C5, C6	IL-12 p70	
C7, C8	IL-13	
C9, C10	IL-16	LCF
C11, C12	IL-17	
C13, C14	IL-17E	
C15, C16	IL-23	
C17, C18	IL-27	
D3, D4	IL-32a	
D5, D6	IP-10	CXCL10
D7, D8	I-TAC	CXCL11
D9, D10	MCP-1	CCL2
D11, D12	MIF	GIF, DER6
D13, D14	MIP-1 α	CCL3
D15, D16	MIP-1 β	CCL4
D17, D18	Serpin E1	PAI01
E1, E2	Reference spot	
E3, E4	RANTES	CCL5
E5, E6	SDF-1	CXCL12
E7, E8	TNF- α	TNFSF1A
E9, E10	sTREM-1	
E19, E20	Negative control	

Tabela 2 - Identificadores dos genes analisados por meio da técnica de qPCR.

Gene – símbolo	Gene – nome	Assays - IDs
IL-1 β	Interleucina-1 beta	Hs01555410_m1
IL-6	Interleucina-6	Hs00985639_m1
ACTB	Beta-actina	Hs99999903_m1
B2M	Beta-2-microglobulina	Hs00984230_m1

Figura 1 - (a) Representação esquemática de uma membrana *antibody array*. Cada círculo representa uma das 36 citocinas que esta membrana permite identificar; (b) imagem demonstrativa da intensidade de sinal positivo para expressão de determinadas citocinas.

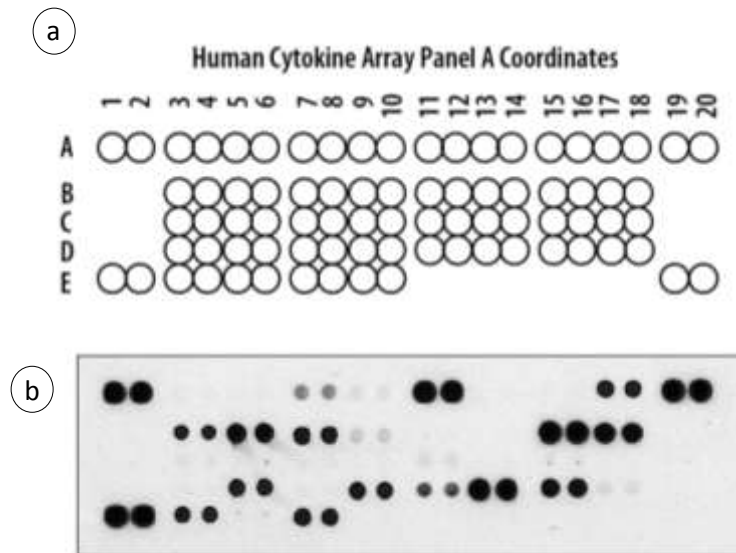


Figura 2 - Resultado das membranas após a revelação de acordo com os grupos: (a) controle; (b) controle+TNF- α ; (c) TNF- α 2J/cm²; (d) TNF- α 4 J/cm²; (e) TNF- α 8 J/cm²; (f) TNF- α 15 J/cm²; e (g) TNF- α 30 J/cm².

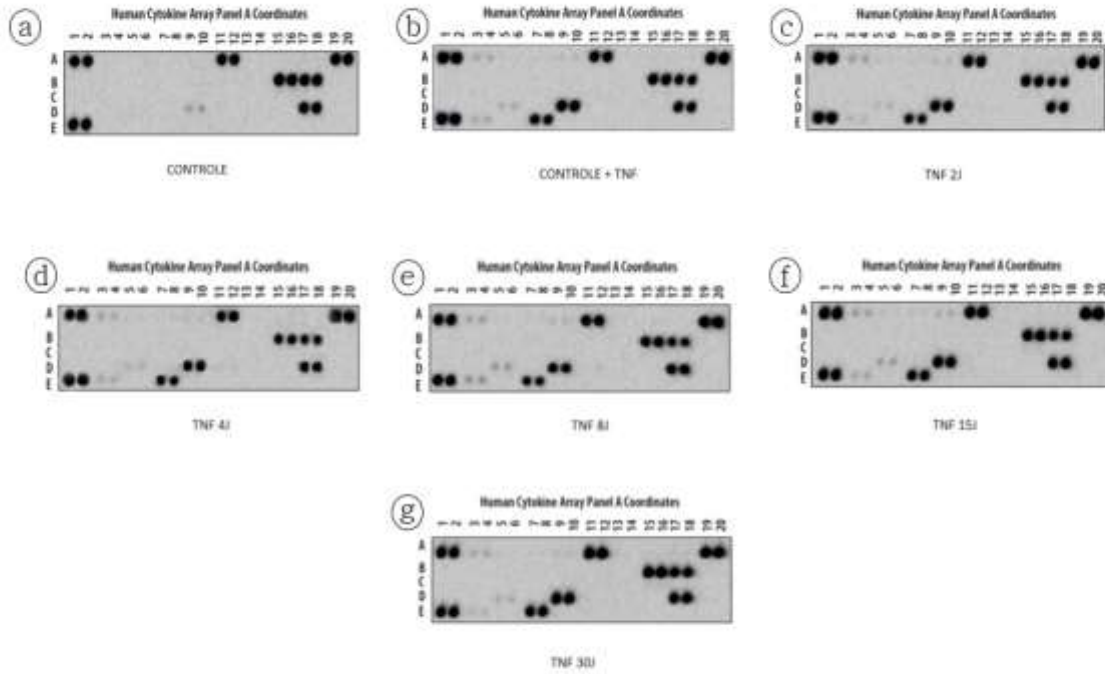
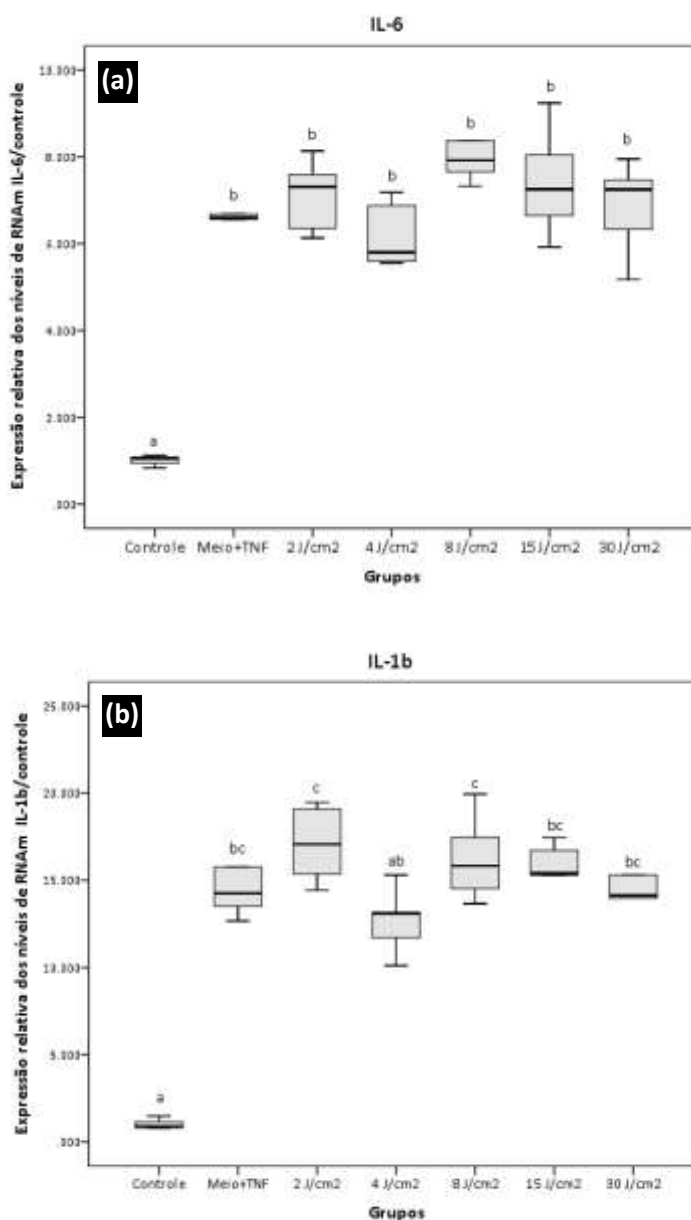
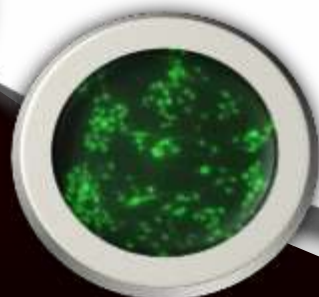


Figura 3 – Expressão relativa dos níveis de RNAm para os genes (a) IL-6 e (b) IL-1 β normalizados pelo controle interno Beta-actina. Diagrama de caixas representativos da expressão mediana de cada gene em função dos grupos. Na caixa estão contidos 50% dos dados, assim, os limites inferior e superior das caixas representam, respectivamente, os percentis 25 e 75. A linha horizontal no interior da caixa representa a mediana e as extremidades das antenas abaixo e acima da caixa representam os valores mínimo e máximo dos dados de cada grupo.



CONSIDERAÇÕES FINAIS



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fototerapia vem sendo amplamente utilizada e vários pesquisadores têm investigado suas possibilidades de aplicação na área da saúde (da Costa Santos et al.⁶, 2013; Dall Agnol et al.⁷, 2009; Kim et al.¹², 2013; Lim et al.¹⁴, 2007), sendo dispensada uma atenção especial para a área da Odontologia (Lizarelli et al.¹⁵, 2007; Mima et al.¹⁶, 2010; Sacono et al.²¹, 2008). Entretanto, a utilização dessa nova tecnologia pelos clínicos permanece limitada pelo fato de que os dados científicos ainda são inconsistentes e os parâmetros específicos para cada tratamento não estão adequadamente estabelecidos.

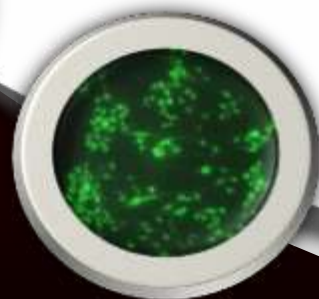
Os dois principais efeitos da luz sobre o tecido pulpar estão relacionados com a biomodulação do processo inflamatório (Holder et al.¹⁰, 2012) e bioestimulação celular (Ferreira et al.⁹, 2006; Holder et al.¹⁰, 2012; Oliveira et al.¹⁸, 2010). Uma vez que a inflamação é controlada e as células pulpares estimuladas, há uma maior possibilidade de sucesso na reparação tecidual (Utsunomiya et al.²⁵, 1998).

No presente estudo, o LED infravermelho no comprimento de onda de 855 nm, apresentou resultados positivos, sendo capaz de biomodular o estresse oxidativo de HDPC para todas as doses investigadas (2, 4, 8, 15 e 30 J/cm²). A resposta celular mais significativa, entretanto, ocorreu para a dose de 15 J/cm². Em contraste aos resultados observados para o estresse oxidativo, a única dose efetiva na modulação da produção e expressão de citocinas inflamatórias, foi a de 4 J/cm². Esses resultados demonstram que os benefícios da fototerapia são célula e evento-dependentes.

Assim, a despeito dos efeitos positivos observados no presente trabalho, ainda há necessidade de mais estudos, tanto *in vitro* e, especialmente, *in vivo*, investigando parâmetros que possam atuar beneficiando diferentes eventos simultaneamente, como os investigados neste estudo. Estas pesquisas futuras serão importantes para o estabelecimento de protocolos seguros e efetivos de irradiação das células pulpares, uma vez que já está comprovado que a luz é capaz de transpor a barreira dentinária e interagir com células do tecido pulpar (Turrioni et al.²³, 2012).

Após obtenção de protocolos seguros de irradiação, visualiza-se a utilização clínica do LED por meio de dispositivos específicos que possam ser aplicados diretamente nas paredes cavitárias ou mesmo sobre o tecido pulpar exposto. Como demonstrado no presente estudo para o estresse oxidativo e expressão de mediadores da inflamação, a luz aplicada sobre o elemento dental, poderia controlar a resposta inflamatória no complexo dentino-pulpar frente às agressões externas (cárie, preparo cavitário, toxicidade dos materiais restauradores) e teria a capacidade de acelerar o processo de reparo, possibilitando maior sucesso nos procedimentos capeadores/restauradores.

REFERÊNCIAS



5 REFERÊNCIAS *

1. Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(1): 141-6.
2. Barolet, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27(4): 227-38.
3. Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto, NA. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser Phys.* 2009; 19(9): 1925-31.
4. Bletsa A, Berggreen E, Fristad I, Tenstad O, Wiig H. Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid Exchange during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *J Physiol.* 2006; 15(573): 225-36.
5. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010; 38(9): 687-97.
6. da Costa Santos VB, Ramos SP, Milanez VF, Corrêa JCM, Alves RIA, Dias IFL, Nakamura FY. LED therapy or cryotherapy between exercise intervals in Wista rats: anti-inflammatory and ergogenic effects. *Lasers Med Sci.* 2013 Jun 19. Epub ahead of print.
7. Dall Agnol MA, Nicolau A, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(6): 900-16.

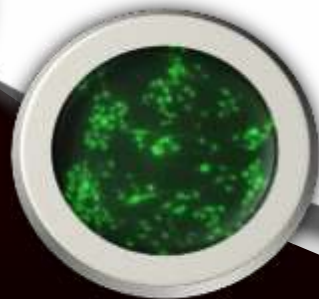
*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

8. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MTT, Dovi JV, et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(2): 121-8.
9. Ferreira ANS, Silveira Jr L, Genovese WS, de Araujo VC, Frigo L, de Mesquita RA, Guedes E. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24(3): 358-65.
10. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res.* 2012; 91(10): 961-6.
11. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(2): 211-6.
12. Kim CH, Cheong KA, Lee AY. 850 nm light-emitting-diode phototherapy plus low-dose tacrolimus (FK-506) as combination therapy in the treatment of dermatophagoides farina-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J Dermatol.* 2013; 72(2): 142-8.
13. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Rossi RP, De Marchi T, Baroni BM, de Godoi V, et al. Effect of cluster multi-diode light emitting diode therapy (LEDT) on exercise-induced skeletal muscle fatigue and skeletal muscle recovery in humans. *Lasers Surg Med.* 2009; 41(8): 572-7.
14. Lim W, Lee SG, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H et al. The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing cox inhibitors. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(7): 614-21.
15. Lizarelli RFZ, Miguel FAC, Villa GEP, de Carvalho Filho E, Pelino JEP, Bagnato VS. Clinical effects of low-intensity laser vs light-emitting diode therapy on dentin hypersensitivity. *J Oral Laser App.* 2007; 7(2): 129-36.

16. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 2010; 109(3): 392-401.
17. Neupane JBE, Ghimire S, Shakya S, Chaudhary L, Shrivastava VP. Effect of light emitting diodes in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Photodynamic Photodyn Ther.* 2010; 7(1): 44-9
18. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS et al. Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys.* 2010; 20(7): 1659-66.
19. Park KY, Han TY, Kim IS, Yeo IK, Kim BJ, Kim MN. The effects of 830 nm light-emitting diode therapy on acute herpes zoster ophthalmicus: a pilot study. *Ann Dermatol.* 2013; 23(2): 163-7.
20. Rosa CB, Habib FAL, de Araújo TM, Aragão JS, Gomes RS, Barbosa AFS, et al. Effect of the laser and light-emitting diode (LED) phototherapy on midpalatal suture bone formation after rapid maxilla expansion: a Raman spectroscopy analysis. *Lasers Med Sci.* 2013 Feb 21. Epub ahead of print.
21. Sacono NT, Costa CAS, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FCB. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg Med.* 2008; 40(9): 625-33.
22. Silva ACO, Faria MR, Fontes A, Campos MS, Cavalcanti BN. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17(5): 527-32.
23. Turrioni AP, de Oliveira CF, Basso FG, Moriyama LT, Kurachi C, Hebling J, et al. Correlation between light transmission and permeability of human dentin. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(1): 191-6.
24. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000; 28(2): 77-92.

25. 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(3): 187-93.
26. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham T-TT, Darverau RP, Dale BA. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(1): 5-13.
27. Vinck EM, Cagnie BJ, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier DC. Pain reduction by infrared light-emitting diode irradiation: a pilot study on experimentally induced delayed-onset muscle soreness in humans. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(1): 11-8.
28. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low Power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003; 18(2): 95-9
29. Xavier M, David DR, de Souza RA, Arrieiro AN, Miranda H, Santana ET, et al. Anti-inflammatory effects of low-level light emitting diode therapy on achilles tendinitis in rats. *Lasers Surg Med.* 2010; 42(6): 553-8.

APÊNDICE



6 APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Por este instrumento particular, declaro para os devidos fins éticos e legais, que eu,, anos, residente à, nº....., na cidade de, Estado de fui informado e concordo voluntariamente com minha participação na pesquisa **“Efeito do LED 855nm na modulação do processo inflamatório em cultura primária de células pulpares”**, tendo como pesquisadora responsável Josimeri Hebling, professora da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. E declaro que tomei ciência e que fui esclarecido(a) de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre minha participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados.

Fui informado que:

- 1) O objetivo da presente pesquisa será avaliar o efeito do LED 855 nm, aplicado em diferentes doses de energia, na modulação da inflamação, sobre cultura primária de células da polpa.
- 2) O dente será extraído pelo profissional responsável pela Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara, ou com a supervisão do mesmo, dentro dos princípios de assepsia e sob anestesia local, conforme a necessidade da técnica.
- 3) Após extração do dente, o mesmo, se intacto, será colocado em um tubo com substância antimicrobiana e encaminhado para o Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais desta Faculdade, onde serão realizados procedimentos para remoção e cultivo das células presentes no interior do dente. Estas células serão utilizadas para avaliar o efeito bioestimulador da irradiação LED.
- 4) Fui informado que os riscos pelo qual o menor sobre minha responsabilidade irá correr serão os mesmos decorrentes da cirurgia, não havendo riscos extras ou utilização de outras drogas no seu organismo, a não ser as necessárias para a exodontia indicadas pelo cirurgião-dentista responsável pela cirurgia. As células do seu dente serão utilizadas única e exclusivamente para avaliação de efeitos bioestimuladores da irradiação LED, e não serão realizados procedimentos com outras finalidades.
- 5) A participação nesta pesquisa será voluntária não sendo oferecido nenhum tipo de pagamento de gastos, assim como não será efetuado nenhum tipo de pagamento pela minha participação.
- 6) Tenho total liberdade em não participar da pesquisa, sem nenhum prejuízo ao atendimento que estou recebendo na Clínica Infantil desta Faculdade.
- 7) Estou ciente que esta pesquisa não vai interferir no tratamento que foi planejado para os meus dentes, e que este tratamento, inclusive a assistência integral necessária por qualquer problema decorrido, é de total responsabilidade da Clínica de Odontopediatria.
- 8) Minha identidade será mantida em sigilo e que tenho total liberdade para solicitar maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa e consultar o Comitê de Ética em Pesquisa para qualquer informação sobre o projeto.
- 9) Estou ciente que não terei benefício direto com este estudo, mas estou disposto a autorizar minha participação para que os resultados encontrados possam ajudar outras pessoas.

Desta forma, confirmo que recebi de maneira clara, todas as informações necessárias ao meu consentimento. Assim, informo que irei participar desta pesquisa por livre e espontânea vontade.

Araraquara, dede 20.....

Eu,, portador(a) do RG nº, residente à, nº....., na cidade de, Estado de, estou ciente das informações acima e autorizo o menor a participar da pesquisa.

Telefones para contato

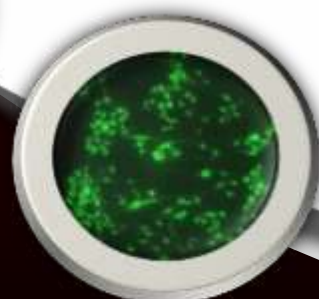
Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa: (016) 3301-6432/3301-6434

Pesquisador responsável: (16) 3301-6334

(Pesquisador Responsável)

(Responsável Legal pelo participante da pesquisa)

ANEXO



7 ANEXO

Certificado de aprovação do CEP

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 **"EFEITO DO LED 855 NM NA MODULAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PULPARES"** sob o protocolo nº 81/11, de responsabilidade do Pesquisador (a) **JOSIMERI HEBLING** está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, 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 **"EFFECT OF 855 NM LED ON DENTAL PULP CELLS IN INFLAMMATORY PROCESS MODULATION"**, protocol number 81/11, under Dr **JOSIMERI HEBLING** responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS 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, 6 de março de 2012.



Prof. Dr. Maurício Meirelles Nagle
Coordenador

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 16 de dezembro de 2013.

Liege Aldrovandi Montoro