

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP



Faculdade de Odontologia de Araraquara

ANA PAULA SILVEIRA TURRIONI

**EFEITO TRANSDENTINÁRIO DO LED EM DIFERENTES
COMPRIMENTOS DE ONDA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara

2011

ANA PAULA SILVEIRA TURRIONI

**EFEITO TRANSDENTINÁRIO DO LED EM DIFERENTES
COMPRIMENTOS DE ONDA SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

2º Examinador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

3º Examinador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Jr.

Araraquara, 25 de julho de 2011.

DADOS CURRICULARES

ANA PAULA SILVEIRA TURRIONI

NASCIMENTO	28 de Março de 1985 – Itajubá/MG
FILIAÇÃO	João Batista Turrioni Ana Maria Silveira Turrioni
2003/2006	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2007/2009	Residência Multiprofissional em Saúde da Família e Comunidade Universidade Federal de São Carlos – Ufscar
2009/2011	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

DEDICO ESSA DISSERTAÇÃO...

“Ninguém é tão ignorante que não tenha algo a ensinar.

Ninguém é tão sábio que não tenha algo a aprender.”

(Blaise Pascal)

A Deus,

Por sempre estar presente na minha vida, guiando meus passos, cuidando de cada detalhe. Por me proteger, levantar quando caio e amparar quando preciso. Agradeço por todas as conquistas e por cada segundo vivido.

Salmo 103:8-14 - Compassivo e misericordioso é o Senhor; tardio em irar-se e grande em benignidade. Não repreenderá perpetuamente, nem para sempre conservará a sua ira. Não nos trata segundo os nossos pecados, nem nos retribui segundo as nossas iniquidades. Pois quanto o céu está elevado acima da terra, assim é grande a sua benignidade para com os que o temem. Como o oriente está longe do ocidente, assim tem ele afastado de nós as nossas transgressões. Como um pai se compadece de seus filhos, assim o Senhor se compadece daqueles que o temem. Pois ele conhece a nossa estrutura.

Aos meus queridos pais,

Grandes responsáveis por tudo que sou. Foram eles que me passaram os valores que me guiam pelo melhor caminho, a coragem e discernimento para realizar minhas escolhas e a sabedoria para enfrentar as dificuldades. Obrigada pelo amor incondicional, pela dedicação, por alimentar meus sonhos, por agüentar a saudade e por serem pais tão presentes, mesmo de longe. Amo vocês com todas as minhas forças!

Ao meu irmão,

André, obrigada pelo companheirismo, pelas boas lembranças, pelas conversas filosóficas, por dividir o sofrimento e torná-lo menos pesado, por dividir as alegrias e torná-las ainda maiores. Obrigada por ser do jeitinho que você é: gentil, alegre, carinhoso, guerreiro, responsável e por encher a sua irmã de orgulho! Te amo maninho!

Ao meu namorado Rodrigo,

Por ser, além de namorado, um grande amigo! Obrigada por ser a pessoa maravilhosa que é. Sempre pronto para me ajudar no que preciso, me apoiando em tudo que faço, agüentando minhas angústias e nervosismo, me trazendo tranqüilidade e tornando a minha vida muita mais feliz. Com certeza, mais uma parte importante da minha vida!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou que desistem deles.”

Augusto Cury

Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo exemplo de pessoa que é, por não medir esforços para estimular o meu crescimento profissional, por cada conselho e cada lição aprendida.

À **Prof^a Dr^a Josimeri Hebling**, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP que contribuiu de forma muito especial e com muita dedicação no desenvolvimento do estudo. Obrigada pelos conselhos, pelos ensinamentos e por ser tão atenciosa.

À **Prof^a Dr^a Elisa Maria Giro**, professora do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por tantos momentos e ensinamentos compartilhados, pela dedicação e principalmente, pela maneira carinhosa com que sempre me tratou.

Às colegas de turma, que ficaram conhecidas como “uvinhas” **Maga, Thalita, Bia, Amandinha, Camila Fragelli, Natália e Luciana**, pela

convivência, pelas conversas e conselhos de cada uma e pelos bons momentos vividos.

Às colegas **Camila Fávero e Fernanda Basso**, que com muita paciência e dedicação me ensinaram e me apoiaram dentro do laboratório. Tiveram grande participação no desenvolvimento da minha pesquisa e na minha evolução como pesquisadora. Serei sempre grata por tudo que aprendi com elas.

Às amigas e companheiras de casa, **Ana Paula Dias Ribeiro e Mariana Carvalho Andrade** pelas conversas, conselhos, tanto no âmbito profissional como no pessoal. Com certeza, duas pessoas muito especiais!

AGRADECIMENTOS...

“A felicidade aparece para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam em suas vidas”.

Clarice Lispector

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, nas pessoas do atual diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla** e atual vice-diretora **Profa. Dra. Andreia Affonso Barretto Montandon**.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Coordenadora **Profa. Dra. Josimeri Hebling** e pelo Vice-coordenador **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**.

Aos **Professores do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos **colegas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais**, tanto os alunos de pós-graduação, como os de iniciação científica, e à técnica Juliana. Uma galerinha muito bacana que ajudou a tornar tudo mais fácil.

Aos colegas **Lilian Moriyama, Denis Jacomassi e Simone Fabiana Lante**, do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, que me ajudaram muito no desenvolvimento da pesquisa. Sempre dispostos a contribuir com o que podiam. Muito obrigada pelo apoio.

Ao **Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato** e a **Profa. Dra. Cristina Kurachi**, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo - USP, que proporcionaram uma parceria extremamente rica, a qual tornou possível a realização do meu estudo.

A todos os **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, que fizeram parte do meu dia a dia e me ajudaram nos pequenos detalhes.

À **FAPESP** por viabilizar o desenvolvimento da pesquisa, através dos auxílios 2009/03615-0 (Bolsa de Mestrado) e 2010/50798-0 (Auxílio Regular), proporcionando mais um sonho realizado.

A TODOS QUE COOPERARAM PARA A REALIZAÇÃO
DESTE SONHO E QUE SEMPRE ME APOIARAM, MEU SINCEROS
AGRADECIMENTOS...

FILHOS BRILHANTES ALUNOS FASCINANTES

- Bons filhos conhecem o prefácio da história de seus pais. Filhos brilhantes vão muito mais longe, conhecem os capítulos mais importantes das suas vidas.

- Bons jovens se preparam para o sucesso. Jovens brilhantes se preparam para as derrotas. Eles sabem que a vida é um contrato de risco e que não há caminhos sem acidentes.

- Bons jovens têm sonhos ou disciplina. Jovens brilhantes têm sonhos e disciplina. Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas, que nunca transformam seus sonhos em realidade, e disciplina sem sonhos produz servos, pessoas que executam ordens, que fazem tudo automaticamente e sem pensar.

- Bons alunos escondem certas intenções, mas alunos fascinantes são transparentes. Eles sabem que quem não é fiel à sua consciência tem uma dívida impagável consigo mesmo. Não querem, como alguns políticos, o sucesso a qualquer preço. Só querem o sucesso conquistado com suor, inteligência e transparência. Pois sabem que é melhor a verdade que dói do que a mentira que produz falso alívio. A grandeza de um ser humano não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe. O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz escolha, escreve sua própria história, constrói seus próprios caminhos.

- Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua. Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos

montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações.

- Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

- Uma pessoa inteligente aprende com os seus erros, uma pessoa sábia vai além, aprende com os erros dos outros, pois é uma grande observadora. Procurem um grande amor na vida e cultivem-no. Pois, sem amor, a vida se torna um rio sem nascente, um mar sem ondas, uma história sem aventura! Mas, nunca esqueçam, em primeiro lugar tenham um caso de amor consigo mesmos.

Augusto Cury

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3 PROPOSIÇÃO.....	76
4 MATERIAL E MÉTODO.....	78
5 RESULTADO.....	99
6 DISCUSSÃO.....	121
7 CONCLUSÃO.....	130
8 REFERÊNCIAS.....	132
9 ANEXOS.....	146

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial	GPx: glutadiona peroxidase
λ : comprimento de onda	HGF: fibroblasto de gengiva humana
Akt: proteína serina quinase	Hep-2: células derivadas de carcinoma de laringe humano
ALP: fosfatase alcalina	HFLUOR-DA: dihidro-fluoresceína diacetato
AP-1: proteína de ativação 1	HAL: halógena
ATP: trifosfato adenosina	HSP-25: proteína Heat shock 25
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro	HC: hidróxido de cálcio
bFGF: fator de crescimento de fibroblastos básico	HS68: fibroblastos derivados de pele humana
Balb/c 3T3: células derivadas do pulmão de rato	iPLA ₂ : fosfolipase A ₂ independente
cGMP: monofosfato guanosina cíclico	I: irradiância
cPLA ₂ : fosfolipase A ₂ citosólica	IFN γ : interferon gama
COX: cicloxigenase	IGF: fator de crescimento insulínico
CK: enzima creatina quinase	Ig: imunoglobulina
CIV: cimento de ionômero de vidro	IL: interleucina
CRP: proteína C-reativa	JNKs: Jun N-quinase terminal
CD: grupo de diferenciação	KGF: fator de crescimento de queratinócito
Col: colágeno	KCN: cianeto de potássio
DE: dose de energia	LED: diodo emissor de luz (light emitting diode)
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	LPLI: irradiação laser de baixa potência
ECM: matriz extracelular	LILT: terapia a laser de baixa potência
ERG: eletroretinograma	L929: linhagem imortalizada de fibroblastos de camundongo
eIF4E: fator de iniciação eucariótica 4E	MCF-7: células derivadas de carcinoma da mama humana
ERK: sinal extracelular regulado por proteína quinase	MTT: metil tetrazólio
FN: fibronectina	
GDNF: fator neurotrófico derivado da glia	

MDA: malonilaldeído

MDPC-23: células derivadas da papila de molar de camundongos

MEK; metil etil cetona

MMP-1: metaloproteinase da matriz 1

MET: microscópio eletrônico de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos

MTA: agregado de trióxido mineral

NO: óxido nítrico

NHEK: queratinócitos de pele humana (Normal Human Epidermal Keratinocytes)

OSC-2: células obtidas de carcinoma epidermóide oral humano

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2: prostaglandina;

PI3Ks: fosfatidilinositol 3-quinase

PT: proteína total

PDT: terapia fotodinâmica

PCR: reação em cadeia de polimerase

PAC: luz arco de plasma

PC12: células derivadas de feocromocitoma de rato

QTH: luz halógena de quartzo-tungstênio

ROS: espécie reativa de oxigênio

RT: transcriptase reversa

sPLA₂: fosfolipase A₂ secretada

SDH: enzima desidrogenase succínica

SFB: soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase

THP-1: monócitos humanos de leucemia

TGF: fator transformador de crescimento

TN: tenastina

Th2: T helper cells 2 (subtipo de célula T)

TNF: fator de necrose tumoral

TPKR: receptores da proteína tirosina quinase

TTX- tetrodotoxina

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular.

WI-38: células derivadas de pulmão de humano

Turrioni APS. Efeito transdentinário do LED em diferentes comprimentos de onda sobre células odontoblastóides [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011

RESUMO

Pesquisas recentes demonstraram que a irradiação transdentinária da polpa pode resultar em aumento na síntese de matriz de dentina e redução na resposta inflamatória local. Entretanto, os mecanismos que regem estes processos permanecem desconhecidos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar o efeito transdentinário do LED, em três comprimentos de onda (CO: 455nm, 630nm e 850nm) e duas doses de energia (DE: 4J/cm² e 25 J/cm²), sobre células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas em discos de dentina (molares humanos) com 0,2 mm de espessura. Foram realizadas análises do metabolismo celular (SDH), proteína total (PT) e fosfatase alcalina (ALP), através dos ensaios de MTT, Read Northcote e Ponto Final, respectivamente. O ensaio de RT-PCR foi aplicado para avaliação da expressão dos genes que codificam para colágeno tipo I (Col-1), fibronectina (FN) e fosfatase alcalina (ALP). Além disso, foi realizada a análise da morfologia celular em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para a produção de PT, os resultados não apontaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados e controle (Mann-Whitney, p>0,05). Entretanto, para o metabolismo celular, o grupo irradiado com LED no CO de 630 nm, na DE de 25 J/cm², obteve melhores resultados (aumento de 21,8 %), com diferença significativa quando comparado ao grupo controle (Mann-Whitney, p<0,05). Para a produção de fosfatase alcalina, houve aumento significativo pra todos os parâmetros utilizados (Mann-Whitney, p<0,05), com exceção da luz azul

na dose de 4 J/cm² (Mann-Whitney, p>0,05). Na análise por RT-PCR, houve maior expressão de Col-1 para o LED infravermelho na dose de 4 J/cm². Um maior número de células MDPC-23 com morfologia normal aderidas aos discos de dentina, semelhante ao grupo controle, foi observado após irradiação com 25 J/cm², quando comparado 4 J/cm², para todos os comprimentos de onda avaliados. De acordo com a metodologia empregada na presente pesquisa, foi possível concluir que a irradiação com LED proporcionou bioestimulação celular transdentinária, sendo que a resposta celular foi dose e comprimento de onda-dependente.

PALAVRAS – CHAVE: Fototerapia; luz; odontoblastos; dentina.

Turrioni APS. Transdental effect of LED irradiation in different wavelengths on odontoblast-like cells [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2011

ABSTRACT

Several studies have demonstrated that the transdental irradiation of dental pulp may increase the dentin matrix synthesis as well as decrease the local inflammatory reaction. However, the mechanisms that regulate these processes remain unknown. Therefore, the objective of this in vitro study was to investigate the transdental effect of LED irradiation at three different wavelengths ($\lambda = 455, 630$ and 850 nm) and two doses (4 J/cm^2 and 25 J/cm^2) on odontoblast-like cells seeded on 0.2 -mm-thick dentin disks obtained from sound human molars. Cell metabolism (MTT), alkaline phosphatase expression (ALP), total protein synthesis, and cell morphology (MEV) were evaluated. The expression of genes that encode for collagen type-1 (Col-1), fibronectin (FN) and alkaline phosphatase (ALP) was analyzed by RT-PCR. For total protein synthesis, the results showed no statistical difference among irradiated and control groups (Mann-Whitney test, $p > 0.05$). However, for cellular metabolism, the group irradiated with 630 nm LED (dose of 25 J/cm^2) showed better results ($21,8\%$ increase), with significant difference when compared to control group (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). For alkaline phosphatase activity, a significantly increase was observed for all parameters (Mann-Whitney test, $p < 0.05$), except for the blue light at a dose of 4 J/cm^2 (Mann-Whitney test, $p > 0.05$). RT-PCR showed a higher expression of Col-1 for the infrared LED at a dose of 4 J/cm^2 . A larger number of MDPC-23 cells with normal morphology adhered to the dentin discs was observed after

irradiation with 25 J/cm^2 when compared to 4 J/cm^2 , for all wavelengths evaluated. It may be concluded that LED irradiation was effective for transdental cell biostimulation and the cellular response was dose and wavelength-dependent.

KEY-WORDS: Phototherapy; light; odontoblasts; dentin.

1 INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

Na sexta semana de vida intra-uterina, o germe dentário começa a ser formado. Esse é um processo complexo que resulta na diferenciação de células, dentre elas os odontoblastos^{27,30}. Após a formação do dente, estas células típicas da polpa se organizam em mono-camada para revestir internamente a dentina coronária e radicular. Os odontoblastos possuem a capacidade de produzir uma matriz rica em colágeno, a qual é mineralizada para originar o tecido dentinário, responsável, particularmente, por proteger o tecido pulpar contra agressões de variadas origens³⁰. Entretanto, durante a evolução do processo carioso nos tecidos duros do dente, a polpa é agredida por bactérias e seus produtos, os quais se difundem através dos túbulos dentinários. Assim, tem início a modulação da atividade odontoblástica no sentido de estimular a formação de dentinária terciária. Dependendo da intensidade e duração do estímulo (agressão), pode haver a formação de um processo inflamatório no local, o qual, caso não seja interrompido, poderá culminar em necrose do tecido pulpar²⁷.

Desta maneira, os dentes comprometidos pelos processos cariosos recebem um preparo cavitário com o intuito de remover a grande concentração de bactérias presente na dentina infectada por cárie. Todavia, neste momento, o tecido pulpar apresenta um processo inflamatório evidentemente instalado, ao qual pode se somar agressões adicionais decorrentes do próprio preparo cavitário. A somatória de danos ao tecido pulpar pode resultar em dor e exacerbar a reação inflamatória neste tecido conjuntivo especializado. Assim, muitos produtos e técnicas de tratamento têm sido propostos com o objetivo de aliviar as dores de origem pulpar

e reduzir a evolução do processo inflamatório local. Dentre estes tratamentos está a laserterapia, cujos resultados são positivamente promissores⁸⁰.

Tem sido descrito, também, que o laser interage com diferentes tipos de tecido causando diversas reações celulares. Muitas pesquisas têm demonstrado que a foto-estimulação pelo laser de baixa intensidade (LILT) pode causar: aumento na síntese de ATP^{37,57}, efeito analgésico³⁷, aceleração da cura tecidual⁴⁵; e elevação da produção de ácido nucléico e da divisão celular⁴³. Alguns tipos específicos de laser apresentam, ainda, capacidade de estimulação da síntese e deposição de matriz de colágeno por fibroblastos^{61,67,68}, aumento na atividade mitocondrial no metabolismo³⁸ e proliferação celular⁴⁵. Também, foi demonstrado que o laser induz uma reação foto-química, ou seja, há uma direta indução na síntese de enzimas pela ação primária da luz nos lisossomos e mitocôndrias das células^{36,37}.

Há alguns anos, foi demonstrado que a aplicação do laser infravermelho em molares de rato induziu a síntese e deposição de dentina terciária, sem causar danos significantes ao tecido pulpar⁷⁷. Em seres humanos, a aplicação do laser vermelho sobre dentina do assoalho cavitário causou bioestimulação dos odontoblastos, resultando em aumento na síntese de colágeno tipo III, tenastina e fibronectina²⁷. Esta bioestimulação pulpar parece ocorrer devido à capacidade de propagação do laser através da dentina, a qual acontece por dispersão da luz através da microestrutura dos túbulos dentinários e dentina intertubular^{42,78,89}. Todavia, os possíveis mecanismos de resposta dessas células odontoblásticas, em nível molecular, frente à irradiação, ainda permanece indefinido^{40,41}.

Apesar das respostas positivas que a laserterapia tem proporcionado, esta técnica de tratamento apresenta algumas desvantagens em relação ao uso do LED (diodo emissor de luz), tais como: o alto custo de fabricação, a luz monocromática do laser, que inviabiliza a combinação de diferentes comprimentos de onda e o feixe de luz estreito do laser, que dificulta o tratamento de grandes áreas. Finalmente, tem sido demonstrado também, que o laser produz uma quantidade considerável de calor, o qual pode adquirir potencial para causar danos aos tecidos irradiados²⁴.

O LED é um diodo semicondutor que, quando energizado, produz luz visível de espectro limitado, em forma de eletroluminescência. Experimentos *in vitro*, utilizando LEDs com diferentes comprimentos de onda, demonstraram um significativo aumento da proliferação celular em uma variedade de linhagens celulares, como fibroblastos, osteoblastos, células musculares de ratos, células epiteliais humanas e células mesenquimais^{34,44,51,85}. Além de resultados em cultura celular, também foram relatados efeitos clínicos positivos decorrentes da irradiação LED^{8,46,55,62}.

Nos odontoblastos, os mecanismos de resposta frente à irradiação por lasers e LEDs não são totalmente conhecidos^{33,54,87}. Tem sido demonstrado que a fototerapia em cultura de células odontoblastóides promove bioestimulação celular, favorecendo a síntese e expressão de algumas proteínas específicas da matriz dentinária^{64,65}. Assim, pode-se especular que em situações *in vivo*, a bioestimulação dos odontoblastos poderia resultar na esclerose dos túbulos dentinários e/ou deposição de dentina terciária, fenômenos estes que protegem a

polpa contra agressões de diferentes origens e podem eliminar ou diminuir a sensibilidade dentinária.

Com a finalidade de observar e entender o metabolismo das células secretoras de matriz extracelular (ECM) na presença de substâncias sintéticas, biológicas ou estímulos externos, alguns pesquisadores desenvolveram modelos de estudo *in vitro* que mimetizam o funcionamento de tais células em situações fisiológicas^{30,43,58}. Destes modelos experimentais, os que têm maior reprodutibilidade de resultados e maior facilidade de manipulação são os de células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura^{2,20,31,58}. A linhagem imortalizada de células odontoblastóides MDPC-23 (Mouse Dental Papillae Cells), também apresenta características que permitem uma avaliação detalhada do efeito de fatores estimulantes (tal como o laser de baixa intensidade e proteínas bioativas), que podem sobre-regular sua atividade sintética e secretora^{63,64}. Estas células MDPC-23, estabelecidas por Hanks et al.³⁰, caracterizam uma linhagem proveniente da papila dentária do molar de camundongos, as quais apresentam características fenotípicas semelhantes aos odontoblastos *in vivo*, tais como: alta atividade de fosfatase alcalina, organização em múltiplos nódulos epitelióides, crescimento em multicamadas celulares e expressão de sialoproteína e fosfoforina da dentina. Tais células têm sido alvo de intensas pesquisas para avaliação do metabolismo quando submetidas a diferentes situações de estímulo biológico ou de estresse^{7,18,19,20,21,31,64,65,72}. Assim, baseado nos conhecimentos acima descritos, pode-se sugerir que os resultados clínicos positivos, relatados após aplicação da

fototerapia, poderiam estar relacionados com o estímulo transdentinário dos odontoblastos, os quais passariam a participar efetivamente do processo de reparo tecidual, por meio da síntese e expressão de algumas proteínas específicas da matriz dentinária. Todavia, os dados científicos que caracterizam a relação do LED com o aumento na atividade metabólica dos odontoblastos ainda não foram demonstrados.

2 REVISÃO DE LITERATURA



2 REVISÃO DE LITERATURA

Para facilitar a compreensão e o acompanhamento do texto, essa revisão abordou, individualmente, quatro aspectos: 1) principais estudos de revisão de literatura sobre fotobiomodulação; 2) ação da luz nas diversas culturas celulares; 3) estudos sobre a resposta pulpar frente aos diferentes estímulos e a propagação da luz pelo tecido dentinário; e 4) estudos *in vivo* sobre a ação bioestimuladora do LED.

2.1 A fotobiomodulação de tecidos

Desmet et al.²⁴ (2006) realizaram uma revisão de literatura apresentando estudos relacionados ao uso do LED vermelho e infravermelho-próximo (NIR LED) como terapia em diversos modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*. Primeiramente, foram abordadas pesquisas que procuraram elucidar o mecanismo de ação deste tipo de luz nos tecidos biológicos, ressaltando o papel da enzima citocromo c-oxidase. Esta enzima está localizada na membrana mitocondrial, e age como fotorreceptor e desencadeador de uma série de sinalizações, levando a produção de energia e proliferação celular. Os autores também discutiram os diversos efeitos positivos já relatados com a utilização do LED, como a aceleração do processo de cicatrização, prevenção de mucosite em pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia e no tratamento de doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer. Ainda foi relatado, nesta revisão, que a fotobiomodulação com LED atenua a toxicidade induzida pela dioxina, um solvente orgânico altamente tóxico e carcinogênico que está associado com alterações subletais na padronização morfológica do esqueleto e de variados órgãos, incluindo coração e

cérebro. Os resultados experimentais analisados demonstraram que o tratamento com LED estimula o metabolismo oxidativo mitocondrial *in vitro*, e acelera a reparação de células e tecidos *in vivo*. A luz vermelha e infravermelho-próxima representa uma intervenção terapêutica não invasiva no tratamento de inúmeras doenças ligadas à disfunção mitocondrial.

Barolet⁸ (2008), em sua revisão de literatura, relatou que a biomodulação, através da luz artificial, teve início nos anos 60, quando um médico húngaro realizou uma série de experimentos em ratos, com a finalidade de avaliar o potencial carcinogênico da irradiação através do laser de baixa intensidade no espectro vermelho ($\lambda=697$ nm). Como resultado, foi encontrado que a luz não provocou o aparecimento do câncer, mas sim estimulou o crescimento de pêlos na região que havia sido raspada para o propósito da pesquisa. Esta foi a primeira demonstração de biomodulação com luz artificial. Desde então, diversos tratamentos médicos utilizando a luz coerente e não coerente tem sido propostos. Ainda nesta revisão, o autor afirma que, para a luz exercer algum tipo de efeito sobre um sistema biológico, os fótons emitidos precisam ser absorvidos por um cromóforo ou fotorreceptor molecular, deste modo, a luz no comprimento de onda e dose apropriada, é absorvida por cromóforos como porfirinas, flavinas, e outras organelas capazes de absorverem a luz. O autor também abordou o mecanismo de ação do LED no interior da célula, através do fotorreceptor, que absorve os espectros vermelho e infravermelho-próximo, situado no final da cadeia respiratória, denominado citocromo c-oxidase. Além disso, foi discorrido sobre o grau de penetrância dos diferentes comprimentos, indicando que o comprimento

de onda infravermelho possui maior penetrância nos tecidos. O autor concluiu sua revisão, indicando que a terapia com luz de baixa intensidade permite o tratamento com ausência de dor ou efeitos colaterais e que pesquisas futuras devem focar na investigação específica da sinalização celular.

Gao, Xing²⁸ (2009), abordaram estudos que avaliaram os mecanismos moleculares de proliferação celular induzida pelo laser de baixa potência. Na revisão, foi relatado que as luzes vermelha e infravermelho-próxima podem conduzir a ativação de componentes da cadeia respiratória mitocondrial e dar início a uma cascata de sinalizações que promovem proliferação celular e citoproteção. Os autores ainda afirmaram que existem reações primárias e secundárias após a absorção da luz. As primárias estariam relacionadas à formação do oxigênio singlete, alterações na propriedade redox, produção de óxido nítrico, aquecimento local transitório e formação de ânion superóxido. As reações secundárias estariam relacionadas com vias de sinalização celular, incluindo a sinalização mitocondrial retrógrada. Há evidências de que o fotorreceptor primário para os comprimentos do vermelho ao infravermelho-próximo é a enzima citocromo c oxidase. A ativação deste fotorreceptor aumenta os níveis de respiração, ATP e ROS, sendo que estas mudanças bioquímicas levam a efeitos macroscópicos como aumento da proliferação celular e aceleração da cicatrização. Além disso, os autores discutiram a existência de fotorreceptores localizados no citoplasma denominados flavinas, que absorvem a luz azul e estão envolvidas com a produção de radicais livres. Para a luz verde, foram relatados os fotorreceptores citocromo b, c1 e c. Após a discussão sobre fotorreceptores, os

autores abordaram as diversas vias que podem estar relacionadas com a ação da luz nas células, como as vias TPKR/Ras/Raf/MEK/ERK/Mnk1/eIF4E/CiclinaD1, TPKR/PI3K/Akt/mTOR/eIF4E, $\Delta\Psi_m$ /ATP/cAMP/JNK/AP-1 e ROS/Src. Os autores ainda fizeram um apanhado das moléculas estimuladas pelo laser de baixa potência e o que cada modulação acarreta, por exemplo: 1- o estímulo de fatores de crescimento (BDNF, GDNF, bFGF, IGF-I, KGF, PDGF, TGF- β , VEGF) leva à diferenciação, proliferação e formação de nódulos mineralizados, 2- o aumento da produção de interleucinas (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-2, IL-4) leva à proliferação, migração e ativação imunológica, 3- o aumento da produção de citocinas inflamatórias (PGE2, COX-2, IL-1 β , TNF- α) levam à inibição da inflamação e 4- o aumento da produção de pequenas moléculas (ATP, cGMP, ROS, Ca²⁺, NO) leva a uma normalização da função celular, alívio da dor, cicatrização, mediação da atividade celular, migração e angiogênese. Os autores finalizaram relatando que existe um grande número de estudos avaliando a aplicação clínica da luz, porém há um número relativamente pequeno de pesquisas básicas. Atualmente, os comprimentos de onda, dose, tempo e condições adequadas de irradiação não estão bem estabelecidos.

AlGhamdi et al.³ (2011), realizaram uma revisão de literatura discutindo estudos que utilizaram o laser de baixa potência para estímulo da proliferação de células nas diferentes linhagens. Os autores relataram os efeitos benéficos da laserterapia em cultura, porém ressaltaram que a resposta a este tipo de luz é dose-dependente, podendo o laser estimular ou suprimir a proliferação celular. Os autores também discorreram acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no

estímulo da proliferação, ressaltando a cascata ativada por receptores de proteína tirosina quinase (TPKR). Um aspecto interessante abordado pelos autores foi referente à dose-resposta “bifásica” que o laser provoca, ou seja, estímulos fracos aceleram a atividade vital e estímulos mais fortes aumentam esta atividade ainda mais, porém, quando o pico é atingido, estímulos mais fortes suprimem esta atividade, até que uma resposta negativa é alcançada. Os autores ainda sugeriram alguns parâmetros para obter um efeito máximo de proliferação através da irradiação com laser de baixa intensidade, reportando que as células precisam estar em 20% de confluência no momento da irradiação e que o meio deve ser substituído por PBS, caso contrário o soro pode interferir nas reações durante a irradiação, além do procedimento precisar ser realizado no escuro. Segundo os autores, a maioria dos estudos sugere que a bioestimulação pelo laser ocorre nas fluências de 0,05 a 10 J/cm², enquanto que fluências acima deste valor assumem efeito bioinibitório.

2.2 Bioestimulação celular através da luz

Karu et al.³⁷ (1995) utilizaram o laser de HeNe, no comprimento de onda de 632 nm, na irradiação de células HeLa em suspensão. Os autores dosaram a quantidade de ATP produzida por diversos períodos, variando de 5 a 45 minutos após a irradiação. O pico de produção de ATP ocorreu no período de 20 minutos após a irradiação. Para a dosagem de ATP realizada em dias diferentes, sempre 20 minutos após a irradiação, o pico ocorreu aos 8 dias. A presente pesquisa demonstrou que a irradiação aumenta a quantidade de ATP, contudo os

mecanismos de ativação desta síntese pela luz não foi completamente elucidado. Foi sugerido que a irradiação ativa moléculas fotorreceptoras e por meio desta ativação o ATP é sintetizado. Os autores concluíram que diversos mecanismos podem ser ativados quando a célula é irradiada com laser HeNe no espectro vermelho.

Em 1996, Karu et al.³⁸, após irradiarem suspensão de células HeLa com laser HeNe, avaliaram a adesão célula-célula e célula-recipiente. A adesão célula-recipiente foi dependente do intervalo de tempo decorrido da irradiação, do comprimento de onda e da dose. Entretanto, quando o tempo foi fixado em 3 minutos após a irradiação e as doses e comprimentos foram variados, observou-se uma adesão ascendente na dose de energia de 50 J/m^2 para os comprimentos de onda de 620, 680, 750 e 830 nm. Quando a irradiação foi realizada no comprimento de onda de 632 nm com 100 J/m^2 , a adesão célula-célula aumentou no grupo irradiado, chegando ao limiar 30 minutos após a irradiação. Este processo de adesão é importante para o crescimento, diferenciação e morfogênese. Foi demonstrado que a irradiação monocromática com a luz visível foi capaz de alterar a adesão celular, tendo sido dependente da dose, comprimento de onda e tempo de avaliação após a irradiação.

Almeida-Lopes et al.⁴ (2001) avaliaram o efeito da laserterapia sobre cultura primária de fibroblastos gengivais, utilizando diferentes irradiâncias e uma mesma dose de energia. Os comprimentos de onda utilizados foram 670, 780, 692 e 786 nm, sendo que a dose de energia foi de 2 J/cm^2 . As células foram cultivadas por 12 horas antes da primeira irradiação e quatro irradiações foram aplicadas

com intervalos de 12 horas. Três amostras de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente, para contagem de células, 2, 4 e 6 dias após a primeira irradiação. O estudo foi dividido em dois momentos, sendo que no primeiro momento foi comparado o efeito do laser ($\lambda=670\text{nm}$, I: 1000 mW/cm^2 e $\lambda=780\text{nm}$, I: 5000 mW/cm^2) utilizando mesma dose de energia e diferentes irradiâncias e no segundo momento os lasers foram comparados ($\lambda=692\text{nm}$ e 786nm , I: 3000 mW/cm^2) utilizando mesma irradiância e mesma dose de energia. Além disso, os autores compararam células cultivadas em meio de cultura (DMEM) suplementado com 10% e 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) em todos os grupos testados (controle e irradiados). A análise de proliferação celular foi realizada através da contagem de células utilizando o teste Tryplan Blue. Em ambos os momentos, uma maior proliferação foi observada, em relação ao grupo controle, suplementado com 5% de SFB, para todos os comprimentos de onda testados. Os autores concluíram que a situação ideal para avaliar o efeito da luz sobre fibroblasto é a suplementação do meio com 5% de SFB e que os dois tipos de laser (visível e infravermelho) proporcionaram efeitos semelhantes na cultura celular quando utilizados com a mesma irradiância. O melhor resultado de proliferação foi encontrado para o comprimento de onda 780 nm.

Vinck et al.⁸¹ (2003) compararam os efeitos do laser e LED sobre cultura primária de fibroblastos obtidos de embriões de frango. As células foram semeadas em placas de 96 compartimentos (densidade: $7 \times 10^{490}\text{ cel/cm}^2$), incubadas por 24 horas e irradiadas antes que as células entrassem em confluência. No momento da irradiação, os autores aspiraram 75% do meio e

mantiveram o restante para evitar desidratação das células. A distância das fontes de luz em relação às amostras foi de 0,6 cm. Os parâmetros utilizados para a laserterapia, no comprimento de onda de 830 nm foram: irradiância de 200 mW/cm² e dose de energia de 1 J/cm². Já para as irradiações através dos diferentes comprimentos de onda do LED, os parâmetros foram: infravermelho: $\lambda= 950$ nm, I: 9 mW/cm² e DE: 0,53 J/cm², vermelho: $\lambda= 660$ nm, I: 4,5 mW/cm² e DE: 0,53 J/cm² e verde: $\lambda= 570$ nm, I: 0,55 mW/cm² e DE: 0,1 J/cm². As irradiações foram realizadas em três momentos distintos com intervalos de 24 horas. Foi avaliado o metabolismo celular através do teste de MTT após 24 e 72 horas da última irradiação. Os resultados apontaram que, após 24h da última irradiação, todos os grupos irradiados (Laser e LED) tiveram maiores valores da produção de SDH em relação ao grupo não irradiado, com diferença estatística. Já após 72 h, todos os grupos apresentaram diminuição do metabolismo em relação ao grupo controle, com exceção do LED infravermelho que não obteve diferença estatisticamente significativa. Os autores concluíram que os efeitos do LED e laser podem ser benéficos, porém, há a necessidade de investigações futuras sobre os efeitos da luz na bioestimulação e para oferecer parâmetros mais eficazes para a utilização da luz nos variados tipos de tratamentos.

Avaliando a resposta celular ao laser, Jia et al.³⁵ (2004) cultivaram condrócitos obtidos das articulações de coelho em diferentes concentrações de SFB. Os autores determinaram que a melhor condição para simular o estresse celular foi a adição de 2% de SFB ao meio de cultura. O laser utilizado foi o HeNe ($\lambda= 632$ nm), o qual foi posicionado a 24 mm de distância das células

cultivadas em placa petri. As densidades de energia avaliadas foram de 1,2,3,4,5 e 6 J/cm², as quais foram aplicadas 3 vezes sobre as células em cultura, com intervalos de 24 horas. Não houve alteração ou dano celular para nenhum dos parâmetros, sendo que as doses de 4,5 e 6 J/cm² apresentaram um maior crescimento celular. A quantidade de glicosaminoglicanos e de colágeno tipo II aumentou nos grupos irradiados. A presente pesquisa demonstrou que o laser pode estimular a proliferação celular, mas mediante a aplicação de parâmetros específicos.

Lewis et al.⁴² (2004) investigaram se a irradiação com luz azul provoca alterações na propriedade redox em cultura primária de queratinócitos (NHEK), monócitos (THP-1) e células tumorais (OSC-2). A fonte utilizada foi a luz halógena de quartzo-tungstênio (QTH) com comprimento de onda na faixa de 380 a 500 nm e doses de energia de 5 e 60 J/cm². Luzes PAC e laser também foram utilizadas, porém não foi informado os parâmetros para estas fontes de luz. Os testes utilizados foram MTT, quantificação de ROS, quantificação de anexina V (morte por apoptose) e análise de proteínas relacionadas ao metabolismo redox, sendo que em cada teste, uma densidade de semeadura foi utilizada. Para o MTT, as células foram semeadas ($1,5 \cdot 10^4$ cel/well - placa de 96 wells), irradiadas e avaliadas 24 horas após a irradiação. Para quantificação de ROS, as células foram semeadas (4×10^4 cel/cm²), irradiadas e avaliadas após 24 horas. Para marcação de anexina V, as células foram semeadas em uma densidade de 4×10^4 cel/cm², irradiadas, submetidas ao reagente por 24 horas e marcada com anexina após 24 e 48 horas. Finalmente, para quantificação de proteínas, as células foram semeadas

em densidade de 5×10^4 cel/mL, irradiadas e avaliadas após 24 horas. Para as células THP-1, o número de proteínas aumentou em mais de 200%. O nível de ROS foi aumentado nas células NHEK e OSC-2, quando irradiadas na dose de 15 J/cm^2 , porém os níveis foram maiores para as células tumorais (25%, $p < 0,05$). No metabolismo celular, as células NHEK e OSC-2 responderam diferentemente a irradiação azul, sendo que para os queratinócitos, o metabolismo aumentou em 20 a 30% para ambas as doses de energia testadas. Para as células tumorais, houve supressão em 80%, quando irradiadas com a dose de energia de 60 J/cm^2 ($p < 0,05$). Em adição, não foi identificado sinal de apoptose pela marcação de anexina V nas células epiteliais (NHEK). Pôde-se concluir que a os efeitos da luz azul são célula-dependentes e que, em queratinócitos a irradiação azul proporcionou efeitos benéficos.

Lockwood et al.⁵⁶ (2004), verificaram a geração de espécie reativa de oxigênio (ROS) através da irradiação com luz azul em células tumorais (OSC-2) e células epiteliais (queratinócitos - NHEK) em estado normal. As células foram semeadas em uma densidade de 1×10^4 cel/cm² e incubadas por 72 horas antes da irradiação. Para irradiação das células, foi utilizada uma luz azul halógena de quartzo-tungstênio (QTH), com comprimento de onda de 380-500 nm, irradiância de 550 mW/cm^2 e doses de energia de 3, 15 e 30 J/cm^2 . Os níveis de ROS foram avaliados duas horas após a irradiação. Um grupo controle positivo para formação de ROS era composto de células que foram expostas a 5 mM de diamida sem a irradiação. A avaliação de ROS foi feita através do corante fluorescente HFLUOR-DA. Os resultados demonstraram que a densidade de energia de 3

J/cm² não induziu geração de ROS em qualquer tipo celular (NHEK ou OSC-2), enquanto que a dose de 15 J/cm² induziu níveis de ROS, equivalentes ao controle diamida positivo, em ambos os tipos de células. Entretanto, a dose de 30 J/cm² causou uma diminuição expressiva nos níveis de ROS em células tumorais e elevou de forma significativa os níveis de ROS em queratinócitos. Concluiu-se que a produção de ROS intracelular é induzida pela luz azul, e que os níveis de ROS produzidas são dose e tipo de célula-dependentes.

Wong-Riley et al.⁸⁶ (2004) avaliaram se a ação do LED vermelho e infravermelho, sobre cultura primária de neurônios, seria reduzida na presença de um inibidor de citocromo c oxidase, denominado cianeto de potássio (KCN) ou de um inibidor de canais de sódio denominado tetrodotoxina (TTX). Os comprimentos de onda testados foram 670, 728, 770, 830 e 880 nm, na dose de 4 J/cm² e irradiância de 50 mW/cm². O estudo foi dividido em quatro partes. Na primeira, as células foram expostas a diferentes concentrações de KCN e irradiadas por cinco dias ($\lambda= 670\text{nm}$), duas vezes ao dia. A segunda parte testou a ação do pré-tratamento do LED antes da exposição das células ao KCN. Deste modo, as células foram irradiadas uma vez ao dia, durante três ou cinco dias, antes de serem expostas ao inibidor, durante cinco dias. Na terceira parte, células expostas a tetrodotoxina (TTX), uma neurotoxina inibidora de canais de sódio, durante seis dias, foram tratadas com LED em diferentes comprimentos de onda ($\lambda= 670, 728, 770, 830$ e 880 nm) no quinto e sexto dia de exposição a TTX, sendo que as irradiações foram realizadas uma vez ao dia. No quarto e último experimento, foi testado se a seqüência de comprimentos de onda, a intensidade

de energia, ou o número de tratamentos afetam a atividade do citocromo c oxidase em neurônios TTX intoxicados. Os testes realizados foram: ensaio de citocromo c oxidase, ensaio de conteúdo de ATP por bioluminescência, coloração do DNA do iodeto de propídio para detectar morte celular e densitometria óptica. Os resultados do experimento 1, demonstraram que a atividade de citocromo c oxidase e quantidade de ATP, diminuíram após intoxicação com KCN e o tratamento com LED 670 inverteu consideravelmente os efeitos da toxina em cultura primária de neurônios, quando as células foram expostas a baixas concentrações do inibidor. No experimento dois, o pré-tratamento com LED 670 nm melhorou significativamente o nível de citocromo c oxidase e reduziu morte celular, porém os valores foram inferiores ao grupo controle. O experimento três apontou que os comprimentos de onda de 670 nm e 830 nm foram mais eficazes na reversão dos efeitos deletérios da TTX. No experimento quatro, os resultados indicaram que todas as combinações de comprimento de onda testadas resultaram em níveis superiores de citocromo c oxidase quando comparados ao controle. Os autores concluíram que a enzima endógena mitocondrial, citocromo c oxidase, é um fotorreceptor biológico importante na fotobiomodulação pela luz vermelha e infravermelha.

Wataha et al.⁸⁴ (2004) investigaram o efeito da irradiação com luz azul na modelação e crescimento em diferentes tipos celulares de linhagem fibroblástica (Balb/c 3T3 - pulmão do rato, HGF – gengiva humana, WI-38- pulmão de humano) ou epiteliais (MCF-7- carcinoma da mama humana, OSC-2- carcinoma epidermóide oral humano, NHEK – queratinócitos de pele humana). As células

foram expostas a três tipos de fontes de luz: luz halógena de quartzo-tungstênio ($\lambda = 400$ e 500 nm, I: 556 mW/cm², DE: 60 J/cm²), luz arco de plasma ($\lambda = 400$ e 500 nm, I: 1690 mW/cm², DE: 60 J/cm²) e laser de argônio ($\lambda = 400$ e 500 nm, I: 202 mW/cm², DE: 5 J/cm²). As células foram semeadas em uma densidade de 12500 cel/cm² e incubadas por 24 horas até o momento da irradiação. Foram realizadas avaliações do metabolismo celular (MTT Assay) e Microscopia Eletrônica de Transmissão após 24, 48 e 72 horas da exposição à luz. A maior parte dos tipos celulares teve supressão da atividade de SDH independente da fonte de luz, entretanto, as células WI -38 (expostas à PAC) e células NHEK (expostas à QTH) aumentaram de 10 a 20% a atividade de SDH quando comparadas ao controle (não irradiado). O laser aumentou atividade de SDH em NHEK, WI-38 e HGF em 30%, 42% e 53%, respectivamente, em relação ao controle sem luz. Os aumentos para WI-38 e HGF foram significativos ($p < 0,05$). A Microscopia eletrônica de transmissão mostrou alterações apenas para os fibroblastos Balb/c, onde foram observadas distintas mudanças estruturais nas mitocôndrias após exposição à luz azul. Os autores concluíram que a irradiação com luz azul pode afetar a atividade de SDH de diferentes formas (dependendo do tipo celular) e que a luz azul pode ser útil como um modulador terapêutico no crescimento e sobrevivência celular.

Mais tarde em 2005, Vinck et al.⁸² utilizaram células de origem fibroblástica e avaliaram apenas o LED no comprimento de 570 nm (verde) – I: $0,5$ mW/cm² e DE: $0,1$ J/cm². Foram realizadas três irradiações diárias, sendo que a partir da primeira e após cada subsequente irradiação, o meio foi substituído por

um novo, suplementado com glicose, objetivando simular uma situação hiperglicêmica. O teste de viabilidade celular (MTT assay) foi realizado 24 h após a última irradiação. Como resultado, foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa no aumento do metabolismo para o grupo irradiado (6,8%) quando comparado ao grupo controle (não irradiado). Os autores concluíram que a luz verde dos diodos emissores de luz exerce efeito benéfico em células submetidas à condição hiperglicêmica.

Com o objetivo de investigar o efeito proliferativo do LED em cultura de células mesenquimais da medula óssea humana, Li et al.⁵⁰ (2006) utilizaram irradiação única, ou irradiações diárias por seis dias, no comprimento de onda de 630 nm, utilizando irradiâncias de 8,9; 13; 13,3 e 27,7 mW/cm², sendo que as doses de energia testadas foram 1,5 e 2,5 J/cm². As células foram semeadas nas densidades de 800, 1500 e 3500 cel/weel e incubadas por 24 horas antes da primeira irradiação. Foi avaliada a viabilidade celular (MTT), número de células (Azul de Metileno) e quantificação de células progenitoras do estroma (contagem de colônia de fibroblastos: CFU-F). A viabilidade celular aumentou, quando as células foram irradiadas na dose de 1,5 J/cm², tanto para irradiação única quanto para as irradiações diárias comparados ao grupo controle (não irradiado). Entretanto, a viabilidade celular foi maior no grupo que recebeu irradiações diárias. Em relação às CFU-F, os resultados foram melhores para as células submetidas a irradiações diárias na dose de 2,5 J/cm². Também foi encontrado que as células semeadas em menor densidade apresentaram melhores resultados quando irradiadas utilizando irradiância de 13,3 mW/cm² e células semeadas em

maior densidade obtiveram melhores resultados com irradiância de 8,9 mW/cm². Os autores concluíram que o crescimento celular através da irradiação vermelha pode estar relacionado com a densidade de células no momento do plantio e que menores irradiâncias possuem maior efeito no estímulo da proliferação celular quando comparadas a irradiâncias altas.

Com o objetivo de avaliar os efeitos biológicos da luz azul emitida por dois tipos de fotopolimerizadores (arco de plasma - PAC e diodo emissor de luz-LED) em fibroblastos de gengiva humana, Gritsch et al.²⁹ (2007) dividiram as células em três grupos: células não irradiadas, células expostas a PAC e células expostas ao LED. 24 horas após o plaqueamento (13500 cel/cm²), as células foram expostas aos dois tipos de luz, com comprimento de onda na faixa de 400-500 nm. As irradiações foram realizadas de acordo com o tempo indicado pelo fabricante de cada fotopolimerizador. Deste modo os parâmetros utilizados para o PAC foram I: 488 mW/cm² e DE: 5,86 J/cm² e para o LED I: 140 mW/cm² e DE: 9,62 J/cm². Os efeitos biológicos foram avaliados 2, 24, 48 e 72 h após a exposição à luz através dos testes MTT e avaliação da morfologia celular (MEV). Os resultados mostraram que a atividade mitocondrial aumentou significativamente nas células expostas ao PAC e LED (45%, p<0,0001 e 9% p<0,05 respectivamente), 72 horas após a exposição, sendo que não houve alterações morfológicas entre os grupos irradiados ou não. Conclui-se que as células expostas à luz azul apresentaram aumento da atividade mitocondrial em relação às células não expostas, principalmente, àquelas expostas à luz PAC.

Brondon et al.¹² (2007) avaliaram o efeito da melanina na fotobiomodulação pelo LED 670 nm em cultura de células epiteliais humanas (Hep-2) e fibroblastos de camundongos (L-929). Para o estudo, foram confeccionados quatro filtros com diferentes concentrações de melanina, estes filtros eram colocados sobre a cultura de células no momento das irradiações. O protocolo de irradiação utilizado foi de dez irradiações diárias, na dose de 5 J/cm² e irradiância de 5 mW/cm². Foi avaliada viabilidade celular pelo teste de MTT e a proliferação celular através do kit CyQUANT NF®, que determina os resultados com base no conteúdo de DNA da amostra. Foi observado que as células irradiadas com filtro sem melanina obtiveram maior proliferação, sendo que os resultados foram piores para maiores concentrações de melanina. Os autores concluíram que a pigmentação da pele é um fator que pode alterar a resposta do tecido frente à fototerapia com LED vermelho.

Ainda em 2007, Higuchi et al.³² avaliaram a ação do LED ($\lambda = 455, 470, 525, 600, 630, 880$ e 945 nm) na formação de neuritos por células PC12, uma linhagem derivadas da medula espinhal de ratos utilizada como modelo para diferenciação neuronal. As células foram cultivadas em uma densidade de 2x10⁴ cel/cm², sendo que após dois dias de cultivo, foi aplicado o meio para diferenciação e realizado o protocolo de irradiação celular. A formação de neuritos foi identificada através de análise em microscópio de luz invertida. Como resultado, ocorreu uma maior formação de neuritos para as células irradiadas com LED no comprimento de onda de 470 nm. Deste modo, os autores concluíram que

a luz azul pode ser a responsável pelo estímulo da diferenciação neuronal em células PC12.

Huang et al.³⁴ (2007), observaram o efeito combinatório da fotoirradiação do LED e Cu-GHK em fibroblastos humanos (HS68). Cu-GHK é um peptídeo encontrado em sangue, saliva e urina, relatado como um importante agente envolvido no processo de cicatrização de feridas. As células foram semeadas em uma densidade de 15000 cel/cm² e mantidas em incubadora 24 horas antes da irradiação. Os parâmetros de irradiação utilizados foram $\lambda= 630\text{nm}$, I: 3 mW/cm², nas doses de 1 e 2 J/cm² e as avaliações foram feitas após um ou três dias da irradiação. Foi realizada a análise de viabilidade celular (AlamarBlue assay), expressão de colágeno tipo I pela técnica RT-PCR e a medição do nível de fatores de crescimento (bFGF) em ELISA. A irradiação com 1 J/cm² proporcionou melhores resultados no aumento da viabilidade para ambos os momentos de avaliação (1 e 3 dias). Sendo que a combinação da irradiação com Cu-GHK foi ainda mais favorável para o aumento da viabilidade nos fibroblastos. Em relação à expressão de colágeno tipo I, a irradiação com 2 J/cm² aumentou em 153% seu nível quando comparado ao grupo controle (não irradiado). Para a combinação de doses de energia e Cu-GHK, o melhor resultado foi obtido para a dose de 1 J/cm², após três dias da irradiação (aumento em 88% na viabilidade, $p<0,01$). Além disso, a combinação 1J/ Cu-GHK proporcionou aumento de 212% na formação de fatores de crescimento quando comparado ao grupo não irradiado. Os autores concluíram que diversos efeitos benéficos, relacionados à síntese de colágeno e

proliferação celular, podem ser obtidos através da combinação do LED vermelho e Cu-GHK.

Procurando avaliar a ação anti-inflamatória do LED vermelho, Lim et al.⁵³ (2007) compararam os efeitos da irradiação do LED 635 nm com a ação de inibidores de COX já conhecidos. O estudo avaliou os efeitos de ambos os tratamentos em cultura primária de fibroblastos da gengiva humana (hGFs). A irradiância utilizada foi 1 mW/cm², sendo que os autores não informaram a dose de energia testada. Após seis horas dos tratamentos, a expressão de genes que codificam para COX-1, COX-2, SOD-1, SOD-2, GPX, Catalase, cPLA₂, sPLA₂ e iPLA₂ foram avaliadas por qPCR. Também foi realizada uma análise em Western Blot para marcação de IgG, além da avaliação das amostras em citometria de fluxo e análise em microscópio confocal para detecção de espécie reativa de oxigênio (ROS). Após 24 horas dos tratamentos, a peroxidação lipídica foi avaliada através do método colorimétrico MDA. Os resultados mostraram que tanto a irradiação com LED 635 nm quanto a aplicação de inibidores de COX inibiram a expressão de COX e PGE₂. Diferentemente da endometacina e ibuprofeno, a irradiação LED levou a uma diminuição nos níveis e ROS, cPLA₂ (fosfolipase A₂ citosólica) e sPLA₂ (fosfolipase A₂ secretada). Como conclusão, os autores sugeriram que a irradiação com LED vermelho pode inibir a síntese de PGE₂, podendo ser útil como antiinflamatório.

Taoufik et al.⁷⁶ (2008) investigaram o efeito da exposição à luz azul, de diferentes fontes, para fotopolimerização sobre a proliferação de fibroblastos de gengiva humana. Para isto, as células foram semeadas e 24 horas após, o meio foi

aspirado e substituído por solução de PBS, no intuito de eliminar interferência do meio colorido (DMEM) durante a irradiação. As fontes de luz testadas foram: luz halógena (HAL) com irradiância de 750 mW/cm^2 e DE: 186 J/cm^2 , LED com irradiância de 900 mW/cm^2 e DE: 162 J/cm^2 e arco de plasma (PAC) com irradiância de 2000 mW/cm^2 e DE: 240 J/cm^2 , simulando os tempos para colocação de banda ortodôntica. Um grupo controle positivo foi utilizado expondo as células a 10 Gy de irradiação gama utilizando Cobalto 60 como fonte de luz. Os testes realizados foram a análise da quantidade de DNA, imunohistoquímica (para avaliar danos ao DNA 24 horas pós-irradiação) e contagem de fibroblastos até 7 dias após irradiação. O teste de expressão de DNA indicou uma inibição da síntese apenas para a radiação gama, como esperado. Para as demais fontes de luz não foi detectado efeito inibitório. Porém, foi observado diminuição na proliferação de fibroblastos, sete dias após a irradiação, para os grupos irradiados (40%, $p < 0,05$), quando comparados ao grupo controle. Nas condições do estudo, a exposição dos fibroblastos a luz azul não proporcionou prisão imediata do ciclo celular e sim, uma inibição em longo prazo da proliferação. Assim, os autores concluíram que mais estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos subjacentes a este efeito.

Oliveira et al.⁶⁵ (2008) avaliaram o efeito da irradiação através do laser de baixa potência no metabolismo celular, produção de fosfatase alcalina e síntese de proteína total em células odontoblastóides MDPC-23. As células foram semeadas em uma densidade de 15000 cel/cm^2 e incubadas por 48 horas. Em seguida, as células foram expostas ao meio (DMEM) sem soro fetal bovino para indução de

estresse. Após 12 horas as células foram submetidas ao protocolo de irradiação. Os parâmetros utilizados na pesquisa foram $\lambda = 830$ nm, DE: $0,32$ J/cm² e I: $9,3$ mW/cm², sendo que foram realizadas 6 irradiações com intervalo de 12 horas, durante 3 dias consecutivos. Os testes foram aplicados três horas após a última irradiação, sendo que foram avaliados o metabolismo celular (MTT Assay), dosagem de proteína total (protocolo Read & Northcote), atividade de fosfatase alcalina (Kit ALP) e RT-PCR para colágeno tipo I e fibronectina. Os resultados de MTT e proteína total não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$) em relação ao grupo não irradiado, já a produção de fosfatase alcalina foi menor no grupo irradiado ($60,8\%$, $p < 0,05$). A irradiação, nos parâmetros citados, também não interferiu na expressão de fibronectina e colágeno tipo I ($p > 0,05$). Deste modo, os autores concluíram que, os parâmetros do laser, utilizados no estudo, não foram suficientes para bioestimular a expressão específica de proteínas e que a dose utilizada provocou uma diminuição nos níveis de fosfatase alcalina.

Ying et al.⁸⁸ (2008) realizaram pré-tratamento com LED (670 nm) próximo ao infravermelho, em cultura primária de neurônios intoxicados com rotenona e MMP⁺ (inibidores do complexo 1 mitocondrial). Os parâmetros de irradiação foram: irradiância de 50 mW/cm² e dose de energia de 4 J/cm². As células foram pré-tratadas com LED duas vezes ao dia, por dois dias antes de serem expostas aos inibidores. Foi realizada análise em microscópio de fluorescência e os níveis de ATP foram avaliados por teste de bioluminescência. O pré-tratamento com LED diminuiu o número de células apoptóticas em $41,42\%$ em células expostas a rotenona e $47,26\%$ em células expostas a MMP⁺. Além

disso, o nível de ATP aumentou quando as células foram submetidas ao pré-tratamento. Deste modo, os autores concluíram que o pré-tratamento com LED 670 nm diminuiu o nível de morte celular dos neurônios, provavelmente pelo aumento de ATP e diminuição de espécie reativa de oxigênio (ROS).

Kim et al.⁴⁴ (2009) observaram a ação do LED 647 nm na diferenciação osteogênica de células mesenquimais. Para isto, as células foram semeadas na densidade de 1×10^4 cel/cm² e mantidas em cultura por 3 dias. Após o terceiro dia (80% de confluência), as células entraram em contato com um meio de diferenciação osteogênica (ODM) e assim permaneceram por mais três dias. Após o terceiro dia em ODM, foi realizada a irradiação (I: 9.29 mW/cm², DE: 0.093, 0.279 e 0.836 J/cm²), sendo que após 48 horas as células foram avaliadas. Os testes utilizados foram MTT, Kit de fosfatase alcalina, Vermelho de Alizarin, RT-PCR para osteocalcina, colágeno tipo I, osteopontina e Runx 2. Além da avaliação de deposição de cálcio através da análise em microscópio eletrônico. Também foi feita citometria de fluxo com marcadores de diferenciação celular (CD44 e CD45). O teste vermelho de Alizarin indicou um aumento na intensidade dos nódulos em 224%, 235% e 231% para as doses de 0.093 J, 0.279 J e 0.836 J/cm² respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos irradiados e não irradiados na viabilidade celular. Porém, para a atividade de fosfatase alcalina houve aumento de 109%, 139% e 99% nas doses de 0.093 J, 0.279 J e 0.836 J/cm² respectivamente. A expressão de mRNA de todos os genes avaliados aumentou significativamente, sendo que a dose de 0.279 J/cm² obteve melhores resultados.

Os autores concluíram que a irradiação do LED estimulou a diferenciação celular e promoveu efeitos benéficos para estas células de linhagem osteogênica.

Barolet et al.⁹ (2009) utilizaram um modelo de cultura 3D (fibroblastos humanos e queratinócitos) para reproduzir o tecido da pele humana (HRS) e submeteram estas células à irradiação LED 660 nm objetivando verificar a produção de colágeno tipo I e MMP-1 (metaloproteinase da matriz 1). Os parâmetros utilizados na irradiação foram irradiância de 50 mW/cm² e dose de energia de 4 J/cm². Foram realizadas onze irradiações no período de quatro semanas. Como resultados, detectou-se um aumento no nível de colágeno tipo I (31%) e uma diminuição nos níveis de MMP-1 (-18%) para as células tratadas com LED em relação ao grupo controle (não irradiado). Concluiu-se que a terapia com LED inverteu os efeitos de diminuição do colágeno e aumento de MMP-1. Isto poderia explicar a melhora na aparência da pele observada em indivíduos tratados com LED. Os achados sugerem que o LED 660 nm é uma forma segura e eficaz para aumentar a produção de colágeno.

Ankri et al.⁶ (2010) irradiaram cultura de células endoteliais e espermatozoides bovinos com luz visível de banda larga (400-800nm) e avaliaram a formação de óxido nítrico (ON) por estas células. Os autores relatam que o ON é um mensageiro biológico importante, participando de vários eventos de modulação no organismo como cicatrização de feridas e movimentação de espermatozoides. Antes do protocolo de irradiação, as células foram divididas em dois grupos: as que foram mantidas em meio com condições normais (sem estresse) e as que foram mantidas em meio com ausência de Ca⁺² e Mg⁺²

(condição de estresse). Foram avaliadas especificamente duas bandas: a azul (400-500 nm) com irradiância de 78 mW/cm^2 e a vermelha (600- 800 nm) com irradiância de 200 mW/cm^2 , sendo que a irradiação foi realizada em um único momento. Os níveis de óxido nítrico foram avaliados através do método colorimétrico de Griess, imediatamente, 1 e 3 horas após a irradiação. Como resultado, observou-se que as células submetidas à condição de estresse e irradiadas apresentaram maior formação de ON em relação ao grupo controle (submetido ao estresse, porém sem irradiação). Além disso, observou-se uma maior formação de ON através da irradiação com luz azul quando comparado à luz vermelha. O melhor tempo de avaliação pós-irradiação para níveis de ON foi de 3 horas. Os autores concluíram que a luz visível estimulou a produção de ON pelas células endoteliais e espermatozóides, sendo que a luz azul foi mais efetiva que a luz vermelha. Além disso, relataram que o ON pode estar envolvido com a fotomodulação.

Em 2010, Oliveira et al.⁶³ avaliaram ação do laser de baixa intensidade sobre o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23, utilizando variadas doses de energia sobre condições normais ou sobre estresse nutricional. As células foram semeadas na concentração de $2 \times 10^4 \text{ cel/cm}^2$ e mantidas em incubadora por 24 horas. Posteriormente, as células foram expostas ao meio (DMEM) com 5% de Soro Fetal Bovino (simulando uma condição de estresse nutricional) ou 10% (condição normal). As células foram expostas aos respectivos meios (durante 24 horas) e então submetidas ao protocolo de irradiação. Os parâmetros utilizados foram $\lambda = 808 \text{ nm}$, DE: 1,5, 5 e 19 J/cm^2 e I: 35 mW/cm^2 , sendo que foram

realizadas três irradiações diárias. Após 24 horas da última irradiação, as células foram avaliadas. Foram realizados testes de metabolismo celular (MTT Assay) e análise da morfologia em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi encontrado que o metabolismo celular foi maior para o grupo exposto a condições normais (10% SFB) quando comparados com o grupo exposto a condição de estresse (5% SFB), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Quando diferentes doses foram comparadas, para a concentração de 5% de SFB, foi observado que a dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$ gerou os melhores valores de atividade da SDH (enzima desidrogenase succínica) e a dose de 19 J/cm^2 gerou os menores valores, sendo que houve diferença estatística quando os dois grupos foram comparados ($p < 0,05$). Na análise da morfologia celular, não foi observado alterações morfológicas entre os grupos irradiados e não irradiados (controle). Pôde-se concluir que a dose de $1,5 \text{ J/cm}^2$ proporcionou um aumento do metabolismo celular em células submetidas à deficiência nutricional.

Li et al.⁵¹ (2010) investigaram os efeitos sobre a proliferação e a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de rato, utilizando irradiação com luz vermelha ($\lambda = 630 \text{ nm}$) de diodos emissores de luz (LED). Para o experimento, as células foram semeadas em baixa densidade (100 cel/cm^2) e alta densidade (1000 cel/cm^2) e após 24 horas de cultura foi realizado o protocolo de irradiação (I: 5 e 15 mW/cm^2 , DE: 2 e 4 J/cm^2). As irradiações foram feitas em um único momento (avaliadas diariamente pelo período de 9 dias) ou em 13 irradiações diárias, sendo que as avaliações eram feitas todos os dias após a primeira irradiação. Foram realizados testes de contagem celular (corante Liu's

stain), formação de colônia (CFU-F), análise da produção de ATP e de diferenciação celular (através da expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina). Os resultados apontaram que para a proliferação celular, o melhor tempo de avaliação para irradiação única foi três dias após, o qual apontou diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados e controle, sendo que a dose de 4 J/cm^2 obteve melhores resultados em ambas irradiâncias, neste mesmo protocolo de irradiação, os demais dias de avaliação (5º, 7º e 9º dia) apontaram o grupo controle obtendo melhores resultados. Já para o protocolo de irradiações múltiplas, houve aumento de proliferação estatisticamente significativa para todos os dias após a primeira irradiação, com aumento gradativo de proliferação até o último dia, sendo que a melhor dose foi de 4 J/cm^2 , com irradiância de 15 mW/cm^2 . Para a expressão de ALP e osteocalcina, houve aumento significativo para os grupo irradiados com 4 J/cm^2 quando comparados ao controle. Células semeadas em menor densidade (100 cel/cm^2) apresentaram maior proliferação. O estudo indicou que a proliferação e o potencial osteogênico das células tronco são realçados por exposições múltiplas do LED 630 nm. Além disto, o aumento no crescimento celular é dependente da densidade de plaqueamento. Os parâmetros ótimos estimulantes foram 15 mW/cm^2 e 4 J/cm^2 .

Neupane et al.⁶² (2010) avaliaram a eficácia da terapia fotodinâmica (PDT), utilizando irradiação com diodos emissores de luz (LED), em cultura primária de linfócitos, para o tratamento de artrite reumatóide. Em um primeiro momento, foram obtidas amostras de pele e músculo de cabra e frango, possuindo diferentes espessuras, para que fosse possível a avaliação de penetrância dos

diferentes comprimentos de onda (vermelho - 660 nm, branco - 450 e 550 nm, amarelo - 590 nm e infravermelho - 850 nm) do LED nos tecidos. Em adição, foi realizada uma cultura primária de linfócitos, para serem testados diferentes tipos de tratamentos: células irradiadas com LED infravermelho (850 nm), células irradiadas com LED infravermelho e expostas ao metotrexato (fotossensibilizador), células expostas apenas ao metotrexato e células que não foram expostas à luz e ao fotossensibilizador. Durante os cinco dias de incubação os linfócitos foram contados em câmara de Neubauer diariamente, sendo que a diferença de contagem inicial e a final revelou o efeito da PDT nas células. Como resultados, para o estudo de penetrância, pôde-se observar que a penetrância da luz nos tecidos foi diretamente proporcional ao comprimento de onda utilizado, ou seja, quanto maior o comprimento de onda, maior foi a penetrância da luz no tecido. Para o estudo em cultura, o melhor resultado foi encontrado nas células que receberam irradiação e foram expostas ao fotossensibilizador (diminuição no número de células em 90%). Os autores concluíram que a PDT com LED infravermelho apresenta uma solução de tratamento eficaz e barata para a artrite reumatóide.

Oliveira et al.⁶⁴ (2011) avaliaram o ação do laser em células odontoblastóides MDPC-23, utilizando diferentes doses de energia. Para o estudo, as células foram semeadas em uma densidade de 2×10^4 cel/cm², e mantidas em incubadora por 24 horas. Posteriormente, as células foram expostas a diferentes condições nutricionais (2, 5 ou 10% de soro fetal bovino) por 24 horas. Os parâmetros de irradiação foi comprimento de onda de 780 nm, doses de energia de

2, 4, 10, 15 e 25 J/cm², com irradiância de 20 mW/cm². As células foram submetidas a três irradiações diárias e as células foram avaliadas após um período de 3 ou 72 horas da última irradiação. Os testes aplicados foram MTT, atividade de fosfatase alcalina (kit ALP), dosagem de proteína total (protocolo Read-Northcote) e análise em microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que houve maiores valores para o tempo de 72 horas quando comparado ao tempo de 3 horas após a última irradiação para todos os testes. Em relação ao MTT, para a concentração de 2%, os grupos tratados com 2 e 10 J/cm² apresentaram maiores valores de MTT quando comparados ao grupo não irradiado ($p < 0,05$). Na análise de produção de fosfatase alcalina, para todas as concentrações, as doses de 2,15 e 25 J/cm² apresentaram maiores valores quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Na análise da morfologia, foi observado um maior número de células recobrando a lamínula de vidro após irradiação com 15 J/cm². Foi concluído que o laser de baixa potência, nos parâmetros utilizados, estimularam atividade metabólica de células MDPC-23, especialmente nas doses de 15 e 25 J/cm².

2.3 Resposta pulpar frente aos diferentes estímulos e a propagação da luz pelo tecido dentinário

Vaarkamp et al.⁷⁹ (1995) investigaram a propagação da luz emitida por laser em esmalte e dentina humano. No estudo, cubos de 0,85 mm de espessura (sentido mesio/disto - pulpar) e altura variando de 2,5 a 5 mm (sentido cérvico-oclusal), contendo esmalte ou dentina, foram obtidos das proximais de pré-molares. As amostras foram irradiadas utilizando um laser HeNe (630 nm) com

potência de 5mW, sendo que, no caso do tecido dentinário, as amostras foram irradiadas perpendicularmente a superfície proximal (na direção do longo eixo dos túbulos dentinários). Para a detecção da luz, foi utilizado um sensor que rotacionava em torno do cubo de dentina a fim de medir a transmissão da luz em diferentes ângulos da amostra. Os resultados apontaram que a intensidade de luz foi maior quando o sensor também se localizava na direção do longo eixo dos túbulos, demonstrando a característica anisotrópica do tecido e sugerindo que os túbulos dentinários são elementos predominantes no espalhamento da luz, confirmando a teoria de fibra ótica para o espalhamento da luz em dentina.

Bergenholtz¹¹ (2000) revisou estudos abordando a resposta pulpar frente às diversas agressões. O autor iniciou o trabalho discutindo a reação pulpar frente aos procedimentos restauradores utilizando resina composta, relatando que a injúria a polpa pode ser causada, pelo trauma durante o preparo cavitário, pelos componentes dos materiais resinosos que apresentam alta toxicidade ou pela influência direta de organismos bacterianos que podem se infiltrar pela periferia das restaurações. Ainda é citado, que a presença de barreira de dentina, mesmo que fina é mais favorável a sobrevivência pulpar. Os testes de compatibilidade de reparação pulpar a materiais e técnicas demonstraram capacidade de cura pela polpa saudável no período de três meses. Estudos experimentais em primatas mostraram que, enquanto a reação inflamatória de natureza aguda predominou após 8 dias, amostras de tecido de 3 meses indicaram presença de dentina reparadora subjacente à cavidade. Além disso, o autor sugeriu o forramento da

cavidade, com materiais biocompatíveis, como forma de proteção às possíveis injúrias dos materiais restauradores.

Zolotarev, Grisimov⁸⁹ (2001), utilizaram o método de polarização óptica para estudar a distribuição dos túbulos dentinários na dentina humana. Neste estudo os autores abordaram, num primeiro momento, as propriedades físicas e estruturais do esmalte e dentina humana. Especificamente em relação ao tecido dentinário, é descrito que este possui uma estrutura complexa composta de matriz orgânica baseada em colágeno, minerais (principalmente cristais de hidroxiapatita) e túbulos permeando todo o volume do tecido. Para o experimento, foram preparadas amostras verticais e horizontais de dente humano medindo 0,2 a 1 mm de espessura, sendo que para análise destas amostras foi utilizado um dispositivo polarimétrico que gerava imagens para análise qualitativa. Foi encontrado que: a luz se propaga ao longo dos túbulos, pela dentina peritubular com um alto índice de refração, os túbulos são desproporcionalmente distribuídos sobre a dentina coronária, os prismas do esmalte são opticamente anisotrópicos devido ao alinhamento dos cristais de hidroxiapatita no interior dos prismas e que as propriedades ópticas de um dente como um todo são determinada pela sua arquitetura, ou seja, depende especificamente da distribuição dos túbulos ao longo da dentina.

Posteriormente, em 2006, Kienle et al.⁴² examinaram a hipótese de que o efeito de ampliação e diminuição da imagem pela dentina é causado devido ao espalhamento múltiplo da luz pelos túbulos e não por efeitos de fibra óptica ou guia de onda. Para o estudo, seis discos de dentina humana, medindo 1 e 3 mm de

espessura foram submetidos a avaliações qualitativas e quantitativas. Para a avaliação qualitativa, um disco de 1 mm foi colocado em uma superfície contendo desenho em forma de grade e posteriormente iluminado por uma fonte de luz branca (lâmpada de Xe), sendo que foram obtidas imagens tanto na direção ocluso-pulpar quanto na direção pulpo-oclusal. Para a avaliação quantitativa, foram utilizadas três vigas colineares de laser HeNe (630 nm), além de ser empregado o método de Monte Carlo para uma análise mais específica da propagação da luz no tecido. As vigas foram alinhadas em fileira com espaçamento de 2 mm entre elas e imagens foram obtidas através de uma câmera fotográfica. Na análise qualitativa, foram geradas imagens iguais para todos os discos, sendo que o sentido pulpo-oclusal provocou diminuição da imagem e o sentido ocluso-pulpar gerou uma imagem aumentada. Um dado interessante encontrado com a utilização das vigas de laser foi que, nas imagens formadas, os lasers já não se encontravam em linha reta, devido à heterogeneidade dos cursos dos túbulos. Através da análise de Monte Carlo, foi observado que a luz se propaga como em um cone em um longo cilindro, sendo que parte da luz é refletida na parede tubular e parte se propaga para a dentina intertubular adjacente. Os autores ressaltaram que a compreensão da óptica do tecido dentário tem um forte impacto sobre uma variedade de aplicações de luz na odontologia como, por exemplo, para detecção de cárie baseado em fluorescência, métodos tomográficos de transluminação e para estudos da bioestimulação pulpar utilizando a irradiação.

Ferreira et al.²⁷ (2006) investigaram o efeito bioestimulatório do laser em células pulpares na dentinogênese reacional e a expressão de colágeno tipo III,

tenastina e fibronectina em tecido dental irradiado ou não. Neste estudo, 16 dentes pré-molares humanos, com indicação de exodontia por motivos ortodônticos, foram selecionados em quatro indivíduos com idade de 11 a 14 anos. Os indivíduos foram subdivididos em grupos irradiados e controle (não irradiado). Os dentes receberam preparo de cavidade classe V em ambos os grupos. A preparação foi padronizada, utilizando uma profundidade de 2 mm, extensão cérvico-oclusal de 2 mm, e largura mesio-distal de 5 mm de área. Os parâmetros de irradiação consistiram em um comprimento de onda de 670 nm, irradiância de 100 mW/cm² e dose de energia de 4 J/cm² a uma distância de 1 mm da superfície da cavidade. Finalmente, as cavidades de ambos os grupos foram restaurados com cimento de ionômero de vidro. As exodontias foram realizadas 14 e 42 dias após o preparo cavitário. As amostras foram preparadas para análise histológica e imunohistoquímica. As alterações histológicas foram observadas por microscopia de luz, uma reação inflamatória menos intensa foi encontrada no grupo irradiado quando comparados aos controles. Apenas o grupo irradiado de 42 dias exibiu uma área associada com dentinogênese reacional. Após a análise imunohistoquímica, a expressão de Col III, TN e FN foi maior no grupo irradiado. Os resultados sugeriram que o laser com densidade de energia de 4 J/cm² e comprimento de onda de 670 nm causa biomodulação de células da polpa e da expressão de colágeno após o preparo de uma cavidade

Tate et al.⁷⁷ (2006) avaliaram os efeitos da irradiação laser em odontoblastos, utilizando imunohistoquímica pela proteína de choque térmico (HSP-25). Para o estudo, a superfície mesial do primeiro molar superior direito de

ratos foi irradiada com laser GaAIAs ($\lambda = 810\text{nm}$), sendo que o primeiro molar superior esquerdo foi utilizado para o grupo controle. Os autores forneceram a potência do aparelho (500, 1000 e 1500 mW) e o tempo de irradiação (180 s), porém não informaram a área irradiada, impossibilitando o cálculo da dose de energia e irradiância. O material foi coletado de 103 animais sacrificados, após 6, 12 e 24 h, e 3, 5, 7 e 30 dias da irradiação. Foram realizados teste de imunohistoquímica (utilizando anticorpo HSP-25) e análise histomorfométrica. Na análise de seis horas e 7 dias após a irradiação nenhuma diferença entre grupo controle e irradiado foi detectada, entretanto, 30 dias após a irradiação dois tipos de padrões de cura foram reconhecidas na polpa dentária: formação de dentina terciária e características mistas de dentina e tecido semelhante ao osso. A análise estatística revelou que a área ocupada por tecido duro recém formado foi significativamente maior em amostras irradiadas com 1500 mW, comparados com a irradiação com 500 mW de potência ($p < 0,05$).

Modena et al.⁵⁹ (2009) realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de salientar e discutir estudos que abordaram a citotoxicidade e biocompatibilidade dos materiais utilizados para a proteção do complexo dentino-pulpar. Primeiramente foi discutido o dano pulpar e sua reparação, sendo que os autores ressaltam que o tecido pulpar é constantemente submetido a diferentes agressões, tais como toxinas microbianas, calor, trauma mecânico, materiais restauradores, soluções de limpeza e cimentos para forramento da cavidade. Em consequência, as células da polpa têm a capacidade intrínseca de reparação, deste modo, nem todo processo inflamatório resulta em danos permanentes. Ainda é

citado que a síntese de colágeno pode ser melhorada através de fatores de crescimento como TGF-1 β e TGF-2 β e interleucina IL-1 β . Em um segundo momento, os autores discorrem sobre a solução de hidróxido de cálcio (HC) e o MTA (mineral trioxide aggregate), sendo que o hidróxido de cálcio tem sido amplamente utilizado devido às suas propriedades de estimular a formação de dentina esclerótica, proteger a polpa contra estímulos térmicos e ação antibacteriana. Entretanto devido ao seu elevado pH, o HC forma uma camada de necrose de coagulação quando em contato direto com o tecido pulpar. Deste modo, os produtos não agem como bioestimuladores, tampouco possuem biocompatibilidade com o tecido pulpar. Além disso, o HC é solúvel em água e ácido e possui propriedades físicas deficientes. Em relação ao MTA foi relatado que este material possui propriedade antibacteriana e antifúngica, além dos estudos sugerirem fortemente que ele exibe um desempenho biológico favorável devido à formação de hidroxiapatita. Entretanto, ainda existem poucos estudos clínicos controlados e bem delineados acerca deste material. A revisão também abordou a resposta celular frente a exposição aos sistemas adesivos e resinas compostas. Foi relatado que o uso de resina como material restaurador é ocasionalmente associado com irritação e necrose pulpar, sendo que os produtos de sua composição são tóxicos e capazes de se difundir pelos túbulos dentinários e entrarem em contato com o tecido pulpar. Por fim, os autores abordam a resposta celular ao Cimento de Ionômero e Vidro (CIV), ressaltando propriedades benéficas como liberação de flúor, módulo de elasticidade semelhante à dentina e biocompatibilidade, porém possui limitações relacionadas com susceptibilidade à

desidratação e alta solubilidade. Os autores concluíram a revisão relatando que o hidróxido de cálcio é a melhor escolha para tratamento conservador da polpa, monômeros liberados por adesivos e resina composta possuem efeito citotóxico, em polpa humana, a proteção pulpar direta com sistema adesivo produz diferentes graus de inflamação e que o CIV modificado por resina possui maior citotoxicidade do que o CV convencional.

Souza et al.⁷³ (2009) investigaram os efeitos da mudança de temperatura, induzida por luz halógena de quartzo-tungstênio (QTH) e LED, sobre o metabolismo das células odontoblastóides (MDPC-23). Para o estudo, trinta e seis discos de dentina com 0,5 mm de espessura foram obtidos a partir molares humanos e divididos entre três grupos (através de valores de permeabilidade dentinária): QTH, LED e grupo não irradiado (controle). Inicialmente, um termômetro foi colocado junto à superfície pulpar de cada disco e as fontes de luz foram aplicadas na superfície oclusal, de acordo com o recomendado pelo fabricante de cada fotopolimerizador. Depois de registrar a mudança de temperatura, as células MDPC-23 foram semeadas no lado pulpar dos discos e as luzes foram novamente aplicadas. O metabolismo celular foi avaliado pelo ensaio de MTT e a morfologia celular foi avaliada por MEV. Os resultados demonstraram que nos grupos QTH e LED houve aumento de temperatura em 6,4 °C e 3,4 °C, respectivamente sendo que a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A luz QTH e o LED reduziram o metabolismo celular em 36,4% e 33,4%, respectivamente. No entanto, quando comparado ao controle, apenas a luz QTH reduziu de forma significativa o

metabolismo celular ($p < 0,05$). Concluiu-se que a irradiação com luz QTH, em discos de dentina com 0,5 mm de espessura promoveu um aumento de temperatura maior quando comparado ao LED, e que esse aumento afeta negativamente o metabolismo das células odontoblastóides.

O estudo de Dogan et al.²⁵ (2009) investigou o aumento da temperatura causada por diferentes aparelhos de fotoativação em discos de dentina com diferentes espessuras. Os aparelhos testados no estudo foram: luz halógena de quartzo-tungstênio (QTH), arco de plasma (PAC) e diodo emissor de luz (LED). Para o estudo, cento e quarenta discos de dentina de 0,5; 1; 1,5 e 2 mm de espessura foram obtidos a partir de molares inferiores. Para todos os tipos de luz, a espessura de dentina foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura e a luz halógena apresentou valores significativamente maiores em relação ao PAC e LED em todas as condições de teste. O aumento de temperatura mais elevado foi observado nos discos de dentina de 0,5 mm de espessura irradiados com QTH, enquanto a menor variação de temperatura foi registrada com luz LED nos discos de dentina de 2 mm de espessura. Os autores concluíram que, utilizando os tempos de irradiação recomendado pelos fabricantes de fotopolimerizadores, a fonte de luz halógena produziu um aumento significativamente maior ad temperatura do que a fotoativação LED e PAC em todas as condições de ensaio e que a espessura de dentina foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura.

Turrioni et al.⁷⁸ (2011) avaliaram a influência da permeabilidade dentinária na propagação da luz pela dentina. Para o estudo, foram obtidos quarenta e cinco

disco de dentina humana com 0,5 mm de espessura. Uma medição inicial foi feita para verificar a perda de potência ocorrida durante a irradiação do LED ($\lambda=630\text{nm}$) no tecido dentinário com a presença de smear layer (túbulos dentinários obliterados). Após esta primeira mensuração, os discos foram tratados com solução EDTA, para a remoção de smear layer e submetidos à análise de condutividade hidráulica, objetivando a obtenção de valores da permeabilidade para cada disco. Em seguida, uma nova medição de perda de potência transdentinária foi realizada. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para análise dos dados, que demonstraram uma fraca correlação entre permeabilidade da dentina e atenuação da luz (coeficiente = 0,19). Esse resultado indica que a dentina com maior ou menor permeabilidade não interfere na propagação transdentinária da luz emitida pelo LED. Além disso, uma propagação significativamente maior foi observada após o tratamento da superfície dentinária com EDTA (teste de Wilcoxon, $p < 0,05$). Os autores concluíram que a permeabilidade da dentina não interfere na transmissão transdentinária do LED, e que a remoção da smear layer facilita essa propagação.

2.4 Estudos in vivo e a ação bioestimuladora do LED

Eells et al.²⁶ (2003) testaram a hipótese de que a exposição a radiação vermelha monocromática de diodos emissores de luz (LED) iria proteger a retina contra a ação tóxica do metal derivado do ácido fórmico em um modelo de roedor. Para o estudo, os ratos foram divididos em quatro grupos: grupo controle não tratado, grupo controle tratado com LED, grupo intoxicado com metanol e grupo

intoxicado com metanol e tratado com LED. O protocolo de irradiação seguiu os seguintes parâmetros: $\lambda = 670$ nm, I: 28 mW/cm² e DE: 4 J/cm², sendo que as irradiações foram feitas 5, 25 e 50 horas após a intoxicação com metanol. Dois protocolos foram utilizados para avaliar a função da retina: eletroretinograma (ERG) e análise histopatológica. Como resultados, os autores observaram que a disfunção de retina provocada pelo metanol foi atenuada pelo tratamento com LED. Alterações patológicas foram claramente identificadas no grupo intoxicado, em contraste o grupo tratado com LED apresentou retina com morfologia indistinguível a dos grupos controle (não intoxicado e tratado apenas com LED). Os autores concluíram que a fotomodulação com LED vermelho promoveu a restauração da função após lesão celular.

Em 2005, Chang et al.¹⁶ testaram a fototerapia, em alta intensidade, com LED azul no tratamento de ratos com icterícia. Os ratos foram divididos em dois grupos: um submetido à fototerapia convencional (luz halógena) e outro submetido à fototerapia com LED azul. Os ratos foram irradiados durante cinco horas, sendo que a porcentagem de degradação de bilirrubina foi calculada através da diferença das concentrações séricas de bilirrubina antes e após a exposição à fototerapia. A degradação de bilirrubina pela fototerapia com LED foi significativamente superior à fototerapia convencional (30% vs 16%). Os autores concluíram que a fototerapia com LED azul, com altos níveis de irradiância apresentaram maior eficácia na fotodegradação da bilirrubina comparada com a fototerapia convencional com luz halógena.

Procurando avaliar as alterações nos níveis de células T (principais efetores da imunidade celular), localizadas na pele, que podem ocorrer através da irradiação do LED vermelho, Takezaki et al.⁷⁵, em 2006 recrutaram seis adultos saudáveis, do sexo masculino e irradiaram a região lateral da perna, localizada sobre a fíbula. Os parâmetros de irradiação foram $\lambda = 630$ nm, I: 105 mW/cm^2 e DE: 94 J/cm^2 , sendo que as irradiações foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas. Uma amostra de três milímetros foi obtida de cada indivíduo após a segunda e oitava irradiação e posteriormente analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Além disso, células T foram isoladas de cada biópsia e analisadas por RT-PCR, pela expressão de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4). Na análise em MET, as amostras obtidas após a segunda sessão apresentavam presença de edema intersticial leve e um aumento de fibras que pode ser identificado particularmente nos fibroblastos. Após a oitava sessão, o número de fibroblasto era maior, além disso, um aumento de grânulos de vimentina e mitocôndrias foram identificados no interior dos fibroblastos. Para os resultados obtidos por meio da análise em PCR, foi encontrado um aumento da expressão de IL-4, indicando um aumento de células Th-2 (subtipo de célula T). Os autores concluíram que a fototerapia do LED 630 nm ativa o sistema imune em pele normal. Em casos de pacientes que apresentam doença de pele imunomodulada, como a dermatite atópica, o tratamento com luz pode melhorar o processo da doença através do estímulo da produção de Th-2.

Vinck et al.⁸³ (2006) avaliaram a eficácia analgésica dos diodos emissores de luz (LED) no comprimento de onda de 950 nm. Para o estudo, 32 adultos

saudáveis foram recrutados e submetidos a um protocolo de indução de dor muscular em ambos os braços. Para cada pessoa, um braço foi usado como controle e outro como tratado. Os parâmetros do LED utilizados neste estudo foram I: 8,9 mW/cm² e DE: 3,2 J/cm², sendo que a irradiação foi realizada diariamente, durante quatro dias. As seguintes avaliações: medição subjetiva da dor, medição de sensibilidade muscular (MSM) e avaliação da força muscular (tolerância do músculo à pressão) também foram realizadas diariamente. Não houve diferença estatística significativa para a diminuição da dor entre grupos irradiado e controle para nenhum dos momentos de avaliação. Porém, um resultado importante foi que, nos braços irradiados, o músculo tolerou melhor a pressão do que os não irradiados (p=0,047). Concluiu-se que o LED pode ter algum potencial no tratamento da dor e comprometimento funcional associado com dor muscular tardia, porém a sua eficácia, nos parâmetros utilizados, não foi estabelecida.

Procurando avaliar a eficácia da fototerapia com LED na melhora de ferida em ratos diabéticos e não diabéticos, Al-Watban et al.⁵ (2006) utilizou irradiação de um LED policromático apresentando as bandas de 510–543, 594–599, 626–639, 640–670 e 842–872 nm. A irradiância utilizada foi de 13.6 mW/cm², sendo que as doses de energia testadas foram 5, 10, 20 e 30 J/cm², além disso, as irradiações foram realizadas três vezes na semana, durante três semanas. As feridas induzidas foram medidas diariamente através de um paquímetro e fotografias digitais foram obtidas a cada sete dias, a partir do início da indução das feridas. Os resultados apontaram que, para os ratos diabéticos, as doses de 5 e 10

J/cm² apresentaram estimulação significativa na cura da ferida quando comparadas ao grupo controle. Os autores concluíram que a terapia com LED policromática afeta a cicatrização em ratos de forma dose-dependente. A eficácia da terapia com LED policromático para estimular a cura em ratos não-diabéticos é inferior ao seu efeito em ratos diabéticos. As doses testadas foram pouco eficazes para acelerar a cicatrização de feridas nos não diabéticos, enquanto que os tratamentos com 5 e 10 J/cm² foram promissores nos ratos diabéticos.

Lizarelli et al.⁵⁵ (2007) compararam os efeitos do LILT e LED no tratamento da hipersensibilidade dentinária. Para o estudo, um total de 144 dentes com hipersensibilidade cervical foram tratados em seis sessões, com 3 sessões de irradiação e três sessões de acompanhamento. O estudo duplo-cego comparou um grupo de controle (placebo) e dois grupos testes: irradiados com laser de baixa intensidade e LED, na mesma banda espectral (vermelho, 630-660 nm). Dois testes de vitalidade (frio e calor) e um teste de sensibilidade (jato de ar) foram utilizados. Como resultados, LILT e LED apresentaram um comportamento semelhante, e ambos propiciaram melhores resultados quando comparados ao grupo controle. No seguimento de 15 e 60 dias, todos os dentes apresentaram bons resultados, com ausência de dor nos testes de jato de ar. Os autores concluíram que duas sessões de irradiação parece ser o suficiente para o tratamento da hipersensibilidade e que, ambos os protocolos, LILT e LED, foram eficazes na redução da dor.

Castro e Silva et al.¹⁵ (2007) realizaram hepatectomia parcial em ratos e avaliaram os efeitos da fototerapia com LED e laser na regeneração do tecido

lesionado. Os ratos foram divididos em quatro grupos: irradiados com LED (630nm) na dose de energia de 10 J/cm², irradiados com LED (630nm) na dose de 140 J/cm², irradiados com laser (590 nm) na dose de 15 J/cm² e grupo controle onde os ratos foram hepatectomizados, porém não receberam irradiação. O procedimento de irradiação foi realizado logo após as cirurgias e os ratos foram sacrificados 24 horas após a irradiação. Amostras de tecido do fígado e de sangue coletado da veia cava inferior foram obtidas para as avaliações. Foi realizado teste de imunohistoquímica, também foi avaliado o nível de oxigênio consumido pelas mitocôndrias e, através de um espectrofotômetro de fluorescência, a diferença de potencial elétrico transmembrana foi monitorada. Atividade respiratória mitocondrial foi aumentada nos grupos irradiados (p<0,05), com melhores resultados para o grupo exposto à dose mais baixa do LED (10 J/cm²). A proliferação celular, medida por imunohistoquímica, foi semelhante para ambos os grupos expostos pelo LED (P>0,05) e superior para o grupo controle (P<0,05). O índice de proliferação das células obtidas com LED e laser foram semelhantes (P>0,05). Em conclusão, os resultados sugerem que a irradiação LED promove efeitos biológicos estimulatórios durante o estágio inicial de regeneração do fígado e que o LED é tão eficaz quanto à luz do laser, independente da coerência, divergência e cromaticidade.

Corazza et al.¹⁷ (2007) avaliaram o potencial de angiogênese, através da irradiação laser e LED, em feridas induzidas em ratos, utilizando variadas doses de energia. Os animais foram divididos em cinco grupos: dois utilizando o laser nas doses de 5 e 20 J/cm², dois grupos utilizando o LED nas mesmas doses

relatadas e um grupo controle. Os comprimentos de onda utilizados foram 660 nm para o laser e 635 nm para o LED, sendo que as irradiâncias foram de 1000 mW/cm² para o laser e 1058 mW/cm² para o LED. As irradiações foram realizadas diariamente, tendo início 6 h depois da indução das feridas até 24 horas antes do sacrifício, sendo que os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 14 e 21. Após o sacrifício, foi realizada biópsia da ferida para análise histológica. Nos dias 3, 7 e 14, a proliferação de vasos sanguíneos dos grupos tratados foi superior em comparação aos do grupo controle ($p < 0,05$). Os autores concluíram que o laser e LED vermelhos demonstraram resultados expressivos na angiogênese e que a coerência da luz revelou não ser fator primordial para o efeito bioestimulador.

Objetivando avaliar os efeitos da fototerapia através do LED na prevenção de feridas induzidas por radiação, De Land et al.²³ (2007) realizaram tratamento com LED (590 nm), em 19 pacientes submetidos a radioterapia. As irradiações eram feitas após cada sessão de radioterapia utilizando dose de energia de 0,15 J/cm², resultando em total de 33 a 38 sessões de fototerapia. As reações cutâneas foram avaliadas e classificadas semanalmente por uma enfermeira utilizando um critério pré-estabelecido pelo Instituto Nacional de Câncer (grau 0 a 4). Também foram obtidas fotografias pré e pós- tratamento, as quais foram comparadas e avaliadas. Foi encontrado que 94,7% dos pacientes tratados com LED apresentaram lesão com grau 0 ou 1 e 5,3 % apresentaram lesão com grau 3. Já para os pacientes que não receberam a fototerapia, 14, 3% apresentaram lesão grau 1 e 85,7% apresentaram lesão com grau 2 e 3. Os autores concluíram que a

fototerapia com LED reduziu a incidência de lesões com grau mais avançados em pacientes submetidos à radioterapia.

Sacono et al.⁷⁰ (2008) avaliaram o efeito da terapia com diodos emissores de luz em mucosite quimicamente induzida em ratos. Os parâmetros de irradiação foram dose de energia de 12 J/cm² e irradiância de 160 mW/cm², sendo que as irradiações foram realizadas nos dias 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 do experimento. Para os teste, foi realizada uma avaliação clínica (escores de 0 a 5) nos dias 4, 6, 8, 10, 12 e 14, além de serem realizadas biópsias das lesões para avaliação histológica (escores de 0 a 4) nos dias 5, 9, 13 e 15. Os resultados da avaliação clínica indicaram um grande número dos escores 0 no grupo irradiado, enquanto que o grupo não irradiado apresentou um grande número de pontos correspondentes a mucosite mais severa, sendo que os grupos diferiram entre si (p<0,05). Na análise histológica, o grupo irradiado apresentou escores mais estáveis em relação ao Grupo não irradiado, que apresentou um pico de mucosite no dia 9 (p<0,05). Os autores concluíram que a terapia com LED , através do protocolo estabelecido para o estudo in vivo, foi eficaz na redução da severidade da mucosite oral.

Comparando a luz coerente (laser) com a luz não-coerente (LED), Dall Agnol et al.²² (2009) avaliaram o efeito dos dois tipos de fototerapia na reparação tecidual de ratos diabéticos. Para o estudo, os animais foram distribuídos em seis grupos (três para ratos diabéticos e três para não diabéticos): o grupo 1 era constituído de ratos não diabéticos com indução de ferida, o grupo 2 de ratos não diabéticos com indução de ferida mais o tratamento com LED, o grupo 3 de ratos não diabéticos com indução de ferida mais o tratamento com laser, sendo que os

grupos 4,5 e 6 seguiram o mesmo protocolo, porém para os ratos diabéticos. Os parâmetros de irradiação foram $\lambda = 640\text{nm}$ (LED) e 660 nm (laser), DE: 6 J/cm^2 e I: 60 mW/cm^2 , sendo que a irradiação foi realizada uma única vez 30 minutos após o procedimento cirúrgico. O diâmetro e as características da ferida foram observados durante 7 dias e a lesão foi fotografada diariamente. Após o sétimo dia, amostras foram coletadas para análise histopatológica. Na avaliação macroscópica do reparo tecidual, as diferenças foram mais evidentes em ratos diabéticos, onde a redução do diâmetro da ferida foi 30,1% para o grupo controle, 45% para o grupo tratado com LED e 44,5% para o grupo tratado com laser ($p < 0,01$). As luzes: coerente e não coerente produziram efeitos semelhantes durante um período de 168 h após a lesão ter sido induzida. Para o grupo composto por animais diabéticos, 72 h após a criação da lesão, foi observado que a terapia com LEDs foi mais eficiente do que com o laser na redução dos diâmetros das lesões. Concluiu-se que a irradiação com laser (660 nm), ou diodo emissor de luz (640 nm) promoveu, de forma semelhante, uma ligeira aceleração do processo de cicatrização de feridas cutâneas quando comparada com ao grupo não tratado. Este efeito foi observado em ambos os ratos diabéticos e não diabéticos, embora tenha sido mais evidente nos grupos de animais diabéticos.

Bastos et al.¹⁰ (2009) comparam o efeito da terapia com laser de baixa intensidade e LED no tratamento do tendão de Aquiles lesionado de ratos. A laserterapia foi aplicada com os comprimentos de 685 e 830 nm, DE: 6 J/cm^2 e I: 5360 mW/cm^2 . Já a LEDterapia foi aplicada nos comprimentos de onda de 630 e 880 nm, com DE: 6 J/cm^2 e I: 88 mW/cm^2 . As amostras foram coletadas e

analisadas em microscópio polarizado. Os resultados mostraram uma eficiência real dos tratamentos com LED e laser e confirmaram que a fototerapia pode ser eficaz na cura do processo. Apesar da falta de coerência do LED, o tratamento do tendão com esse recurso foi satisfatória e certamente pode substituir tratamentos baseados em aplicações de luz laser. As aplicações de laser infravermelho de 830 nm e LED infravermelho 880 nm foram mais eficientes quando o objetivo era uma boa organização, agregação e alinhamento do colágeno em feixes na cicatrização do tendão.

Casalechi et al.¹⁴ (2009) avaliaram o efeito da terapia de baixa intensidade do LED no reparo do tendão de Aquiles em ratos. Os parâmetros de irradiação consistiram em um comprimento de onda de 640 nm, dose de energia de 20 J/cm² e irradiância de 200 mW/cm², sendo que as irradiações foram realizadas uma hora antes da cirurgia e a cada 24 horas após a agressão. Os animais foram sacrificados nos dias 7, 14 e 21 após a cirurgia, os tendões foram removidos e preparados para análise histológica. Os resultados demonstraram que, para ambas as análises, qualitativa e quantitativa, o tratamento com LED foi benéfico no processo de reparo no tendão. Especificamente na análise quantitativa das amostras, o tratamento com LED apresentou um aumento no nível de remodelação de 14, 15 e 11% para os tempos de 7, 14 e 21 dias respectivamente, quando comparado aos grupos controles de cada momento. Além disso, o número de fibroblastos aumentou de forma significativa para os tempos de 7 e 14 dias (p<0,05). Concluiu-se que o uso da terapia de LED, nos parâmetros testados, proporcionou

uma qualidade superior do tecido regenerado quando comparado ao grupo controle, para todos os momentos de avaliação.

Leal Júnior et al.⁴⁸ (2009) testaram a terapia com diodos emissores de luz no desempenho muscular, desenvolvimento de fadiga e na marcação de agentes bioquímicos relacionados com a remodelação do músculo esquelético, em um modelo experimental de contração muscular em humanos. O procedimento de irradiação foi realizado em duas sessões (dia 1 e 8), com a combinação de dois comprimentos de onda, sendo que os parâmetros utilizados foram $\lambda = 660$ nm (vermelho) e 850 nm (infravermelho), I: 50 mW/cm² (para o vermelho) e 150 mW/cm² (para o infravermelho) e DE: 1,5 J/cm² (vermelho) e 4,5 J/cm² (infravermelho). Além da avaliação do número de contrações musculares, amostras de sangue foram coletadas para avaliar os níveis de lactato (produto final da glicólise anaeróbica), atividade de CK (enzima creatina quinase), e níveis de CRP (proteína C-reativa) para lesão muscular. A fototerapia com LED aumentou o número de contrações em 12,9% quando comparada ao tratamento placebo. Além disso, os níveis pós-exercício de marcadores bioquímicos diminuíram significativamente com a LEDterapia: lactato (p=0,04), creatina quinase e proteína C-reativa (p=0,03). Os autores concluíram que os parâmetros testados do LED provocam um ligeiro atraso no desenvolvimento de fadiga muscular, diminui os níveis, pós-exercício, de lactato sanguíneo e inibe a liberação de creatina quinase e proteína C-reativa.

Ainda em 2009, Lim et al.⁵² investigaram a ação da fototerapia com LED vermelho e infravermelho-próximo em células T e na expressão de citocinas,

utilizando um modelo in vivo de ratos. A irradiação foi feita através de dois comprimentos do LED ($\lambda = 610$ nm ou 720 nm), com irradiância de 0,042 mW/cm² e dose de energia de 1,8 J/cm². As irradiações foram feitas por 12 horas/dia, durante 28 dias consecutivos, sendo que os animais foram mantidos por mais cinco semanas sem exposição ao LED para ser avaliada a eliminação do efeito imunológico induzido por este tipo e luz. Foram coletadas amostras de sangue e células mononucleares periféricas (PBMCs) foram isoladas para avaliação dos marcadores de CD4 e CD8, em citometria de fluxo. Também foi realizada a técnica RT-PCR para avaliar expressão de IL-1 β , IL-4, IL-6, e IFN γ . Os testes foram realizados antes e depois da fototerapia. Foi encontrado que a irradiação com comprimento de onda de 710 nm provocou aumento significativo nos níveis de CD4 ($p < 0,05$), sendo que após cinco semanas sem a irradiação, o nível de CD4 atingiu os valores semelhantes ao controle. O nível de transcrição de IL-1 β aumentou para a irradiação de 710 nm e o nível de IL-6 e IL-4 aumentou para ambos os comprimentos de onda (610 e 710 nm) quando comparados ao grupo controle. Os autores concluíram que a irradiação in vivo do LED 710 nm aumentou significativamente a população de células T CD4+, o que pode sugerir uma terapia promissora para imunomodulação.

Ablon et al.¹ (2010) desenvolveram um estudo para verificar a eficácia da combinação dos comprimentos de onda de 830 nm e 633 nm na fototerapia por LED no tratamento de psoríase recalcitrante. Em cada sessão de irradiação pelo LED, a dose de energia utilizada era de 60 J/cm² (para o 830 nm) e 126 J/cm² (para o 633 nm), o regime de tratamento consistiu em dez sessões, durante cinco

semanas, com 48 horas de intervalo entre cada sessão. Foi encontrado que as taxas de desaparecimento das manchas ao final do regime variaram entre 60 e 100%, com satisfação muito alta dos pacientes. Os autores concluíram que a fototerapia é de fácil aplicação, com ausência de dor e efeitos colaterais, além disso, a combinação dos LEDs vermelho e infravermelho-próximo, nos parâmetros utilizados, proporcionou eficácia no tratamento da psoríase.

Souza et al.⁷¹ (2010) realizaram avaliação histológica da proliferação fibroblástica em feridas cutâneas, através de um modelo de roedores tratados ou não com LED em três diferentes comprimento de onda. Os animais foram divididos em quatro grupos contendo quatro animais em cada: G0 (controle), G1 (LED 700 nm, I: 15 mW/cm²), G2 (LED 530 nm, I: 8 mW/cm²) e G3 (LED 460 nm, I: 22 mW/cm²). A LEDterapia teve início imediatamente após a indução das feridas e se repetiu diariamente até o 7º dia. A dose de energia utilizada para todos os grupos, em cada sessão foi de 10 J/cm². Após o tratamento, os animais foram sacrificados e as amostras foram preparadas para análise histológica. A análise estatística mostrou que a quantidade de fibroblastos nas amostras iluminadas com 700 e 530 nm foi significativamente maior do que para os controles ($p < 0,01$ e $p = 0,02$, respectivamente). Os autores concluíram que o uso do LED verde e vermelho, nos parâmetros do estudo, foi eficaz no aumento da proliferação fibroblástica em roedores.

Ainda em 2010, Kelencz et al.³⁹ desenvolveram um estudo clínico objetivando avaliar os efeitos da irradiação com LED 640 nm na atividade muscular. Para os estudos, 30 voluntários foram divididos em três grupos que

receberam diferentes doses de irradiação no músculo masseter direito: 1,044 J por ponto (G1), 2,088 J por ponto (G2) e 3,132 J por ponto (G3), sendo que o masseter esquerdo foi utilizado como grupo placebo. As medições foram realizadas antes e após as irradiações através do posicionamento de eletrodos na pele localizada na região do músculo avaliado, para a captação de sinais por eletromiografia (EMG), sendo que cada avaliação ocorreu após a contração isométrica máxima. Um aumento na atividade muscular foi observado após irradiação com 1,044 J por ponto ($p < 0,05$). Além disso, um aumento significativo no tempo antes da fadiga foi observado no músculo irradiado com 2,088 J por ponto ($p < 0,01$), sem uma mudança na força de contração ($p > 0,05$). Este aumento não foi observado com 1,044 J por ponto e 3,132 J por ponto. Os resultados sugeriram uma relação dose-dependente com este tipo de irradiação no espectro vermelho no processo de fadiga muscular. Concluiu-se que o LED pode ser usado como uma ferramenta clínica para aumentar atividade muscular (1,044 J por ponto) e para prevenir a fadiga (2,088 J por ponto), sem alteração na força muscular.

3 PROPOSIÇÃO



3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito transdentinário da luz emitida por diodos emissores de luz (LED) em diferentes comprimentos de onda sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23 cultivadas sobre discos de dentina com 0,2 mm de espessura.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito transdentinário do LED em três comprimentos de onda, nos parâmetros selecionados, sobre o metabolismo das células odontoblastóides MDPC-23;
2. Avaliar a produção de proteína total e a atividade da enzima fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 após a irradiação transdentinária com LED em três comprimentos de onda;
3. Avaliar o efeito da irradiação com LED sobre a expressão de Col I, FN e ALP pelas células odontoblastóides;
4. Avaliar se os fatores “comprimento de onda” e “dose de energia” interferem na terapia celular com LED.

4 MATERIAL E MÉTODO



4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Determinação dos parâmetros do LED

Neste trabalho de pesquisa foram utilizados três dispositivos (LEDTables) desenvolvidos 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 da Prof^a. Dr^a. Cristina Kurachi. As LEDTables, com 24 diodos montados em cada uma delas, apresentavam comprimentos de onda estabelecidos em 455 nm, 630 nm e 850 nm. Tem sido demonstrado que estes comprimentos de onda podem propiciar efeitos celulares positivos, tais como proliferação celular, aumento na síntese de ATP, e redução dos danos protéicos em decorrência da produção de antioxidantes^{5,24,81,85}. Os diodos, do tipo InGaN (nitreto de índio e gálio), foram posicionados nas LEDTables de tal maneira que quando ativados, simultaneamente, cada um deles irradiou, individualmente, cada compartimento da placa de cultura de células de 24 compartimentos (Figura 1).

As densidades de energia de 4 J/cm^2 e 25 J/cm^2 , selecionadas neste estudo para serem aplicadas sobre as células MDPC-23 em cultura, foram estabelecidas de acordo com pesquisas prévias realizadas em diferentes tipos celulares^{50,51,64,82,86}. Cada diodo foi posicionado a uma distância padronizada das células com o intuito de envolver, de forma uniforme, toda área da base de cada compartimento (2 cm^2). A irradiância (dose de potência) emitida pelos LEDs foi de 88 mW/cm^2 , sendo que a potência total de irradiação foi dosada levando-se

em consideração a perda de potência óptica em cada compartimento devido à presença do acrílico (fundo do compartimento) e disco de dentina.

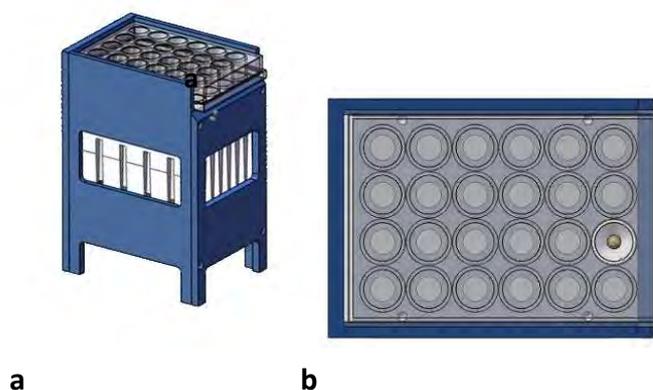


FIGURA 1 (a,b) - Dispositivo de irradiação. a- Vista lateral da LEDtable demonstrando o posicionamento da placa de acrílico. b- Vista superior da LEDtable com a placa posicionada para irradiar individualmente cada um dos 24 compartimentos da placa de acrílico.

A partir desses dados e utilizando o valor da área de cada compartimento, os tempos de irradiação necessários, para as densidades de energia propostas no presente projeto de pesquisa, puderam ser calculados. Na Figura 2 abaixo podem ser observados os dispositivos de irradiação acionados.

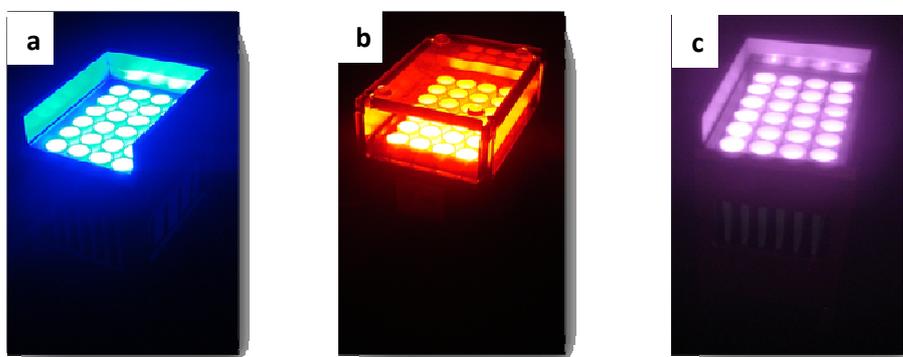


FIGURA 2 (a,b e c) - LEDTables com os diodos acionados (a- 455 nm, b- 630 nm e c- 850 nm).

No momento da irradiação, as células estiveram em contato com PBS, pois uma medição realizada por meio de um espectrógrafo de transmitância USB2000 (Ocean Optics, California, EUA) com uma interface elaborada no programa Lab View, revelou um alto coeficiente de absorção desse corante presente no DMEM apenas para a irradiação no comprimento de onda de 455 nm (Figura 3). Desta maneira, com o intuito de padronizar o meio a ser empregado neste estudo durante a irradiação, a solução selecionada foi o PBS para todos os grupos amostrais.

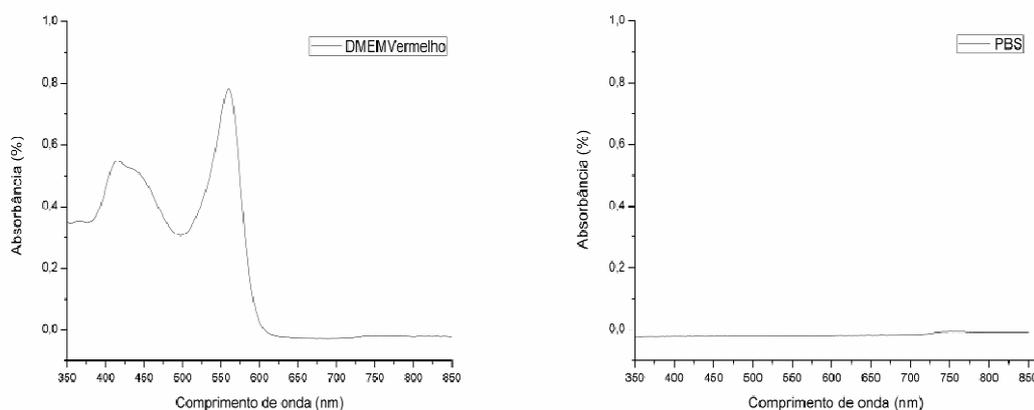


FIGURA 3 - Gráficos da absorbância do meio de cultura celular baseados em DMEM com corante e PBS

Foi realizada, previamente ao início da pesquisa, uma avaliação quanto ao monitoramento da variação de temperatura do meio que estaria em contato com as células no momento da irradiação (PBS), uma vez que o aumento de calor pode causar danos irreversíveis sobre células pulpares. Dessa maneira, por meio de um multímetro e um termistor calibrado e fixo à base dos compartimentos da placa,

no Laboratório de Biofotônica do IFSC (Instituto de Física de São Carlos - USP - São Carlos, SP), foi determinada a variação de temperatura dos compartimentos preenchidos com PBS. O comprimento de onda 630 nm (LED vermelho) não gerou aumento de temperatura em 10 minutos de irradiação (tempo máximo para irradiação celular neste estudo), já os comprimentos 455 nm (LED azul) e 850 nm (infravermelho) provocaram um aumento de 2 °C durante 10 minutos de irradiação (Figura 4). Deste modo, o aumento de temperatura não ocasionou dano as células, visto que o aumento de temperatura de até 3,4 °C não provoca efeitos danosos às células MDPC-23⁷³.

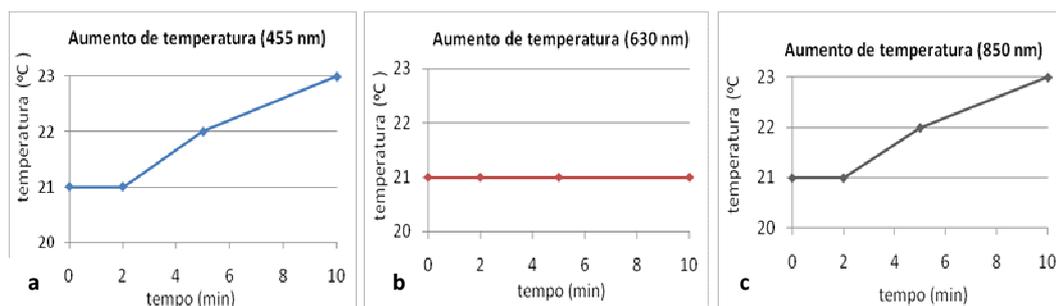


FIGURA 4 (a,b,c)- Gráficos representativos do aumento de temperatura ocorrido, na solução de PBS, durante a irradiação com os dispositivos (LEDtables). a- 455 nm (LED azul), b- 630 nm (LED vermelho), c- 850 nm (LED infravermelho).

4.2 Manutenção das células MDPC-23 em cultura

Células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Costar Corp., Massachusetts, EUA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO, New York, EUA), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e

estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, New York, EUA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias em incubadora (Isotemp Fisher Scientific, Pensilvânia, EUA) com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C, até que fosse obtido o número adequado de células para a pesquisa.

4.3 Bioestimulação transdentinária

4.3.1 Obtenção dos discos de dentina

Cento e oitenta e dois discos de dentina foram obtidos através do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Protocolo 26/09 em anexo). Os dentes foram imersos em etanol 70% por 5 dias e submetidos à remoção de restos de ligamento periodontal e debris aderidos à sua superfície. Da região central da coroa de cada dente foi obtido um disco de dentina com 0,2 mm de espessura, a qual foi determinada por meio da utilização de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda. SP, Brasil). Tal espessura foi empregada neste estudo para simular a condição clínica de uma cavidade muito profunda, a qual caracteriza uma situação de desafio do complexo dentino-pulpar, particularmente dos odontoblastos que revestem internamente a dentina, contra agressões ou estímulos externos.

Para obtenção dos discos de dentina, foi utilizado um disco de diamante (11-4254, 4"x 0,012"/ série 15LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Illinois, EUA) montado em uma cortadeira metalográfica (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Illinois, EUA). Após a obtenção dos discos, estes foram analisados em uma Lupa Esterioscópica (Modelo – SZ2-ILST - Olympus Corporation, Tokio, Japan). Os dentes que possuíam “ilhas” de esmalte ou depressões representando a porção mais superior dos cornos pulpares foram descartados. Posteriormente, as superfícies dos discos de dentina cuidadosamente selecionados, foram lixadas e regularizadas com lixas d’água de granulação 400 e 600 (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiaí, SP, Brasil), sendo que durante este procedimento, os discos foram freqüentemente avaliados por meio de um paquímetro digital (Modelo 500-144B, Mitutoyo Sul América Ltda., SP, Brasil), com o objetivo de certificar que sua espessura final fosse de 0,2 mm.

Uma solução de EDTA 0,5M (pH 7,2) foi aplicada, por 2 minutos, sobre os discos de dentina com o objetivo de limpeza superficial e remoção da *smear layer* preparando os espécimes para o teste de medição de potência. Além disso, este procedimento proporciona adequado substrato dentinário para adesão e crescimento celular. Após condicionamento da dentina, a solução de EDTA foi lavada das superfícies dos discos através da aplicação, por 60 segundos, de água deionizada esterilizada. Finalmente, os discos de dentina foram submetidos, individualmente, ao teste de medição de potência transdentinária.

4.3.2 Medição de potência transdentinária

O teste medição de potência transdentinária teve como objetivo mensurar a perda de potência que pode ocorrer durante a irradiação na presença dos discos. Para isto, um detector de potência foi posicionado na face pulpar do disco de dentina, enquanto que o feixe de luz foi aplicado sobre a superfície oclusal do mesmo disco. O procedimento foi realizado no Laboratório de Biofotônica do IFSC (Instituto de Física de São Carlos - USP - São Carlos, SP). Para a realização destas medições, os discos foram posicionados, com a face oclusal voltada para cima, em um pequeno compartimento contendo um detector de potência, o qual estava conectado diretamente a um potenciômetro (LM-2 - Coherent, California, EUA). Cada disco foi irradiado (de acordo com cada grupo/comprimento de onda), através de um dispositivo contendo um cilindro de acrílico, cuja função foi colimar o feixe de luz e direcioná-lo para a área onde foram adaptados os discos. O dispositivo de irradiação estava sustentado por uma haste metálica, permitindo estabilidade no momento da irradiação (Figura 5).

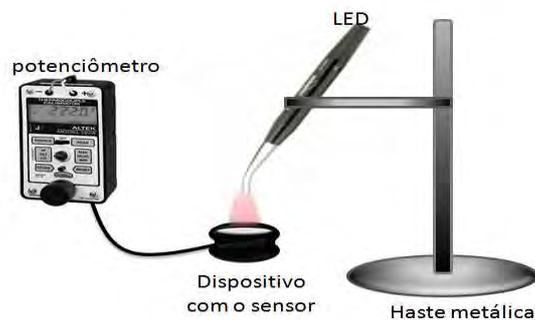


FIGURA 5- Esquema do dispositivo de medição de potência de cada disco.

A perda de potência em cada disco foi calculada através da diferença de potência obtida pela irradiação do compartimento na ausência e presença dos discos, respectivamente. Para tal análise, os valores foram convertidos em porcentagem, pois a potência inicial de cada disco tendia a variar devido a característica de perda de potência do aparelho de irradiação com o tempo, sendo esta variação de pequena magnitude.

4.3.3 Condições do experimento

Após divisão dos dentes em grupos experimentais e controle, de acordo com o teste de perda de potência, os discos de dentina selecionados sofreram redução da sua área total com ponta diamantada cilíndrica (número 1095 - KG Sorensen) em alta rotação, com acabamento em baixa rotação, de forma que o diâmetro final dos discos fosse de 8 mm. Este procedimento foi realizado com o objetivo de criar condições para adaptar estes discos, com sua superfície pulpar voltada para cima, no centro de um dispositivo metálico especialmente preparado para o desenvolvimento da presente pesquisa (Figura 6). Cada dispositivo metálico com o disco de dentina adaptado permitiu a aplicação dos LEDs sobre a superfície oclusal (voltada para baixo), enquanto a superfície pulpar (onde as células foram cultivadas) permaneceu em contato com o meio de cultura (voltada para cima). Previamente a montagem do conjunto disco de dentina/dispositivo metálico, os discos foram embalados individualmente e esterilizados por meio de gás de óxido de etileno⁴⁷. Os dispositivos metálicos e anéis de silicone que mantiveram os discos em posição (Figura 6) foram autoclavados individualmente em recipientes de vidro contendo água deionizada, pelo período de 15 minutos, à

120°C e pressão de 1 Kgf. No interior de uma câmara de fluxo laminar (Bio Protector Plus 12, Veco do Brasil – Ind. Com. de Equipamentos Ltda, Campinas, SP, Brasil), os conjuntos disco de dentina/dispositivo metálico foram montados nos compartimentos das placas de acrílico e as células MDPC-23 foram semeadas (3×10^4 células/disco) sobre a superfície pulpar dos discos.

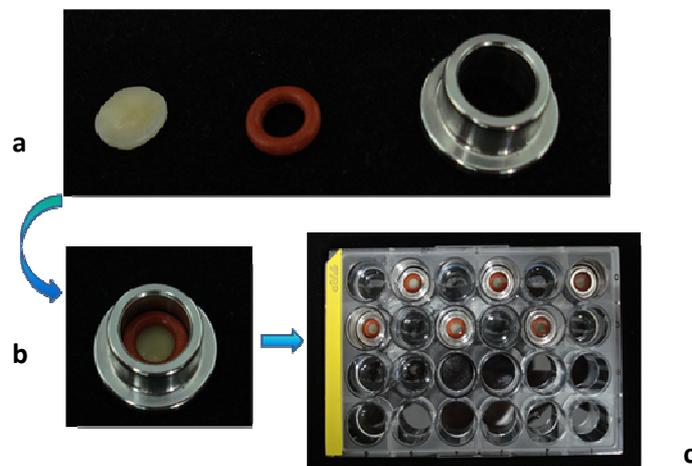


FIGURA 6 (a,b e c) - Foto ilustrativa do conjunto disco de dentina/dispositivo metálico (**a**- disco de dentina, anel de silicone e dispositivo metálico respectivamente, **b**- conjunto disco/dispositivo metálico, **c**- conjunto disco/dispositivo metálico posicionado na placa de acrílico).

As placas com os conjuntos disco/dispositivo metálico foram mantidas por 48 horas em incubadora com atmosfera úmida a 37° C com 5% de CO₂ e 95% de ar. Após este período, o meio de cultura foi aspirado, sendo que para os grupos experimentais e controle, um novo meio de cultura, suplementado com 2% SFB (indução de estresse por carência nutricional^{4,13,35,74}) foi aplicado sobre as células por 24 horas. Imediatamente antes de iniciar a irradiação, o meio de cultura foi

substituído por solução de PBS³ e após a irradiação, um novo DMEM contendo 10% de soro fetal bovino foi colocado sobre as células.

O procedimento de irradiação celular transdentinária com LED foi realizado uma única vez, com o objetivo de simular uma situação clínica na qual uma cavidade profunda seria submetida ao procedimento restaurador. A adesão de células viáveis no disco de dentina, no momento da irradiação pode ser observada na Figura 7.

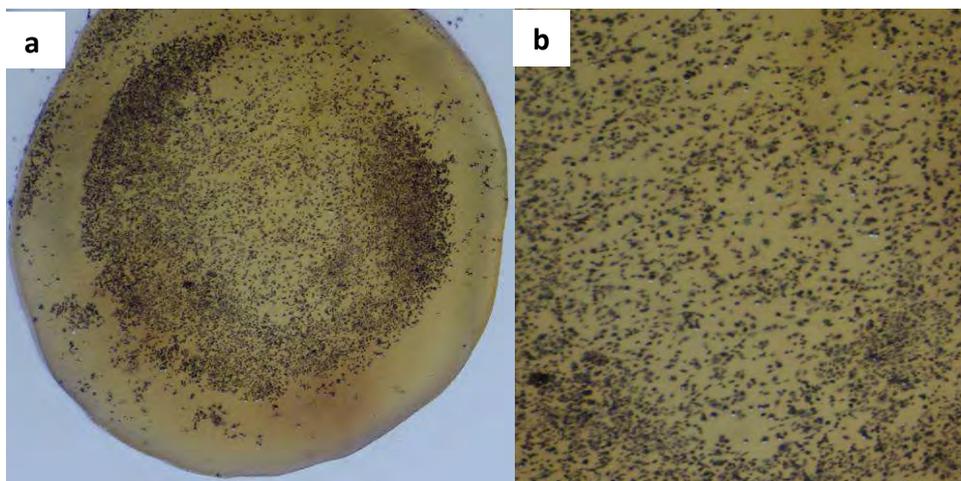


FIGURA 7 (a,b)- células MDPC-23 viáveis sobre disco de dentina, marcadas pelo ensaio de MTT, no momento em que seria realizada a irradiação (a- disco de dentina com as células aderidas na área delimitada pelo anel de silicone, b- imagem aumentada das células MDPC-23 localizadas na região mais central do disco).

Imediatamente após a irradiação, as placas de acrílico com seus respectivos conjuntos disco/dispositivo metálico foram colocados em incubadora, onde permaneceram pelo período de 72 horas. Após este tempo, as células foram submetidas à avaliação de seu metabolismo, expressão de proteína total, fosfatase

alcalina, avaliação da expressão de fibronectina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I pela técnica do RT-PCR, além de realizar a análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura.

Os grupos experimentais e controle, estabelecidos de acordo com a espessura dos discos de dentina e os comprimentos de onda, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Apresentação dos grupos experimentais e controles de acordo com o número de amostras e tipo de tratamento dos discos de dentina

Comprimento de onda (nm)	Dose de Energia (J/cm ²) (n=26)	
	4	25
450 nm	Grupo 1	Grupo 4
630 nm	Grupo 2	Grupo 5
840 nm	Grupo 3	Grupo 6
0	Grupo 7 (Controle)	

Para o grupo controle, os mesmos procedimentos de manipulação das amostras foram realizados, inclusive o posicionamento da LEDTable sobre a superfície oclusal dos discos de dentina; todavia os diodos não foram ativados.

4.4 Testes

Os testes realizados e respectivos números de amostras por grupo estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2- Apresentação do número de amostras por grupo e testes utilizados

Testes	MTT	MEV	PT e ALP	PCR
Número de amostras por grupo	8	2	8	8

4.4.1 Análise da viabilidade celular (MTT assay)

Esta avaliação foi realizada 72 horas pós-irradiação, utilizando-se para isto o método colorimétrico do metiltetrazolium (MTT Assay). Este método determina a atividade da enzima produzida pelas mitocôndrias presentes nas células. 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^{60,63,64,65}. Os discos de dentina foram removidos cuidadosamente dos compartimentos com os discos metálicos, sendo colocados em nova placa de 24 compartimentos. Sobre as mesmas foi aplicado 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 teve o objetivo de dissolver os cristais violeta resultante da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das

células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp. Cambridge, Massachusetts, EUA). Avaliou-se viabilidade celular de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, LabSystems CE, Lês Ulis, France).

A absorbância foi expressa em valores numéricos, os quais foram submetidos à análise estatística para indicar o efeito da atividade mitocondrial das células.

4.4.2 Análise da morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para cada grupo do experimento, foram preparadas 2 amostras representativas para análise da morfologia das células MDPC-23 em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isto, as células tratadas diretamente com LED e as pertencentes ao grupo controle foram fixadas por 2 horas em glutaraldeído a 2,5%.

Após fixação das células, estas foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS (5 minutos cada lavagem) e então pós-fixadas por 60 minutos em 200 µL de tetróxido de ósmio 1%. As amostras foram desidratadas em trocas ascendentes de soluções de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 minutos em cada solução), sendo finalmente submetidas à secagem por meio do solvente de baixa tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, New Jersey, EUA) e mantidas em dessecador durante 12 horas. Finalmente, as

amostras foram fixadas em “stubs”, metalizadas com ouro, e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – EUA Inc., Peabody, Massachusetts, EUA).

4.4.3 Dosagem da proteína total e análise da atividade de fosfatase alcalina

Para este protocolo, oito amostras por grupo foram selecionadas para determinação da dosagem de proteína total, sendo que destas mesmas amostras foram obtidas alíquotas para análise da atividade de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 irradiadas ou não.

4.4.3.1 Dosagem da proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada para cada grupo experimental e controle, 72 horas após a irradiação com o LED, segundo protocolo de Read, Northcote (1981). O meio de cultura foi aspirado e as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. A lise das células foi realizada adicionando-se 1,2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA) em cada compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas e 1 mL de cada compartimento foi transferido para tubos Falcon (Corning Incorporated, New York, EUA) devidamente identificados (tubos testes), sendo que para o tubo representando o branco, foi acrescentado 1 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA) foi adicionado em todos os tubos, sendo agitados por 10 segundos em agitador de

tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil) e permanecendo por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se em cada tubo, 500 μ L de Solução de Folin e Ciocalteau's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA) e novamente agitou-se por 10 segundos em agitador de tubos. Trinta minutos após, três alíquotas de 100 μ L de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader, Hercules, Califórnia, EUA)

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

4.4.3.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada 72 horas após a irradiação das células, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utiliza o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, é possível medir-se diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH. O pH alterado promove a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que é medida fotometricamente (Roy, 1970).

O meio de cultura foi aspirado e as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. A lise das células foi realizada adicionando-se 1,2 mL de Lauril Sulfato de Sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, Missouri, EUA) em cada

compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. Enquanto isso, os tubos Falcon (testes, padrão e branco) foram devidamente identificados e 50 μ L de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 μ L de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit) foram adicionados em cada tubo. Apenas no tubo padrão, foi acrescentado 50 μ L do padrão 45 U/L (reagente nº 4 do Kit). Decorridos os 40 minutos da lise celular, os tubos foram colocados em banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) a 37°C por 2 minutos. As amostras foram, então, homogeneizadas e 50 μ L de cada compartimento foram transferidos para os tubos testes, mantidos em banho-maria e gentilmente agitados. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado 2 mL de Reagente de Cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit). A absorvância dos tubos testes, padrão e branco foi determinada em espectrofotômetro (Micronal B382, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda de 590 nm.

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

4.4.4 Expressão de proteínas

4.4.4.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

As células foram transferidas para tubo de microcentrífuga, foi adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para inibir a ação de RNAases - e incubado por 5min à temperatura ambiente. Após este período, foram

adicionados, para cada 1,0mL de Trizol, 0,2mL de clorofórmio (Sigma – Aldrich, St Louis, EUA,) para promover a liberação das proteínas citoplasmáticas.

Os tubos foram submetidos à agitação manual por 15 segundos mantidos à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1200rcf (Microcentrifuga Eppendorf modelo 5415R, Hamburg, Germany) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, estas amostras se apresentaram divididas em três fases, uma fase precipitada, correspondente à porção orgânica (fenol, clorofórmio, DNA), uma fase intermediária (proteínas) e uma fase mais aquosa sobrenadante, correspondente ao RNA (RNA e tampão).

A fase aquosa foi alíquotada para um novo tubo, no qual, para cada 1.0mL de Trizol utilizado foi adicionado 0,5mL de Isopropanol (Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA) para promover a precipitação do RNA em solução.

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos e, a seguir, centrifugadas a 12.000 rcf por 10 minutos a 4°C. Após esta etapa, foi observada a formação de uma fração precipitada (pellet) no fundo do tubo.

A parte sobrenadante do tubo foi descartada e a fração precipitada foi seca através da inversão dos tubos em papel por 10 minutos.

Após a secagem do RNA obtido, foram adicionados, para cada 1.0 mL de Trizol, 1.0 mL de etanol 75% (Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA) e as amostras foram colocadas em agitação e centrifugadas a 7.500 rcf por 5 minutos a 4°C.

A fração sobrenadante obtida foi descartada e o RNA submetido ao mesmo procedimento de secagem previamente descrito, por 30 minutos.

Após este período o RNA foi ressuspensão em 10 μ L de água ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a solução obtida foi incubada por 10 minutos a 55°C.

Parte do RNA obtido (1.0 mL) foi diluído em água ultrapura, na proporção de 1:50, para a realização da quantificação do RNA em Biofotômetro (Biophotometer Eppendorf – modelo Eppendorf RS – 232C, Hamburgo, Germany). Para cada amostra de RNA obtida foi sintetizado o cDNA, para a realização do qPCR. Esse protocolo foi realizado utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo o protocolo abaixo descrito.

Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 10x RT Buffer, 10X RT Random Primers, 25X dNTP Mix, Reverse Transcriptase and 0,5 μ g do RNA de cada amostra. A seguir, as amostras foram submetidas ao ciclo de amplificação, de 25°C (10min), 37° (120min), 85°C (5sec), 4°.

4.4.4.2 Q-PCR

Após a síntese do cDNA, foi avaliado o efeito da irradiação com o LED sobre a expressão dos genes que codificam fosfatase alcalina (ALP), fibronectina (FN), colágeno tipo I (Col I) e β Actina (controle endógeno). Para cada um destes genes, primers específicos foram desenhados a partir da sequência de mRNA (Tabela 3).

Tabela 3- Sequências e aplicações dos primers para *mus musculus* utilizados neste trabalho

Sequências dos primers		Utilização
S:	5' - AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC 3'	Amplificação de β Act
AS:	5' - CT CTC AGC TGT GGT GGT GAA 3'	
S:	5' - CTG GGG TCT ACT CCA CCG AA -3'	Amplificação de FN
AS:	5' - GCC AAG ATT CAG AGA CCC GG - 3'	
S:	5' - TGA GGT CCA GGA GGT CCA - 3'	Amplificação de Col-1
AS:	5' - AAC TTT GCT TCC CAG ATG TCC - 3'	
S:	5' - CTT GAC CTC CTC GGA AGA CAC TC- 3'	Amplificação de ALP
AS:	5' - CGC CCA CCA CCT TGT AGC C - 3'	

As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) adicionado dos conjuntos de primers para cada gene. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, foi referente ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram transferidos para planilhas e agrupados de acordo com os grupos experimentais, sendo então normalizados de acordo com a expressão do gene endógeno

selecionado (β Actina). Logo após, as concentrações de RNAm de cada gene alvo foram avaliadas estatisticamente.

4.5 Análise Estatística

O conjunto de dados de cada variável resposta, ou seja, atividade de SDH, síntese de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, expressão de colágeno tipo I, expressão de fosfatase alcalina e expressão de fibronectina, foi avaliado quanto a sua distribuição. Respeitados os requisitos para a seleção de testes paramétricos, para todos as variáveis-resposta (MTT, ALP, proteína total, expressão de colágeno tipo I, ALP e fibronectina), os respectivos testes não-paramétricos foram os de Kruskal-Wallis, complementado por Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância pré-determinado de 5%.

5 RESULTADO



5 RESULTADO

5.1 Análise da viabilidade celular (atividade de SDH pelo ensaio de MTT)

Os dados da atividade de enzima desidrogenase succínica (SDH) pelas células MDPC-23, em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 4 e Figura 8.

Tabela 4- Atividade da enzima desidrogenase succínica (%) pelas células MDPC-23, detectada pelo método MTT, em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	100,0 (93,8 - 128,7) a A*	100,0 (93,8 - 128,7) a B	100,0 (93,8 - 128,7) a A
4	106,0 (85,78 - 112,4) a A	101,1 (66,5 - 136,8) ab AB	81,4 (72,8 - 89,8) b B
25	105,2 (71,62 - 143,9) ab A	121,8 (106,7 - 169,7) a A	70,9 (58,4 - 102,7) b B

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=8. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

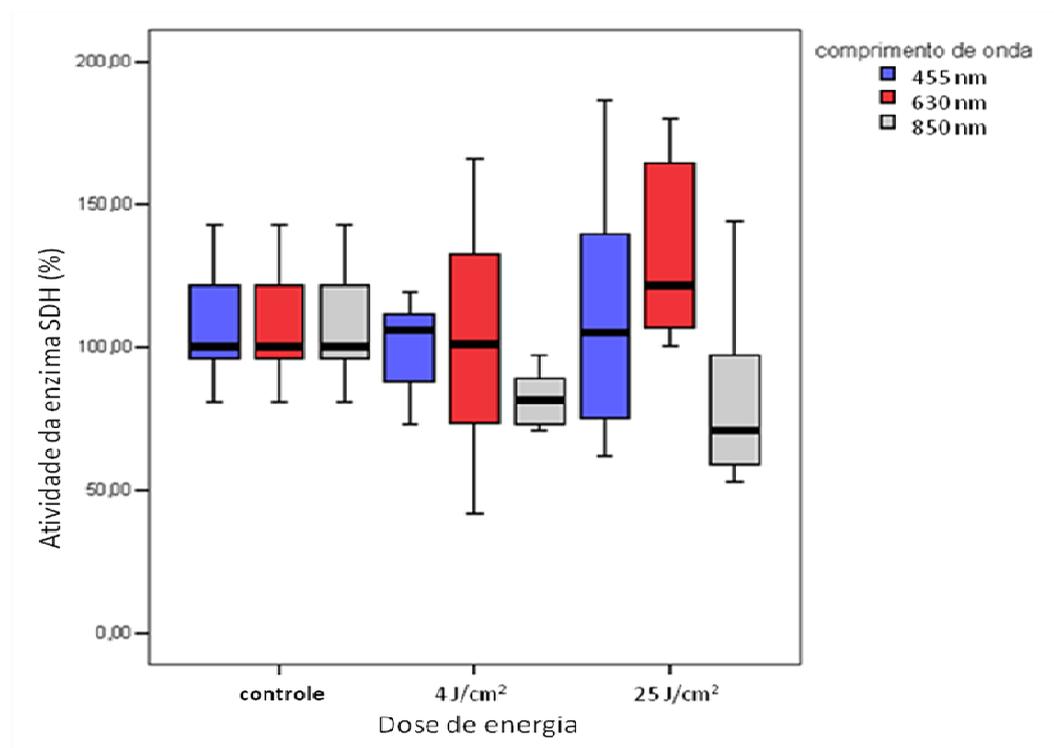


FIGURA 8- Gráfico representativo dos valores da atividade da enzima desidrogenase succínica (%) comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Quando realizada a comparação entre as doses de energia, foi observado que, para o comprimento de onda 455 nm (LED azul), não houve diferença estatística entre grupos irradiados e controle ($p > 0,05$). Já para o comprimento de onda 630 nm (LED vermelho), a dose de 25 J/cm² provocou um aumento no metabolismo celular (21,8%) com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, enquanto que para o comprimento de onda 850 nm (LED infravermelho), as doses de 4 e 25 J/cm² apresentaram menores valores em relação ao grupo que não recebeu irradiação (diminuição em 18,6% e 29,1% respectivamente, $p < 0,05$).

Quando os comprimentos de onda foram comparados entre si, para a dose de 4 J/cm², houve diferença estatisticamente significativa entre os comprimentos de onda 455 nm e 850 nm (p <0,05), sendo que a luz azul apresentou melhores resultados. Para a dose de energia de 25 J/cm², houve diferença entre os grupos irradiados com LED vermelho (630 nm) e o LED infravermelho (850 nm), sendo que o grupo irradiado com luz vermelha apresentou maiores valores (p < 0,05).

5.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

Os dados da atividade de fosfatase alcalina (ALP) pelas células MDPC-23, em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 5 e Figura 9.

Tabela 5- Atividade de fosfatase alcalina (%) pelas células MDPC-23, em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	100,0 (83,3 - 103,7) a B*	100,0 (83,3 - 103,7) a B	100,0 (83,3 - 103,7) a B
4	125,8 (82,6 - 253,4) bAB	146,7 (109,7 - 177,5) b A	320,1 (214,7 - 556,6) a A
25	213,0 (175,8 - 259,7) a A	181,7 (159,5 - 296,6) a A	221,2 (163,2 - 284,1) a A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=6. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, p > 0,05).

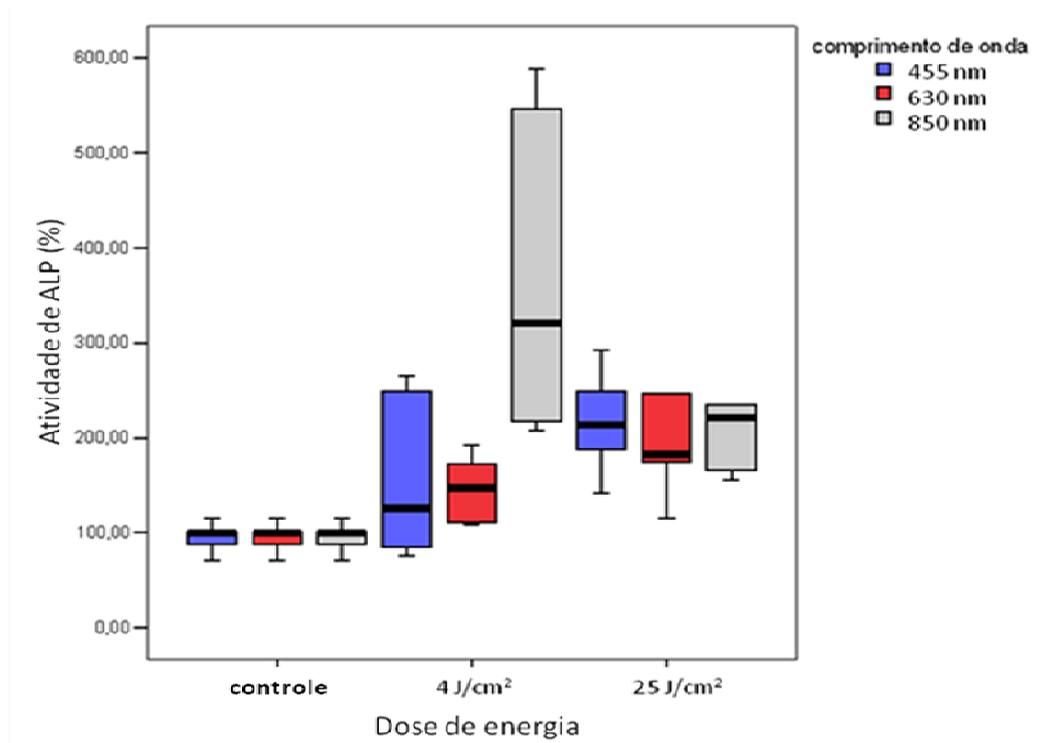


FIGURA 9- Gráfico representativo dos valores de síntese da fosfatase alcalina (%) comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Quando realizada a comparação entre as doses de energia, pôde ser observado que os grupos irradiados apresentaram maiores valores de atividade da fosfatase alcalina, quando comparados ao grupo controle, para todos os comprimentos, exceto para o LED azul, na dose de 4 J/cm² ($p > 0,05$). Para o comprimento de onda de 455nm (LED azul), o grupo irradiado com 25 J/cm² diferiu-se estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$) com aumento na atividade de ALP de 113%. Para o comprimento de onda 630 (LED vermelho), os grupos irradiados com 4 e 25 J/cm² também apresentaram valores superiores com significância estatística ($p < 0,05$), com aumento na atividade de ALP de 46,7% e 81,7%, respectivamente. Para o comprimento de onda de 855 nm (LED

infravermelho), os grupos irradiados com 4 e 25 J/cm², da mesma forma, apresentaram maiores valores com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, com aumento na atividade de ALP de 220% e 121%, respectivamente.

Quando os comprimentos de onda foram comparados, foi observado que não houve diferença entre os grupos quando as células foram irradiadas com a dose de 25 J/cm² ($p > 0,05$). Entretanto, quando irradiadas com 4 J/cm², maior atividade de ALP foi observada para o comprimento de onda de 830 nm em comparação aos comprimentos de 455 nm e 630 nm ($p < 0,05$), os quais não diferiram estatisticamente entre si ($p > 0,05$).

5.3 Produção de proteína total (PT)

Os dados de produção de proteína total (PT) pelas células MDPC-23, em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 6 e Figura 10 abaixo.

Tabela 6- Produção de proteína total (%) pelas células MDPC-23, em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	101,0 (100,0 - 118,5) a A*	101,0 (100,0 - 118,5) a A	101,0 (100,0 - 118,5) a A
4	93,8 (80,6 - 113,2) ab A	103,9 (98,1 - 125,5) a A	91,8 (76,1 - 99,8) b A
25	109,1 (95,5 - 129,7) a A	106,5 (89,7 - 119,2) a A	93,1 (80,5 - 112,7) a A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=8. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

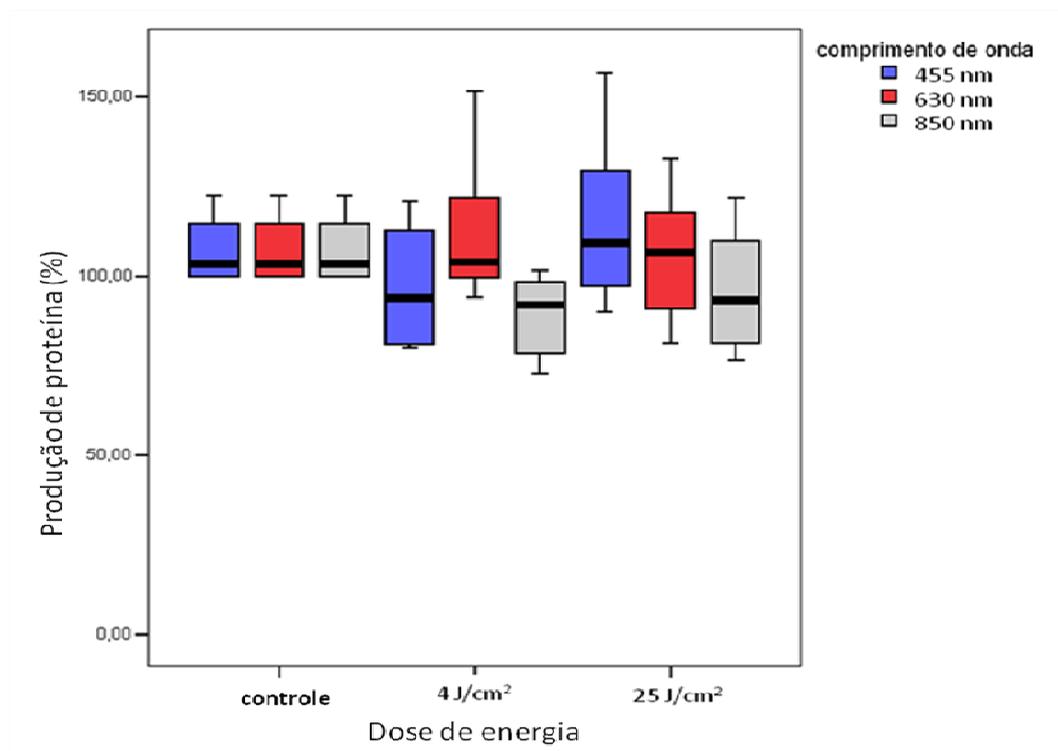


FIGURA 10- Gráfico representativo dos valores de produção de proteína total (%) pelas células MDPC-23 comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Quando as doses de energia foram comparadas, não houve diferença estatística entre grupos irradiados e controle, para nenhum dos comprimentos de onda utilizados ($p > 0,05$). Já quando os comprimentos de onda foram comparados, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os comprimentos 630 nm (LED vermelho) e 850 nm (LED infravermelho), apenas na dose de 4 J/cm², sendo que o comprimento pertencente a região vermelha apresentou melhores resultados ($p < 0,05$).

5.4 Avaliação da expressão gênica por RT-PCR

5.4.1 Expressão do colágeno tipo I (Col I)

Os dados da expressão de colágeno tipo I pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 7 e Figura 11 abaixo.

Tabela 7- Expressão de colágeno tipo I (%) pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	100,2 (91,6 - 137,9) a A*	100,2 (91,6 - 137,9) a A	100,2 (91,6 - 137,9) a B
4	36,0 (28,58 - 48,7) c B	91,7 (81,6 - 100,7) b A	267,6 (225,2 - 309,1) a A
25	44,2 (33,8 - 60,8) b B	60,3 (54,0 - 66,1) b B	74,7 (64,5 - 100,0) a B

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=8. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

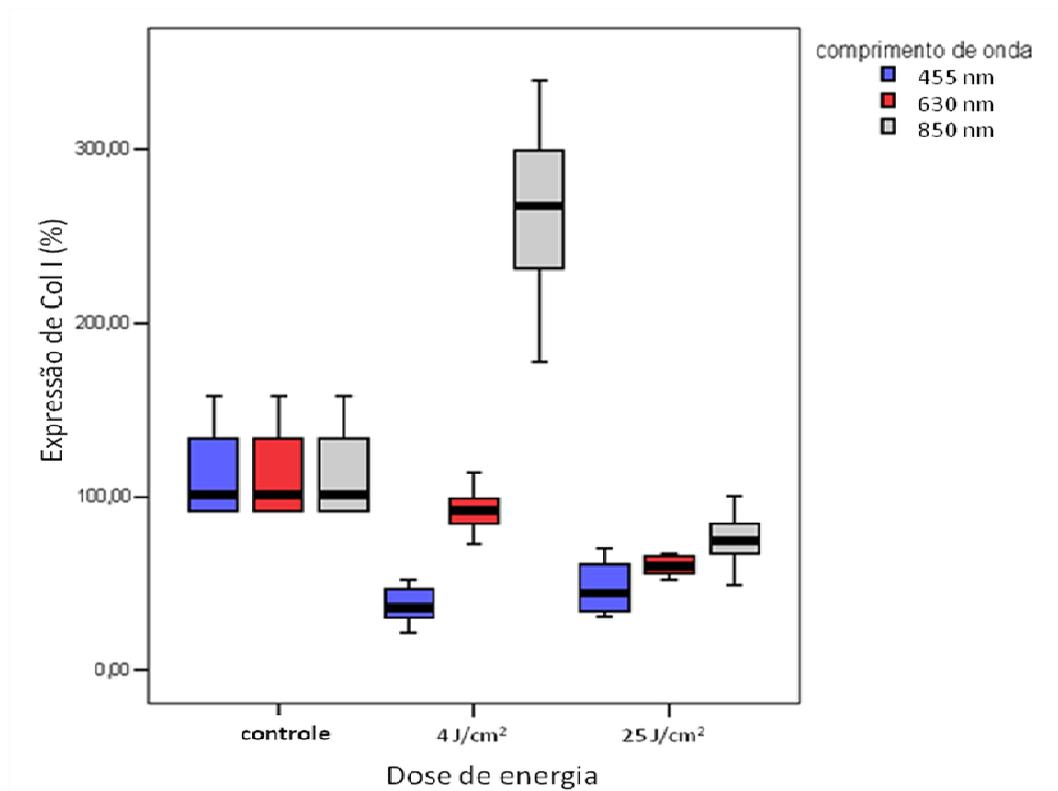


FIGURA 11- Gráfico representativo dos valores da expressão de colágeno tipo I (%) por células MDPC-23, pela técnica RT-PCR, comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Quando realizada a comparação entre as doses de energia, a irradiação com o comprimento de onda de 455 nm, para ambas a doses (4 e 25 J/cm²), gerou valores menores, com $p < 0,05$ (diminuição em 64% e 56% respectivamente). Para o LED vermelho, o grupo de 4 J/cm² não diferiu estatisticamente do grupo controle, entretanto a dose de 25 J/cm² reduziu a expressão de colágeno tipo I (diminuição em 40%, $p < 0,05$). Para o LED infravermelho a dose de 4 J/cm² resultou em maior expressão do colágeno tipo I em relação ao grupo controle,

sendo que o aumento da expressão foi em 168% ($p < 0,05$), a dose de 25 J/cm^2 não diferiu-se estatisticamente ($p > 0,05$).

Quando os comprimentos de onda foram comparados entre si, para a dose de 4 J/cm^2 , houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre todos os comprimentos, sendo que o 855 nm (infravermelho) apresentou melhores resultados, seguido do 630 nm (vermelho) e 455 nm (azul). Para a dose de 25 J/cm^2 o comprimento de onda de 850 nm apresentou maiores valores em relação aos comprimentos 455 nm e 630 nm ($p < 0,05$), os quais não diferem entre si ($p > 0,05$).

5.4.2 Expressão do fibronectina (FN)

Os dados da expressão de fibronectina pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 8 e Figura 12 abaixo.

Tabela 8- Expressão de fibronectina (%) pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	99,9 (92,5 - 113,8) a A*	99,9 (92,5 - 113,8) a A	99,9 (92,5 - 113,8) a A
4	112,0 (79,5 - 129,4) ab A	196,1 (92,9 - 247,3) a A	95,1 (76,7 - 125,7) b A
25	82,8 (57,1 - 102,9) a A	46,1 (22,6 - 55,8) b B	89,4 (86,3 - 92,0) a A

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=8. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

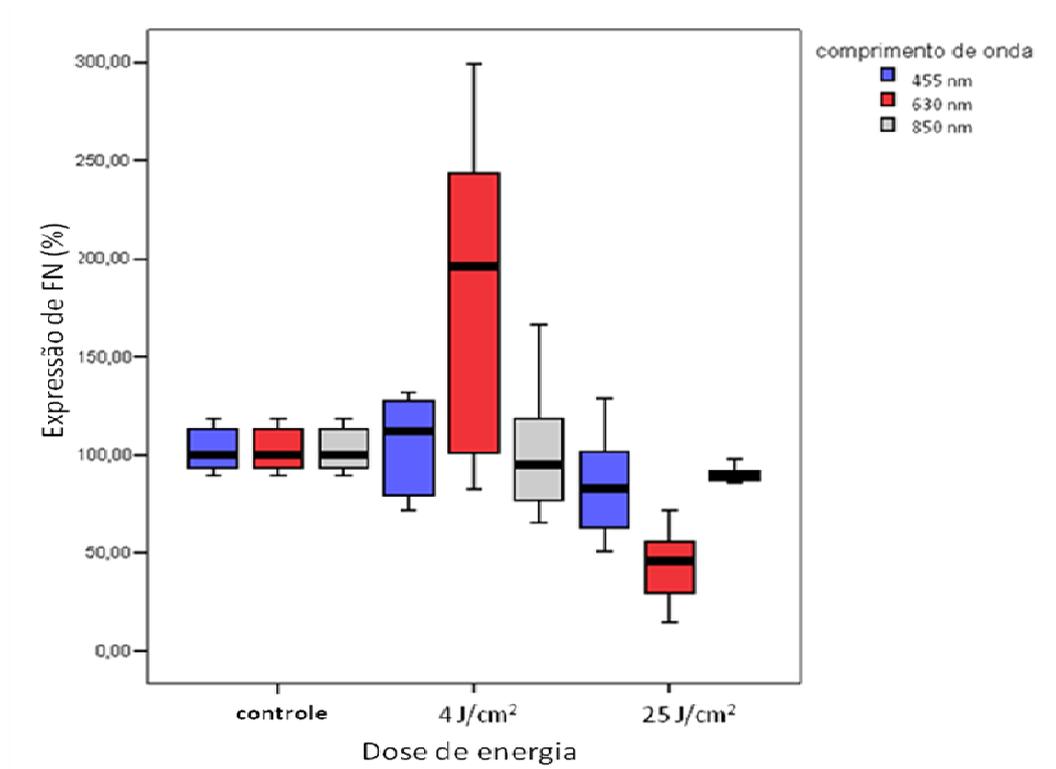


FIGURA 12- Gráfico representativo dos valores de expressão de fibronectina (%) pelas células MDPC-23 comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Não foi observada diferença estatística entre as doses (0-não irradiado, 4 e 25 J/cm²) para o grupo de 455 nm e 850 nm ($p > 0,05$). Para o grupo irradiado com LED vermelho (630 nm), a dose de 25 J/cm² diminuiu a expressão de FN em relação ao grupo não irradiado (diminuição em 54%, $p < 0,05$) e a dose de 4 J/cm² gerou valores superiores quando comparada ao grupo irradiado com 25 J/cm² ($p < 0,05$), porém sem diferir estatisticamente do controle ($p > 0,05$).

Quando os comprimentos de onda foram comparados entre si, para a dose de 4 J/cm², houve diferença estatisticamente significativa entre os comprimentos de onda 850 nm e 630 nm ($p < 0,05$), sendo que o LED vermelho apresentou

melhores valores. Já para a dose de 25 J/cm², os grupos irradiados com LED infravermelho (850 nm) e azul (455 nm) apresentaram maiores valores para expressão de fibronectina quando comparados ao grupo irradiado com LED vermelho (630 nm), com p < 0,05, porém sem diferença entre eles.

5.4.3 Expressão de fosfatase alcalina (ALP)

Os dados da expressão de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda utilizados estão apresentados na Tabela 9 e Figura 13 abaixo.

Tabela 9- Expressão de fosfatase alcalina (%) pelas células MDPC-23 (após 72 horas da irradiação) em função da dose de energia e do comprimento de onda

Dose de energia (J/cm ²)	Comprimento de onda (nm)		
	455	630	850
0 (controle)	99,8 (93,9 - 125,7) a A*	99,8 (93,9 - 125,7) a A	99,8 (93,9 - 125,7) a A
4	77,3 (41,8 - 136,1) a A	60,7(40,5 - 134,2) a AB	85,9 (46,8 - 139,3) a AB
25	25,9 (15,0 - 40,1) c B	52,7 (43,8 - 57,6) b B	80,3 (74,6 - 93,7) a B

Valores são medianas (percentil 25-percentil 75), n=8. *Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Valores com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (Mann-Whitney, p > 0,05).

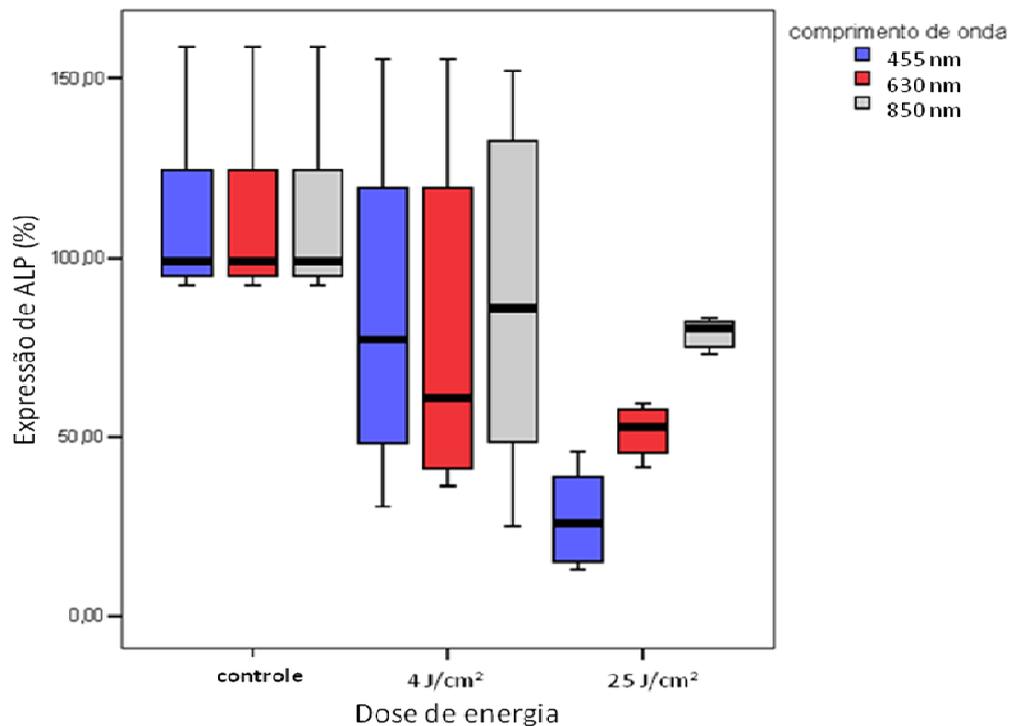


FIGURA 13- Gráfico representativo dos valores de expressão de fosfatase alcalina (%) pelas células MDPC-23 comparando os comprimentos de onda em função das doses de energia 4 e 25 J/cm².

Para o grupo irradiado com o comprimento de onda de 455 nm, a dose de 25 J/cm² provocou diminuição da expressão de ALP após 72 horas da irradiação (diminuição em 74%, $p < 0,05$), sendo que grupo controle e 4 J/cm² não diferiram entre si ($p > 0,05$). Para o grupo irradiado com LED vermelho (630 nm), a dose de 25 J/cm² diminuiu a expressão de ALP em relação ao grupo não irradiado em 47% ($p < 0,05$). Para o comprimento de onda de 850 nm, as doses de 4 e 25 J/cm² não diferiram estatisticamente do grupo controle para nenhum dos comprimentos ($p > 0,05$).

Quando os comprimentos de onda foram comparados entre si, para a dose de 4 J/cm², não houve diferença estatisticamente significativa entre os

comprimentos de onda ($p > 0,05$), enquanto que para a dose de 25 J/cm^2 , o grupo irradiado com LED infravermelho (850 nm) gerou maiores valores de expressão da fosfatase alcalina seguido do comprimento de onda de 630 nm e 455 nm, com $p < 0,05$ para todas as comparações.

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

A- Grupo controle (não irradiado): Um grande número de células MDPC-23 pode ser observado forrando o tecido dentinário (Figuras 14a e 14b).

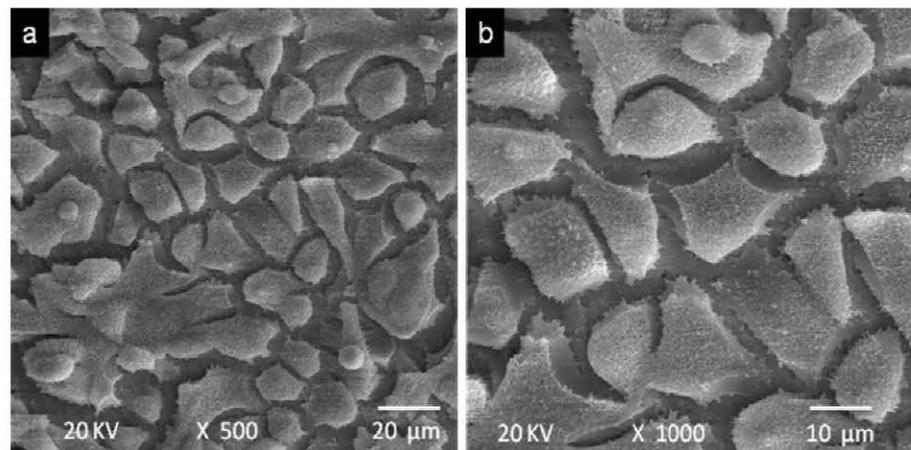


FIGURA 14 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo controle.

B- Grupo irradiado com LED azul (455 nm) na dose de 4 J/cm^2 : Um menor número de células recobrindo o tecido é observado, levando a exposição dos túbulos dentinários. Entretanto, numerosas mitoses estão presentes (setas) (Figuras 15a e 15b).

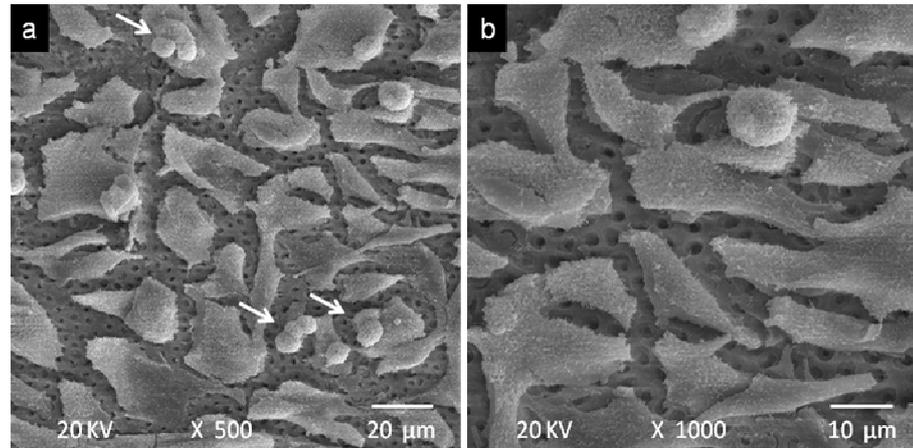


FIGURA 15 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo irradiado com LED azul (455 nm) na dose de 4 J/cm².

C- Grupo irradiado com LED azul (455 nm) na dose de 25 J/cm²: Um grande número de células recobrindo o tecido é observado, sendo que numerosas mitoses estão presentes (setas) (Figuras 16a e 16b).

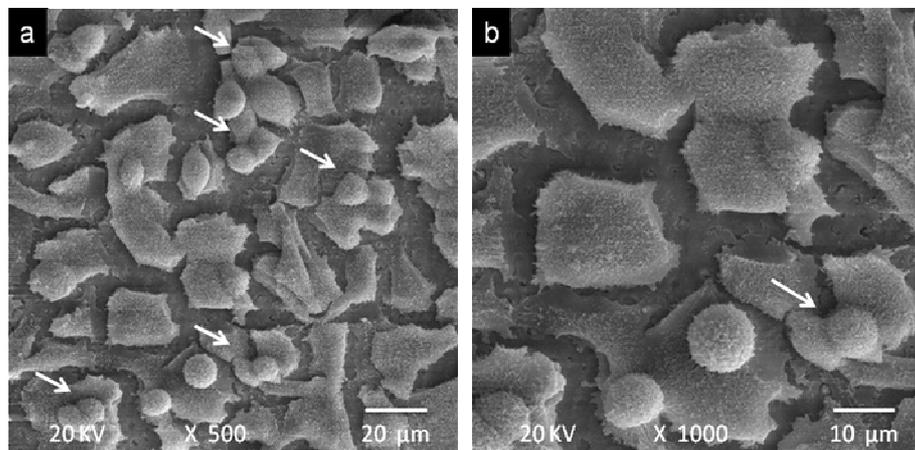


FIGURA 16 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23do grupo irradiado com LED azul (455 nm) na dose de 25 J/cm².

D- Grupo irradiado com LED vermelho (630 nm) na dose de 4 J/cm²: Um reduzido número de células recobrindo o tecido é observado, expondo

os túbulos dentinários, porém a presença de mitoses é observada (setas) (Figuras 17a e 17b).

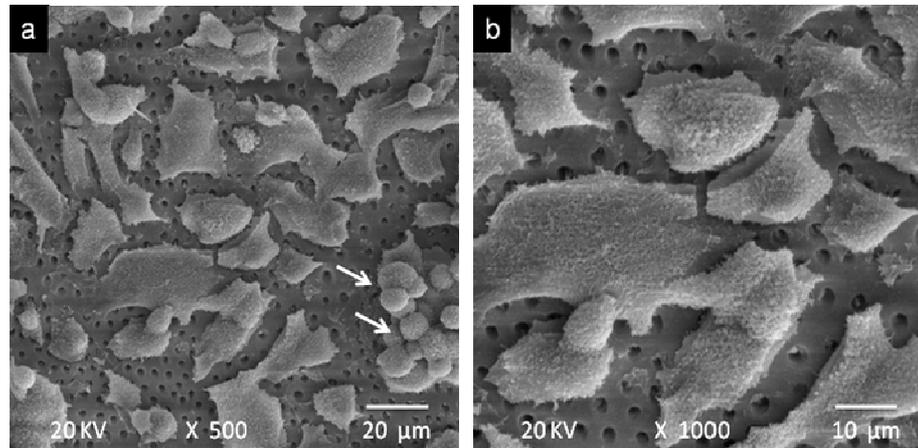


FIGURA 17 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo irradiado com LED vermelho (630 nm) na dose de 4 J/cm².

E- Grupo irradiado com LED vermelho (630 nm) na dose de 25 J/cm²:

Um grande número de células recobrindo o tecido dentinário e a presença de mitoses é observada (setas) (Figuras 18a e 18b).

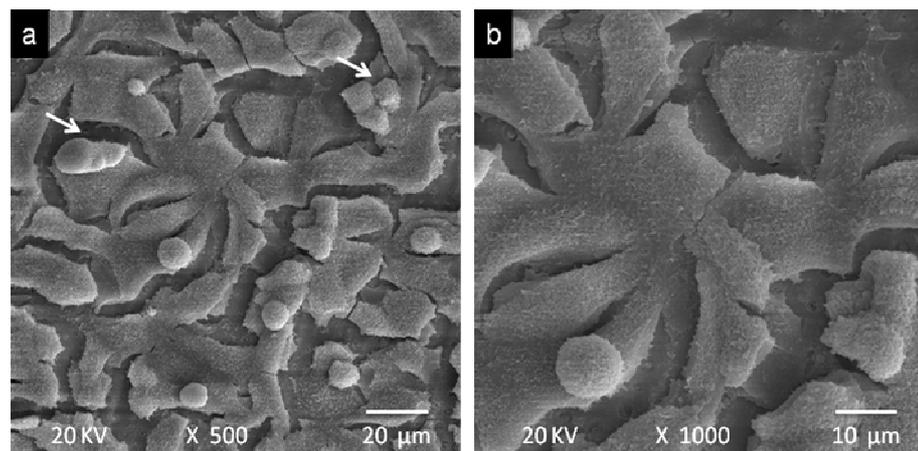


FIGURA 18 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo irradiado com LED vermelho (630 nm) na dose de 25 J/cm².

F- Grupo irradiado com LED infravermelho (850 nm) na dose de 4 J/cm²:

Um grande número de células recobrindo o tecido dentinário e a presença de mitoses (seta) são observados; entretanto alguns túbulos dentinários encontram-se expostos (Figuras 19a e 19b).

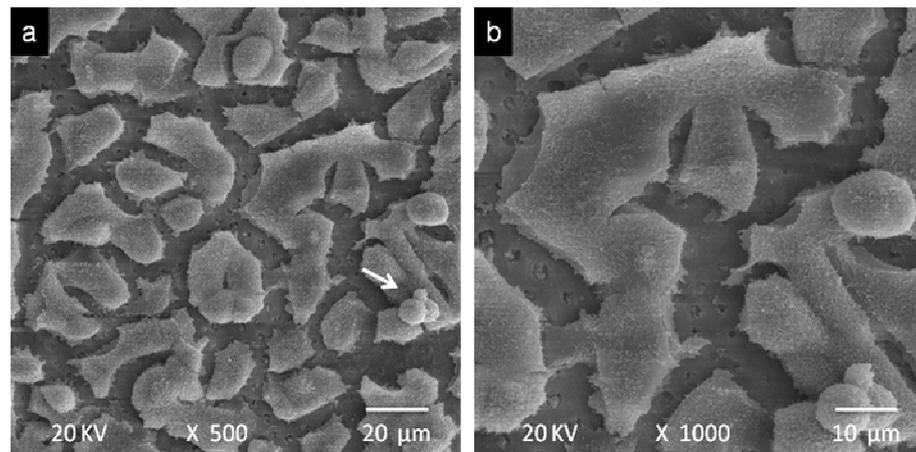


FIGURA 19 (a,b) – Morfologia das células odontoblastóides MDPC-23 do grupo irradiado com LED infravermelho (850 nm) na dose de 4 J/cm².

G- Grupo irradiado com LED infravermelho (850 nm) na dose de 25

J/cm²: Pode-se observar um grande número de células recobrindo o tecido dentinário e a presença de mitoses (setas), entretanto como na dose de 4 J/cm², há exposição d alguns túbulos dentinários (Figuras 20a e 20b).

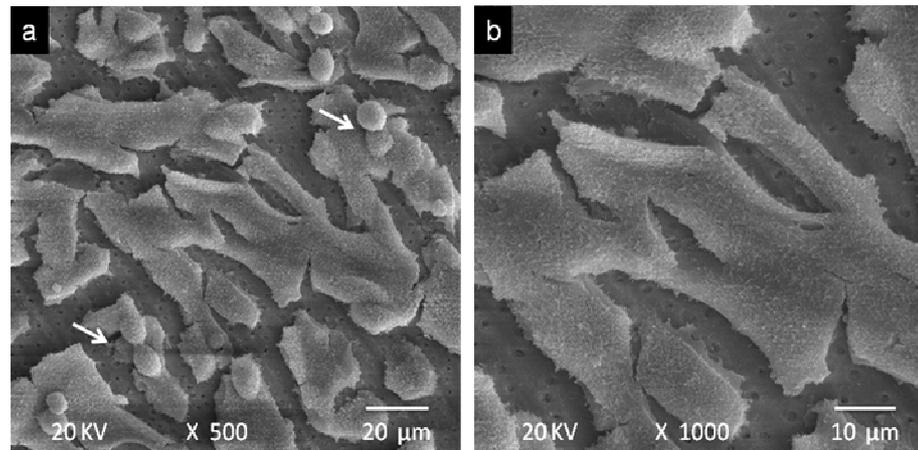


FIGURA 20 (a,b) – Morfologia das células odontoblásticas MDPC-23 do grupo irradiado com LED infravermelho (850 nm) na dose de 25 J/cm^2 .

Para possibilitar uma melhor comparação entre os diferentes grupos experimentais, as imagens geradas (nos diferentes aumentos) por Microscopia Eletrônica de Varredura das células MDPC-23 cultivadas em discos de dentina, após receberem os tratamentos estão indicadas nas Figuras 21 e 22.

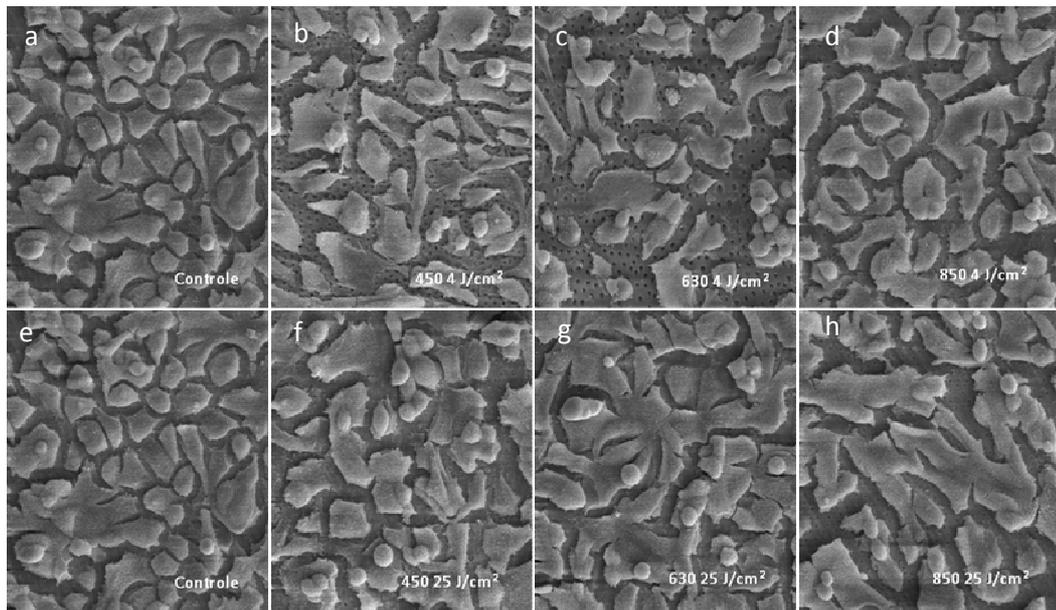


FIGURA 21- Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com aumento em x500, indicando células MDPC-213 sobre disco de dentina após tratamento. Letras a,b,c e d representam grupo controle, LED 455, 630 e 850 nm, respectivamente (DE: 4 J/cm²). Letras e,f,g e h representam grupo controle, LED 455, 630 e 850 nm, respectivamente (DE: 25 J/cm²)

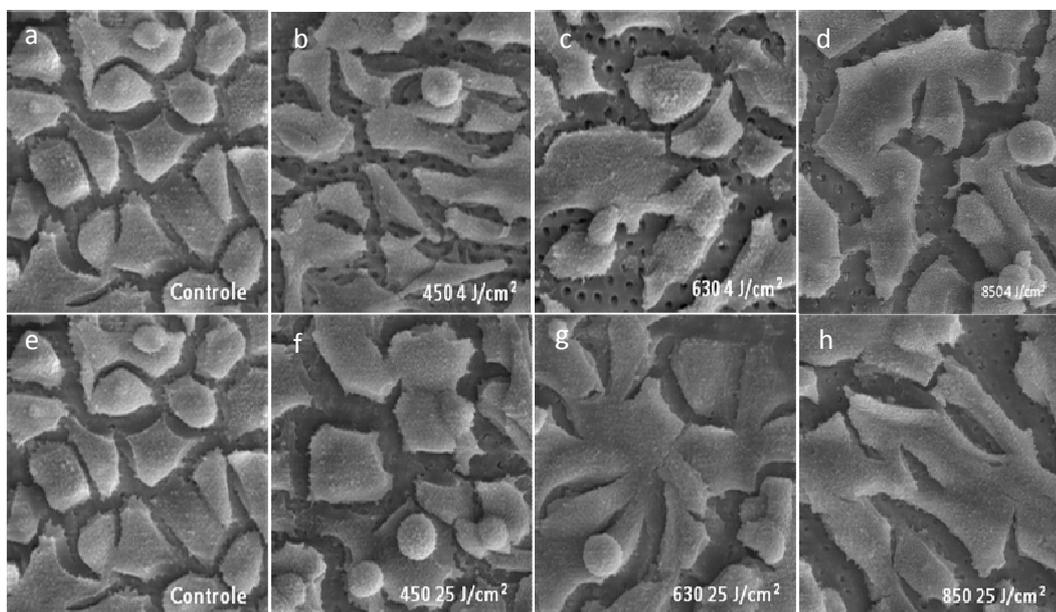


FIGURA 22- Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com aumento original x 1000, demonstrando a presença de células MDPC-23 sobre disco de dentina após tratamento. Letras a, b, c e d representam grupo controle, LED 455, 630 e 850 nm, respectivamente (DE: 4 J/cm²). Letras e, f, g e h representam grupo controle, LED 455, 630 e 850 nm, respectivamente (DE: 25 J/cm²).

Com o objetivo de facilitar a interpretação do comportamento celular nas diferentes avaliações e a comparação entre os comprimentos de onda e doses de energia testados, os dados foram resumidos na Tabela 10.

Tabela 10- Resposta celular encontrada para cada teste (72 horas após a irradiação) de acordo com os diferentes parâmetros testados quando comparados ao grupo controle (não irradiado)

Parâmetros testados	TESTES						
	(72 horas após a irradiação)						
	MTT	ALP	PT	MEV	FN (PCR)	Col I (PCR)	ALP (PCR)
(azul)							
455 nm	= C	= C	= C	- forrado	= C	- 64%	= C
4 J/cm²							
(azul)							
455 nm	= C	+ 113%	= C	= C	= C	-56%	- 74%
25 J/cm²							
(vermelho)							
630 nm	= C	+ 47%	= C	- forrado	= C	= C	= C
4 J/cm²							
(vermelho)							
630 nm	+ 22%	+ 82%	= C	+ forrado	- 54%	- 40%	- 47%
25 J/cm²							
(infravermelho)							
850 nm	- 19%	+ 220%	= C	= C	= C	+ 168%	= C
4 J/cm²							
(infravermelho)							
850 nm	- 29%	+ 121%	= C	= C	= C	=C	= C
25 J/cm²							

Resultados apresentados significam: iguais ao controle (= C), aumento da expressão, produção ou atividade (+ %), diminuição da expressão, produção ou atividade (- %), maior número de células recobrando o tecido dentinário (+ forrado) ou menor número de células recobrando o tecido dentinário (- forrado).

6 DISCUSSÃO



6 DISCUSSÃO

A utilização de diodos emissores de luz (LED) tem sido sugerida como forma de terapia em diversas áreas da saúde, particularmente para tratamento de dermatites^{1,16,23} e doença de Alzheimer⁸⁶. Este tipo de luz também tem sido empregado para analgesia muscular, ação antiinflamatória^{48,52,83} e na regeneração de tecidos lesionados^{5,10,14,15,17,22,71}. Especificamente na área da Odontologia, o LED tem sido sugerido como forma de tratamento para mucosites⁷⁰ e também de hipersensibilidade dentinária⁵⁵.

A ação da luz na diminuição da hipersensibilidade da dentina parece ocorrer devido ao aumento do limiar de excitação das terminações nervosas livres na polpa, além da capacidade de estimular a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos, ativando a síntese da matriz de dentina terciária rica em colágeno^{27,77}. Tate et al.⁷⁷ (2006) irradiaram molares de ratos com laser de baixa intensidade e verificaram formação de tecido mineralizado após 30 dias da irradiação. Entretanto, para que a luz tenha algum efeito benéfico para a polpa, ela precisa ser transmitida através do tecido dentinário e alcançar as células pulpares numa dose de energia suficiente para bioestimulá-las. Segundo Gao, Xing²⁸ (2009), existem muitos estudos avaliando os efeitos clínicos da luz; por outro lado, poucas são as pesquisas desenvolvidas na área básica com o objetivo de determinar os parâmetros ideais para a aplicação da luz nas diversas atividades terapêuticas. Desta maneira, o presente estudo avaliou o efeito transdentinário do LED sobre células odontoblastóides MDPC-23 cultivadas em discos de dentina, empregando para isto três comprimentos de onda pertencentes a diferentes

espectros, para os quais alguns efeitos celulares positivos já foram descritos na literatura^{32,34,50,51,62}. Assim, foi demonstrado, na presente pesquisa, que as células odontoblastóides responderam de diferentes formas, dependendo do comprimento de onda e da dose de energia utilizada.

Discos de dentina com espessura de 0,2 mm foram usados na presente pesquisa com o objetivo de simular situações clínicas onde as cavidades dentárias são muito profundas e a agressão às células do tecido pulpar pode ser considerada intensa. Neste estudo, a distribuição homogênea dos discos de dentina entre os diferentes grupos foi baseada na perda de potência ocorrida em cada disco, e não nos valores de permeabilidade dentinária como realizado em estudos anteriores⁷³. Este parâmetro metodológico foi determinado com base no estudo de Turrioni et al,⁷⁸ em 2011, onde foi demonstrado a baixa correlação entre a passagem de luz pelo tecido dentinário e sua permeabilidade (definida pelo número e diâmetro dos túbulos dentinários). Assim, os autores sugeriram que o teste mais indicado para a distribuição homogênea dos discos entre os diferentes grupos experimentais, para estudos que avaliam a ação de luz através da dentina, é a perda de potência transdentinária.

Com relação aos parâmetros de irradiação utilizados no presente estudo, encontrou-se dificuldade em determinar a irradiância e a dose de energia ideais para estimulação da cultura celular, devido à falta de padronização nos estudos já existentes. De acordo com a revisão de literatura, as doses de energia do LED utilizadas para bioestimulação variaram de 0,093 J/cm²⁴⁴ a 162 J/cm²⁷⁶, sendo que a dose mais estudada pelos pesquisadores foi a de 4 J/cm²^{9,51,86,88}. Desta

forma, as duas doses de energia testadas na presente pesquisa (4 e 25 J/cm²) estão dentro do intervalo de doses anteriormente avaliadas. Quanto aos valores de irradiância, a revisão de literatura apresentou uma variação de 0,5 mW/cm²⁸² a 140 mW/cm²²⁹, sendo que a maior parte dos estudos utilizou irradiância abaixo de 10 mW/cm²^{12,34,44,50,51,53,65,81,82}. No presente estudo, foi empregada a irradiância de 88 mW/cm² devido a três motivos: 1- a luz necessitava ultrapassar uma barreira dentinária, e sendo assim, isto não ocorreria se fosse utilizada uma irradiância igual ou inferior a 10 mW/cm²; 2- a dose testada é a máxima que o LED infravermelho consegue alcançar sem causar danos aos diodos; e 3- a dose de potência proposta está dentro do intervalo de irradiância previamente avaliada na literatura^{29,82}. Além disso, valores de potência variando de 1 a 500 mW, em doses de 0,04 a 50 J/cm² são considerados parâmetros de terapia de baixa intensidade, sendo assim recomendados para estimular células em cultura³.

Além do comprimento de onda, dose de energia e irradiância, deve-se levar em consideração, também, alguns outros fatores, tais como: a) densidade de células cultivadas para o experimento; b) tempo de incubação antes da irradiação (que determina o nível de confluência celular); c) existência ou não de estresse celular; d) número de irradiações realizadas; e e) tempo de avaliação pós-irradiação, os quais influenciam a resposta das células frente à fototerapia^{4,6,29,50,51,63,64,84}. Li et al.⁵¹ (2010) utilizaram LED vermelho na irradiação de células mesenquimais e verificaram que a densidade de plaqueamento interferiu na resposta celular, sendo que a densidade de 100 células/cm² (menor densidade testada), apresentou os melhores resultados para o

teste de proliferação. No presente estudo, as células foram semeadas numa densidade de 3×10^4 células/disco, as quais foram, então, incubadas por 24 horas em meio de cultura completo (DMEM + 10% de SFB). Decorrido este período inicial, o meio de cultura foi substituído por outro com reduzida quantidade de soro fetal bovino (DMEM + 2% de SFB), onde as células permaneceram por mais 24 horas, até receberem as irradiações. Este protocolo coincide com aqueles utilizados em estudos anteriores realizados com células MDPC-23^{63,64}. É importante ressaltar que neste caso, os protocolos variam de acordo com o tipo de célula em questão; entretanto, de acordo com a revisão de literatura, o tempo de incubação mais utilizado, independente do tipo celular, foi de 24 horas antes da irradiação^{12,29,34,50,51,76,81,82,84}. Além disso, AlGhamdi et al.³ (2011) demonstraram que, para obtenção de resposta máxima da proliferação induzida pela luz, as células precisam estar em um nível de confluência mínima de 20% no momento da irradiação. Como observado na Figura 7 apresentada na metodologia deste estudo, sugere-se que o nível de confluência das células MDPC-23, no momento da irradiação era maior do que 20%. Todos os fatores discutidos até o momento são importantes para se conseguir uma resposta efetiva das células submetidas a irradiação.

No presente estudo, observou-se aumento significativo do metabolismo celular apenas para o grupo submetido à irradiação de 25 J/cm^2 com LED vermelho ($\lambda = 630 \text{ nm}$), sendo que para o LED azul ($\lambda = 455 \text{ nm}$), nas doses de 4 e 25 J/cm^2 e para o LED vermelho, na dose de 4 J/cm^2 não houve diferença estatística em relação ao controle. Já as doses de 4 e 25 J/cm^2 , no comprimento de

onda de 850 nm (LED infravermelho), provocaram diminuição do metabolismo celular após 72 horas da irradiação. Vinck et al.⁸¹ (2003) irradiaram fibroblastos com LED vermelho e infravermelho, sendo que o metabolismo celular foi avaliado após 24 e 72 horas. Observou-se aumento do metabolismo no tempo de 24 horas e diminuição do metabolismo no tempo de 72 horas. Os autores justificaram que a redução do metabolismo no período de 72 horas pode ter acontecido devido a uma possível confluência ocorrida depois de um longo tempo de incubação, o que provoca inibição do metabolismo celular por contato. Sugere-se que, no presente estudo, este evento tenha ocorrido para o comprimento de onda infravermelho, o qual pode ter proporcionado uma maior proliferação celular, levando as células a entrarem em confluência em um menor período de tempo, causando a diminuição no metabolismo das células MDPC-23 após 72 horas de incubação.

Outros estudos também avaliaram o efeito da luz sobre o metabolismo celular através do método de MTT, sendo que as respostas encontradas após estímulo foram: aumento do metabolismo após 24 horas^{81,82} ou após três dias⁵⁰ e metabolismo semelhante ao grupo controle^{44,65}. É importante ressaltar que as respostas foram sempre dependentes do tipo de cultura celular e parâmetros de irradiação testados. Deste modo, as células que apresentaram aumento do metabolismo após 24 horas da última irradiação foram as de linhagem fibroblástica, semeadas na densidade de 7×10^4 células/cm², incubadas por 24 horas e submetidas a 3 irradiações diárias^{81,82}, sendo que este protocolo não coincide com àquele empregado na presente pesquisa. Tal protocolo não foi

utilizado no presente estudo devido à diferença do tipo celular, a necessidade de uma única irradiação para simular a condição clínica na cavidade antes de uma restauração, e a existência de protocolos utilizando irradiação em células MDPC-23^{63,64}.

Além da avaliação do metabolismo celular, também foi analisado no presente estudo, a atividade de fosfatase alcalina (ALP) pelas células MDPC-23. A ALP é uma enzima expressa por células (osteoblastos ou odontoblastos) que participam da mineralização inicial da matriz (óssea ou dentinária), sendo considerada, desta maneira, um marcador de diferenciação para estes tipos celulares^{44,51}. A análise dos resultados do presente estudo, caracterizou o aumento na atividade desta proteína para todos os grupos irradiados, exceto para o grupo de 4 J/cm² do LED azul. Pesquisas prévias demonstram que, dependendo do parâmetro de irradiação utilizado, diferentes respostas podem ocorrer quanto a atividade de ALP^{44,51,65}. Oliveira et al.⁶⁵ (2008) irradiaram células odontoblastóides com laser de baixa intensidade no comprimento de onda infravermelho (I: 9,3 mW/cm², DE: 0,32 J/cm²) e encontraram uma diminuição da atividade de ALP para o grupo irradiado. Entretanto, outras investigações que avaliaram o efeito da luz sobre cultura de células mesenquimais, encontraram aumento da expressão desta proteína após irradiação com LED vermelho^{44,51}. No presente estudo, foi observado aumento da atividade desta enzima, o qual variou de 47 % (LED vermelho, 25 J/cm²) a 220% (LED infravermelho, 4 J/cm²). Desta forma, a irradiação com LED infravermelho promoveu uma diminuição do metabolismo celular provavelmente pela confluência em um menor tempo⁸¹, não

impedindo, no entanto, a continuidade e aumento na síntese e atividade de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23. As imagens em MEV das amostras submetidas à irradiação com LED infravermelho foram semelhantes àsquelas do grupo controle, sugerindo que a diminuição do metabolismo não foi devido à morte celular. Portanto, acredita-se que a irradiação com LED nos diferentes comprimentos gerou um estímulo capaz induzir o aumento na atividade de fosfatase alcalina pelas células odontoblastóides.

Quanto à análise da expressão de genes relacionados à formação de matriz dentinária e sua mineralização (FN, Col I e ALP), de uma maneira geral, os grupos irradiados apresentaram respostas semelhantes ao controle ou provocaram diminuição da expressão destes genes. A exceção foi para o comprimento de onda infravermelho, na dose de 4 J/cm^2 , cuja irradiação promoveu aumento da expressão de Col I em 167%, quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, estudos anteriores que avaliaram a expressão de Col I ou ALP relataram que a resposta do grupo irradiado foi semelhante ao controle⁶⁵ ou que a expressão foi aumentada para os grupos irradiados^{9,44}. Kim et al.⁴⁴ (2009) utilizaram LED vermelho (I: $9,29 \text{ mW/cm}^2$, DE: $0,279 \text{ J/cm}^2$) para irradiar cultura de células mesenquimais. Os autores demonstraram, diferentemente do protocolo utilizado no presente estudo, no qual foi avaliado a expressão de ALP 72 horas após a irradiação, a ocorrência de significativo aumento na expressão de ALP no período de 48 horas após a irradiação. Num trabalho recente, Barolet et al.⁹ (2009) irradiaram cultura 3D (fibroblastos e queratinócitos) com LED vermelho. Os autores, os quais aplicaram 11 irradiações sobre as células durante 4 semanas,

demonstraram a ocorrência de aumento na expressão de Col I. Ambos os protocolos relatados se diferem do utilizado para as células odontoblastóides neste estudo. A diminuição da expressão de FN, Col I e ALP, observado no presente estudo para as células MDPC-23, em alguns grupos irradiados, pode ter acontecido em decorrência de um possível estímulo inibitório do LED, para os parâmetros selecionados, sobre as células MDPC-23 ou ao tempo de avaliação inadequado para detectar o pico de expressão destes genes. Como a atividade de fosfatase alcalina foi aumentada para os grupos irradiados, é sugerido que o pico de sinalização da expressão dos genes selecionados tenha ocorrido em um período anterior a 72 horas e que no momento da avaliação, as células já não sinalizavam para a produção de Col I, FN e ALP.

Deste modo, o presente estudo apresentou algumas limitações como a falta de dados científicos anteriores que indicassem o parâmetro de irradiação ideal para o tipo celular estudado e a ausência de obtenção da curva tempo/resposta para a expressão de Col I, FN e ALP. Sugere-se a realização de novas investigações para avaliar a curva tempo/resposta da expressão dos genes analisados no presente estudo, seguindo o mesmo protocolo de irradiação. Seria importante, também, fazer a avaliação das vias de sinalização relacionadas com o aumento da produção de proteínas envolvidas na formação e mineralização da matriz dentinária, por células irradiadas com LED.

7 CONCLUSÃO



7 CONCLUSÃO

Com base nas condições experimentais do presente estudo e de acordo com a metodologia empregada, foi possível concluir que:

1. A irradiação com LED vermelho ($\lambda = 630$ nm), na dose de 25 J/cm^2 promoveu aumento do metabolismo de células MDPC-23;
2. A atividade de fosfatase alcalina foi aumentada para todos os grupos irradiados exceto para o grupo irradiado com LED azul ($\lambda = 455$ nm) na dose de 4 J/cm^2 ;
3. A irradiação com LED infravermelho ($\lambda = 850$ nm), na dose de 4 J/cm^2 estimulou a expressão de Col I pelas células MDPC-23;
4. O comprimento de onda e a dose de energia foram fatores que interferiram na resposta celular frente a irradiação com diodos emissores de luz.

8 REFERÊNCIAS



8 REFERÊNCIAS*

1. Ablon G. Combination 830-nm and 633-nm light-emitting diode phototherapy shows promise in the treatment of recalcitrant psoriasis: preliminary findings. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28: 141-6.
2. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK express in vitro. *Lasers Med Sci.* 2006; 21: 24-33.
3. Alghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan 28 [Epub ahead of print].
4. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on culture irradiance an same fluency. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-84.
5. 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.
6. Ankri R, Friedman H, Savion N, Kotev-Emeth S, Breitbart H, Lubart R. Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cells. *Lasers Surg Med.* 2010; 42:348-52.
7. 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.

*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)

8. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 2008; 27:227-38.
9. Barolet D, Roberge CJ, Auger FA, Boucher A, Germain L. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. *J Invest Dermatol.* 2009; 129:2751-9.
10. Bastos JLN, Lizarelli RFZ, Parizotto NA. Comparative study of laser and LED systems of low intensity applied to tendon healing. *Laser Phys.* 2009; 19:1925–31.
11. Bergenholtz G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11:467-80.
12. Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. Melanin density affects photobiomodulation outcomes in cell culture. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25:144-9.
13. Cagnie EMVB, Cornelissen MJ, Declerecq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and power laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2003; 18:95-9.
14. Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L Jr, De Paula AM, Pacheco MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24:659-65.

15. Castro-e-Silva T, Castro-e-Silva O, Kurachi C, Ferreira J, Zucoloto S, Bagnato VS. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondria function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40:1065-9.
16. Chang YS, Hwang JH, Kwon HN, Choi CW, Ko SY, Park WS, et al. In vitro and in vivo efficacy of new blue light emitting diode phototherapy compared to conventional halogen quartz phototherapy for neonatal jaundice. *J Korean Med Sci.* 2005; 20:61-4.
17. Corazza AV, Jorge J, Kurachi C, Bagnato VS. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. *Photomed Laser Surg.* 2007; 25:102-6.
18. 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.
19. Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003; 24:3853-8.
20. 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.
21. Costa CAS, Duarte PCT, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent.* 2008; 21:255-61.

22. Dall 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.
23. 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.
24. 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.
25. Dogan A, Hubbezoğlu I, Dogan OM, Bolayir G, Demir H. Temperature rise induced by various light curing units through human dentin. *Dent Mater J.* 2009; 28:253-60.
26. 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.
27. Ferreira ANS, Silveira S, Genovese WJ, Cavalcante de Araújo V, Frigo L, de Mesquita RA, et al. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 358–65.
28. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 4.

29. Gritsch K, Ponsonnet L, Schembri C, Farge P, Pourreyron L, Grosogoea B. Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. *Mater Sci Eng C*. 2008; 28: 805-10
30. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res*. 1998; 3: 1-17.
31. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF – β activated leads to a Smad3 – mediated down – regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol*. 2004; 49: 911–8.
32. Higuchi A, Watanabe T, Noguchi Y, Chang Y, Chen WY, Matsuoka Y. Visible light regulates neurite outgrowth of nerve cells. *Cytotechnology*. 2007; 54:181-8.
33. 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.
34. 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 photoradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg*. 2007; 25:183-90.
35. Jia YL, Guo ZY. Effect of Low-Power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Lasers Surg Med*. 2004; 34: 323-8.

36. Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effect of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36:307-14.
37. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol Biol.* 1995; 27: 219-23.
38. Karu TI, Pyatibrat, LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low - intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18:171-7.
39. Kelencz CA, Muñoz IS, Amorim CF, Nicolau RA. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium noncoherent light (640 nm) on muscle activity: a clinical study. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28:647-52.
40. Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behavior of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16: 168–75.
41. Khadra M, Lyngstadaas PS, Haanæs RH, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26: 3503–9.
42. Kienle A, Michels R, Hibst R. Magnification - a new look at a long-known optical property of dentin. *J Dent Res.* 2006; 85:955-9.

43. Kikuchi H, Sawda T, Yanagisawa T. Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated, agar-coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 871-83.
44. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Kim DO, Park SJ, Chung JY, et al. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.* 2009; 24:214-22.
45. Koutná M, Janisch R, Veselska R. Effects of low-power irradiation on cell proliferation. *Scr Med (BRNO).* 2003; 76: 163-72.
46. Kumar P, Murki S, Malik GK, Chawla D, Deorari AK, Karthi N, et al. Light emitting diodes versus compact fluorescent tubes for phototherapy in neonatal jaundice: a multi center randomized controlled trial. *Indian Pediatr.* 2010; 47:131-7.
47. Lanza CRM, Costa CAS, Alecio AC, Furlan M, Hebling J. Transdental diffusion and cytotoxicity of self-etching adhesive systems. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25: 533-43.
48. 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.
49. Lewis JB, Wataha JC, Messer RL, Caughman GB, Yamamoto T, Hsu SD. Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2005; 72:223-9.

50. Li WT, Chen HL, Wang CT. Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Med Biol Eng.* 2006; 26: 35-42
51. Li WT, Leu YC, Wu JL. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28:157-65
52. Lim JH, Lee J, Choi J, Hong J, Jhun H, Han J, et al. The effects of light-emitting diode irradiation at 610 nm and 710 nm on murine T-cell subset populations. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27:813-8.
53. 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.
54. Linde A, Bhowm 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; 255:5931-42.
55. Lizarelli RFZ, Miguel FAC, Villa GEP, Filho EC, Pelino JEP, Bagnato VS. Clinical effects of low-intensity laser vs light-emitting diode therapy on dentin hypersensitivity. *J Oral Laser Appli.* 2007; 7:1-8.
56. Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RL, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater.* 2005; 21:683-8.

57. Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, Lavie R, Breitbart H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol Biol.* 1992; 15: 337-41.
58. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 97-103.
59. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT, Costa CA, Hebling J, Sipert CR, et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci.* 2009;17:544-54.
60. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
61. Nara Y, Tsukamoto Y, Fukutani S, Yamaguchi N, Mori M, Morioka T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. *Lasers Life Sci.* 1992; 4: 249-56.
62. Neupane J, Ghimire S, Shakya S, Chaudhary L, Shrivastava VP. Effect of light emitting diodes in the photodynamic therapy of rheumatoid arthritis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010;7:44-9.
63. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, et al. Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys.* 2010; 20: 1659-66.

64. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, et al. In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett.* 2011; 8: 155-63.
65. Oliveira CF, Hebling J, Souza PPC, Sacono NT, Lessa FR, Lizarelli RFZ, et al. Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Phys* 2008; 5: 680-5.
66. Outhwaite WC, Mickenzie DM, Pashley DH. A versatile split-chamber device for studying dentin permeability. *J Dent Res.* 1974; 53: 1503
67. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981; 116: 53-64.
68. Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immuno-histochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med.* 1995; 16: 368-79.
69. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970; 16: 431-6.
70. Sacono NT, Costa CA, Bagnato VS, Abreu-e-Lima FC. Light-emitting diode therapy in chemotherapy-induced mucositis. *Lasers Surg Med.* 2008; 40:625-33.
71. Sousa AP, Santos JN, Dos Reis JA Jr, Ramos TA, de Souza J, Cangussú MC, Pinheiro AL. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28:547-52.

72. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Costa CAS. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 838–44.
73. Souza PPC, Hebling J, Scalón MG, Aranha AM, Costa CA. Effects of intrapulpal temperature change induced by visible light units on the metabolism of odontoblast-like cells. *Am J Dent.* 2009; 22:151-6.
74. 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.
75. Takezaki S, Omi T, Sato S, Kawana S. Light-emitting diode phototherapy at 630 +/- 3 nm increases local levels of skin-homing T-cells in human subjects. *J Nippon Med Sch.* 2006; 73:75-81.
76. Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dent Mater.* 2008; 24:895-900.
77. 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.
78. Turrioni AP, de Oliveira CF, Basso FG, Moriyama LT, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Correlation between light transmission and permeability of human dentin. *Lasers Med Sci.* 2011 May 10 [Epub ahead of print].

79. Vaarkamp J, ten Bosch JJ, Verdonschot EH. Propagation of light through human dental enamel and dentine. *Caries Res.* 1995; 29:8-13
80. Villa GEP, Catirse ABCED, Lia RCC, Lizarelli RFZ. In vivo analysis of low-power laser effects irradiation at stimulation of reactive dentine. *Laser Phys Lett.* 2007; 4: 690-5.
81. 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.
82. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23:167-71.
83. Vinck EM, Cagnie BJ, Coorevits, 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.
84. Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Hsu S, Messer RL, Rueggeberg FA, et al. Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res.* 2004; 83:104-8.
85. 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.

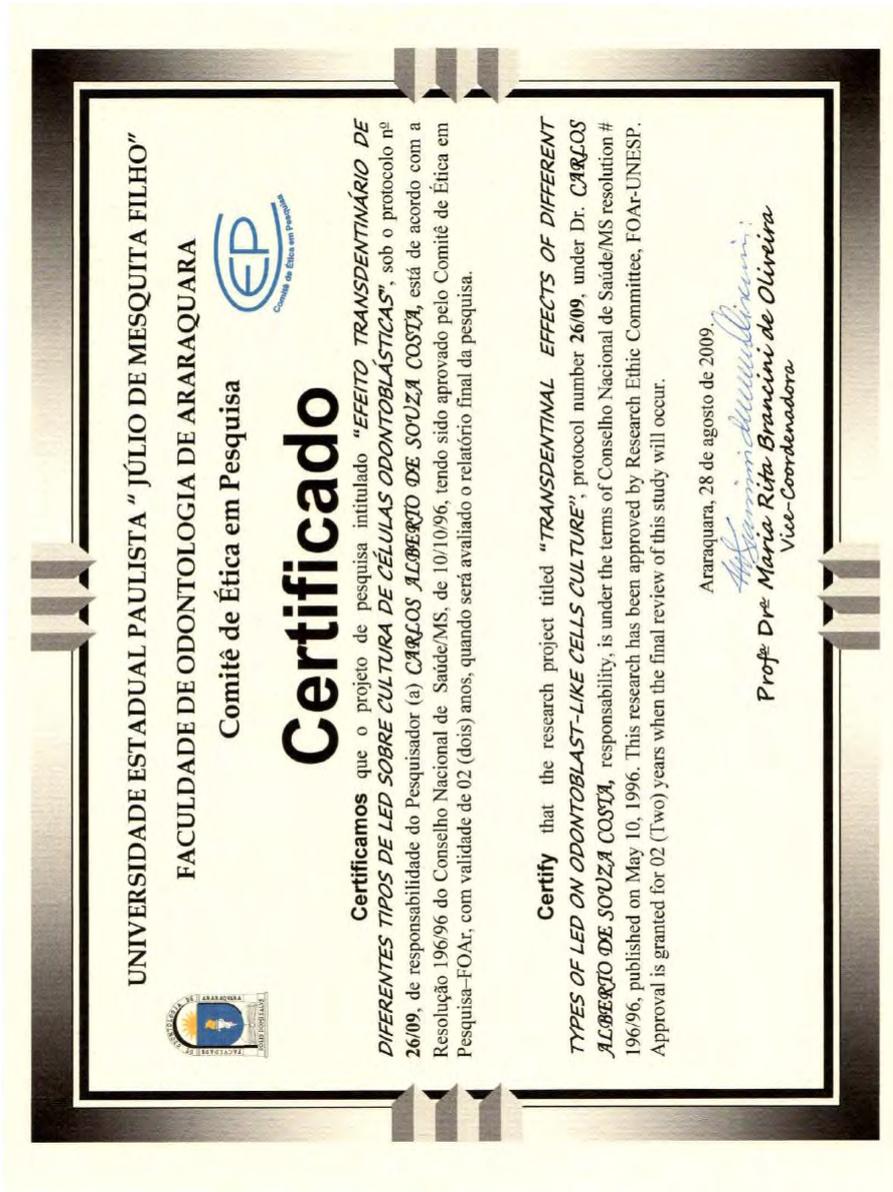
86. Wong-Riley MT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2005; 280:4761-71.
87. Yamakoshi Y, Hu JC, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP. Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2006; 281:38235-43.
88. Ying R, Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MT. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2008; 1243:167-73.
89. Zolotarev VM, Grisimov VN. Architectonics and optical properties of dentin and dental enamel. *Optics and spectroscopy*. 2001; 90: 753-9.

9 ANEXOS



9 ANEXOS

9.1 Anexo 1 (Certificado do Comitê de Ética)



Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 25 de julho de 2011.

ANA PAULA SILVEIRA TURRIONI