

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA   
Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**MARCELA MARTINI TAGLIANI**

**RESPOSTA DE CÉLULAS  
ODONTOBLASTÓIDES MDPC-23  
IRRADIADAS COM LED DE 630nm**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

**Araraquara**

**2010**

Tagliani, Marcela Martini

Resposta de células odontoblastóides MDPC-23 irradiadas com LED de 630nm / Marcela Martini Tagliani.– Araraquara: [s.n.], 2010.

70 f. ; 30 cm.

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

Orientador : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Odontoblastos 2. Técnicas de cultura de células 3. Fototerapia I.

Título

**Marcela Martini Tagliani**

**Resposta de células odontoblastóides MDPC-23 irradiadas com LED de 630  
nm**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

2º Examinador

Profª Drª Denise Palomari Spolidório

3º Examinador

Profª Drª Cristina Kurachi

Araraquara, 18 de junho de 2010.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Marcela Martini Tagliani**

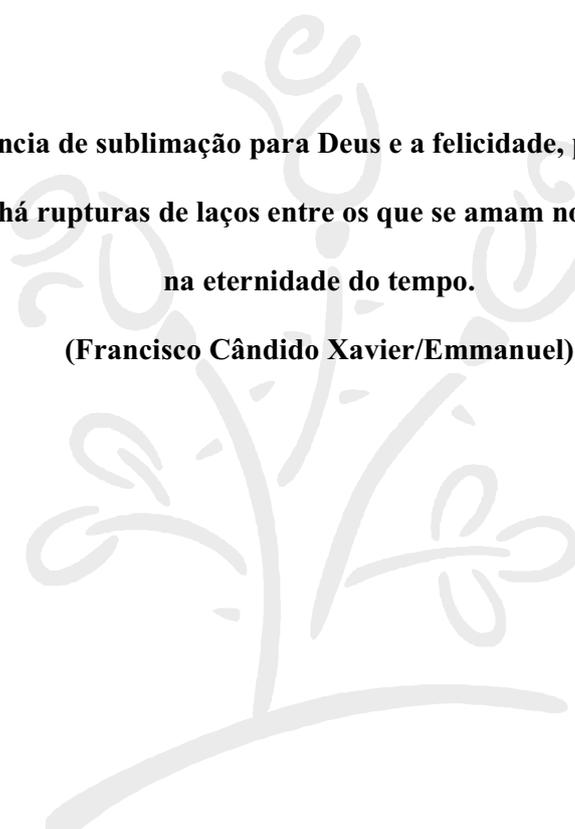
<b>Nascimento</b>	12.09.1981
<b>Naturalidade</b>	Bauru, SP
<b>Filiação</b>	Eliana Martini Tagliani Paulo Roberto Tagliani
<b>2002 - 2005</b>	Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
<b>2006 - 2008</b>	Pós-graduação Lato Sensu – Residência e Especialização em Odontopediatria – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP
<b>2008 - 2010</b>	Pós-graduação em Ciências Odontológicas, área de Odontopediatria, nível Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus amados pais **Eliana Martini Tagliani** e **Paulo Roberto Tagliani**, palavras são insuficientes na expressão do meu amor, gratidão e admiração a vocês. Muito obrigada pelo apoio incondicional na vida e pelos grandiosos exemplos no dia a dia.

**O amor é ciência de sublimação para Deus e a felicidade, para crescer, deve dividir-se. Não há rupturas de laços entre os que se amam no infinito do espaço e na eternidade do tempo.**

**(Francisco Cândido Xavier/Emmanuel)**



## AGRADECIMENTOS

Eliana Martini Tagliani e Paulo Roberto Tagliani

Luis Tagliani Neto

Maria Amélia Lopes Martini

Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, agradeço a orientação no curso de Mestrado.

*“A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas”.* Marcel Proust

### **Agradecimentos Especiais:**

Tatyana Erofeeva, Martin Hättich, James and Janet Hobbs, Stephan Kruber, Patrícia Mendonça, Katia Peres, Patrícia Valentim, Maria Arantes, Carol Masiero, Natalia Mondelli, Fernanda Piffer, Thalita Franco, Fernanda Munari, Loyde, Jeferson Rader, Cristiane Silva, Fabiano Jeremias, Juliana Feltrin, Débora Salles, Juliana Assumpção, Zilá Soucheff, Jaroslav Duchnický, Victor Bassetto, Juliana Peres, Fernanda Dutra, Tatiana Mufarrej, Adriano Mendonça, Zilda Amaro, Raquel Turci, Antonio (Tio Toninho) e Sueli Fernandes, Thais Maria, Luciana Santos, Ana Carolina Cleski, Bárbara Arruda, Margareth Ferreira, Lyete Richter e família, Yara Martini, Alessandra Ranieri, Daniele e Ricardo Estebam, Blayr e Giedre Martini, Magali Pereira Leite, Fozi José Jorge Segundo, Érica Chiquetano, Mauro Daró, Paula Moreno, Diogo Oliveira, Thiago Dela Coleta, Roberto, Laura, Karina, Flavia Dela Coleta e família, Marcelo Zandavali, Amanda Beltramine e família, Marco Aurélio Paschoal, Fabrício Alencar, Sebastião Munaretti, Fernando e Cris Tagliani, Marisa Semprini, Maria Fernanda Tagliani, Daniele Mansur, Marcela Junqueira, Giorgio de Liso, Tathiana Cinel, Elisabeth Koller, Amanda Amaral, Renato Simões, Gustavo Garcia, Marcio Beloti, Monica Domingues, Claudio Cury, Valdemar Barros, Fabrício Alencar, Ivan Barbi, Fernanda Almendros, Marcela Cardoso, Cleide Carrara, Evandro Ventrilho, Janete Galante, Bia Bis, Márcia

Bianco, Luci Nassif, Clélia Celino.

À Camila Fávero de Oliveira: agradeço o auxílio experimental neste trabalho e a generosidade de sempre.

À Prof. Dra. Josimeri Hebling: agradeço o auxílio estatístico neste trabalho.

Aos amados Blayr Bradaschia Martini, Luiz Tagliani e Ercília Tagliani (*in memoriam*).

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald e Vice-reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. José Claudio Martins Segalla e Vice-diretora Prof. Dra. Andreia Affonso Barreto Montandon e, nesta, Prof. Dra. Raquel Caminaga, Prof. Dr. José Govone, Cristiane Silva, Fabiano Jeremias, Juliana Feltrin, Débora Salles, Márcia Tanaka, Keren Jordão, Juliana Gondim, Prof. Dr. Cleverton Roberto, Adriano Mendonça, Nancy Sacono, Ana Paula Ribeiro, Camila Fávero de Oliveira, Ana Paula Turrioni, Daniela Salazedas, Fernanda Basso, Livia Gomes, Castelo Cidade, Joyce Bellan, Rafaela Soares, Bruno Herrera, Andreza Aranha, Fernanda Lessa, Fernanda Vargas, Flávia Trindade, Indri Nogueira, João Kina, Prof. Dra. Regina Helena, Delise Pellizzaro, Mariana Basílio, Simone M., Hermes Pretel, Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi, Prof. Dra. Denise Spolidório, Juliana Pirola.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, representado pelo chefe Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior e pela Vice-Chefe Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas coordenado pela Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa.

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria, Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu e Lima, Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa, Profa. Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola

Cordeiro.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Antonio, Dulce, Sônia, Odete, Regina, Cristina, Pedro e Tânia, aos funcionários da Biblioteca, Adriano, Ceres, Eliane Maria, Eliane Cristina, Inês, Maria Aparecida, Maria Helena, Silvia, Odete e especialmente, Marley, agradeço a correção desta dissertação; aos funcionários da Pós-graduação Alexandre, Mara, Rosângela e Flávia.

Ao Instituto de Física de São Carlos/USP e Emery Lins, Prof. Dra. Cristina Kurachi, Prof. Dr. Salvador Bagnato, José Dirceu, Fernando Florez.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP e ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, o Centrinho - HRAC/USP-Bauru e, nestes, aos professores doutores Marisa Semprini, Alma Catirse, Valdemar Barros, Márcio Beloti, Raquel Gerlach, Wilson Mestriner, Paulo Tambasco, Maria José Rocha, Maria da Glória Chiarello, Telma Nascimento, Mamie Misusaki, Adalberto Luiz Rosa, Márcia Gomide, Beatriz Costa, Lucimara Neves, Gisele Dalbem, José Alberto de Souza Freitas, Carlos Alberto Aiello, Cleide Carrara. Obrigada por serem grandes e inesquecíveis mestres.

Aos colegas residentes do HRAC/USP.

À FAPESP, pela Bolsa MS (processo: 08/03663-2) concedida para a realização do Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado e fizeram parte da minha história. Muito obrigada, de coração.

Acima de tudo, agradeço ao Universo, a Deus.

*“A beleza está em toda parte. E em cada momento de nossas vidas”.*

*Jorge Luis Borges*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Nos últimos dois anos tive a forte e significativa presença de uma pessoa definitiva. Definitiva na forma de se expressar, de ensinar, na sua autenticidade, bondade, pureza, lealdade, senso de justiça, coragem, espiritualidade, luta e, principalmente, na sua honesta forma de amar ao próximo.

**Cristiane Maria da Costa Silva**

Agradeço-lhe as palavras de incentivo, a força nos momentos decisivos e difíceis, as ações e intuições. Agradeço-lhe por ser muito mais do que uma companheira de pós-graduação; você tem sido uma amiga e guia. Obrigada por sempre me lembrar da fugacidade do presente e, ao mesmo tempo, da eternidade de nossos espíritos.

Para nos tornarmos professores memoráveis, temos que deixar lições as quais transcendem os espaços acadêmicos. Que você seja uma educadora a qual faça a diferença em nosso país. Desta forma, finalizo esse agradecimento dedicando-lhe:

### **Ensinar, aprender: leitura do mundo, leitura da palavra**

... É que não existe *ensinar sem aprender* e com isto eu quero dizer mais do que diria se dissesse que o ato de ensinar exige a existência de quem ensina e de quem aprende. (...) O aprendizado do ensinante ao ensinar se verifica à medida em que o ensinante, humilde, aberto, se ache permanentemente disponível a repensar o pensado, rever-se em suas posições; em que procura envolver-se com a curiosidade dos alunos e dos diferentes caminhos e veredas, que ela os faz percorrer. Alguns desses caminhos e algumas dessas veredas, que a curiosidade às vezes quase virgem dos alunos percorre, estão grávidas de sugestões, de perguntas que não foram percebidas antes pelo ensinante. Mas agora, ao ensinar, não como um burocrata da mente, mas reconstruindo os caminhos de sua curiosidade — razão por que seu corpo consciente, sensível, emocionado, se abre às adivinhações dos alunos, à sua ingenuidade e à sua criatividade — o ensinante que assim atua tem, no seu ensinar, um momento rico de seu aprender. O ensinante aprende primeiro a ensinar mas aprende a ensinar ao ensinar algo que é reaprendido por estar sendo ensinado. [Do livro *Professora sim, tia não. Cartas a quem ousa ensinar* (Editora Olho D'Água, 10ª ed., p. 27-38), Paulo Freire].

## EPÍGRAFE

- Como podemos nos preparar para morrer? – perguntei.

- Fazendo como os budistas. No começo de cada dia, ter um passarinho no ombro que pergunta: é hoje que vou morrer?

Estou fazendo tudo o que preciso fazer?

Estou sendo a pessoa que quero ser?

A verdade, Mitch, é que quando se aprende a morrer, aprende-se a *viver*.

*Conversa entre Mitch Albom e seu ex-professor de faculdade, Morrie Schwartz, vítima de Esclerose Lateral Amiotrófica, uma doença degenerativa.*

**Mitch Albom, “A Última Grande Lição”, Ed. Sextante.**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO .....	17
REVISÃO DA LITERATURA.....	20
PROPOSIÇÃO.....	30
MATERIAL E MÉTODO.....	31
RESULTADOS .....	41
DISCUSSÃO.....	54
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Dispositivo de irradiação.....	32
<b>Figura 2.</b> Gráfico temperatura (°C) x tempo (segundos) do DMEM irradiado com a LED Table (630nm; 15 J/cm <sup>2</sup> ).....	34
<b>Figura 3.</b> Gráficos representativos da porcentagem de Absorbância do Meio - <b>2a</b> - DMEM vermelho; <b>2b</b> - DMEM incolor.....	35
<b>Figura 4.</b> Placa de cultura celular acoplada à LEDTable.....	36
<b>Figura 5.</b> Box-plot ( [ ] de SFB/tempo para as células MDPC-23 do grupo controle....	42
<b>Figura 6.</b> MEV de células MDPC-23 irradiadas a 1 J/cm <sup>2</sup> .....	46
<b>Figura 7.</b> MEV de células MDPC-23 irradiadas a 2 J/cm <sup>2</sup> .....	47
<b>Figura 8.</b> MEV de células MDPC-23 irradiadas a 4 J/cm <sup>2</sup> .....	49
<b>Figura 9.</b> MEV de células MDPC-23 irradiadas a 8 J/ cm <sup>2</sup> .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Grupos experimentais de acordo com parâmetros de aplicação do LED e estresse celular.....	40
<b>Tabela 2.</b> Atividade da enzima SDH observada nos grupos controle.....	43
<b>Tabela 3.</b> Porcentagem (%) da atividade da enzima SDH calculada para os grupos irradiados.....	45

Tagliani MM. Resposta de células odontoblastóides MDPC-23 irradiadas com LED de 630 nm. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

## **RESUMO**

Na biofotônica, lasers e LEDs (light-emitting diodes) têm sido empregados na bioestimulação de células e tecidos. LED é um diodo semiconductor que, quando energizado, produz luz de espectro estreito, em forma de eletroluminescência. Experimentos *in vitro* utilizando LEDs com diferentes comprimentos de onda demonstraram a ocorrência de significativo estímulo no crescimento celular, efeito antiinflamatório e antimicrobiano, além do metabolismo celular aumentado. Na odontologia, a aplicação clínica de lasers e LEDs em terapias objetivando a redução da hipersensibilidade dentinária tem se mostrado efetiva, através de aparente síntese e deposição de dentina reacional. Entretanto, não há trabalhos na literatura que demonstrem o efeito do LED sobre a cultura de odontoblastos, tampouco dados científicos caracterizando a relação entre LED e redução da hipersensibilidade dentinária. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a ação do LED em 630 nm sobre o metabolismo de células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Para isto, as células foram descongeladas, cultivadas e plaqueadas. Então, o LED foi aplicado diretamente sobre estas células, em diferentes tempos (20, 40, 80 e 240") e condições de estresse (2 ou 10% de SFB), de acordo com cada grupo experimental, por três dias consecutivos, através de um dispositivo de irradiação denominado "LEDTable". Posteriormente, foram avaliados a viabilidade celular, através do teste MTT, e a morfologia celular, por microscopia eletrônica de varredura. Os dados obtidos nos testes

de MTT foram submetidos ao teste de Mann-Whitney para a comparação das concentrações de soro fetal bovino em cada dose de energia individualmente. Foi utilizado também o teste de Kruskal-Wallis para comparar as diferentes doses de energia em cada concentração de soro fetal bovino.

Os dados foram analisados estatisticamente em nível de significância pré-determinado de 5%. Numa avaliação comparativa entre os grupos foi possível demonstrar que células MDPC-23 mantidas em condições normais são bioestimuladas através de sua irradiação com baixa dose de LED, tal como com  $1 \text{ J/cm}^2$ . Porém, em condições de estresse por restrição de soro fetal bovino (2% SFB), as células MDPC-23 apenas são bioestimuladas através de doses mais elevadas de irradiação com LED, tal como com  $4 \text{ J/cm}^2$ . Por outro lado, a aplicação de uma dose de  $8 \text{ J/cm}^2$  não influencia o metabolismo desta linhagem de célula odontoblastóide. A análise de MEV demonstrou um maior número de células aderidas ao substrato após irradiação com  $4 \text{ J/cm}^2$ . De acordo com as condições experimentais deste estudo in vitro, foi possível concluir, tal como anteriormente demonstrado para outras linhagens celulares, que a terapia com LED no comprimento de onda em torno de 630 nm sob fluência de  $4 \text{ J/cm}^2$  foi efetiva no processo de bioestimulação das células odontoblastóides MDPC-23.

**Palavras chave:** *odontoblastos; técnicas de cultura celular; fototerapia*

Tagliani MM. Response of Odontoblast-like cells to 630 nm LED irradiation. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP, 2010.

## **ABSTRACT**

Lasers and LEDs (light-emitting diodes) have been used for biostimulation of cells and tissues. LED is a semiconductor diode which produces limited spectrum visible light. In vitro experiments using LEDs at different wavelengths have shown an enhancement of cell growth, anti-inflammatory and antibacterial effects and increased cell metabolism. In dentistry, the use of lasers and LEDs in therapies to reduce dental hypersensitivity has been proved to be clinically effective, through the synthesis and deposition of reactionary dentin. However, there are no studies that demonstrate the effect of LED therapy on odontoblast-like cells and there is no scientific data linking LED irradiation to dental hypersensitivity reduction. For this reason, the aim of this study was to investigate the effect of LED 630 nm irradiation on MDPC-23 (odontoblast-like) cells metabolism. Cells were seeded on 24-wells plates and cultured. Then the LED light was directly applied to these cells under different experimental conditions (time and % of BFS), according to each experimental group, for three following days. A device named LEDTable provided red LED irradiation. Then, cell viability (MTT Assay) and cell morphology (SEM) were evaluated. The cell viability results were first submitted to Mann-Whitney tests in order to compare the fetal bovine serum concentrations and energy dose, and then Kruskal-Wallis test was performed to compare different energy doses in every serum concentration. Data were statistically analyzed ( $p=0,05$ ). Results show a biostimulation of cells kept under normal culture conditions and submitted to low LED irradiation dose ( $1 \text{ J/cm}^2$ ). However, under

nutritional stress, cells required higher energy dose to be stimulated, such as  $4 \text{ J/cm}^2$ . On the other hand, a  $8 \text{ J/cm}^2$  dose did not affect the metabolism of this immortalized cell line. The SEM analysis showed a higher number of cells attached to the glass substrate after  $4 \text{ J/cm}^2$  dose irradiation. According to the experimental conditions, it was possible to conclude that LED therapy under fluence of  $4 \text{ J/cm}^2$  biostimulates MDPC-23 cells, such as previously demonstrated by other studies in which different cell lines were submitted to similar LED irradiation.

**Key-words:** *odontoblasts; cell culture techniques; phototherapy*

## INTRODUÇÃO

A biofotônica investiga os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre a luz e componentes biológicos. Neste campo de estudo, pode-se utilizar, por exemplo, lasers (light amplification by stimulated emission of radiation) e LEDs (light-emitting diodes) aplicados às células e tecidos, buscando a bioestimulação destes.

Sabe-se que o LED é um diodo semicondutor que, quando energizado, produz luz visível de espectro estreito, em forma de eletroluminescência. Da mesma maneira, foi demonstrado que a terapia com luz de baixa intensidade, comumente referida de fotobiomodulação, utiliza luz na região do espectro que vai do vermelho ao infravermelho (630-1000 nm), a qual pode modular inúmeras funções celulares<sup>15</sup>.

O mecanismo pelo qual a luz LED de vermelha à infravermelha produz seus efeitos biológicos ainda não é totalmente compreendido. Nos tecidos dos mamíferos, existem três importantes moléculas fotorreceptoras: hemoglobina, mioglobina e citocromo C oxidase<sup>54</sup>. Tem sido postulado que a citocromo C oxidase age como uma molécula fotorreceptora para os efeitos biológicos da fotobiomodulação<sup>27</sup>. Os estudos de Beauvoit et al.<sup>6</sup> demonstraram que até 50% da luz próxima à infravermelha é absorvida por cromóforos mitocondriais, incluindo o citocromo C oxidase. O resultado final da fotobioestimulação com LED é o aumento do metabolismo energético e da viabilidade celular<sup>15,54</sup>. Experimentos in vitro utilizando LEDs com diferentes comprimentos de ondas demonstraram um significativo aumento do crescimento celular em uma variedade de linhagens celulares, como fibroblastos, osteoblastos, células musculares de ratos e células epiteliais humanas<sup>23, 50-51</sup>.

Em uma recente pesquisa, Lim et al.<sup>36</sup> investigaram o efeito antiinflamatório do LED em fibroblastos humanos cultivados e verificaram que este inibe a síntese de COX

e prostaglandina E2, com efeitos similares aos do Ibuprofeno. Há cerca de uma década a terapia com LED foi aprovada pelo FDA para uso em seres humanos<sup>51</sup> sendo que, desde então, algumas pesquisas passaram a ser desenvolvidas.

Na odontologia, a aplicação clínica de lasers e LEDs em terapias objetivando a redução da hipersensibilidade dentinária tem se mostrado efetiva<sup>32</sup>. A hipersensibilidade dentinária pode ser caracterizada por uma dor aguda de curta duração, a qual surge a partir da dentina exposta em resposta a estímulos térmicos, evaporativos, táteis, osmóticos ou químicos; sua prevalência varia de 8% a 57% entre a população mundial<sup>13</sup>.

Tate et al.<sup>46</sup>, em 2006, utilizaram o laser com variados níveis de energia para irradiar molares de rato. Os autores demonstraram que a camada odontoblástica dos dentes irradiados respondia ao estímulo através de discreta síntese e deposição de dentina reacional ou notável formação de dentina reparadora osteóide, sendo que esta última resposta pulpar estava diretamente relacionada com a degeneração dos odontoblastos primários injuriados pelo laser.

Embora o laser tenha sido estudado e aplicado na melhora dos sintomas da hipersensibilidade dentinária, ele apresenta desvantagens em relação ao uso dos LEDs. Na fotobiomodulação, são limitados da luz monocromática vermelha à infravermelha, dificultando a combinação de diferentes comprimentos de onda. Além disso, possuem alto custo de fabricação e seu feixe de luz colimado dificulta o tratamento de grandes áreas<sup>15</sup>.

Em um estudo comparativo do LED 630 nm com o laser 590 nm, Castro-e-Silva<sup>10</sup> demonstraram que a irradiação com o LED promoveu efeitos bioestimulatórios durante os primeiros estágios da regeneração hepática, sendo tão efetiva quanto o laser, independentemente da coerência, divergência ou cromaticidade.

Os mecanismos de resposta dos odontoblastos frente à irradiação por laser e LED não são totalmente conhecidos. Porém, sabe-se que estas células, quando em homeostasia, expressam proteínas típicas, como sialoproteína e fosfoproteína da dentina<sup>24, 37, 55</sup>, e apresentam elevada atividade de fosfatase alcalina e síntese de proteínas da matriz de dentina, particularmente colágeno tipo I<sup>24, 49</sup>. Quando em estresse, causado pela exposição dos túbulos dentinários ao ambiente externo (preparo cavitário, erosão, atrição ou abfração) ou por estímulo químico originado de bactérias e seus produtos, os odontoblastos podem responder de variadas maneiras, inclusive com dor associada à reação inflamatória tecidual. Assim, pesquisas com a linhagem imortalizada de células odontoblastóides MDPC-23 têm sido realizadas a fim de avaliar seu metabolismo em diferentes situações de estímulo biológico ou de estresse<sup>4, 11-12, 22</sup>.

Acredita-se que a fototerapia em cultura de células odontoblastóides estimularia os odontoblastos ao reparo tecidual, através da síntese e expressão de algumas proteínas específicas da matriz dentinária, resultando em esclerose dos túbulos e/ou deposição de dentina terciária. Entretanto, não há trabalhos na literatura que demonstrem o efeito do LED sobre a cultura de odontoblastos, tampouco dados científicos que caracterizem a relação entre LED e redução da hipersensibilidade dentinária através do aumento na atividade metabólica destas células pulparem em cultura.

Desta maneira, é importante determinar os parâmetros e técnicas de bioestimulação direta com LED sobre células de linhagem odontoblástica, para posteriormente estudar, através de pesquisas com câmaras pulparem *in vitro*, ou mesmo em dentes *in vivo*, a possível atividade transdentinária do LED.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **Histórico da Fototerapia com LED:**

A terapia com luz é uma das mais antigas modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento das doenças humanas. Por séculos, a luz solar foi explorada em civilizações antigas, como egípcia, indiana e chinesa, sendo redescoberta por Niels Finsen no início do século XX, que ganhou um Nobel em 1903 por utilizar a luz no tratamento de lúpus vulgar. Assim nasceu a moderna fototerapia, a qual utiliza fontes artificiais de irradiação (Roelandts<sup>42</sup>, 2005).

No final da década de 60, Endre Mester iniciou uma série de experimentos com o Laser vermelho em ratos. Para sua surpresa, ao invés de um esperado potencial carcinogênico, a luz provocou um crescimento de pêlos na região dorsal dos animais. Esta foi a primeira demonstração da possível fotobioestimulação in vivo com Laser terapêutico de baixa intensidade (LLLT). Desde então, tratamentos médicos utilizando a luz coerente (Laser) e não coerente (LED) tem se expandido (Barolet<sup>5</sup>, 2008).

A fotobiomodulação com o LED surgiu após experimentos da NASA (National Aeronautics and Space Administration), em plantas, no espaço, nos quais se observou que a luz em um comprimento de onda específico acelerava o crescimento das plantas (Whelan et al.<sup>51</sup>, 2001). Em seguida, o mesmo grupo testou o LED na cicatrização de feridas em astronautas em condições de ausência gravitacional, obtendo significativo sucesso após esta terapia (Whelan et al.<sup>51</sup>, 2001). Desde então, a luz LED em diferentes parâmetros tem sido desenvolvida, aplicada e estudada em um grande número de pesquisas ao redor do mundo.

**A luz LED:**

A palavra LED é um acrônimo de light-emitting diode, ou seja, diodo emissor de luz. Este diodo é composto de um sistema de junções positivo-negativo, com metais dopados de impurezas e uma cápsula de acrílico ou vidro envolvendo o sistema. Para que a luz seja emitida, é necessária uma fonte de energia elétrica. A luz emitida pelo LED é não coerente, de espectro estreito (Barolet<sup>5</sup>, 2008).

O LED foi primeiro introduzido na década de 60, como luz de relógios de alarme e câmeras. Atualmente, os LEDs são produzidos em comprimentos de onda que variam do ultravioleta à infravermelha (247 a 1300 nm), sendo fabricados a partir de diversos metais dopados, dependendo da coloração de luz desejada.

Dentro de um mesmo comprimento de onda, os LEDs provêm uma terapia de luz mais suave do que os Lasers, utilizando uma potência substancialmente menor (Vinck et al.<sup>48</sup>, 2006, Whelan et al.<sup>52</sup>, 2002). Estes LEDs permitem uma combinação de diferentes comprimentos de onda em um único dispositivo e podem ser irradiados em grandes superfícies, oferecendo vantagens em relação ao uso do Laser (Whelan et al.<sup>52</sup>, 2002, Wong-Riley et al.<sup>54</sup>, 2001). Sendo uma fonte barata de fótons, os pesquisadores tentam determinar os parâmetros adequados de bioestimulação para cada tipo celular (Barolet<sup>5</sup>, 2008, Kim et al.<sup>31</sup>, 2009).

**Efeito bioestimulador do LED:****LEDterapia in vitro:**

As primeiras pesquisas com luz não coerente foram publicadas há aproximadamente duas décadas (Young et al.<sup>56</sup>, 1989). Estes pesquisadores avaliaram o efeito da luz no estímulo de liberação de mediadores da inflamação por macrófagos e na proliferação de fibroblastos 3T3. As células foram expostas à luz incoerente (LED) nos comprimentos de onda de 660, 870 e 880 nm e à luz coerente (Laser) em 820 nm. Após 12 horas da exposição à luz, os macrófagos sobrenadantes foram removidos e colocados em culturas de fibroblastos. Após 5 dias, observou-se que a luz nos comprimentos de 660, 820 e 870 estimulou a proliferação de fibroblastos, independentemente da coerência.

Whelan et al.<sup>51</sup> (2001) foram os pioneiros na publicação de pesquisas as quais utilizavam luz (LED) propriamente dita em cultura de células e sobre tecidos. Estes pesquisadores verificaram que o uso do LED em determinados parâmetros aumentou a taxa de crescimento de fibroblastos 3T3 e osteoblastos derivados de camundongo, em relação ao controle. Ainda neste estudo, porém utilizando uma linhagem celular músculo-esquelética (L-6) derivadas de rato, os autores mostraram um aumento de 140% na taxa de crescimento celular em relação ao controle, após 24 horas da irradiação com LED em 670 nm,  $8\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $50\text{mW}/\text{cm}^2$ . Utilizando células epiteliais humanas, os pesquisadores também demonstraram um significativo aumento de 150% e 171% na taxa de crescimento celular quando da irradiação destas células com LED a 670 nm e 880 nm, respectivamente. Finalmente, para as células HaCAT irradiadas com LED vermelho em  $8\text{J}/\text{cm}^2$ , os autores demonstraram que estas células sintetizaram duas vezes mais colágeno do que células não irradiadas. Neste mesmo ano de 2001, Wong-Riley et al.<sup>54</sup> buscaram determinar a correlação entre células neuronais em cultura primária e a tetrodoxina (TTX), um bloqueador do canal de sódio voltagem-dependente, que impede a propagação dos impulsos neuronais, diminui a demanda de ATP e desregula a

citocromo C oxidase. O tratamento com o LED infravermelho demonstrou reverter os efeitos tóxicos do TTX, levando a citocromo C oxidase aos níveis normais em neurônios expostos à TTX, e aumentando a atividade desta enzima em neurônios submetidos à irradiação com LED.

Em 2003, Vinck et al.<sup>47</sup> compararam o Laser de baixa potência infravermelho e LEDs em diferentes comprimentos de onda (950 nm, 660 nm, 570 nm) sobre cultura primária de fibroblastos. Os pesquisadores demonstraram a ocorrência de um significativo aumento na proliferação celular a despeito da fonte de irradiação utilizada, sendo que os LEDs verde e vermelho apresentaram maior estímulo na proliferação destas células em relação ao Laser.

Culturas primárias de células neuronais foram tema de estudo de Wong-Riley et al.<sup>53</sup> (2005), cujo principal objetivo foi avaliar se o KCN (cianeto de potássio), um inibidor irreversível da citocromo c oxidase, competiria com o LED e reduziria seus efeitos benéficos, já obtidos em experimentos prévios. Foram utilizados LEDs em diferentes comprimentos de onda, variando do vermelho ao infravermelho, a 50 mW e 4 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados demonstraram que o LED em 670 nm, quando aplicado duas vezes ao dia, por cinco dias, combinado a baixas concentrações de KCN (10-100µm), reverteu, de forma significativa, o efeito deletério da toxina na atividade da citocromo C oxidase. Isto comprovou o envolvimento da citocromo C oxidase na fotobiomodulação, a atenuação dos benefícios do LED pelo KCN e a redução na porcentagem de morte celular pós-irradiação induzida pelo KCN.

O efeito da luz LED vermelha em 630 nm na proliferação de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de camundongo, em diferentes parâmetros de irradiação, foi avaliado por Li et al.<sup>34</sup>, em 2007. Os resultados demonstraram um aumento na taxa de proliferação destas células, principalmente quando utilizados 15

mW/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura utilizado na avaliação de MTT estava suplementado com 2% de SFB com o objetivo de estabelecer um modelo de estresse celular.

O LED vermelho, combinado ou não a peptídeos de cobre, também foi aplicado por Huang et al.<sup>24</sup> (2007) sobre cultura de fibroblastos humanos HS68. O LED sozinho manteve a viabilidade da cultura celular e elevou a síntese de colágeno. Na combinação com as incubações em peptídeos de cobre, as células apresentaram maior secreção de fator de crescimento fibroblástico, elevação na produção de pró-colágeno tipo I e expressão de colágeno do tipo I, comparado com a irradiação de LED vermelho, isoladamente.

Os fibroblastos gengivais humanos também foram estudados por Lim et al.<sup>36</sup> (2007), desta vez tratados com ácido aracdônico. Foi investigado um possível efeito antiinflamatório do LED em 635 nm, comparado a inibidores de COX existentes (indometacina e ibuprofeno). Os autores demonstraram que tanto a irradiação com o LED neste comprimento de onda quanto os inibidores de COX existentes inibem a liberação de COX e prostaglandinas (PG) E2. Ao contrário da indometacina e ibuprofeno, a irradiação LED a 635 nm leva à diminuição dos níveis de ROS (espécies reativas de oxigênio) e fosfolipases A2. Os resultados desta pesquisa determinou que o LED 635 nm pode dissociar as ROS, levando, ao final, a uma inibição de PGE2.

Liang et al.<sup>35</sup> (2008) testaram a hipótese de que o tratamento com o LED poderia proteger neurônios de camundongos da toxicidade induzida por rotenona e MPP+. Assim, culturas primárias de neurônios corticais e estriatais de camundongos foram utilizadas, aplicando-se LED duas vezes por dia. Os resultados indicaram que houve um aumento no conteúdo de adenosina trifosfato celular, diminuição do número de neurônios sofrendo morte celular e significativa redução na expressão de espécies

reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), comparado aos neurônios não tratados. Os autores sugerem que a LEDterapia pode ser efetiva na proteção de neurônios danificados por neurotoxinas relacionadas ao Mal de Parkinson, através da energização das células e do aumento da viabilidade celular.

Em 2009, Kim et al.<sup>31</sup> examinaram os efeitos do LED vermelho (647 nm) na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais derivadas de ratos (células D1). As células foram irradiadas por 10, 30 ou 90 s. Após 48 horas da irradiação, foram feitos os testes *in vitro* e observou-se que as células D1 tiveram um aumento na taxa de diferenciação celular quando expostas ao LED. Também houve um aumento da taxa de síntese de fosfatase alcalina, das expressões de osteocalcina, colágeno do tipo 1, osteopontina e Runx-2, marcadores de células ósseas, quando realizados testes de RT-PCR.

Também utilizando o LED vermelho, a 650 nm, Zhang et al.<sup>60</sup> (2009) estudaram os efeitos desta terapia e demonstraram que células HeLa, uma linhagem celular de carcinoma cervical humano, tiveram sua taxa de proliferação reduzida de maneira significativa após terem sido irradiadas por 24, 48 e 72 horas, com o LED. Os resultados mais significativos foram obtidos após 72 horas de irradiação, com índice de 62% de apoptose das células tumorais. A irradiação também provocou alterações morfológicas na célula, prolongando a fase S do ciclo celular e ativando as enzimas caspase 3, 6 e 8, em experimentos *in vitro*. É sabido que a apoptose está relacionada às caspases e ao cálcio intracelular. Também houve um aumento da concentração de cálcio intracelular, oriundo do retículo endoplasmático e liberados no citosol. Em testes *in vivo* subsequentes, a irradiação com LED diminuiu o crescimento tumoral no dia 50 e atenuou a elevação de expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em células tumorais HeLa implantadas em ratos.

**LEDterapia in vivo :**

Whelan et al.<sup>51</sup> (2001), em conjunto com os experimentos in vitro anteriormente citados, avaliaram o efeito do LED infravermelho (880 nm - 4J/cm<sup>2</sup>- 50mW/cm<sup>2</sup>) e do oxigênio hiperbárico na cicatrização de feridas criadas em camundongos. Os autores observaram que o LED por si só aumenta consideravelmente a velocidade de cicatrização das feridas, abrindo um campo de estudos promissor da LEDterapia moderna aplicada à dermatologia.

No ano seguinte, Whelan et al.<sup>52</sup> avaliaram o efeito do LED infravermelho (670 nm - 4 J/cm<sup>2</sup>) em 32 pacientes pediátricos submetidos à terapia mieloablativa em preparação para um transplante medular. O tratamento consistia de aplicações diárias de LED do lado esquerdo do epitélio extra-oral, iniciando no dia do transplante, por 14 dias consecutivos. O resultado obtido com a LEDterapia foi uma redução de 17 a 47% da incidência de mucosite oral nestes pacientes, bem como uma redução da dor oral em cerca de 40% dos indivíduos. Concluiu-se que o LED, irradiado nos parâmetros investigados, foi útil na prevenção da mucosite oral em pacientes transplantados de medula óssea.

Também em 2002, Castro-e-Silva et al.<sup>9</sup> investigaram o efeito do LED vermelho (630 nm e 10 J/cm<sup>2</sup>) na função mitocondrial, durante a regeneração hepática, após hepatectomia parcial. Através da avaliação do índice de fosforilação oxidativa de mitocôndrias hepáticas de camundongos, eles observaram uma interação efetiva entre a luz LED e as mitocôndrias hepáticas, com um significativo aumento da taxa de fosforilação oxidativa mitocondrial.

Sabe-se que a disfunção mitocondrial tem um papel central na patologia de inúmeras doenças, inclusive as retiniais e neurodegenerativas, como o Mal de Parkinson,

Mal de Alzheimer e a neuropatia óptica. A toxicidade retinal resultante da intoxicação pelo metanol, através do ácido fórmico, foi significativamente reduzida com a aplicação do LED a 670 nm por 2'24''. Além disso, a LEDterapia protegeu a retina das mudanças histopatológicas induzidas pelo formato derivado de metanol (Eells et al.<sup>16</sup>, 2003). O ácido fórmico é uma toxina mitocondrial a qual inibe a citocromo c oxidase na retina e no nervo óptico, resultando em cegueira. Estas descobertas provêm uma ligação entre a ação do LED no metabolismo oxidativo mitocondrial in vitro e a retino-proteção in vivo.

Seguindo os estudos com a luz LED e os tecidos biológicos, Weiss et al.<sup>50</sup> (2005), em um estudo clínico qualitativo, utilizaram a luz amarela do LED em 590 nm e 5 J/cm<sup>2</sup>, combinada ou não com uma terapia não ablativa, como terapia dérmica facial em 900 pacientes. Uma melhora no aspecto da textura da pele facial e considerável diminuição das rugas foram constatadas por 90% dos pacientes que receberam a fototerapia com LED, nos parâmetros estudados. Pacientes com queimaduras solares que receberam a LEDterapia nestes parâmetros tiveram uma melhora na ardência, vermelhidão, inchaço e descamação da pele.

No ano de 2006, Al-Watban et al.<sup>3</sup> investigaram a eficácia do LED policromático na aceleração do processo de reparo tecidual de feridas em camundongos diabéticos (induzidos) ou não. Eles testaram diferentes comprimentos de onda e potência e concluíram que a terapia com LED policromático, de maneira dose dependente (5 e 10 J/cm<sup>2</sup>), foi promissora no reparo tecidual de camundongos diabéticos.

Outro estudo de 2006, de Vinck et al.<sup>48</sup>, investigou o efeito analgésico do LED infravermelho (950 nm e 3.2 J/cm<sup>2</sup>) sobre músculos doloridos e fatigados, em seres humanos. O tratamento dos voluntários consistiu de indução de fadiga e dor muscular,

com subsequente aplicação de LED ou simulação de irradiação (placebo). Embora encontrassem diferenças no relato de melhora de dor entre os pacientes irradiados com LED ou placebo, elas não foram estatisticamente significantes. Desta forma, os autores não descartam o efeito analgésico do LED em diferentes parâmetros de estudo. Por se tratar de um estudo piloto, é possível que os autores alterem alguns parâmetros de irradiação, como comprimento de onda, dose ou tempo, quando realizarem o estudo de fato.

Voltando ao campo da dermatologia, DeLand et al.<sup>14</sup> (2007) avaliaram o uso da fotobiomodulação com LED a 590 nm na prevenção da dermatite pós-radioterapia em pacientes com câncer de mama. As pacientes irradiadas com LED imediatamente após a radioterapia tiveram um índice reduzido de lesões dermatológicas, como eritemas, descamação e edemas, comparado às pacientes que não receberam a LEDterapia. Os autores sugerem que a estimulação de fibroblastos e a redução da inflamação propiciadas pela LEDterapia podem ser responsáveis pela redução de efeitos deletérios em pacientes submetidas ao tratamento radioterápico.

A fim de avaliarem a importância da coerência da luz no processo bioestimulador, Castro-e-Silva et al.<sup>10</sup>, no mesmo ano, utilizaram o LED vermelho (630 nm) na tentativa de promover a estimulação da regeneração do fígado após hepatectomia parcial (70%) em camundongos e o comparou com a irradiação Laser (590 nm). Os resultados demonstraram que a LEDterapia promoveu efeitos bioestimulatórios durante os primeiros estágios da regeneração hepática, sendo esta tão efetiva quanto a irradiação proveniente do Laser.

Em revisão da fototerapia aplicada à dermatologia, Boixeda et al.<sup>7</sup> (2007) discutiram os possíveis efeitos antiinflamatórios do LED na dermatologia, para o tratamento de rosácea, psoríase, eritemas e edemas após o uso de certos tipos de lasers,

cicatrizes hipertróficas, úlceras dérmicas e hiperpigmentação pós-inflamatória. Os autores sugeriram, ainda, o papel do LED na fotoprofilaxia, ou seja, na prevenção de danos causados pelos raios UV, e que alvos potenciais para a terapia com o LED poderiam ser a citocromo c oxidase, p53, proteína G, ativação do cAMP, aumento da síntese de DNA e RNA e fotoporfirina IX.

Em 2009, Agnol et al.<sup>1</sup> compararam a ação do Laser (660 nm e 6 J/cm<sup>2</sup>) versus LED (640 nm) no reparo tecidual de feridas induzidas em camundongos diabéticos e não diabéticos. Eles observaram que o grupo diabético tratado com o LED demonstrou uma redução significativa no diâmetro da lesão 72h após o tratamento, quando comparado com o controle diabético ou com o grupo irradiado com Laser. Os resultados permitiram concluir, ainda, que tanto a luz coerente (Laser) quanto a não coerente (LED) aceleraram o reparo tecidual cutâneo quando comparados aos grupos não irradiados.

Por fim, Leal Junior et al.<sup>33</sup> (2009) testaram a eficácia do LED na alteração da performance muscular, do desenvolvimento de fadiga e de marcadores bioquímicos da recuperação músculo-esquelética, junto a um modelo experimental, utilizando contrações musculares de bíceps e úmero. Para tal, atletas receberam 30'' de irradiação LED 630 ou 850 nm ou irradiação placebo nos músculos, imediatamente antes do início de exercícios. A LEDterapia propiciou um atraso no desenvolvimento de fadigas musculoesqueléticas, diminuição dos níveis de lactato pós exercícios e inibição de creatina quinase e proteína c-reativa, marcadores da injúria muscular e de processo inflamatório, respectivamente.

## **PROPOSIÇÃO**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do LED, em parâmetros específicos, sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 em cultura.

### **Objetivos Específicos**

- Verificar o possível efeito bioestimulatório do LED sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23;
- Avaliar se as células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas em condições de estresse, através da redução do SFB, respondem de maneira efetiva à LEDterapia, nos parâmetros específicos de irradiação testados.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **Determinação dos parâmetros do LED e confecção da LED Table**

Neste trabalho de pesquisa foi utilizado um dispositivo de irradiação (LED Table), desenvolvido pelo Grupo de Óptica (GO) do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. Para a confecção da LED Table, um sistema de lentes convergentes foi desenvolvido visando à uniformização do feixe LED emitido por cada diodo e, conseqüentemente, da irradiação em cada compartimento da placa de cultura de células.

Esse projeto envolveu as distâncias entre os LEDs, as lentes e a placa de 24 compartimentos para evitar a divergência do feixe de irradiação e garantir o alinhamento entre as partes. O próximo passo foi o desenvolvimento da fonte elétrica do protótipo. A dissipação térmica dos diodos também deveria ser efetiva, pois uma sobrecarga num diodo individual implicaria na sobrecarga em todos os outros, e isso levaria à falência do dispositivo. Optou-se pela dissipação coletiva dos diodos com a utilização dos sistemas de *peltiers*. Os LEDs foram posicionados na LED Table de maneira que, quando ativados simultaneamente, cada um deles individualmente irradiasse os 24 compartimentos da placa de cultura (Figura 1).

Cada LED foi aplicado a uma distância padrão de 0,3 cm das células em cultura com o intuito de envolver, de forma uniforme, a área da base de cada compartimento (2 cm<sup>2</sup>). Assim, as perdas de energia foram consideradas durante o processo de irradiação. Além disso, a luz emitida pela LED Table teve parâmetros distintos que foram determinados previamente ao início da pesquisa, visando compensar essas perdas e

garantir que os parâmetros incidentes nas culturas fossem os determinados neste projeto.



FIGURA 1 - Protótipo do dispositivo de irradiação LED Table, desenvolvido em associação com o Grupo de Óptica (GO) do CePOF/IFSC/USP.

O LED empregado nesse sistema foi arseneto de gálio alumínio (AlGaAs), emitindo luz em um comprimento de onda centrado em 630 nm e uma banda de 10 nm, gerando feixes luminosos de coloração vermelho intenso. As densidades de energia estabelecidas para realização deste experimento foram as seguintes: 1 J/cm<sup>2</sup>; 2 J/cm<sup>2</sup>; 4 J/cm<sup>2</sup> e 8 J/cm<sup>2</sup>, as quais foram aplicadas diretamente sobre as células MDPC-23 em cultura. Estes parâmetros de irradiação foram estabelecidos de acordo com pesquisas prévias realizadas em diferentes culturas celulares <sup>15, 23, 31, 34, 36, 51, 54, 60</sup>.

### **Testes de Temperatura do Substrato**

Previamente ao início do experimento, realizou-se o teste de temperatura em função do tempo, com meio de cultura DMEM, no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF,) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC)/USP.

Para realizar esta análise de temperatura, um termistor (Departamento de Física e Ciências dos Materiais, Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica USP - São Carlos, SP) foi fixado na base dos compartimentos da placa de acrílico. Foi utilizada uma pasta isolante térmica (Implastic, Votorantin, SP) para prevenir a influência da temperatura ambiente nos valores finais obtidos durante a medição. A outra extremidade do termistor foi conectada a um microcomputador (Pentium II, 233 MHz), o qual registrou a diferença de potencial (ddp) resultante de pequenas variações de temperatura, através do programa Pproto 10 (Departamento de Física e Ciências dos Materiais, Grupo de Óptica, Laboratório de Biofotônica - USP - São Carlos, SP).

Este teste foi importante para verificar o aumento da temperatura no meio de cultura, em função do tempo de irradiação, visto que a literatura demonstra que uma variação de  $5,5^{\circ}\text{C}$  pode resultar em lesão irreversível para células pulpare<sup>58</sup>. A medida da temperatura do meio simula uma situação experimental real e informa ao pesquisador o tempo disponível para irradiação sem que haja um dano térmico indesejado às células. A Figura 2 mostra o gráfico do experimento, no qual constatamos que a elevação de  $5^{\circ}\text{C}$  ocorre apenas quando se utiliza um tempo superior a 600 segundos de irradiação com o LED nos parâmetros estabelecidos.

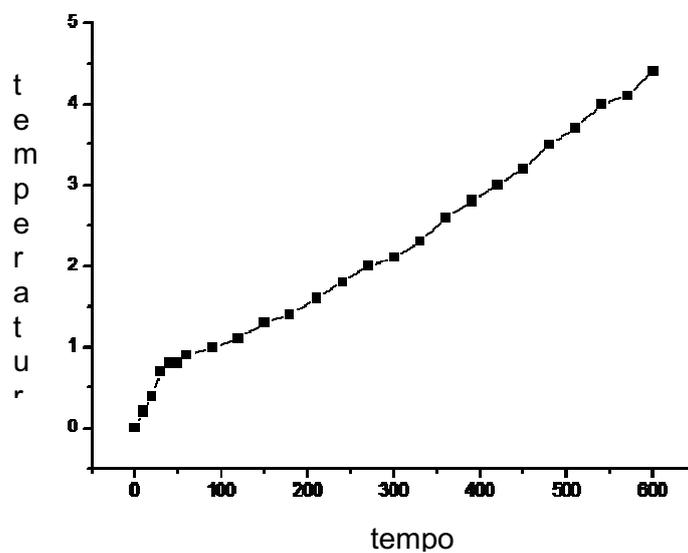


FIGURA 2 - Gráfico temperatura (°C) x tempo (segundos) do meio de cultura DMEM irradiado com a LED Table (630 nm).

Estes dados preliminares determinaram a viabilidade e segurança dos dados obtidos nesta pesquisa, uma vez que o período de irradiação das células MDPC-23, utilizando-se, para isto, a LED Table, não excedeu o tempo de 600 segundos.

### Teste de Absorbância

Um estudo piloto de absorbância (Espectrômetro USB 2000, Ocean Optics<sup>®</sup>, USA) também foi realizado no Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF), IFSC-USP) com o objetivo principal de determinar se a coloração vermelha do meio de cultura poderia interferir ou não na irradiação do LED com comprimento de onda de 630 nm.

Foi verificado que a coloração do meio não interfere na absorvância da luz, visto que a porcentagem de absorvância da luz vermelha foi de apenas 5% (Figura 3a), sendo este valor muito próximo ao demonstrado para o mesmo meio de cultura sem coloração, para este comprimento de luz (Figura 3b).

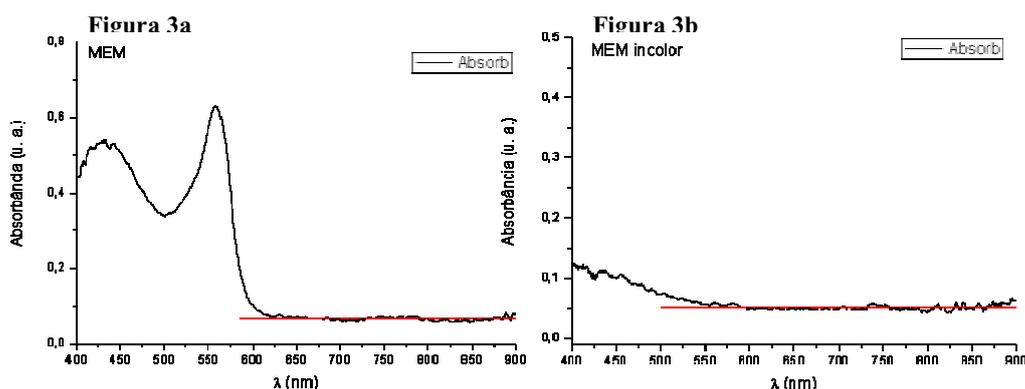


FIGURA 3 - Gráficos representativos da porcentagem de Absorbância do meio; 3a - DMEM vermelho; 3b - DMEM incolor.

### Descongelamento e manutenção das células MDPC-23 em cultura

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram descongeladas e cultivadas ( $30.000\text{células}/\text{cm}^2$ ) em garrafas plásticas de  $75\text{ cm}^2$  (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA), em uma incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , na temperatura de  $37^\circ\text{C}$  (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Em

seguida, as células foram subcultivadas a cada três dias, até que se obtivesse o número adequado de células para a realização dos experimentos, em torno de 80% de confluência.

### **Bioestimulação direta das células**

Para o plaqueamento, células MDPC-23 em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) foram cultivadas em placas de acrílico esterilizadas de 24 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) Em cada compartimento foi aplicado 1 mL de DMEM contendo 20.000 células/cm<sup>2</sup>, sendo que as placas foram levadas à incubadora, onde permaneceram por 48 horas.

Decorrido este período, o DMEM completo foi aspirado e substituído por um novo meio de cultura suplementado com 2% de SFB (indução de estresse) ou 10% SFB (condição ideal). Após 24 horas da troca do meio, foi realizada a primeira irradiação, sendo que para isto a placa de cultura foi individualmente adaptada ao dispositivo de irradiação LED Table (Figura 4).



FIGURA 4 - Placa de acrílico de 24 compartimentos adaptada a LED Table.

A redução da concentração de soro fetal bovino (2% SFB) no meio de cultura está baseada em dados científicos previamente publicados na literatura, onde foi demonstrado que células de mamíferos mantidas em cultura respondem de maneira mais efetiva à fototerapia quando submetidas a condições de estresse, tal como carência nutricional<sup>2, 34, 44, 47</sup>.

As células foram irradiadas periodicamente a cada 24 horas, num total de 3 aplicações durante três dias consecutivos<sup>19-20, 47</sup>. Após a última irradiação, as placas de 24 compartimentos permaneceram em incubadora pelo período de 3 horas<sup>25</sup>. Este procedimento de irradiação foi adotado devido ao fato de pesquisas anteriores terem demonstrado que 3 aplicações de luz proveniente de LEDs resultou em efeitos bioestimuladores positivos sobre células<sup>47</sup>.

Após este tempo, as células foram submetidas à avaliação da produção atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH) e a morfologia celular foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os grupos experimentais e controle estabelecidos de acordo com os parâmetros de aplicação do LED e condições de estresse estão demonstrados na Tabela 1.

Para os grupos controle, os mesmos procedimentos de manipulação das células foram realizados, inclusive o posicionamento da LED Table na base de cada placa de 24 compartimentos. Todavia, o LED não foi ativado, pois este procedimento de aplicação direta da luz sobre as células MDPC-23 em cultura ocorreu apenas para os grupos experimentais.

Tabela 1: Apresentação dos grupos experimentais e controles de acordo com parâmetros de aplicação do LED e condições de estresse celular; n= 14 (total de amostras por grupo)

DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm <sup>2</sup> )	% SORO FETAL BOVINO	
	10%	2%
1	Grupo 1a	Grupo 1b
2	Grupo 2a	Grupo 2b
4	Grupo 3a	Grupo 3b
8	Grupo 4a	Grupo 4b
0 (sem irradiação)	Controle 1	Controle 2

### **Análise da Viabilidade Celular (MTT assay)**

Do total de 14 amostras, dez de cada grupo experimental e de cada grupo controle foram utilizadas para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada por meio da aplicação do método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT Assay), o qual determina a atividade da SDH produzida pelas mitocôndrias presentes nas células<sup>39</sup>.

Para a preparação da solução de MTT, 25 mg do sal de metiltetrazolium foram pesados em balança analítica de alta precisão (AG 2000 GEHAKA, Diadema, SP, Brasil) e, posteriormente, adicionados a 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS), alcançando uma mistura final de concentração igual a 5mg/mL.

Sobre as células cultivadas em placas de 24 compartimentos aplicou-se 900 µL de meio de cultura (DMEM) associado a 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL do sal

metiltetrazolium em PBS). As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas.

Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 700 µL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Este procedimento tem o objetivo de dissolver os cristais violeta resultados da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp. Cambridge, MA, USA).

A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France).

Os dados obtidos nos testes de MTT (produção de SDH) foram primeiramente avaliados quanto à distribuição, não normal, utilizando-se, por conseguinte, o teste de Mann-Whitney para a comparação das concentrações de soro fetal bovino em cada dose de energia individualmente. O teste estatístico de Kruskal-Wallis também foi empregado com o objetivo de comparar as diferentes doses de energia em cada concentração de soro fetal bovino. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré-determinado de 5% ( $p < 0.05$ ).

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

Para cada grupo desta etapa do experimento, foram preparadas 4 amostras representativas para análise da morfologia das células MDPC-23 em MEV. Para isto, lamínulas de vidro esterilizadas, as quais apresentavam 12mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) foram posicionadas individualmente nas bases das

placas de acrílico de 24 compartimentos. Os mesmos procedimentos de cultivo celular, tal como anteriormente descrito para o protocolo de MTT, foram realizados de tal forma que as células cultivadas em cada compartimento, passaram a se aderir aos discos de vidro. Então, as células foram submetidas às 3 irradiações com LED, tal como anteriormente relatado. Decorridas 3 horas após a última irradiação, o meio de cultura foi aspirado, sendo que as células que permaneceram aderidas ao substrato de vidro foram imersas por 120 minutos em 1mL de glutaraldeído tamponado a 2,5% (Mallinckrodt Baker, Inc., Paris, Kentucky, USA). Posteriormente, estas células foram submetidas à lavagem por três vezes com 1mL de PBS (5 minutos cada lavagem), pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% (Tec Science, São Paulo, SP, Brasil) por 60 minutos, desidratação através de trocas ascendentes de soluções de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 minutos em cada solução), sendo finalmente, submetidas à secagem por meio do solvente de baixa tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexametildesilazano (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, USA). Após terem sido mantidas em dessecador por 12 horas, as amostras foram individualmente fixadas em “stubs” metálicos, submetidas à metalização com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (ZEISS, modelo DSM-940A, Oberkochen, Germany), no Instituto de Física da USP (São Carlos). A análise da morfologia celular foi realizada de forma descritiva.

## RESULTADOS

### Atividade da enzima SDH (MTT)

#### Comparação dos grupos controle (células não irradiadas):

Uma vez que cada dose de irradiação exigiu um tempo específico para que a mesma fosse atingida, esse tempo foi simulado no grupo controle referente a cada dose. Os dados de atividade da enzima SDH obtidos nesses grupos estão apresentados na Tabela 2 e Figura 5.

Tabela 2. Atividade da enzima SDH observada nos grupos controle

Tempo fora da incubadora	SFB	
	2%	10%
20 s (dose de 1J/cm <sup>2</sup> )	0.197 (0.183-0.209) c B	0.218 (0.247-0.299) c A
40s (dose de 2J/cm <sup>2</sup> )	0.188 (0.171-0,218) c B	0.278 (0.250-0.293) c A
80s (dose de 4J/cm <sup>2</sup> )	0.234 (0.221-0,243) b B	0.337 (0.300-0.363) b A
240s (dose de 8J/cm <sup>2</sup> )	0.251 (0.231-0,264) a B	0.393 (0.359-0.432) a A

Valores são mediana (percentil 25-percentil 75) expressa em densidade óptica (DO), n=24

<sup>a</sup> letras minúsculas permitem comparações dentro das colunas, enquanto letras maiúsculas nas linhas. Grupos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05).

Para todos os tempos em que as células não irradiadas permaneceram fora da incubadora, a concentração de 10% de SFB propiciou atividade significativamente maior

da enzima SDH (Tabela 2, comparação nas linhas). Entretanto, para ambas as concentrações de SFB investigadas, o tempo de permanência das células não irradiadas fora da incubadora exerceu efeito significativo na produção dessa enzima mitocondrial. Em linhas gerais, uma relação positiva foi observada entre o tempo de permanência das células MDPC-23 não irradiadas fora da incubadora e a atividade de SDH. Desta maneira, foi possível determinar que o tempo de permanência das células fora da incubadora não interferiu negativamente na continuidade da produção da enzima SDH pelas células MDPC-23, independente da concentração de SFB adicionado ao meio de cultura. A maior atividade metabólica celular foi observada para a dose de  $8 \text{ J/cm}^2$ , seguida das doses de  $4 \text{ J/cm}^2$  e  $2 \text{ J/cm}^2$ , sendo que essa última não diferiu estatisticamente do tempo necessário para reproduzir a dose de  $1 \text{ J/cm}^2$  (Tabela 2, comparação nas colunas).

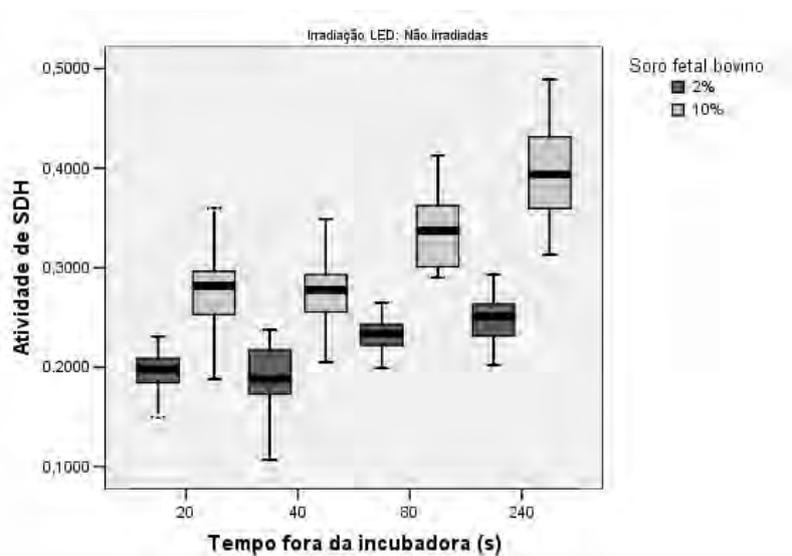


FIGURA 5 - Gráfico de box-plot segundo concentração de soro fetal bovino (SFB) e tempo de permanência fora da incubadora (min) para as células MDPC-23 do grupo controle (não irradiadas).

Uma vez que o tempo de permanência das células MDPC-23 fora da incubadora, com o objetivo de simular o tempo necessário de aplicação da luz LED para atingir a dose de irradiação pré-estabelecida, não exerceu efeito negativo sobre a atividade metabólica das células MDPC-23, a comparação das diferentes doses de irradiação entre si apenas foi possível após a transformação dos dados em porcentagem do controle. Dessa forma, para cada concentração de SFB e dose de irradiação, a mediana do seu respectivo controle foi considerada como 100% de metabolismo celular. Os valores de porcentagem da atividade da enzima SDH em relação ao controle segundo as variáveis “concentração de SFB” e “dose de irradiação/tempo fora da incubadora” estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem (%) da atividade da enzima SDH calculada para os grupos irradiados considerando-se a mediana dos grupos não irradiados (controles) como 100% de atividade

Dose (J/cm <sup>2</sup> ) ou tempo fora da incubadora (min)*	Irradiação LED			
	Grupos irradiados		Grupos não irradiados	
	2% SFB	10% SFB	2% SFB	10% SFB
1 / x	87,6 (79,7-93,0) d C	179,5 (167,9-191,9) a A	100,2 (92,8-106,3) a B	100,2 (88,1-106,3) a B
2 / y	103,7 (99,5-112,5) b B	169,2 (133,4-178,2) b A	100,2 (91,2-115,8) a BC	100,0 (90,0-105,4) a C
4 / q	113,7 (109,7-124,0) a A	114,5 (105,9-120,6) c A	100,0 (94,7-103,8) a B	100,1 (89,2-107,6) a B
8 / r	96,0 (90,9-100,0) c AB	93,6 (87,9-100,1) d B	100,0 (92,1-105,1) a A	100,1 (91,3-109,9) a AB

\*considera-se a dose para os grupos irradiados e o tempo fora da incubadora para os grupos não irradiados

<sup>a</sup> valores representam mediana (percentil 25–percentil 75), n=24. Letras minúsculas possibilitam comparações dentro de cada coluna, enquanto que letras maiúsculas comparações dentro de cada linha. Valores representados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p>0,05)

Redução significativa da atividade da enzima SDH foi observada para o grupo irradiado com  $1 \text{ J/cm}^2$ , cujo meio de cultura foi suplementado com apenas 2% de SFB. Quando as células foram mantidas em meio de cultura com 10% de SFB, houve aumento significativo da produção dessa enzima, sendo o mesmo padrão de resultado observado também quando as células foram irradiadas com  $2 \text{ J/cm}^2$ . Estes dados científicos demonstram que para uma dosagem tão baixa quanto  $1 \text{ J/cm}^2$ , o estresse celular induzido pela restrição de SFB influenciou negativamente na produção da enzima SDH, caracterizando a redução no metabolismo celular. Já para a dose de  $4 \text{ J/cm}^2$ , aumento significativo na atividade de SHD foi observado independentemente da concentração de SFB, enquanto que para a dose de  $8 \text{ J/cm}^2$  as células não foram estimuladas a aumentar a atividade dessa enzima mitocondrial.

Comparando-se as doses de irradiação LED dentro de cada concentração de SFB, observou-se que a maior atividade de SDH ocorreu quando as células foram irradiadas com  $4 \text{ J/cm}^2$  para o meio de cultura suplementado com 2% de SFB. Quando essa suplementação foi aumentada para 10%, a melhor resposta celular quanto a produção da enzima SDH foi obtida após sua irradiação com  $1 \text{ J/cm}^2$ .

Assim, foi possível demonstrar que células MDPC-23 mantidas em condições normais são bioestimuladas através de sua irradiação com baixa dose de LED, tal como com  $1 \text{ J/cm}^2$ . Porém, em condições de estresse por restrição de soro fetal bovino (2% SFB), as células MDPC-23 apenas são bioestimuladas através de doses mais elevadas de irradiação com LED, tal como com  $4 \text{ J/cm}^2$ . Por outro lado, a aplicação de uma dose de  $8 \text{ J/cm}^2$  não influencia o metabolismo desta linhagem de célula odontoblastóide.

**Morfologia celular (MEV):**

As células MDPC-23 submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas com LED na dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  apresentavam-se organizadas em nódulos epitelióides, os quais parcialmente recobriam o substrato de vidro (Figura 6A). Estas células apresentavam amplo citoplasma, sendo que numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos eram originados da membrana citoplasmática. Mitoses foram observadas em todos os espécimes avaliados. Semelhantes características morfológicas foram observadas também para as células MDPC-23 irradiadas com a mesma dose de LED, mas que não foram colocadas em condições de estresse (10% SFB). Porém, as imagens em MEV claramente demonstraram que um maior número de células MDPC-23 recobria completamente o substrato de vidro (Figura 6B). No grupo controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 2% de SFB (estresse) e mantidas por 20 segundos fora de incubadora (sem irradiação com LED), o substrato de vidro estava quase que completamente recoberto por nódulos epitelióides de células MDPC-23 (Figura 6C/D). Porém, algumas estruturas globulares menores, características de restos celulares envolvidos por membrana, típicos de células em apoptose, foram observadas em MEV (Figura 6C). O mesmo padrão morfológico das células de linhagem odontoblástica MDPC-23, bem como distribuição em nódulos epitelióides sobre o substrato de vidro, foi observado para o grupo controle, onde as células não irradiadas e cultivadas em condições normais (10% de SFB) também foram mantidas por 20 segundos fora da incubadora.

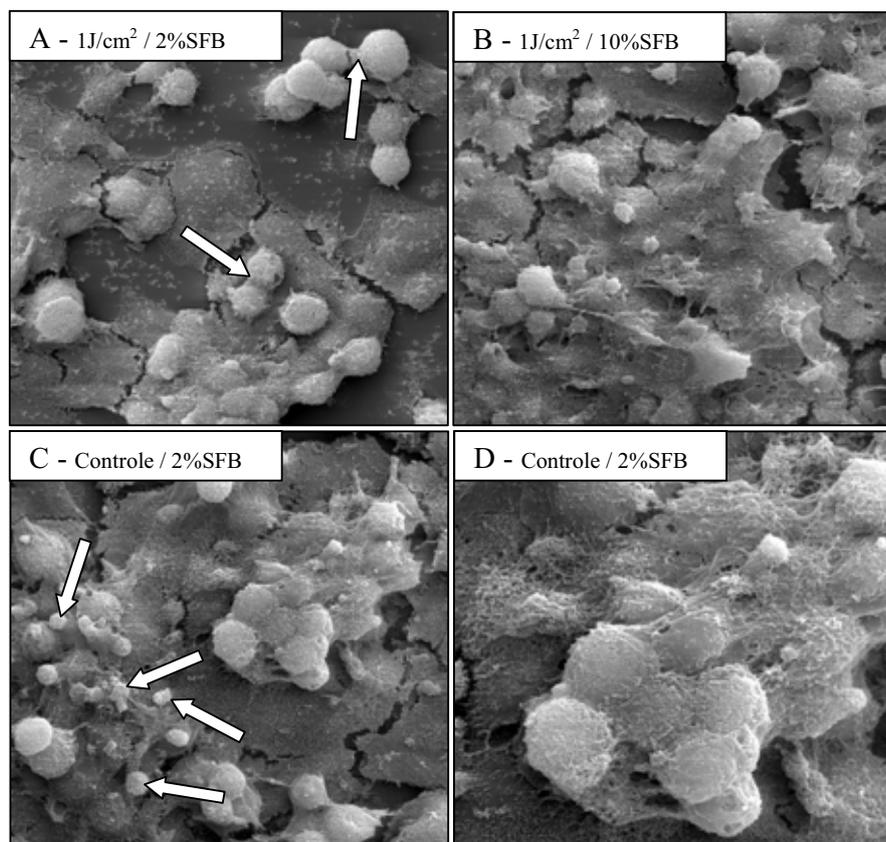


FIGURA 6 - A - Células MDPC-23, algumas em mitose (setas), estão parcialmente recobrando o substrato de vidro. MEV, 500x. B – Uma grande quantidade de células está recobrando o disco de vidro. Note que prolongamentos citoplasmáticos finos são originados da ampla membrana celular. MEV, 500x. C (controle) – Tal como observado para a figura 6B, grande parte do substrato de vidro está recoberto por células MDPC-23 que apresentam morfologia normal. Note que células em apoptose deram origem a pequenos fragmentos envolvidos por membrana (setas). MEV, 500x. D (controle) – Detalhe da figura 6C. Observe a organização de um grupo de células para formar um nódulo epitelióide. Estas células exibem membrana citoplasmática irregular devido aos numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos que se originam de sua superfície. Este mesmo padrão morfológico normal das células MDPC-23 também pode ser observado nas figuras 6A e 6B. MEV, 1000x.

Tal como demonstrado anteriormente, as células MDPC-23 submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas com LED na dose de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  apresentavam morfologia normal e se organizavam em nódulos epitelióides (Figura 7A). Algumas raras mitoses foram observadas. As células MDPC-23 irradiadas com a mesma dose de LED, mas que não foram colocadas em condições de estresse (10% SFB) se organizavam em maior quantidade sobre substrato de vidro (Figura 7B). Estruturas características de corpos apoptóticos foram observadas, sendo que este processo de morte celular pode ter sido ocasionado pela inibição de contato entre as numerosas células aderidas ao substrato de vidro. Para ambos os grupos controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 2% de SFB (estresse) ou 10% de SFB, sendo então mantidas por 40 segundos fora de incubadora (sem irradiação com LED), o substrato de vidro apresentava-se recoberto por células organizadas em nódulos epitelióides (Figura 7C/D). As células MDPC-23 exibiam amplo citoplasma, do qual eram emitidos numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos (Figura 7D).

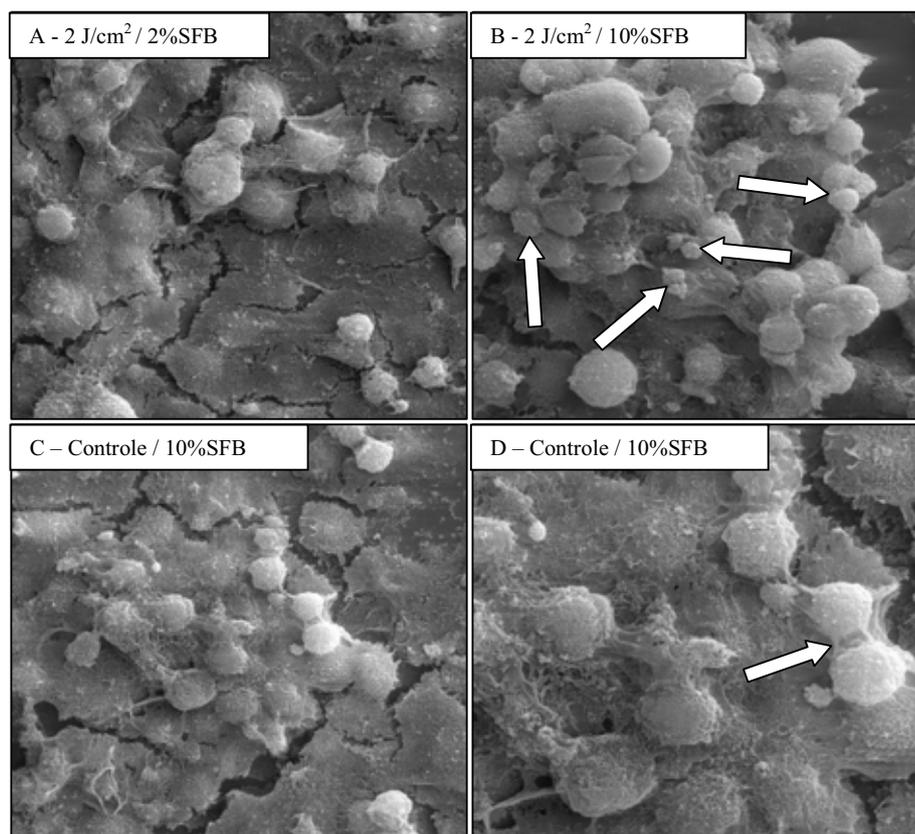


FIGURA 7 – A - Numerosas células MDPC-23 estão recobrando o substrato de vidro. MEV, 500x. B – Uma grande quantidade de células é observada sobre o disco de vidro. Algumas estruturas características de corpos apoptóticos (setas) são observadas numa região de alta concentração celular. MEV, 500x. C (controle) – Tal como observado para a figura 7A, o substrato de vidro está recoberto por células MDPC-23 com morfologia normal, as quais se organizam em nódulos epitelióides. MEV, 500x. D (controle) – Detalhe da figura 7C. Observe a organização de um grupo de células para formar um nódulo epitelióide, bem como células em mitose na região (seta). As células MDPC-23 exibem ampla membrana citoplasmática de onde se originam numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. MEV, 1000x.

As células MDPC-23 submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas com LED na dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  apresentavam-se organizadas em

nódulos epitelióides definidos, os quais parcialmente recobriam completamente o substrato de vidro (Figura 8A). Estas células apresentavam amplo citoplasma de onde eram originados numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. Este mesmo padrão morfológico e de distribuição celular também foi observado no grupo onde as células MDPC-23 irradiadas com  $4\text{J}/\text{cm}^2$  foram mantidas em meio de cultura com 10% SFB (Figura 8B). Para ambas as situações de normalidade ou estresse das células, mitoses foram freqüentemente observadas em todos os espécimes avaliados. Quando comparados aos outros parâmetros de irradiação utilizados nesta pesquisa, foi observado, através da análise dos espécimes em MEV, que um maior número de células permaneceram aderidas ao substrato de vidro após irradiação destas com  $4\text{J}/\text{cm}^2$ . Nos grupos controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 2% (estresse) ou 10% de SFB e mantidas por 80 segundos fora de incubadora (sem irradiação com LED), o substrato de vidro estava quase que completamente recoberto por nódulos epitelióides de células MDPC-23 (Figura 8C/D), tal como observado para os demais grupos.

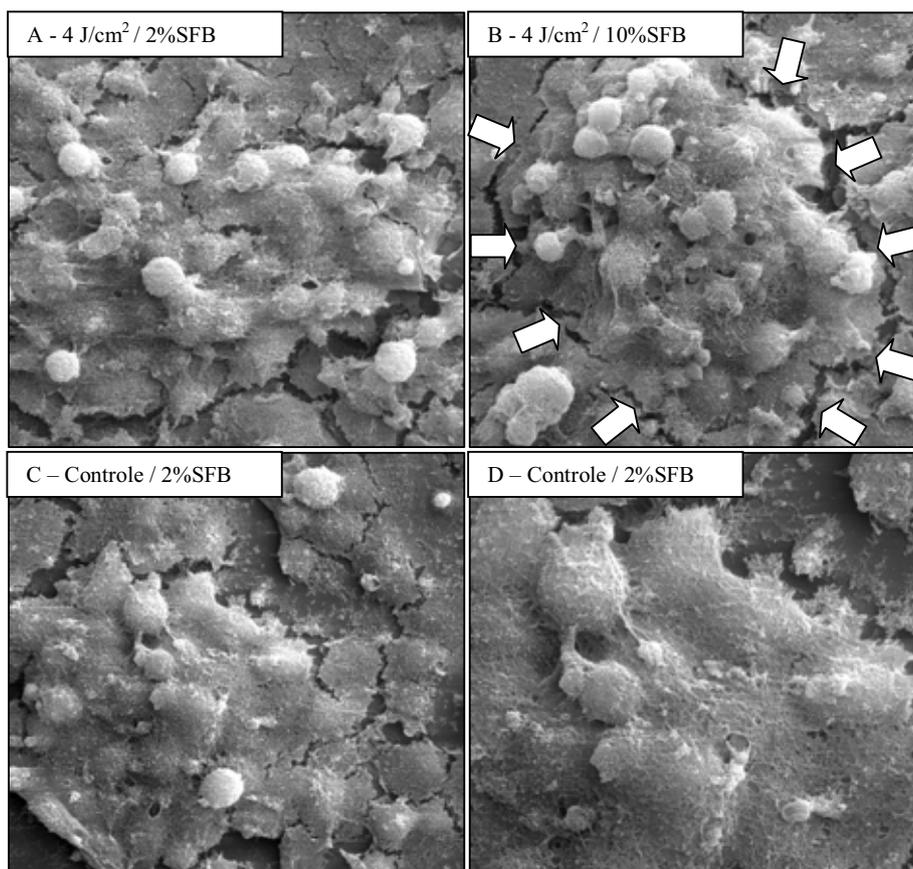


FIGURA 8–A - Numerosas células MDPC-23, algumas em mitose, estão recobrando completamente o substrato de vidro. MEV, 500x. B – Note o detalhe de um nódulo epitelióide (delimitado por cabeças de seta) formado por um grupo de células odontoblastóides, as quais apresentam morfologia normal. MEV, 500x. C (controle) – Tal como observado para os demais grupos controle demonstrados anteriormente, grande parte do substrato de vidro está recoberto por numerosas células MDPC-23. MEV, 500x. D (controle) – Detalhe da figura 8C. As células exibem ampla membrana citoplasmática irregular devido aos numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos que se originam de sua superfície. MEV, 1000x.

As células submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas com LED na dose de  $8\text{Jcm}^2$  apresentavam-se organizadas em nódulos

epitelióides, os quais parcialmente recobriam o substrato de vidro (Figura 9A/B). Estas células apresentavam numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos originados de sua membrana citoplasmática. Mitoses foram observadas em todos os espécimes avaliados. Semelhantes características morfológicas foram observadas também para as células MDPC-23 irradiadas com a mesma dose de LED, mas que não foram colocadas em condições de estresse (10% SFB). No grupo controle, onde as células foram cultivadas em meio de cultura com 2% ou 10% de SFB e mantidas por 240 segundos fora de incubadora (sem irradiação com LED), o substrato de vidro estava quase que completamente recoberto por nódulos epitelióides formados por numerosas células MDPC-23 (Figura 9C/D). Porém, algumas estruturas globulares menores, características de restos celulares envolvidos por membrana, típicos de células em apoptose, foram observadas.

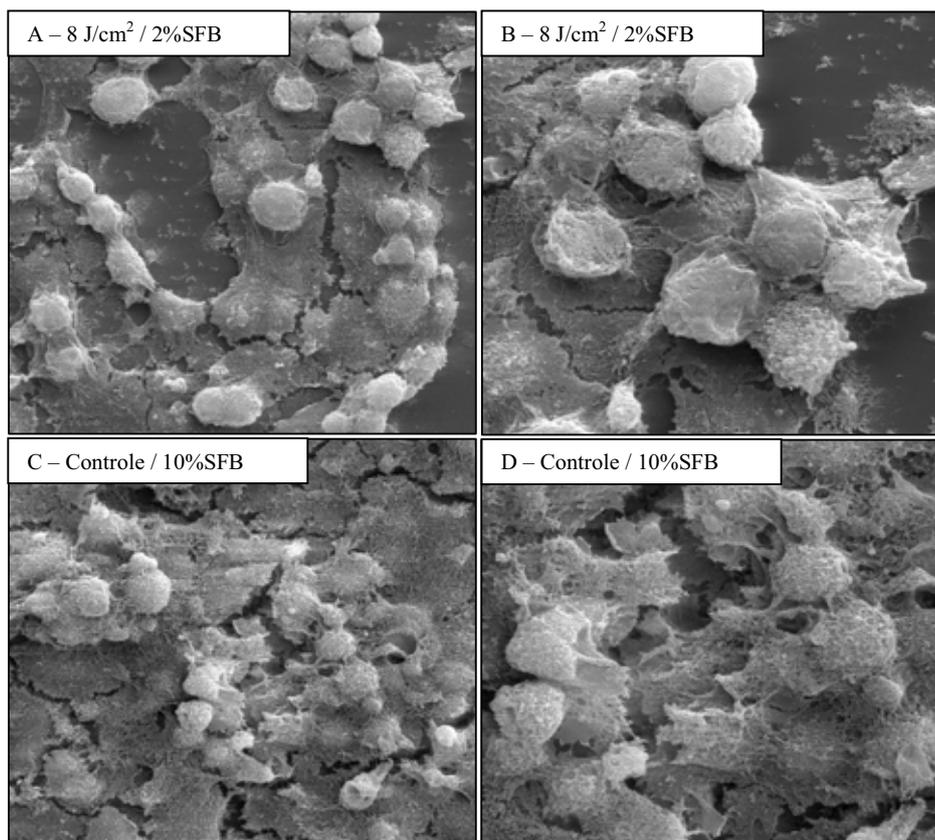


FIGURA 9 – A - As células MDPC-23, as quais não se organizaram homoganeamente, porém exibem morfologia normal, estão parcialmente recobrendo o substrato de vidro. MEV, 500x. B – Detalhe da figura anterior. Observe que as células MDPC-23 apresentam amplo citoplasma, do qual se originam numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos. MEV, 1000x. C (controle) – Tal como observado para os demais grupos controle utilizados nesta pesquisa, grande parte do substrato de vidro está recoberto por células MDPC-23, as quais apresentam morfologia normal. MEV, 500x. D (controle) – Detalhe da figura 9C. Observe a organização de um grupo de células para formar um nódulo epitelióide. Estas células exibem membrana citoplasmática irregular devido aos numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. MEV, 1000x.

## DISCUSSÃO

O dispositivo LED foi introduzido no mercado há 40 anos, em aparelhos eletrônicos. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, atualmente os LEDs podem ser produzidos em variados comprimentos de onda e têm sido aplicados em diversas terapias biológicas *in vitro* e *in vivo*<sup>15,18,23,31,48,50-52,54,56,60</sup>. Assim, na busca de uma fonte de luz que reunisse vantagens econômicas e funcionais, o LED foi selecionado para ser aplicado e estudado na presente pesquisa.

Tem sido demonstrado que os LEDs não produzem calor nos parâmetros usualmente empregados na fotobiomodulação, podem ser configurados para emitir múltiplos comprimentos de onda e serem posicionados em sondas grandes e largas, sendo possível sua indicação para irradiação de áreas extensas<sup>51</sup>. Além disto, os LEDs também são bem tolerados pelos tecidos biológicos, não causam efeitos deletérios, são portáteis, mais compactos e economicamente acessíveis<sup>55</sup>, sendo que a terapia com este tipo de fonte de luz foi aprovada há quase uma década pelo FDA para uso em seres humanos<sup>51</sup>.

Em um estudo recente, Zhang et al.<sup>59</sup> compararam o aumento de temperatura provocado por Laser KTP, LED e laser diodo, durante um experimento *in vitro* com incisivos humanos extraídos. O LED produziu o menor índice de aumento de temperatura pulpar (aproximadamente 2.9°C). Desta forma, os pesquisadores concluíram que o LED é um dispositivo que pode ser considerado seguro para utilização sobre o tecido pulpar. Entretanto, ainda não se conhece até o momento, os efeitos da luz LED especificamente sobre as células odontoblastóides, as quais apresentam fenótipo semelhante aos odontoblastos, os quais são células típicas da polpa e que se organizam em monocamada para revestir internamente a dentina. Baseado nos resultados de

trabalhos nos quais se utilizou a LEDterapia sobre cultura de células *in vitro*<sup>15,23,31,34,36,51,54,60</sup>, optou-se, na presente pesquisa, por utilizar o LED vermelho, em um comprimento de onda que variava entre 600-630 nm, e testar as diferentes doses de energia (1, 2, 4 e 8 J/cm<sup>2</sup>), as quais foram efetivas sobre outras linhagens de células em cultura. Porém, para que sejam compreendidos os mecanismos de ação do LED sobre as células, algumas teorias têm sido propostas.

A primeira lei da fotobiologia afirma que para a luz visível de baixa intensidade ter algum efeito em um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos por bandas de absorção eletrônica pertencentes a cromóforos, como a porfirina e flavina, ou fotorreceptores, como a citocromo C oxidase, dentro das mitocôndrias e membranas celulares<sup>5,45</sup>.

Tem sido sugerido que as citocromos C oxidases, no término da cadeia respiratória, são os fotorreceptores moleculares para a irradiação com luz que varia de vermelha à infravermelha<sup>54</sup>, e aqueles para a luz violeta à azul são flavoproteínas, no início da cadeia respiratória. A ativação de fotorreceptores gera uma série de respostas que podem eventualmente resultar em aumento da proliferação celular e atividades celulares<sup>28,34</sup>.

A absorção de fótons pelas moléculas leva a um estado de excitação eletrônica e conseqüentemente pode levar a reações de aceleração de transferência de elétrons<sup>57</sup>. Um maior transporte eletrônico necessariamente leva a um aumento na produção de ATP<sup>40</sup>. Este aumento de ATP, junto ao aumento de ingrediente de próton (H<sup>+</sup>), causa uma maior atividade de troca de íons, como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Os íons Ca<sup>2+</sup> regulam muitos processos no corpo humano, como a contração muscular, coagulação sanguínea e expressão gênica.

Outra proposição é a hipótese do oxigênio singlete, na qual moléculas excitadas podem interagir com o oxigênio estável, transferindo energia e formando espécies reativas<sup>17</sup>. A hipótese redox<sup>38</sup> propõe que a alteração do metabolismo mitocondrial levaria à produção de ânions superóxido. Por fim, a hipótese do óxido nítrico (NO)<sup>30</sup> propõe que a irradiação de luz poderia reverter a inibição da citocromo C oxidase pelo NO.

A célula utiliza o óxido nítrico (NO) para regular os processos da cadeia respiratória, resultando em mudança no metabolismo celular. O NO inibe a citocromo C oxidase em competição com o oxigênio e a cadeia respiratória mitocondrial e diminui a síntese de ATP<sup>8</sup>. A citocromo C oxidase se liga tanto ao oxigênio quanto ao óxido nítrico (NO). Assim, a respiração celular gera energia à célula, mas também ocasiona um feedback que permite a célula monitorar e responder ao ambiente.

Quando a respiração celular é bloqueada, radicais livres são gerados. Tem sido sugerido que, durante processos inflamatórios, a citocromo C oxidase é inibida pelo NO, e a LEDterapia dissociaria o NO ao empurrá-lo à matriz extracelular para o oxigênio se religar à citocromo C oxidase, retomando a atividade da cadeia respiratória<sup>5, 54</sup>. Baseado nesta teoria, foi demonstrado que em fibroblastos expostos à irradiação com LED, houve um aumento na atividade de ATP e modulação de espécies reativas de oxigênio (como oxigênio singlet), redução e prevenção de apoptose, estimulação da angiogênese, aumento do fluxo sanguíneo e indução de fatores de transcrição<sup>21</sup>. Em um outro estudo desenvolvido por Geronemus et al.<sup>18</sup>, também foi demonstrada a rápida produção de ATP após a fotobiomodulação com LED, disparando uma subsequente atividade metabólica de fibroblastos. Weiss et al.<sup>50</sup> relataram que a fotobiomodulação com o LED sobre a pele humana leva a um aumento do metabolismo celular, tal como um aumento de síntese de colágeno pelos fibroblastos da derme.

Observa-se que os efeitos da luz LED na bioestimulação têm sido cada vez mais evidenciados ao longo dos anos. O que se busca, ainda, são os parâmetros ideais de irradiação, tais como: comprimento de onda, dose (fluência), intensidade (potência ou irradiância), tempo de irradiação, onda contínua ou pulsátil, frequência de irradiação, intervalos entre tratamentos e número total de aplicações.

O que se conhece, no momento, através das evidências científicas publicadas nas últimas décadas, é que os efeitos da luz sobre as células e tecidos são dose-dependentes<sup>26-28, 38, 41, 56</sup>. Todavia, como anteriormente descrito, não há protocolos já estabelecidos para a irradiação das variadas linhagens celulares. Assim, no presente estudo, as células MDPC-23 foram irradiadas periodicamente a cada 24 horas, num total de 3 aplicações durante três dias consecutivos. Este procedimento de irradiação foi adotado devido ao fato de pesquisas anteriores terem demonstrado que 3 aplicações de luz proveniente de LEDs resultou em efeitos bioestimuladores positivos sobre células<sup>47</sup>.

Na presente pesquisa, após a última irradiação, as placas de 24 compartimentos onde estavam as células cultivadas permaneceram em incubadora pelo período de 3 horas. Este protocolo foi seguido com o objetivo de permitir que as células irradiadas pudessem retornar a um equilíbrio de suas funções, previamente aos testes específicos de viabilidade e morfologia<sup>25</sup>.

Em 2004, Karu et al.<sup>29</sup> propuseram que a magnitude do efeito bioestimulatório depende da condição fisiológica das células no momento da irradiação. No ano seguinte, Smith<sup>43</sup> afirmou que, se a célula estiver em homeostasia, não há nada que a irradiação possa estimular, e conseqüentemente, nenhum efeito terapêutico ocorre. Desta forma, na presente pesquisa, a redução na concentração do soro fetal bovino (SFB) no meio de cultura foi uma tentativa de gerar um estresse celular por déficit nutricional, tal como anteriormente demonstrado por variados pesquisadores<sup>2,34,44,47</sup>. Assim, no presente

estudo, duas concentrações de SFB (2% e 10%) foram independentemente utilizadas na suplementação do meio de cultura usado para a manutenção da cultura celular. Desta forma, cada grupo irradiado teve o seu respectivo controle não irradiado, gerando, desta maneira, dois grupos controles para cada dose avaliada, permitindo adequada análise comparativa da possível bioestimulação gerada através da irradiação com LED. Para os grupos controle, em todos os tempos em que as células permaneceram fora da incubadora, o meio de cultura suplementado com 10% de SFB propiciou atividade celular e produção de SDH significativamente maior do que no caso onde foi induzido estresse celular. A grande maioria dos estudos *in vitro* publicados, onde se avaliou os efeitos biológicos da irradiação LED, foi utilizado também como controle, meio de cultura suplementado com 10% de SFB<sup>23, 31, 36, 47, 51, 56, 60</sup>. Desta forma, nossos resultados estão de acordo com dados científicos prévios, os quais correlacionam concentração de SFB e aumento da atividade celular.

Os dados obtidos para os grupos controle resultam de uma atividade celular típica e, a partir deles, pode-se avaliar se as irradiações realizadas nos grupos de estudo foram suficientes para estimular significativamente as funções metabólicas celulares. No presente estudo, houve redução na produção de SDH quando as células foram mantidas em meio de cultura com 2% de SFB e irradiadas com  $1\text{J}/\text{cm}^2$ . Sugere-se que essa dose não tenha sido suficiente para estimular significativamente as funções metabólicas celulares. Pode-se especular que esse parâmetro não foi suficiente para ativar os receptores celulares ou os mecanismos celulares de produção de espécies reativas (ROS, por exemplo) sobre este tipo celular, os quais desencadeariam um aumento das atividades metabólicas e mitoses. Por outro lado, o melhor resultado de produção de SDH foi obtido quando as células mantidas em meio suplementado com 2% de SFB foram irradiadas com  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , sugerindo, desta maneira, que essa é a dose

ideal de irradiação LED a 630 nm para estimular o metabolismo das células odontoblastóides MDPC-23. Resultado semelhante foi obtido recentemente por Li & Leu<sup>34</sup>, em um estudo onde células em cultura foram submetidas a irradiação com LED de 630 nm, com o mesmo comprimento de onda empregada no presente estudo. Nesta pesquisa, células mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos foram cultivadas e a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> foi a mais efetiva para o aumento da proliferação celular, também na concentração de 2% de SFB. No presente estudo, a análise da proliferação celular, através da MEV, mostrou que o grupo irradiado com 4 J/cm<sup>2</sup> apresentou um maior número de células aderidas ao substrato quando comparado aos demais grupos experimentais. Embora Li, Leu<sup>34</sup> tenham avaliado apenas a proliferação celular, pode-se dizer que em ambos os estudos os melhores resultados foram obtidos de maneira dose-dependente, com a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> sendo a mais efetiva.

Na presente pesquisa, foi demonstrado que para o grupo no qual as células odontoblastóides foram irradiadas com 8J/cm<sup>2</sup>, ocorreu discreta redução no metabolismo celular tanto em meio de cultura com 2% quanto com 10% de SFB. Neste caso, pode-se sugerir que esta dose foi, de alguma maneira, agressiva para este tipo celular, inibindo as cascatas de reações físico-químicas intracelulares. Em contrapartida, utilizando a mesma dosagem de 8J/cm<sup>2</sup> e também o LED vermelho (670 nm), Whelan et al.<sup>51</sup> verificaram que a irradiação LED em uma linhagem celular músculo-esquelética (L-6) derivada de rato aumentou em 140% a taxa de crescimento celular em relação ao controle, após 24 horas da irradiação. Os pesquisadores também demonstraram que células HaCAT irradiadas com LED vermelho em 8 J/cm<sup>2</sup> sintetizaram duas vezes mais colágeno do que células não irradiadas. Esses resultados antagônicos demonstram a alta especificidade dos parâmetros de irradiação de luz LED sobre os diversos tipos celulares. Não há muitos trabalhos na literatura que utilizem a irradiação LED sobre

culturas celulares, tampouco na dose de  $8\text{J}/\text{cm}^2$ . Além disso, a combinação de outros fatores, como por exemplo, o tempo de irradiação, dispositivo de irradiação, comprimento de onda do LED, frequência de aplicações da luz LED podem interferir na resposta celular, determinando que cada tipo célula pode responder de maneira singular frente à irradiação. Especificamente para as células odontoblastóides MDPC-23, a irradiação com  $8\text{J}/\text{cm}^2$  determinou uma discreta inibição metabólica.

Com relação à morfologia celular, as células MDPC-23 submetidas a condição de estresse por restrição de SFB e que foram irradiadas com LED nas doses de 1, 2, 4 e  $8\text{ J}/\text{cm}^2$  apresentavam-se organizadas em nódulos epitelióides. Particularmente quando se utilizou a dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , as células MDPC-23, as quais apresentavam-se em maior número e organizadas em nódulos epitelióides definidos, se caracterizaram morfológicamente por apresentar amplo citoplasma de onde eram originados numerosos prolongamentos citoplasmáticos finos e curtos. Para ambas as situações de normalidade ou estresse das células, mitoses foram freqüentemente observadas em todos os espécimes avaliados. Por outro lado, para os grupos experimentais onde foram aplicadas as doses de irradiação de  $1\text{ J}/\text{cm}^2$  e  $8\text{ J}/\text{cm}^2$ , foi observado a formação de nódulos epitelióides com menor número de células aderidas ao substrato de vidro, sendo que estas células apresentavam tamanho reduzido. Estas observações de morfologia e número de células refletem os resultados de metabolismo celular (produção de SDH) determinado para os grupos em estudo, visto que houve redução estatisticamente significativa na produção de SDH para os grupos onde as células foram irradiadas com  $1\text{ J}/\text{cm}^2$  e  $8\text{ J}/\text{cm}^2$  quando comparadas ao grupo de  $4\text{ J}/\text{cm}^2$  (Mann-Whitney,  $p<0,05$ ).

Zhang et al.<sup>60</sup> demonstraram que células HeLa, uma linhagem celular de carcinoma cervical humano, tiveram sua taxa de proliferação reduzida de maneira significativa após terem sido irradiadas com LED vermelho por 24, 48 e 72 horas. Na

avaliação da morfologia celular, a irradiação também provocou alterações nas células, as quais se apresentaram em menor densidade, dispostas distantes umas das outras e com corpos apoptóticos notáveis. No grupo controle (sem irradiação), as células apresentavam citoplasma amplo, núcleos alargados e nucléolos nítidos, além de se disporem em elevada densidade e próximas umas das outras. Por outro lado, em um outro experimento onde foi avaliado a proliferação celular em fibroblastos irradiados com LED e Laser nas cores verde, vermelho e azul, foi demonstrado um significativo aumento na taxa de proliferação celular após as irradiações, em relação aos respectivos controles<sup>48</sup>. Em ambos os estudos, houve uma variação dos parâmetros de irradiação e dos tipos celulares. No primeiro, embora o comprimento de onda fosse único, em torno de 630 nm, o tempo de exposição variou entre 1 a 3 dias de irradiação. Os resultados mais significativos foram obtidos após 72 horas de irradiação, com índice de 62% de apoptose das células tumorais, embora ocorresse apoptose em todos os grupos irradiados. Já no trabalho de Vinck et al.<sup>47</sup>, foram avaliados três diferentes comprimentos de onda sobre as células, obtendo uma maior proliferação celular em todos os grupos irradiados, independentemente da fonte de luz. No presente trabalho de pesquisa, para todos os grupos experimentais e controle avaliados, estruturas características de corpos apoptóticos também foram observadas, sendo que este processo de morte celular pode ter sido ocasionado pela inibição por contato entre as numerosas células aderidas ao substrato de vidro. Assim, a morte celular por apoptose demonstrada nas imagens obtidas das células MDPC-23 aderidas ao substrato de vidro não estaria diretamente relacionada com os efeitos da irradiação por si só, tal como observada por Zhang et al.<sup>60</sup>.

Quanto às aplicações experimentais e clínicas da fototerapia, muitas investigações têm sido desenvolvidas de tal maneira que esta área de pesquisa tem se

expandido de forma significativa nos últimos 30 anos<sup>26</sup>. Porém, não se deve esquecer que os inúmeros tipos celulares têm seus parâmetros únicos de absorção de luz, sendo que estudos ainda necessitam realizados com o objetivo de compreender os mecanismos de interação entre a luz (agente físico) e os diferentes tecidos biológicos. Porém, na presente pesquisa foi possível demonstrar, através da irradiação de células odontoblastóides MDPC-23 com LED de alumínio-gálio-arsênico (AlGaAs), no comprimento de onda centrado em 630 nm e uma banda de 10 nm, o qual gerava feixes luminosos de coloração vermelho intenso, que estas células com fenótipo de odontoblastos pulparem podem ser bioestimuladas quando da utilização da densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com a metodologia empregada na presente pesquisa in vitro, foi possível concluir que as células odontoblastóides MDPC-23, colocadas ou não em condição de estresse por restrição de soro fetal bovino, apresentam resposta metabólica variada de acordo com os parâmetros de irradiação com LED. Assim, foi demonstrado que a maior taxa de produção de SDH, o que reflete o metabolismo celular, ocorreu quando as células desta linhagem imortalizada foram colocadas em condição de estresse e irradiada com LED no comprimento de onda em torno de 630 nm sob fluência de 4 J/cm<sup>2</sup>.

## REFERÊNCIAS \*

1. Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 909-16.
2. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-84.
3. Al-Watban FA, Andres BL. Polychromatic LED in oval full-thickness wound healing in non-diabetic and diabetic rats. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 10-6.
4. Aranha AMF, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Effect of Curing Regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
5. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27: 227-38.
6. Beauvoit B, Kitai T, Chance B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach. *Biophys J.* 1994; 67: 2501-10.
7. Boixeda P, Calvo M, Bagazgoitia L. Recent advances in laser therapy and other technologies. *Actas Dermosifiliogr.* 2008; 99: 262-8.
8. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1504:46–57.

- De acordo com o estilo Vancouver.
- Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

9. Castro-e-Silva O, Castro-e-Silva T, Ramalho FS, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Marcassa LG et al. Led enhancement in mitochondrial oxidative phosphorylation for hepatectomized rats. *Acta Cir Brasil*. 2002; 17: 92-5.
10. Castro-e-Silva T, Castro-e-Silva O, Kurachi C, Ferreira J, Zucoloto S, Bagnato VS. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40:1065-9.
11. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*. 1999; 25: 434-41.
12. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent*. 2003; 28: 365-70.
13. Dababneh RH, Khouri AT, Addy, M. Dentine hypersensitivity— an enigma? A review of terminology, epidemiology, mechanisms, etiology and management. *Br Dent J*. 1999; 187: 606–61.
14. DeLand MM, Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG. Treatment of radiation-induced dermatitis with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Lasers Surg Med*. 2007; 39: 164-8.
15. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ, Eells JT, Wong-Riley MT, Henry MM et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24:121-8.
16. Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, Wong-Riley MT, Buchmann EV, Kane M et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3439-44.

17. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1991; 11: 87-91.
18. Geronemus R, Weiss RA, Weiss MA, McDaniel DH, Newman J. Nonablative nonthermal LED photomodulation-light activated fibroblast stimulation clinical trial. *Lasers Surg Med*. 2003; 32: 22.
19. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med*. 1998; 22: 212-8.
20. Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagama T, Kawahara M, Ohta M et al. Effect of low-level irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2003; 18: 78-82.
21. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms for Low-Light Therapy, in Hamblin MR, Waynant R, Anders J (eds): *Proceedings of the SPIE*, 2006; 6140: 1-12.
22. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF –  $\beta$  activated leads to a Smad3 – mediated down – regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol*. 2004; 49:911-8.
23. Huang PJ, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25:183-90.
24. Huang B, Sun Y, Maciejewska I, Qin D, Peng T, McIntyre B et al. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *Eur J Oral Sci*. 2008;116:104-12.

25. Karu T, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of Hela cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 171-7.
26. Karu, TI. *The science of low power laser therapy.* London: Gordon and Breach. 1998.
27. Karu TI. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol Biol.* 1999; 49: 1–17.
28. Karu, TI. Low-power laser therapy. In: Vo-Dinh, T. *Biomed. Photonics Handbook.* CRC Press: New York, 2003. p.48.
29. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 211-6.
30. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 307-14.
31. 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; 2: 214-22.
32. Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 715–21.
33. 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: 572-7.
34. Li WT, Leu YC. Effects of low level red-light irradiation on the proliferation of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2007; 5830-33.

35. Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MT. Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience*. 2008; 153: 963-74.
36. Lim W, Lee S, 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: 614-21.
37. Linde A, Bhowan M, Butler WT. Noncollagenous proteins of dentin. A re-examination of proteins from rat incisor dentin utilizing techniques to avoid artifacts. *J Biol Chem*. 1980 Jun 25; 255: 5931-42.
38. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedmann H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23:3-9.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
40. Passarella S. He-Ne laser irradiation of isolated mitochondria. *J Photochem Photobiol B*. 1989; 3: 642-3.
41. Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med*. 1997; 20:426-32.
42. Roelandts R. A new light on Niels Finsen, a century after his nobel prize. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2005; 21:115-17.
43. Smith KC. Laser (and LED) therapy is phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23: 78-80.

44. Stein A, Benayahu D, Maltz D, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 161-6.
45. Sutherland, JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol.* 2002; 76: 164-70.
46. Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 50-7.
47. 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: 95-9.
48. Vinck E, Cagnie B, Coorevits P, Vanderstraeten G, Cambier D. 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: 11-8.
49. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod.* 2007; 33: 703-8.
50. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.* 2005; 31: 1199-205.
51. Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA et al. Effects of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19: 305-14.

52. Whelan HT, Connelly JF, Hodgson BD, Barbeau L, Post AC, Bullard G et al. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. *J Clin Laser Med Surg.* 2002; 20: 319-24.
53. Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport.* 2001; 12: 3033-7.
54. 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: 4761-71.
55. Yamakoshi Y, Hu JC, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 2006; 281: 38235-43.
56. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 497-505.
57. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol.* 1997; 66: 866-71.
58. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965; 19: 515-30.
59. Zhang C, Wang X, Kinoshita J, Zhao B, Toko T, Kimura Y et al. Effects of KTP laser irradiation, diode laser, and LED on tooth bleaching: a comparative study. *Photomed Laser Surg.* 2007; 2: 91-5.
60. Zhang L, Xiong Z, Li Z, Yao B, Zhang D. Effects of red light emitting diode on apoptosis of HeLa cells and suppression of implanted HeLa cells growth in mice. *J Radiat Res.* 2009; 50: 109-17.

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

Araraquara, 18 de junho de 2010.

MARCELA MARTINI TAGLIANI