



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA**

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LED AZUL E VERMELHO  
SOBRE O METABOLISMO DE CÉLULAS PULPARES EM  
CULTURA**

**Araraquara**

**-2015-**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA**

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LED AZUL E VERMELHO  
SOBRE O METABOLISMO DE CÉLULAS PULPARES EM  
CULTURA**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Dentística, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josimeri Hebling

**Co- orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Basso

**Araraquara**

**-2015-**

Almeida, Leopoldina de Fátima Dantas de  
Efeito da fototerapia com LED azul e vermelho sobre o metabolismo  
de células pulpares em cultura / Leopoldina de Fátima Dantas de  
Almeida.-- Araraquara: [s.n.], 2015  
113 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia  
Orientadora: Profa. Dra. Josimeri Hebling  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

1. Fototerapia 2. Odontoblastos 3. Polpa Dentária 4. Proliferação  
de Células I. Título

**LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA**

**EFEITO DA FOTOTERAPIA COM LED AZUL E VERMELHO SOBRE O  
METABOLISMO DE CÉLULAS PULPARES EM CULTURA**

Tese para obtenção do grau de Doutor.

**Comissão Julgadora**

Presidente e Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Fernanda Gonçalves Basso

1° Examinador: Dr<sup>a</sup> Carla Raquel Fontana Mendonça

2° Examinador: Dr Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva

3° Examinador: Dr<sup>a</sup> Andréa Abi Rached Dantas

4° Examinador: Dr<sup>a</sup> Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia

Araraquara, 04 de dezembro de 2015

# Dados Curriculares

**LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA**

NASCIMENTO	07 de Dezembro de 1985 - Uiraúna - PB
FILIAÇÃO	José Geraldo de Almeida Maria do Céu Dantas de Almeida
2005 a 2009	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Federal da Paraíba – UFPB
2010 a 2011	Curso de Especialização em Endodontia, Faculdade CIODONTO/NEAO – João Pessoa -PB
2010 a 2011	Curso de Pós Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Odontologia Preventiva e Infantil, nível mestrado, Universidade Federal da Paraíba - UFPB

“Quando o homem compreende a sua realidade, pode levantar hipóteses sobre o desafio dessa realidade e procurar soluções. Assim, pode transformá-lo e o seu trabalho pode criar um mundo próprio, seu Eu e as suas circunstâncias.”

Paulo Freire

# Dedicatória

*“Confia no Senhor e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega teu caminho ao Senhor, confia nele e ele o fará!*

*Salmo 37 4-5*

À Deus, por ter me guiado em minhas escolhas. Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar que Ele trace o seu caminho. Não foi fácil chegar até aqui, mas sei que Teus olhos e mãos me conduziram a fazer as melhores escolhas, mesmo que não tenham sido as mais fáceis.

Aos meus pais, Maria do Céu e José Geraldo. Meus espelhos de humildade e coragem. Sei que esta vitória representa muito para vocês, por todas as dificuldades que já passamos. Foram muitas despedidas e reencontros, mas valeu à pena ter vindo até aqui. Papai e Mainha, já eu chego em casa!!

Ao Yuri Cavalcanti. Meu eterno namorado, amigo, parceiro, professor e co-autor. Sabemos o quão importante foi chegar até aqui. Você é parte fundamental desta conquista. Meu amor e gratidão são imensuráveis. Vamos em frente, havemos de vencer!

# Agradecimentos Especiais

*“Aqueles que passam por nós não vão sós.*

*Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

Agradeço imensamente aos meus pais, irmãs (Valéria e Rossana), sobrinhos (Elisa, Alan e José Inácio), cunhados (André e Frank), sogros (Ives e Sandra) e aos demais membros da minha família por terem me encorajado a seguir até aqui, apesar da saudade, mesmo sabendo que eu estaria ausente de casa durante muito tempo. Foram muitos dias dos pais, dias das mães, aniversários, nascimentos, até mesmo natal e ano novo sem estar presente. Vocês são a minha base e sei que torcem por mim a cada derrota ou vitória. Minha maior alegria é voltar para o meu lugar, pois sei que estão a minha espera para festejar esta conquista.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Josimeri Hebling por ter me orientado durante esta etapa da minha vida. Obrigada pela acolhida, estar em um lugar novo e ter que aprender uma nova forma de trabalhar foi mais fácil com seus ensinamentos. Vir até aqui foi um sonho, então agradeço imensamente por ter feito este se realizar.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa pela disponibilidade em me auxiliar durante a execução deste trabalho, bem como confiança em mim depositada durante este período. Tentarei seguir seu exemplo de dedicação a carreira acadêmica.

Às colegas de profissão e de linha de pesquisa Dr<sup>a</sup> Fernanda Basso e Dr<sup>a</sup> Ana Paula Turrioni pelo auxílio nas etapas iniciais deste trabalho. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse concluí-lo. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

À minha amiga Rosa Virgínia, que foi a minha família durante todos esses anos. Obrigada por dividir comigo tantos momentos, bons e ruins. Irei levar esta cumplicidade para toda minha vida.

Às minhas amigas Cláudia Huck e Liege Montoro. Vocês que me auxiliaram na execução deste trabalho, mas também me ajudaram sempre que precisei. Agradeço cada dia por ter pessoas como vocês em meu convívio.

# Agradecimentos

*“Sê todo em cada coisa. Põe quanto és*

*No mínimo que fazes.”*

*Ricardo Reis*

À Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”, em nome do magnífico Reitor Prof. Dr. Julio Cezar Durigan e da Vice-Reitora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilza Vieira Cunha Rudge.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista, representados pela digníssima Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Affonso Barretto Montandon e pela Vice Diretora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Maria Sgavioli Massucato.

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais do Departamento de Patologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, onde realizei todas as etapas deste estudo.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representado pelo Chefe de Departamento Prof. Dr. Edson Alves Campos e Vice-chefe Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru.

Aos professores da Disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Abi Rached Dantas, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Nara de Souza Rastelli, Prof. Dr. Edson Alves Campos, Prof. Dr. José Roberto Cury Saad, Prof. Dr. Marcelo Ferrarezi Andrade pela

acolhida quando da minha chegada, além de todos os ensinamentos e palavras de incentivo trocadas durante esta jornada.

As professoras da Disciplina de Ergonomia em Odontologia e Orientação Profissional, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Pinelli por todos os ensinamentos durante laboratórios e clínicas.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, representada pelos professores Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Parsekian Martins.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Mara Candida Munhoz, José Alexandre e Cristiano, pelos serviços prestados e atenção a mim dedicada.

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, Creusa, Marinho e D. Cida, pela atenção durante este período.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, alunos de pós graduação e graduação, por toda ajuda e convívio diário durante esta etapa da minha vida.

Aos colegas da Pós-graduação do departamento de Odontologia Restauradora Cláudia Huck, Mateus Tonetto, Keren Jordão, Vanessa Torraca, Janaina Bortolato, Tiago Porto e Carolina Santezi, pelo convívio durante estes anos.

Aos colegas da pós graduação do departamento de Odontopediatria, Rosa Virgínia, Ana Paula Turrioni, Liege Montoro, Camila Fragelli, Thalita Boldieri, Luciana Bianchi, Luana Marti, Carol Becci, Manuel Restrepo, Diego Giroto, Vinícius Krieger e Yasmim

Albuquerque, por todas as conversas, risadas e conselhos durante todo este período.

Obrigada por terem me acolhido!

Aos meus amigos Clara Correia, Raquel Almeida, Pedro Babo, Lisete Neves, Agatha Carretro, Ramon Novoa, Jeanny Maciel e aos demais do Grupo de Pesquisa 3Bs - *Biomaterials, Biodegradables and Biomimetic*, principalmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Manuela Gomes. Mesmo do outro lado do oceano Atlântico, guardo todos em meu coração. Vocês fizeram parte de uma das experiências mais incríveis da minha vida.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP pela ajuda durante a formatação do presente trabalho.

Aos Membros do Grupo de Pesquisa em Odontopediatria e Clínica Integrada - GPOCI, por estarem sempre presentes na minha formação, mesmo com a distância física.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de doutorado durante os meses iniciais.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de Doutorado (processo 2012/17552-3) e bolsa de Estágio em Pesquisa no exterior (processo 2014/12017-8).

Aos participantes da pesquisa, os quais doaram seus dentes para que fossem utilizados.

**A TODOS QUE ME APOIARAM, TORCERAM, SOFRERAM E SORRIRAM COMIGO DURANTE ESTES ANOS, MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...**

Almeida LFD. [Tese de Doutorado] Efeito da fototerapia com LED azul e vermelho sobre o metabolismo de células pulpares em cultura. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

## **RESUMO**

Objetivou-se avaliar os efeitos da fototerapia de baixa intensidade realizada com diodos emissores de luz (LEDs) nos comprimentos de onda azul (455 nm) e vermelho (630 nm) sobre o metabolismo de células pulpares. Quatro estudos foram desenvolvidos. No estudo 1 foi avaliado o efeito do LED vermelho sobre células MDPC-23, utilizando-se dose de energia fixa (DE) de  $2\text{J}/\text{cm}^2$ , com variação da densidade de potência (DP) em 20 e  $40\text{mW}/\text{cm}^2$  e frequência de exposição. Vinte e quatro horas após a irradiação foram avaliadas a viabilidade celular, o número de células viáveis e a dosagem de proteína total. No estudo 2 investigou-se o efeito da luz azul sobre células MDPC-23. Foram utilizadas DE de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e DP de  $20\text{mW}/\text{cm}^2$  e foram avaliadas a viabilidade, número de células viáveis, morfologia celular em MEV e expressão gênica de fosfatase alcalina (Alp), colágeno (Col-I) e proteína da matriz dentinária (Dmp-1). O estudo 3 determinou os efeitos transdentinários da luz azul e vermelha sobre células MDPC-23. As DPs foram ajustadas em 40 e  $80\text{mW}/\text{cm}^2$  para luz vermelha e azul, respectivamente. Após irradiação foram avaliadas a viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, produção de proteína total e colágeno. No estudo 4 foram investigados os efeitos bioestimuladores da luz azul sobre cultura primária de polpa humana. Foram utilizadas DE de 2 e  $4\text{J}/\text{cm}^2$  com DP de  $20\text{mW}/\text{cm}^2$ . A atividade de fosfatase alcalina, produção de proteína total e de colágeno, deposição de nódulos mineralizados e viabilidade celular foram avaliadas após a irradiação. Para todos os estudos, os dados foram submetidos aos testes estatísticos de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney ou ANOVA/Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados do estudo 1 demonstraram que uma exposição ao LED vermelho aumentou a viabilidade, independente da DP e que o conteúdo de proteína total aumentou quando foi utilizada a DP de  $20\text{mW}/\text{cm}^2$ . No estudo 2 foi observado que a luz azul em uma DE de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  não exerceu efeitos na

viabilidade celular, enquanto redução foi observada para a DE de  $2 \text{ J/cm}^2$ . A expressão gênica para Alp foi reduzida enquanto nenhuma alteração foi vista para a expressão gênica de Col-1 e Dmp-1. Os resultados do estudo 3 demonstraram que a luz vermelha promoveu efeitos proliferativos ( $DE=4\text{J/cm}^2$ ) enquanto a luz azul reduziu a viabilidade celular ( $DE=2\text{J/cm}^2$ ). A luz vermelha estimulou a atividade de fosfatase alcalina nas duas DE, enquanto que a produção de proteína total foi reduzida pela exposição a luz azul ( $DE=4\text{J/cm}^2$ ). Não foram observadas diferenças na produção de colágeno. No estudo 4 observou-se que a DE de  $2\text{J/cm}^2$  estimulou a produção de proteína total, porém sem efeito sobre a atividade de fosfatase alcalina e colágeno. A DE de  $4\text{J/cm}^2$  aumentou a produção de nódulos de mineralização em relação ao grupo controle. Viabilidade e número de células viáveis não foram afetados. De modo geral, a luz vermelha exerceu melhores efeitos sobre o metabolismo de células MDPC-23 em comparação à azul. Nos parâmetros utilizados, a luz azul foi capaz de bioestimular a deposição de matriz mineralizada por cultura primária da polpa de dentes humanos.

Palavras-chave: Fototerapia. Odontoblastos. Polpa dentária. Proliferação de células

Almeida LFD. [Tese de Doutorado] Phototherapy effect of blue and red LED on the metabolism of dental pulp cells in culture. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

## **ABSTRACT**

The overall aim of this work was to evaluate the effects of the low level phototherapy using light emitting diodes (LEDs) at the blue (455nm) and red (630nm) wavelengths on the metabolism of pulp cells in culture. Four studies were performed. In the first study, the effect of red LEDs on MDPC-23 cells was investigated, using a fixed energy dose of  $2\text{J}/\text{cm}^2$  and varying the density of potency in  $20$  and  $40\text{mW}/\text{cm}^2$  and the frequency of irradiation. Cell viability, number of viable cells and production of total protein were analyzed after 24h from the irradiation. In the second study it was evaluated the effect of the blue light on MDPC-23 cells. The energy doses of  $2$  or  $4\text{J}/\text{cm}^2$  with a dose of potency of  $20\text{mW}/\text{cm}^2$  were delivered to the cells. Cell viability, number of viable cells, cell morphology in SEM and gene expression for alkaline phosphatase (Alp), collagen (Col-I) and dentin matrix protein (Dmp-1) were analyzed. The third study investigated the transdermal effects of a blue and red light on MDPC-23 cells. The densities of potencies were adjusted in  $40$  and  $80\text{mW}/\text{cm}^2$  for the blue and red lights, respectively. After irradiation of the cell culture, cell viability, alkaline phosphatase activity, production of total protein and collagen were determined. Lastly, the biostimulatory effect of the blue light on a primary culture of human pulp was investigated in the fourth study. The energy doses of  $2$  or  $4\text{J}/\text{cm}^2$  were delivered to the cells, keeping a fixed density of potency of  $20\text{mW}/\text{cm}^2$ . Methodologies to determine the activity of alkaline phosphatase, production of total protein and collagen, deposition of mineralized nodules and cell viability were performed. For all the studies, data were subjected to Kruskal-Wallis/Mann-Whitney or ANOVA/Tukey tests ( $p < 0.05$ ). The results of the first study revealed that a single irradiation with the red LED increased the cell viability, irrespective of the density of potency, and that total protein production was improved when using  $20\text{mW}/\text{cm}^2$ . In the second study it was seen that the blue light

delivering 4 J/cm<sup>2</sup> did not influence the cell viability while decrease was observed when 2J/cm<sup>2</sup> was used. Gene expression for Alp was reduced whilst there was no effect on the gene expression of Col-1 and Dmp-1. In the third study the red light promoted proliferative effects (4J/cm<sup>2</sup>) while the blue light reduced the cell viability (2J/cm<sup>2</sup>). The red light photostimulated the activity of alkaline phosphatase for both densities of energy. On the other hand, the production of total protein was reduced after irradiation with the blue light delivering 4J/cm<sup>2</sup>. There was no effect on the production of collagen. In the fourth study, the results revealed that the irradiation with 2J/cm<sup>2</sup> was able to stimulate the production of total protein although there was no effect on the activity of alkaline phosphatase and production of collagen. The energy dose of 4J/cm<sup>2</sup> increased the deposition of mineralized nodules in comparison to the control. Cell viability and number of viable cells were not affected. Overall, the red light had better effects on the metabolism of odontoblast-like cells than the blue light. However, the later was able to photobiostimulate the deposition of mineralized matrix by human pulp cells in culture.

Keywords: Phototherapy. Odontoblasts. Dental pulp. Cell proliferation

# Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	17
2 PROPOSIÇÃO .....	24
3 MATERIAL E MÉTODO .....	25
3.1 Publicação 1: <i>“Red LED photobiomodulates odontoblast-like cells' metabolic activity”</i> .....	26
3.2 Publicação 2: <i>“Metabolic acvity of odontoblast-like cells irradiated with blue LED (455 nm)”</i> .....	42
3.3 Publicação 3 : <i>“Metabolismo de células odontoblastóides submetidas à irradiação transdentária com LED azul e vermelho ”</i> .....	61
3.4 Publicação 4: <i>“Proliferação e diferenciação de cultura primária de polpa humana irradiada com LED azul”</i> .....	82
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS .....	106
ANEXO .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

O elemento dental é constantemente submetido a desafios físicos, químicos e biológicos, e, portanto, deve ser capaz de contrapor quaisquer que sejam os efeitos deletérios impostos por esses desafios para garantir sua integridade biológica (Goldberg et al.<sup>17</sup>, 2004). Dentina e polpa são os tecidos responsáveis pela manutenção dessa integridade. O então denominado complexo dentino-pulpar responde aos efeitos nocivos por meio de uma intrincada e complexa rede de eventos celulares, moleculares e teciduais os quais, quando efetivos, promovem o reparo pulpar e permitem manutenção da vitalidade (Sloan, Smith<sup>33</sup>, 2007; Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014).

A manutenção de um tecido pulpar sadio é de extrema relevância uma vez que este representa a unidade sensorial responsável pelo controle de processos fisiológicos e patológicos, sendo a única fonte executora da reparação dentinária (Couve et al.<sup>9</sup>, 2013). Além disto, é a unidade responsável pela formação dos tecidos dentários, sendo responsável pela hidratação da dentina (Tjäderhane, Haapasalo,<sup>34</sup> 2012) e ainda, a despeito de todo o avanço científico, nenhum material odontológico é capaz de reproduzir com fidelidade a funcionalidade mecânica e biológica dos tecidos dentários (Godoy et al.<sup>16</sup>, 2007).

Ambos os fatores, intensidade e curso da agressão, desempenham papel importante na resposta do complexo dentino-pulpar. Sucintamente, em resposta à estímulos de baixa intensidade e moderada progressão o tecido pulpar responde com inflamação e aumento da atividade dos odontoblastos sem que ocorra morte celular (Cooper et al.<sup>7</sup>, 2010; Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014). Esses odontoblastos primários

são estimulados à depositar matriz dentinária no interior de alguns túbulos dentinários (dentina intratubular) e na periferia da câmara pulpar (dentina terciária reacional) (Arana-Chavez, Massa,<sup>4</sup> 2004).

Além da resposta celular mediada por odontoblastos, células mesenquimais indiferenciadas presentes na polpa também podem participar do processo de reparo do complexo, a partir de sua diferenciação em células odontoblastóides. Isso ocorre em resposta a estímulos de alta intensidade que ultrapassam o limiar de tolerância dos odontoblastos primários, ou ainda quando ocorre exposição do tecido pulpar (Goldberg, Smith<sup>17</sup>, 2004; Cooper et al.<sup>7</sup>, 2010). Os novos odontoblastos, denominados de odontoblastos secundários, também tem a missão de depositar matriz dentinária. Após sofrer mineralização, esse novo tecido apresenta padrão histológico distinto da dentina fisiológica e da dentina reacional. Tem aspecto amorfo, com inclusão de corpos celulares e ausência de túbulos em suas camadas iniciais, sendo denominada de dentina reparadora (Goldberg, Smith<sup>17</sup>, 2004; Demarco et al.<sup>10</sup>, 2011).

Entretanto, a mobilização e estimulação das células pulpares é precedida pela instalação do processo inflamatório. Alterações vasculares e o desencadeamento do processo inflamatório são as resposta iniciais do complexo dentino-pulpar frente a agentes agressores, independente de sua natureza (Cooper et al.<sup>7</sup>, 2010). Embora importante como resposta inicial, a manutenção ou agravamento dessa reação inflamatória pode causar danos irreversíveis ao tecido pulpar (Holder et al.<sup>20</sup>, 2012). Portanto, estratégias capazes de modular a resposta inflamatória e de acelerar o

reparo dos tecidos devem ser empregadas quando necessárias (Dungel et al.<sup>12</sup>, 2014).

A procura por novas terapias e materiais que possam reestabelecer a função do tecido pulpar é constante (Galler et al.<sup>15</sup>, 2011; Holder et al.<sup>20</sup>, 2012; Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014; Piva et al.<sup>29</sup>, 2014). Entretanto, promover o completo reparo pulpar por meio da indução da dentinogênese tem sido um desafio, principalmente porque os eventos relacionados à diferenciação celular ainda não estão completamente elucidados (Galler et al.<sup>15</sup>, 2011; Piva et al.<sup>29</sup>, 2014). Embora a remoção do agente agressor seja a chave para se debelar a reação inflamatória e permitir o reparo tecidual, em muitos casos isso somente é possível às custas do sacrifício do tecido pulpar. A aplicação de técnicas efetivas quanto a modulação da inflamação e da reação imunológica podem ser benéficas para futuros tratamentos pulpares (Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014). Uma dessas técnicas é a fototerapia de baixa intensidade.

A fototerapia de baixa intensidade, assim denominada por empregar baixos valores de densidade de potência e doses de energia (Huang et al.<sup>21</sup>, 2009), tem sido avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* (Al-Ghamdi et al.<sup>1</sup>, 2012; Basso et al.<sup>5</sup>, 2013; Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Karu, Kolyakov,<sup>22</sup> 2005; Pereira et al.<sup>28</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014; Vila et al.<sup>36</sup>, 2007) com o objetivo de acelerar o reparo de tecidos, por meio da diferenciação e proliferação celular, bem como pela modulação da liberação de fatores de crescimento, citocinas e interleucinas (Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Prindeze et al.<sup>31</sup>, 2012). Atualmente, a teoria aceita para o possível mecanismo de ação da fototerapia está pautada no aumento do metabolismo celular e síntese de moléculas como adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico

(NO) (AlGhamdi et al.<sup>1</sup>, 2012; Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Prindeze et al.<sup>31</sup>, 2012;).

Tem sido sugerido que a fotossensibilização da enzima citocromo c oxidase é o fator chave para desencadear as respostas celulares mencionadas (Anders et al.<sup>3</sup>, 2015; Al-Ghamdi et al.<sup>1</sup>, 2012; Prindeze et al.<sup>31</sup>, 2012). Estes efeitos podem ser considerados como primários, enquanto os efeitos secundários estão relacionados às mudanças de gradiente no fluxo de cálcio, aumento da expressão gênica de proteínas e ativação de vias como NF- $\kappa$ B (Hamblin, Demidova,<sup>19</sup> 2006; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Prindeze et al.<sup>31</sup>, 2012).

A fototerapia de baixa intensidade utiliza fontes de luz LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou LED (*Light Emitting Diodes*), em comprimentos de onda que podem envolver desde os da luz visível ao infravermelho (600-1000 nm) (Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Peplow et al.<sup>27</sup>, 2011). Nessa terapia, a fonte de luz é aplicada sobre uma área determinada, utilizando-se baixos valores de densidade de potência ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) e doses de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Desse modo, não são observados efeitos térmicos danosos à região de aplicação (Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009).

Estes parâmetros físicos de irradiação tem sido extensivamente estudados (Basso et al.<sup>5</sup>, 2013; Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014), pois são os responsáveis pela estimulação ou inibição de tecidos ou culturas celulares (Huang et al.<sup>21</sup>, 2009). Assim, tem sido sugerido que a fototerapia apresenta um efeito bifásico de dose-resposta, no qual existe uma dose de energia ótima ou um intervalo de doses, capazes de promover melhores resultados. Doses

acima ou abaixo da dose destes valores podem não causar efeitos mensuráveis ou podem até mesmo serem nocivos às células e tecidos (Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; AlGhamdi et al.<sup>1</sup>, 2012).

A exposição aos parâmetros ótimos da luz pode gerar respostas como modulação do processo inflamatório, aceleração da angiogênese e remodelação de tecidos (Amat et al.<sup>2</sup>, 2006). Estes eventos ocorrem por meio do estímulo à proliferação celular e síntese de fatores de crescimento (Posten et al.<sup>30</sup>, 2005). Tem sido observado que a aplicação da fototerapia nas doses de 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> exercem efeitos de citoproteção em modelos experimentais em animais, ou culturas celulares expostas às mais variadas fontes de luz e comprimentos de onda (Peng et al.<sup>26</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014).

Assim, o emprego de fontes de luz em baixa potência para o tratamento restaurador do complexo dentino-pulpar, principalmente em casos de cavidades profundas ou exposições pulpares, poderia permitir a modulação do processo inflamatório e a aceleração do reparo pulpar, associado ao tratamento restaurador. Entretanto, constata-se que poucos trabalhos tem avaliado os efeitos das fontes de luz sobre o tecido pulpar (Holder et al.<sup>20</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014). Além disso, dentre os ensaios já realizados não há uniformidade quanto aos parâmetros físicos utilizados, dificultando a comparação de resultados e o estabelecimento de propostas terapêuticas para diferentes condições (Pereira et al.<sup>28</sup>, 2012).

Investigar os efeitos da fototerapia sobre o tecido pulpar poderia gerar resultados que respaldariam a escolha dos melhores parâmetros para estimular o metabolismo celular, com o objetivo de promover a formação de dentina terciária,

reacional ou reparadora (Villa et al.<sup>36</sup>, 2007). Especificamente para o LED no comprimento de onda do vermelho e infravermelho aplicado sobre células pulpares, estudos tem demonstrado seus benefícios quanto à produção de ATP e proliferação celular (Holder et al.<sup>20</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014), ao aumento na atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e expressão gênica de sialoproteína da matriz dentinária (DSPP) (Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2014) e ao aumento da produção da matriz extracelular (Holder et al.<sup>20</sup>, 2012). Todos esses eventos celulares e moleculares são imprescindíveis para o reparo do tecido pulpar. Entretanto, a despeito dos resultados favoráveis para o comprimento de onda na faixa do vermelho e do infravermelho, a falta de padronização dos parâmetros físicos dificulta a definição de protocolos clínicos.

Além da busca por parâmetros de dosimetria ideais, outro ponto a ser considerado é a faixa de comprimento de onda da luz capaz de exercer efeitos bioestimulatórios. A maioria dos trabalhos publicados tem utilizado fontes de luz laser ou LED no comprimento de onda do infravermelho ou vermelho (Desmet et al.<sup>11</sup>, 2006; Holder et al.<sup>20</sup>, 2012; Oliveira et al.<sup>24</sup>, 2010; Oliveira et al.<sup>25</sup>, 2011; Prindeze et al.<sup>31</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>35</sup>; 2014). Assim, a utilização da luz no comprimento de onda vermelho tem sido citada como padrão em estudos da área. Esse comprimento de onda permite maior penetração da luz do que espalhamento, em comparação a comprimentos como azul ou verde (Dungel et al.<sup>12</sup>, 2014). Entretanto, a luz no comprimento de onda correspondente ao azul é frequentemente utilizada em Odontologia com a função de fotoativar compósitos restauradores (Emami, Söderholm,<sup>13</sup> 2003; Lewis et al.<sup>23</sup>, 2005) devido ao espectro de absorção da canforoquinona (467 nm) (Rueggeberg et al.<sup>32</sup>, 2011). A despeito de sua constante

utilização, pouco se sabe acerca dos possíveis efeitos bio-estimulatórios promovidos por esse comprimento de onda, sendo escassos os estudos que avaliam os efeitos da luz azul sobre células do tecido pulpar ou mesmo aquelas que compõem os tecidos de suporte (Gritsch et al.<sup>18</sup>, 2007).

Estudos *in vitro* sugerem que a luz azul atua estimulando o metabolismo mitocondrial (Desmet et al.<sup>11</sup>, 2006; Gritsch et al.<sup>18</sup>, 2007). Fibroblastos humanos aumentaram sua atividade mitocondrial quando expostos ao LED comprimento de onda entre 400–500 nm (Gritsch et al.<sup>18</sup>, 2007) e resultado semelhante foi observado para a aplicação do LED em sobre queratinócitos (Lewis et al.<sup>23</sup>, 2005). *In vivo*, já foi demonstrado que a irradiação com LED azul estimulou a cicatrização de tecidos (Desmet et al.<sup>11</sup>, 2006).

Assim, diante da necessidade clínica de procedimentos inovadores que permitam a estimulação celular, tanto de células mesenquimais indiferenciadas quanto de odontoblastos, a premissa do presente trabalho foi baseada na possibilidade de utilização de uma fonte de luz LED, no comprimento de onda do vermelho (630 nm) ou do azul (455 nm), para estimular o reparo do tecido pulpar previamente ao capeamento pulpar direto ou indireto, e a aplicação de materiais restauradores.

## 2 PROPOSIÇÃO

### Proposição Geral

O objetivo geral do presente estudo, composto por 4 publicações, foi avaliar o efeito da luz emitida por LEDs nos comprimentos de onda azul (450 nm) e vermelho (630 nm) sobre o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23 e de polpa humana em cultura.

### Proposições Específicas

**Publicação 1:** Avaliar o efeito da irradiação com LED vermelho (630 nm) sobre o metabolismo de células MDPC-23, comparando diferentes densidades de potência (20 e 40 mW/cm<sup>2</sup>) e frequências de exposição (1 e 3 irradiações).

**Publicação 2:** Avaliar o metabolismo de células MDPC-23 expostas a luz azul (455 nm) emitida por LEDs empregando-se densidade de potência fixa em 20 mW/cm<sup>2</sup>, com variação da dose de energia (2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>).

**Publicação 3:** Investigar o efeito da fototerapia com os LEDs azul (455 nm) e vermelho (630 nm) sobre o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23 em um modelo transdentinário.

**Publicação 4:** Avaliar os efeitos da irradiação direta com LED (2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>) no comprimento de onda 455 nm (luz azul) na proliferação e diferenciação de células da polpa humana em cultura.

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

Para responder a proposição geral desse trabalho, foram desenvolvidos quatro estudos independentes, porém sobre a mesma temática central. Esses estudos foram denominados Publicação 1, Publicação 2, Publicação 3 e Publicação 4, cada qual com sua proposição específica.

### 3.1 PUBLICAÇÃO 1

## Red LED photobiomodulates odontoblast-like cells' metabolic activity

Red LED photobiomodulates odontoblast cells

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida<sup>1</sup>; Ana Paula Silveira Turrioni<sup>2</sup>; Fernanda Gonçalves Basso<sup>2</sup>; Liege Aldrovandi Montoro<sup>2</sup>; Carlos Alberto de-Souza-Costa<sup>3</sup>; Josimeri Hebling<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Restorative Dentistry, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physiology and Pathology, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

Prof Josimeri Hebling (Author for Correspondence)

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

Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brazil.

e-mail: [jhebling@foar.unesp.br](mailto:jhebling@foar.unesp.br).

Telephone: +55 (16) 3301-6334 – Fax: +55 (16) 3301-6329

## SUMMARY

Phototherapy has been indicated as an adjunctive treatment for tissue repair, including the pulp tissue. However, there are no defined irradiation parameters what poses a great challenge to the clinical use of phototherapy. The aim of this study was to evaluate the effect of phototherapy with red LED, using several parameters, on odontoblast-like cells. MDPC-23 cells. For this purpose, cells were seeded ( $10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) and incubated for 12h in complete DMEM. Then, the culture medium was replaced by DMEM with 0.5% FBS. After 12h incubation, irradiations were performed ( $630\text{nm}\pm 10$ ) using a LED-Table device with a power density of 20 or 40 mW/cm<sup>2</sup> and energy dose of 2 J/cm<sup>2</sup>. The cells were irradiated 1 or 3 times, at intervals of 1 minute. Non-irradiated cells served as control. The cells were evaluated for viability (MTT assay), total protein dosage (Lowry method) and number of viable cells (Trypan Blue). The data ( $n=12$  *per* group) were submitted to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $p=0.05$ ). A single irradiation with 20 or 40 mW/cm<sup>2</sup> enhanced cell viability, which was negatively affected after 3 irradiations. Cells irradiated only once with 20 mW/cm<sup>2</sup> produced more proteins compared with those irradiated with 40 mW/cm<sup>2</sup>. Reduction in the number of viable cells occurred only after three times irradiation with 40 mW/cm<sup>2</sup>. In conclusion, red LED was capable of bio-modulating the metabolic activities of cultured MDPC-23 odontoblast-like cells. The best cell bio-stimulation was obtained when one single irradiation with 2 J/cm<sup>2</sup> using the power density of 20 mW/cm<sup>2</sup> was delivered to the pulp cells.

**Key words:** Phototherapy, Odontoblasts, Cell Metabolism, Cell Proliferation

## INTRODUCTION

The effects of low level phototherapy with wavelengths in the red and infrared light spectrum have been investigated in different areas of health (1) including dentistry (2, 3). The main overall mechanism of action of this therapy is the stimulation of cell metabolism and tissue repair, thus favoring a more effective and rapid response of the tissue or organ exposed to an aggression (4). It has been demonstrated that irradiation with red and infrared lights improves the ATP synthesis and stimulates cellular proliferation (5,6). However, the mechanism of action of this therapy is still not completely elucidated (3).

Wavelengths in the red region of the spectrum have been considered the best stimulatory source in studies regarding the application of light as a therapy. Compared to another wavelengths, such as blue or green (1,7), the red light induces more penetration than spreading (7). This behavior suggests the application of red light as an adjuvant therapy to the pulp repair after pulp capping or restorative treatments performed in deep cavities. Although some *in vitro* and *in vivo* studies have evaluated the effect of light sources on this process, the mechanism of action of light on the pulp tissues is not clearly stated (3,8). It is known that light exerts positive effects on primary cultures derived from rodent pulp, inducing an increase in cell metabolism and proliferation, consequently with greater production of mineralized tissue (3).

The positive effect of low-level phototherapy using red laser (670 nm) in reactionary dentinogenesis, on the increase in type III collagen, tenascin and fibronectin expression has been observed in human teeth (9). In the same study, a less intense inflammatory reaction was also observed in the teeth submitted to phototherapy, when compared to the non-irradiated teeth. Although studies had observed encouraging results about the use of phototherapy with LED (3,8,10,11), finding reliable and reproducible parameters for the application of this technique in different therapeutic situations is still a challenge (12).

It is known that the pulp tissue is injured after caries removal and cavity preparation. It may be suggested that the application of a red LED under specific parameters on the cavity walls immediately after the preparation of a dental cavity may stimulate the subjacent pulp cells, thus limiting the possible tissue damage caused during the restorative procedure. Based on previous scientific data (3,9), this irradiation may reduce the local inflammatory process (13) and attenuate the intensity of the pulp-origin pain, preventing possible post-operative discomfort.

Given the lack of standardization within the parameters used for low-intensity light therapy, laboratorial studies are important to screen the best set of physical parameters. Thus, *in vitro* studies are necessary to determine both energy dose and power density parameters for successful stimulation of cells, resulting in clinically optimal application.

Thus, in the present study, odontoblast-like cells (MDPC-23) were investigated with regards to the effect of red LED (630 nm) irradiation. Cells with such phenotype are found within the dental pulp of mammals' teeth, forming a single layer that underlies the dentin, which is able to promote pulp tissue repair through deposition and mineralization of dentin matrix (9,14). Therefore, MDPC-23 cells were subjected to red-LED irradiation (630 nm), under different power densities and irradiation frequencies, in order to determine adequate parameters capable of promoting photobiostimulation of these cells. Therefore, the establishment of specific irradiation parameters is important to develop an alternative therapy to preserve the viability of tooth, stimulate dental pulp cells and consequently accelerate the pulp repair process. The tested null hypothesis was that the irradiation with a red-LED does not affect the metabolism of odontoblast-like cells.

## MATERIALS AND METHODS

### CELL CULTURE AND EXPERIMENTAL PROTOCOL

MDPC-23 odontoblast-like cells were seeded (10,000 cells/cm<sup>2</sup>) in 24-well acrylic plates (n=12) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), for 12 hours. Then, the medium was replaced by a new DMEM containing 0.5% of FBS, in order to induce a cellular metabolism stress, due to the lower concentration of growth factors. This contributed to reduce de metabolism of cells and therefore determine the possible adjuvant effects of phototherapy. After 12 hours of incubation, the irradiation procedures were performed, and the samples were kept in DMEM medium with 0.5% FBS. Cell number and viability as well as their potential to produce proteins were assessed 24 hours after exposure to the red LED.

## IRRADIATION DEVICE AND PARAMETERS

The irradiation procedures were performed with a device called LEDTable ( $\lambda$  630 nm  $\pm$ 10 nm), which was developed by the Optical Group (OG) of the Optics and Photonics Research Center ("Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica - CePOF") of the São Carlos Institute of Physics (IFSC) of the University of São Paulo (USP). In this device, there are 24 Indium Gallium Arsenioto (InGaAs) diodes, which are positioned so that the base of each compartment of the 24-well acrylic plate could be individually and homogeneously irradiated by a single diode (Figure 1).

In this device, there were 24 Indium Gallium Nitrogen (InGaN) diodes, which were positioned underneath of each compartment of the 24-well, so that they are exposed to the red light individually and evenly. To ensure uniform distribution of light, there was also an 11 mm distance between the plate base plate and LED. In order to standardize the correct direction of LED, a collimator was included within the lamps, allowing proper individualization of irradiation for each sample

The energy doses were selected by means of pilot studies, with the power densities being those most frequently found in the literature (15). The time needed to delivery 2 J/cm<sup>2</sup> using 20 mW/cm<sup>2</sup> of power density was 1 min and 40 s while using 40 mW/cm<sup>2</sup> it was 50 s. The exposure frequencies evaluated were 1 or 3 consecutive irradiations, with an interval of 1 minute between each of them. Thus, the samples submitted to the consecutive exposures received three energy doses of 2 J/ cm<sup>2</sup> each, according to the power densities used (20 and 40 mW/cm<sup>2</sup>). During the interval, the samples were kept in an incubator at 37°C with 5% of CO<sub>2</sub>.

Non-irradiated MDPC-23 cells served as control. The 24-well culture plate containing the cells was placed in the LEDTable for the same period of time, except that the LEDs were not turned on.

## CELL VIABILITY

Cell viability was analyzed by means of the methyl tetrazolium assay (MTT Assay) (16), which evaluates the activity of the succinate dehydrogenase enzyme (SDH). Therefore, after 24 hours had elapsed after the last irradiation, the culture medium was aspirated and replaced by a solution containing 900  $\mu$ L of DMEM and 100  $\mu$ L of MTT solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in the concentration of 5 mg/mL. The cells were incubated for 4 hours in contact with this solution, which was aspirated and replaced by 600  $\mu$ L acidified isopropanol (HCl 0.04

N) for solubilization of the formazan crystals. Three aliquots of 100  $\mu$ L of this solution were individually transferred to the compartments of 96-well acrylic plates (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) and the absorbance was determined at 570 nm in an Elisa reader (TP - Reader, ThermoPlate, China). The mean of the absorbance values of the three aliquots was calculated, and the values transformed into percentage, considering the median of the control group as being metabolism of 100%.

#### TOTAL PROTEIN PRODUCTION

For the Total Protein Production analysis, the Lowry method was used (16). The cells were lysed using 1.0 mL of 0.1% Sodium Lauryl Phosphate, (Sigma-Aldrich Corp. Aldrich Corp.) for 40 minutes. After this period, the samples were homogenized and 1.0 mL of Lowry reagent (Sigma Aldrich Corp.) was added for 20 minutes, and then 500  $\mu$ L of Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich Corp.), for 30 minutes. Aliquots of the samples, in triplicate were placed in 96-well plates, and the absorbance was measured in an Elisa reader at 655 nm. Total protein production was calculated according to a standard curve obtained with known albumin concentrations. In the same way as described for cell viability, the data were transformed into percentage of the control.

#### NUMBER OF VIABLE CELLS

The number of viable cells was evaluated by means of the Trypan Blue test, in which the dye added to the culture medium penetrates into those cells that underwent rupture of the membrane, thus staining them blue (17). For this test, the culture medium of each compartment was aspirated and replaced by 300  $\mu$ L of 0.25% trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), which was kept in contact with the cells for 10 minutes. Aliquots of 50  $\mu$ L of this cell suspension and 50  $\mu$ L of 0.04% Trypan Blue solution (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) were placed in the wells of a 96-well acrylic plate, where they remained for 2 minutes at ambient temperature. To count the viable cells, 10  $\mu$ L of this final solution was taken to the hemocytometer and evaluated under an inverted light microscope (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). The number of viable cells was determined by subtracting from the total number of cells, the cells determined to be non-viable (stained blue). Thus, the number of viable cells obtained in the count corresponded to

$n \times 10^4$  cells per milliliter of the suspension, with these values being transformed into percentage of the control.

## DATA ANALYSIS

No set of data (cell viability, total protein production and number of viable cells) presented normal distribution. Therefore, data were submitted to the nonparametric Kruskal-Wallis test, complemented by Mann-Whitney tests for comparison of the groups two by two. Statistically significant difference between the groups was inferred when  $p < 0.05$ ; that is, at the level of significance of 5%.

## RESULTS

### CELL VIABILITY

Data from MDPC-23 cells viability are shown in Figure 2A. When one single irradiation was performed, the viability of MDPC-23 cells was significantly higher after using both power densities in comparison with non-irradiated cells. However, the best results were seen for 20 mW/cm<sup>2</sup>. After 3 irradiations, a significant reduction in cell viability was observed in comparison with the control, for both power densities. Considering the same power density, a single irradiation was always better than a triple irradiation.

### TOTAL PROTEIN PRODUCTION

An increase in total protein production was observed in the group with one single irradiation using the power density of 20 mW/cm<sup>2</sup>, but the same was not observed for the power density of 40 mW/cm<sup>2</sup>. When the cells were exposed to 3 irradiations with a power density of 40 mW/cm<sup>2</sup>, there was a statistically significant reduction in total protein production in comparison with the non-irradiated group, while absence of effect was observed when the power density of 20 mW/cm<sup>2</sup> was used. A single irradiation, irrespective of the power density used, was superior to the use of multiple irradiations (Figure 2B).

## NUMBER OF VIABLE CELLS

Significant reduction in the number of viable MDPC-23 cells was observed when they were irradiated with a density of 40 mW/cm<sup>2</sup>, in comparison with non-irradiated cells and with the group irradiated with 20 mW/cm<sup>2</sup>, which did not differ between them. No effect on the number of cells was detected for the groups irradiated 3 times, with both energy densities. Similarly, no effect was observed with regard to the number of irradiations when the same power density was compared (Figure 2C).

## DISCUSSION

This study demonstrated that the odontoblast-like cells metabolism was affected in different ways depending on the combination of the physical parameters investigated. The best biostimulatory response was seen after a single irradiation with red LED at the wavelength of 630 nm, energy dose of 2 J/cm<sup>2</sup> and power density of 20 mW/cm<sup>2</sup>. Therefore, the null hypothesis that the LED irradiation would have no effect on odontoblast-like cells was rejected.

The biostimulative effect induced by low level phototherapy on the repair capacity of the dentin-pulp complex has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* (3,9,18,19). This effect is characterized by the increased cellular proliferation and mineralized matrix production. In spite of low- level phototherapy has demonstrated favorable results after some *in vivo* studies, there is still little research developed in the basic area, aiming to determine the optimal parameters for the light application among various therapeutic activities (1,12). Besides that, the effect of low- level phototherapy on a specific cellular population derived from dental pulp tissue has not been described yet.

In this study the irradiation by red LED was performed in MDPC-23 cell culture. The fixed dose of 2 J/cm<sup>2</sup> was selected based on pilot studies (data not shown) using wavelengths selected from previous reports in the literature (8,16), while cell irradiation was performed one or three times consecutively to simulate a clinical protocol where the phototherapy would be applied before the insertion of the restorative materials. The results demonstrated that the increase in the frequency of light application had a detrimental effect on cells metabolic activity for both power densities.

The photoeffect on cell proliferation may vary according to the energy dose, power density and frequency. These parameters applied at higher values may cause adverse effects on cells such as structural damage to the DNA and exacerbated increase in reactive oxygen species (20). From the results obtained in the present study and based on those from Oliveira et al. (16), it was evident that the increase in frequency from one to three consecutive irradiations reduced the viability of odontoblast-like cells. The combination of a single irradiation of the cells with red LED at the power density of 20 mW/cm<sup>2</sup> was efficient in promoting and increase in cell viability.

It has been reported that the power density has a direct influence on the effect of light by the generation of a two-stage dose-response effect, in which inhibition of stimulatory effects is achieved when the threshold of energy received by the cell is exceeded (15,20). Therefore, since the dose-response effect varies in accordance with the set of irradiation parameters (21) it may be suggested that a higher frequency of exposure of MDPC-23 cells to LED exceeded the threshold of biological tolerance of these cells, leading to a reduction in their metabolism. Previous studies that evaluated the bio-stimulatory effects of light sources have observed such biphasic effect (1,15,20). These studies have shown that the effect of light is not linear, being dependent on the frequency of application and energy doses. In other words, light stimulus can both cause benefits and damage, depending on the total energy provided to the cell.

Previous studies have evaluated the effects of red LED applied on different cell lines (3,9,10,11). Irradiation in the red wavelength range, energy dose of 9.5 J/cm<sup>2</sup> caused an increase in type I collagen and TGB- $\beta$  expression in a fibroblast culture (11). Increase in cell proliferation and angiogenesis in rodents was reported by Nishioka et al. (10), when the energy dose of 2.49 J/cm<sup>2</sup> was delivered with a device with a cross-sectional area of 0.5 cm<sup>2</sup> and output power of 150 mW. In the present research, the increase in cell viability and total protein production occurred when the MDPC-23 cells were submitted to a single irradiation with red LED at the power density of 20 mW/cm<sup>2</sup> and energy dose of 2 J/cm<sup>2</sup>. It appears to be evident that different types of cells need a specific energy dose in order to be bio-stimulated. When evaluating the effect of red LED (632 nm) on a culture of pulp cells obtained from rodents, Holder et al. (3) demonstrated that the cells irradiated for 40 or 60

seconds with a power density of 3.73 mW/cm<sup>2</sup> had increased viability and production of mineralized nodules.

These positive cellular effects were obtained with the use of red LED at a power density of almost five times lower than that used in the present study. It was observed bio-stimulation using 20 mW/cm<sup>2</sup>. Holder et al. (3) used a primary culture of rodent dental pulp, in which fibroblasts, stem cells, endothelial and other cells are present, whereas, in the present study, an immortalized culture of odontoblast-like cells were used. The sensitivity of these cells is different from cells in a primary culture of pulp (21). The difference in sensitivity between cell cultures may be related to the intrinsic characteristics of each cell, as well as to the process of immortalization of the culture (22). Therefore, a higher power density was necessary to bio-stimulate MDPC-23 cells in culture than that used by Holder et al. (3) to irradiate the primary culture of rodent pulp.

In spite of phototherapy presenting positive cellular bio-stimulation results, the light mechanism of action, specifically its participation in the tissue repair process, has still not been completely elucidated (3,20). It is believed that the light may be absorbed by chromophores present in the cells (23), providing an increase in the activation of the cytochrome c oxidase pathway (6,16,20). That would generate an increase in the production of ATP and, consequently, induce cellular proliferation (5,13). In the present study, the energy dose of 2 J/cm<sup>2</sup> has been shown to increase cell metabolism determined by SDH activity. It is well known that SDH consists in a protein that belongs to the complex II of the cellular respiratory chain. This protein, therefore, acts within the electron transference catalysis (24), which determines the physiological ROS production (25). Therefore, our results reinforce the hypothesis that the light's mechanism of action is by mitochondrial pathway. Other targets, however, should be assessed to confirm the effect of light on other mitochondrial complexes.

A positive relationship between the SDH increase and the total protein production was observed in the group irradiated with 20 mW/cm<sup>2</sup> at once. These results corroborate this possible mechanism of action, related to cells' chromophores excitation. This phenomenon, however, was not seen within the other irradiation parameters. The evaluation of total protein production was performed because the

protein deposition is markedly necessary for deposition of matrix during the repair process (5). Notably in the repair of the pulp tissue, type I collagen deposition and other proteins such as alkaline phosphatase and dentin matrix protein allow deposition and matrix mineralization (14). However, because it is an initial study, which aimed at screening power parameters, the production of total protein can aid in response to this requirement. Future studies may be performed to specifically evaluate the production of those specific proteins.

No linear relationship between the SDH and the number of viable cells was observed within all groups. The Trypan blue assay detects the presence of non-viable cells, and consequently the proportion of viable ones, due to the cellular membrane disruption (17). According to this technique, it is not possible to confirm that the evaluated irradiation procedures induced any cellular damage. Actually, when analyzed together, the results from Trypan blue and SDH assays confirmed that higher frequency of LED irradiation (three consecutives irradiations) resulted in overall decrease in cellular metabolism, meaning that the total energy tolerated by the cell exceeded the threshold.

The beneficial effects obtained in the present study, combined with the low cost of LED, which present a long time of useful life (5), indicate that the application of this light source deserves additional investigations, still it is adequate to be applied clinically in dentistry. This technique should be considered as an adjuvant method within the restorative treatment, in which the bio-stimulatory effects and the modulation of inflammation provided by the light source could help the pulp-dentin complex healing. Therefore, the use of LED-therapy would contribute to greater success in the management of deep cavities and pulp exposures. Further *in vitro* and *in vivo* studies should be conducted to establish ideal direct and transdental irradiation parameters in order to improve the repair of the pulp tissue, maintaining the vitality of the tooth.

In conclusion, based on the results of this study, a single irradiation with red LED at the wavelength of 630 nm, energy dose of 2 J/cm<sup>2</sup> and power density of 20 mW/cm<sup>2</sup>, promoted bio-stimulation of MDPC-23 odontoblast-like cells in culture and it could be further used as an adjunctive step in restorative procedures. However,

further studies are needed to demonstrate the clinical effectiveness of this phototherapy.

## RESUMO

Fototerapia tem sido indicada como um tratamento adjuvante para o reparo de tecidos, incluindo o tecido pulpar. Entretanto, não há parâmetros de irradiação definidos o que representa um grande desafio para o uso clínico da fototerapia. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fototerapia com LED vermelho, usando vários parâmetros, em células com fenótipo odontoblastóide. Células MDPC-23 foram semeadas ( $10^4$  cels/cm<sup>2</sup>) e incubadas por 12 h em DMEM completo. Após, o meio de cultura foi trocado por um novo DMEM com 0,5% SFB. Após 12 h, as irradiações foram realizadas ( $630\text{ nm}\pm 10$ ) usando um dispositivo com densidade de potência de 20 ou 40 mW/cm<sup>2</sup> e dose de energia de 2 J/cm<sup>2</sup>. As células foram irradiadas 1 ou 3 vezes, com intervalos de 1 minuto. Células não irradiadas serviram como controle. Foram avaliadas a viabilidade (ensaio de MTT), dosagem de proteína total (método de Lowry) e número de células viáveis (ensaio de Trypan Blue). Os dados (n=12 por grupo) foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (p=0,05). Uma simples irradiação com 20 ou 40 mW/cm<sup>2</sup> aumentou a viabilidade celular, entretanto, a viabilidade celular foi negativamente afetada após 3 irradiações. Células irradiadas apenas uma vez com 20 mW/cm<sup>2</sup> produziram mais proteínas comparadas com aquelas irradiadas com 40 mW/cm<sup>2</sup>. Redução no número de células viáveis ocorreu apenas no grupo irradiado três vezes com 40 mW/cm<sup>2</sup>. Em conclusão, o LED vermelho foi capaz de biomodulação da atividade metabólica de células MDPC-23. A melhor resposta bioestimulatória foi obtida após uma única irradiação das células com 2 J/cm<sup>2</sup> usando uma densidade de potência de 20 mW/cm<sup>2</sup>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge with thanks the financial support provided by the Brazilian financing agencies FAPESP (São Paulo State Research Supporting Foundation - grant 2012/17552-2) and CNPq (National Council of Research and Scientific Development - grants 305204/2010-6 and 301291/2010-1).

## REFERENCES

1. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg* 2010; 28: 291-325.
2. Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* 2008; 26: 401-404.
3. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR.. Effects of red Light-emitting Diode Irradiation on Dental Pulp cells. *J Dent Res* 2012; 91: 961-966.
4. Fujimura T, Mitani A, Fukuda M, et al. Irradiation with a low-level diode laser induces the developmental endothelial locus-1 gene and reduces proinflammatory cytokines in epithelial cells. *Lasers Med Sci* 2013; 29: 987-994.
5. Desmet KD, Paz DA, Corry JJ et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed. Laser Surg* 2006; 24: 121–128.
6. Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J* 2007; 202: 131-138.
7. Dungal P, Hartinger J, Chaudary S, Slezak P, Hofmann A, Hausner T et al. Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing. *Lasers Surg Med*. 2014; 46:773-780.
8. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida L de F, Costa CA, Hebling J. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent* 2014; 42: 1292-1299.
9. Ferreira AN, Silveira L, Genovese WJ et al. Effect of GaAIAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 358-365.
10. Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci* 2012; 27: 1045–1050.
11. Seo YK, Park JK, Song C, Kwo SY. Comparison of light-emitting diode wavelength on activity and migration of rabbit ACL cells. *Lasers Med Sci* 2013; 29: 245 –255.
12. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *Journal of Biomed Sci* 2009; 12: 1:-16.
13. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater* 2014; 30: 465-475.

14. Tjäderhane L, Haapasalo M. The dentin–pulp border: a dynamic interface between hard and soft tissues. *Endodontic Topics* 2012; 20: 52–84.
15. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response* 2009; 7: 358–383.
16. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC et al. *In vitro* effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett* 2011; 8: 155-163.
17. Wiegand C, Hipler, U.C. (2008). Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2008; 3: Doc12.
18. Villa GEP, Catirse ABCEB, Lia RCC, Lizarelli RFZ. *In vivo* analysis of low-power laser effects irradiation at stimulation of reactive dentine. *Laser Phys Lett* 2007; 4: 690–695.
19. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC et al. Increased Viability of Odobtoblast-like Cells Subjected to Low-Level Laser Irradiation. *Laser Phys* 2010; 20: 1659-1666.
20. 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; 27: 237–249.
21. Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 409-413.
22. Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil* 2008; 35: 940-946.
23. Chorvat D, Chorvatova A. Approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Phys. Lett* 2009; 6: 175-193.
24. Lenaz G, Genova ML. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:1750–1772.
25. Kluckova K, Bezawork-Geleta A, Rohlena J, Dong L, Neuzil J. Mitochondrial complex II, a novel target for anti-cancer agents. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1827: 552-564.

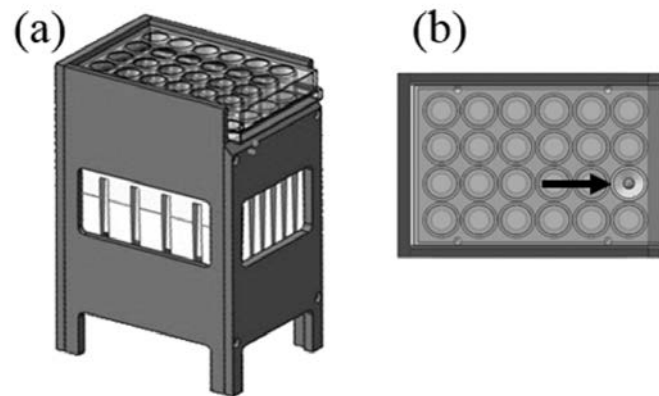


Figure 1

Fig 1 LEDtable side view showing the positioning of the 24- well culture plate (A). Top view of LEDtable with the culture plate and diode array (B) in position.

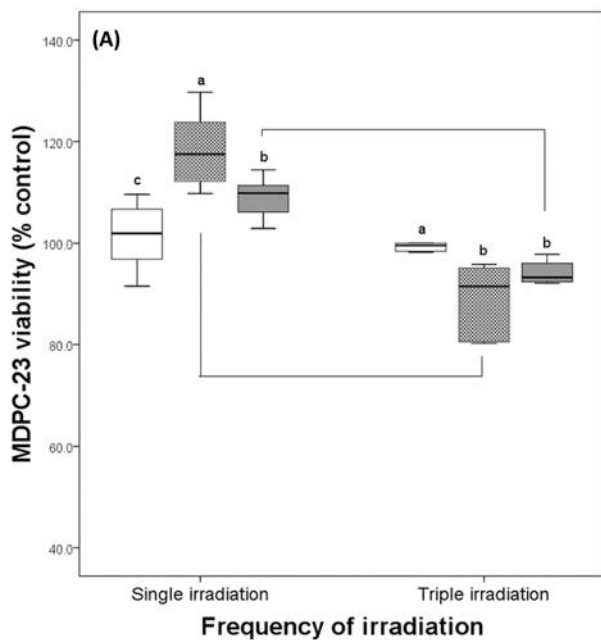


Figure 2A

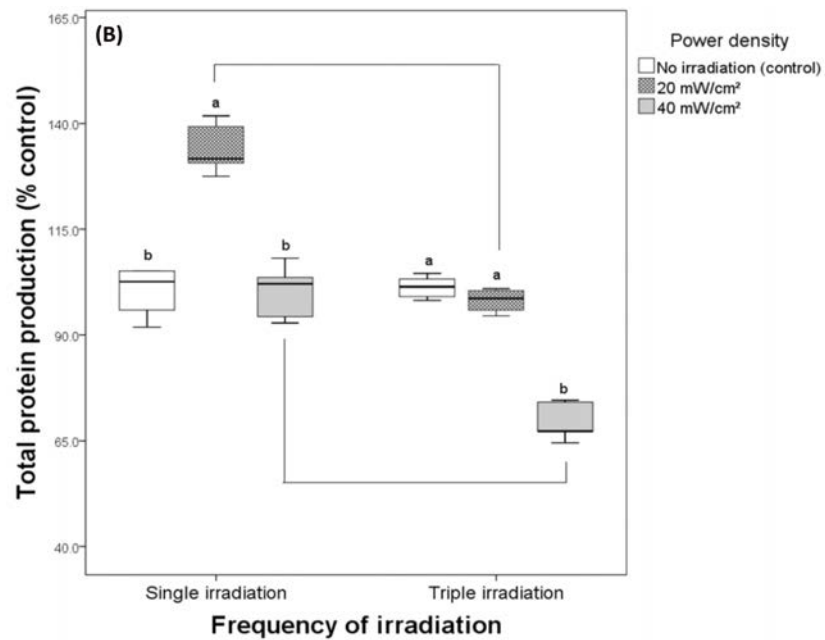


Figure 2B

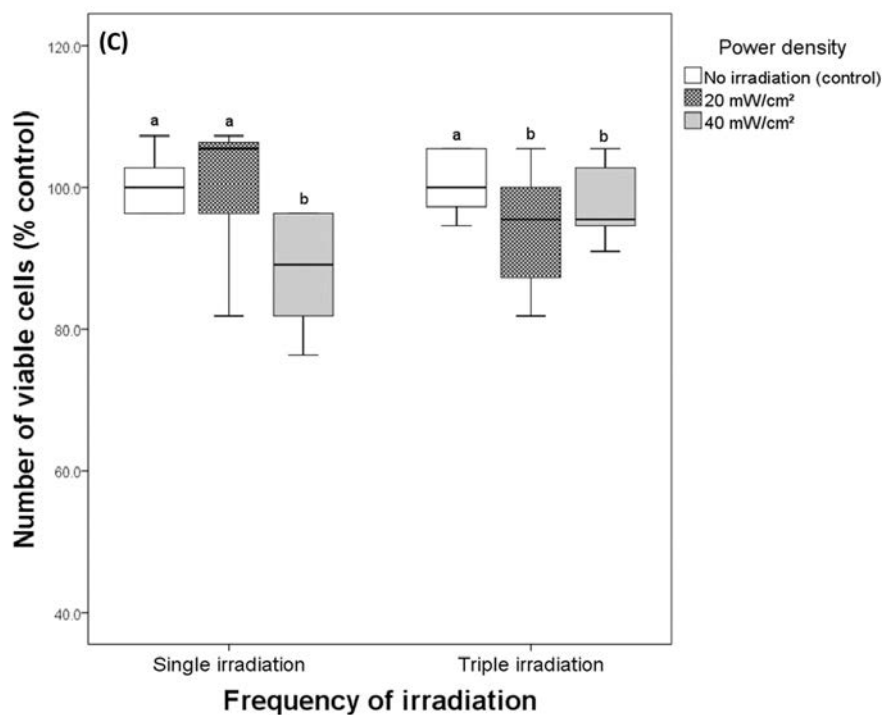


Figure 2c

Fig 2 (A) Viability, (B) total protein production, (C) number of viable MDPC-23 irradiated with a red LED delivering 2 J/cm<sup>2</sup>, in a single or triple irradiation, and distinct power densities, 20 mW/cm<sup>2</sup> and 40 mW/cm<sup>2</sup>. Values are presented as percentage of the control group (non-irradiated cells). Within each frequency of irradiation, groups indicated by the different letter are statistically different (p < 0.05). The same is true for groups connected by the lines. The boxes extend from the first quartile (Q1) to the third quartile (Q3); within the boxes, the horizontal lines are the medians of each data set. The two horizontal lines, called whiskers, extend from bottom and top of the box. The bottom whisker goes from percentile 25 (Q1) to smallest non-outlier in the data set, and the top whisker goes from percentile 75 (Q3) to the largest non-outlier value.

## 3.2 PUBLICAÇÃO 2

### **METABOLIC ACVITIVITY OF ODONTOBLAST-LIKE CELLS IRRADIATED WITH BLUE LED (455 nm)**

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida<sup>1</sup>; Fernanda Gonçalves Basso<sup>2</sup>, Ana Paula Silveira Turrioni<sup>2</sup>; Carlos Alberto de-Souza-Costa<sup>3</sup>; Josimeri Hebling<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Restorative Dentistry, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physiology and Pathology, Araraquara Dental School, "Univ. Estadual Paulista-UNESP", Araraquara, SP, Brazil.

Prof Josimeri Hebling (Author for Correspondence)

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

Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brazil.

e-mail: [jhebling@foar.unesp.br](mailto:jhebling@foar.unesp.br).

Telephone: +55 (16) 3301-6334 – Fax: +55 (16) 3301-6329

**ABSTRACT**

Blue light emitting diodes (LEDs) are frequently used in dentistry for light-activation of resin-based materials; however, their photobiostimulatory effects have not yet been fully investigated. This study aimed to investigate the effect of blue LED (455 nm) on the metabolism of odontoblast-like cells MDPC-23. Energy doses of 2 J/cm<sup>2</sup> and 4 J/cm<sup>2</sup> were used at 20 mW/cm<sup>2</sup> fixed power density. MDPC-23 cells were seeded at 10,000 cells/cm<sup>2</sup> density in DMEM containing 10% FBS. After 12 hours, the culture medium was replaced with new DMEM supplemented with 0.5% of FBS and the cells were incubated for further 12 hours. After that, single irradiation was performed to the culture, under selected parameters. Cell viability evaluations (Alamar Blue Assay, n=12), number of viable cells (Trypan Blue Assay, n=12), morphological analysis by scanning electron microscopy (SEM, n=2), gene expression (n=6) of alkaline phosphatase (*Alp*), collagen (*Col-1a1*) and dental matrix protein (*Dmp-1*) (q-PCR) were performed 72 hours after irradiation. Data were analyzed by Kruskal-Wallis, ANOVA and Tukey tests (p<0.05). Direct light application at 4J/cm<sup>2</sup> energy dose had no negative effects on cell viability, while irradiation with 2 J/cm<sup>2</sup> reduced cell metabolism. None of doses affected the number of viable cells compared with the control group. The two energy doses down-regulated the expression of *Alp*; however, expression of *Col-1a1* and *Dmp-1* had no alteration. Cells presented change in the cytoskeleton only when irradiated with 2J/cm<sup>2</sup>. In conclusion, the blue LED (455 nm) irradiation, under the evaluated parameters, had no biostimulatory effects on MDPC-23 cells.

**Key words:** Phototherapy, Odontoblasts, Cell Metabolism, Cell Proliferation

## INTRODUCTION

Camphorquinone, which is activated when submitted to visible light at the wavelength of 467 nm, is the photoinitiator most used in biomedical applications [1]. This photoinitiator is one of the constituents of dental materials, such as restorative composites, adhesive systems, resin and ionomer materials. For this reason the blue band (440-500nm) of the visible light spectrum has been used in restorative procedures. It may be emitted by sources such as plasma arc, halogen light or LEDs (light emitting diodes) [2,3].

LEDs are small devices with high energy efficiency, which may emit light between the ultra-violet and infrared electromagnetic spectrum [4]. LEDs have been used in low level light therapy [5], particularly in the red and infrared wavelengths [6-8], which have been included in the “optical window” [9]. However, there are few studies regarding the use of LEDs at the blue light wavelength [5, 10, 11], even though this light wavelength is routinely used to photo-activate dental materials. In the literature, it has been observed that energy doses such as 2 or 4J/cm<sup>2</sup> promoted biostimulatory effects, and fitted into the parameters of low level light therapy [8, 9, 12]. However, these values differ from the dose of energy used for restorative purposes, which must be around 16J/cm<sup>2</sup> [13].

It has been demonstrated that low level light therapy has positive biologic effects on cell proliferation [7, 8, 14] favoring tissue repair [6]. Light stimulation promotes alterations in the production of reactive oxygen species, modulation of ATP production and increase in cell proliferation [8, 15]. However, the exact mechanism of action of the therapy [AlGhamdi 6], and its molecular effects [15] which are dependent on the physical parameters used, such as wavelength, power density and energy dose [9, 16,17], have not yet been completely elucidated.

Since there is no consensus with regards to the results obtained with cellular photobiostimulation by light in the blue spectrum [5, 10, 11, 15, 18] and considering that this wavelength is the most used for restorative purposes in Dentistry, the aim of the present study was to determine the effects of irradiation with blue LED on odontoblast-like cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **CELL CULTURE AND IRRADIATION PROTOCOL**

Odontoblast like-cells MDPC-23 cells were used, and seeded at a density of 10,000 cells/cm<sup>2</sup>, in 24-well plates, using DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) [14]. The samples were maintained in an environment with 5% of CO<sub>2</sub>, at 37° C, for 12 hours. After this, fresh DMEM containing 0.5% of FBS was used with the purpose of promoting cellular nutritional deficit.

The irradiation procedures were performed after 12 h of cellular nutritional deficit. A device named LEDTable (Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, São Carlos, Brazil) [ 19] was used to provide LED irradiation at the blue band of the visible light wavelength (455 ±10 nm). This device has 24 light emitting diodes, which are activated simultaneously. Collimators within LEDs allow homogeneous and individualized light exposition to each well of the culture plate. Thus, possible effects of scattering and reflection of light were minimized. Additionally, the loss of power caused by the distance between the diodes and acrylic on the bottom of culture plates (11 mm) was previously calculated. Temperature variation, considering the physical irradiation parameters used in the study, was assessed using a calibrated multimeter and thermistor, both fixed to the base of the culture plate wells. The blue-light wavelength (455 nm) was found to produce a 2° C increase within 10 minutes

irradiation which is below the 3.4° C threshold necessary to cause harmful effects to MDPC-23 culture cells (Souza et al., 2009).

The parameters for exposure to light consisted of a fixed power density of 20 mW/cm<sup>2</sup>, which fitted into the parameters of low level light therapy [9]. Therefore, energy doses of 2J/cm<sup>2</sup> and 4J/cm<sup>2</sup> were achieved by irradiating samples for 1 min and 40 s, and 3 min and 20s, respectively. Before irradiation, the culture medium was replaced by 1.0 mL of phosphate buffer saline (PBS 1x), with the purpose of avoiding the absorbance of LED by the culture medium containing phenol-red. After irradiation, the buffer solution was removed and 1.0mL of DMEM supplemented with 0.5% of FBS was added.

The cell viability, the number of viable cells, the analysis of gene expression of *Alp*, *Col-1a1* and *Dmp-1*, and cell morphology were evaluated 72 hours after irradiation. This period of evaluation was previously determined in pilot studies as being the best period to observe the cellular events investigated in this study. For internal validity of the study, a control group was used, in which all the procedures were performed, including mounting the plates on LEDTable, except for activation of the diodes. For each group, including the control, 12 wells of a 24-well cell culture plate were used (n=12).

## **CELL VIABILITY ANALYSIS**

Cell viability was analyzed by means of the Alamar Blue assay (n=12). In this method, the oxidized form of Alamar Blue (at blue color) is added to the culture, and by means of mitochondrial activity, it is converted into its reduced form, leading to a change in color from blue to pink [21]. Thus, 10% Alamar blue solution was prepared in DMEM culture medium without FBS and 500 µL was distributed to each sample.

The samples were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After 4 hours, 200 µL of each sample was transferred, in duplicate, to a 96-well plate. Mitochondrial activity was determined by means of detection of fluorescence of the reduced salt, with excitation at 530-560 nm and emission at 590 nm (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Vermont, USA). The fluorescence values were normalized by the median of the control group and transformed into percentages.

### **NUMBER OF VIABLE CELLS**

The Trypan Blue assay (n=12) was used for counting the number of viable cells [ 22]. After 72 hours from radiation, the culture medium was removed and 300 µL of 0.25% Trypsin was inserted (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for 10 minutes. After this, 50 µL of the cell suspension was transferred to a 96-well plate and 50 µL of 0.04% Trypan Blue solution was added (Sigma – Aldrich, St Louis, MO, USA) and incubated for 2 minutes at room temperature. An aliquot of 10 µL of the solution was inserted into a hemocytometer, used for counting the total number of cells and the number of non-viable cells, under an inverted light microscope (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Counts corresponded to  $n \times 10^4$  cells per milliliter of the suspension. Non-viable cells were marked in blue, due to Trypan Blue dye penetration into cells that presented rupture of the plasma membrane. The number of viable cells was determined by means of subtraction of the number of non-viable cells from the total number of cells. The values found were normalized by the median of the control group, considered 100% viable cells.

## **GENE EXPRESSION ASSAY (RT q-PCR)**

The expression of genes (n=6 per gene) that codify alkaline-phosphatase (*Alp*), collagen type I (*Col-1a1*) and dentin matrix protein (*Dmp-1*) was evaluated by means of the RT-qPCR. Initially RNA extraction was performed with trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's indications. The concentration of total RNA in each sample was determined in a biophotometer (RS – 232C, Eppendorf, Hamburg, Germany), in using 1:50 dilution, followed by verification of the purity values with regards to the ratio 260/280 nm. After that, 1.0 µg of total RNA was used for cDNA synthesis of each sample, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For each of the genes selected, the specific primers were synthesized (Table 1). The reactions were prepared with standard reagents for real-time qPCR; TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (*Dmp-1*) and Syber Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (*Alp*, *Colla1* and  $\beta$ *Actin*). The StepOne Plus equipment (Applied Biosystems) was used for readout of the fluorescence, followed by the detection of amplification cycles, which were analyzed by the StepOne Software 2.1 (Applied Biosystems). All the reactions were performed according to the procedure proposed by Basso et al. (2013) [23]. The results for each gene were normalized according to the expression of the selected housekeeping gene ( $\beta$ *Actin*). Analysis of gene expression within groups was made as a percentage of control.

## **SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

The cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy, using two samples from each group (n=2). For this, glass slides (13 mm in diameter, Fisher

Scientific, Pittsburgh, PA, USA) were sterilized and inserted into 24-well plates immediately before seeding the cells. The culture medium was then removed 72 h after irradiation and the specimens were fixed and treated according to the method proposed by Oliveira et al. (2011) [14]. The specimens were mounted on metal stubs and stored in a desiccator for 7 days. The samples were sputtered with gold and evaluated by scanning electron microscopy (Inspect Scanning Electron Microscope - S50, FEI, Hillsboro, USA). Images were obtained at 200× and 1000× magnification.

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis of cell viability and of the number of viable cells was performed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. Data from gene expression assay presented normal distribution and homoscedasticity, being therefore analyzed by the fixed one-way ANOVA and Tukey tests. The level of significance was set on 5%. Cellular morphology was descriptively analyzed.

## RESULTS

The viability of MDPC-23 cells irradiated with an energy dose of 4J/cm<sup>2</sup> did not differ statistically from that of the control group. However, there was significant reduction in the viability of cells irradiated with a dose of 2J/cm<sup>2</sup> (Figure 1a). None of the energy doses increased the number of viable cells, since the counts did not differ from those of the control. However, when the doses were compared with each other, a significantly higher number of viable cells were observed for the 4J/cm<sup>2</sup> dose (Figure 1b).

Of the genes investigated, only *Alp* expression was negatively influenced by irradiation with blue LED, irrespective of the energy dose used. Exposure of MDPC-

23 cells to blue LED had no effect on the gene expression of *Col-1a1* and *Dmp-1* (Table 1).

The SEM analysis (Figure 2) demonstrated that irradiation under the parameters selected, had no negative effects on the morphology of the MDPC-23 cell culture. At the dose of 4 J/cm<sup>2</sup>, cytoplasmic and cell membrane projections continued to have an aspect of normality. The 4 J/cm<sup>2</sup>-irradiated cells had large cytoplasm emitting multiple slender projections that allowed adhesion to the glass surface, similar to that observed for the control group. Likewise, some cellular mitosis were found both in the control group and the samples exposed to 4J/cm<sup>2</sup>. Considering the dose of 2J/cm<sup>2</sup>, cytoplasmic contraction of the cells adhered to the glass substrate was observed. However, no quantitative alterations were apparent for this group.

## **DISCUSSION**

Light sources with various wavelengths have been used with the purpose of biostimulating cell lineages and/or promoting tissue repair [6, 7,8, 10, 12, 14]. However, there are few studies about blue wavelength, which is widely used in Dentistry as an instrument for light activating polymers [2, 3]. In the present study we investigated the effect of LED in the blue wavelength (455 nm) on the metabolism of MDPC-23 cells, which present phenotypic characteristics of odontoblasts. These cells are essential to the pulp tissue repair process, and are generally the first to suffer the effects of aggressions imposed on this tissue [24], by pathological processes such as dental caries, or due to the treatment of these pathologies.

The physical parameters of phototherapy have an important effect on cell and tissue response [8,9]. The energy doses used in the present study were 2 and 4J/cm<sup>2</sup>, and have been extensively cited in the literature as recommended energy dose for low

level light therapy [9, 12, 19, 25, 26]. Those energy doses differ from that commonly used for light activation of dental materials ( $16 \text{ J/cm}^2$ ) [13].

The low level light therapy is primordially performed to biostimulate cells and tissues, and must be within the limit of tolerance so that it does not cause cell death [Carroll 8]. This is, perhaps, the greatest challenge in light therapy: to define the best set of physical parameters for each cell lineage and tissue [9], in order to allow reproducibility of the technique [16].

The viability of MDPC-23 cells was not negatively affected by blue LED at an energy dose of  $4 \text{ J/cm}^2$ . However, exposure to  $2 \text{ J/cm}^2$  had a deleterious effect, promoting reduction in the cell respiratory metabolism. It may be suggested that these energy dose values were not capable of stimulating the flavoproteins and cell chromophores, sensitized by the wavelength of blue light, which belong to site I of the electron transport chain present in the cell respiratory cycle [10, 27].

The phototherapy may exert cell stimulatory effects by accelerating the electron transport in the respiratory chain, and consequently increasing ATP production [9, 28]. However, such effect was not seen in the present study, since none of the irradiated groups had an increase in cell proliferation in comparison to the non-irradiated group. The effects of phototherapy have been recently considered biphasic [9], producing a nonlinear response [18]. The biphasic effect could explain the results seen in the present study since the  $2 \text{ J/cm}^2$  dose reduced cellular viability, whilst  $4 \text{ J/cm}^2$  dose did not differ significantly from the control group. Other studies have also demonstrated similar results by employing other physical parameters of light exposure [29, 30,31]. Together, these studies ratify the concept that the effects of phototherapy are not linear.

Light in the blue wavelength may also be capable of increasing the production of reactive oxygen species (ROS) in a non-modulated manner [17]. This increase promotes damage to the cell cycle and effects on the integrity of DNA [32, 33]. This oxidative stress may lead to a reduction in the potential of the mitochondrial membrane, and alter the distribution of this organelle in the cytoplasm [34].

Protein expression, such as Collagen and Dentin Matrix Protein suffered no influence from exposure to blue LED light. However, both energy doses had deleterious effects on the gene expression of *Alp*. These proteins are related to dental extracellular matrix synthesis and its mineralization [35]. When using blue light LASER (405 nm) at a power density of 100 mW/cm<sup>2</sup>, Kushibiki et al. (2010) [15] observed an increase in collagen expression in prechondrogenic cells. Obviously, the differences between the studies do not allow direct comparison of the results; however, they reinforce the concept that positive results for light therapy depend on the cell stimulation threshold, defined by power density parameters, cell phenotype and embryonic origin [10].

Positive effects were obtained with the irradiation of keratinocytes and fibroblasts with blue LED light [10, 36,37]. Exposure to LED and Plasma Arc, using power density parameters of 140 mW/cm<sup>2</sup> and 466 mW/cm<sup>2</sup>, resulted in an increase in human fibroblast cell viability, 72 hours after exposure [37]. The period of evaluation after light irradiation is another aspect that must be considered. In previous investigations [12, 14] using the same cell line, the after-irradiation period of analysis used in the present study (72 hours) was proven able to detect significant metabolic changes in odontoblast-like cells culture.

Pulp cells could be directly, in cases of pulp exposure or pulpotomies, or indirectly photostimulated. A dentin barrier between the cells and the light source was not used in the present study. However, the anisotropic property and the heterogeneity of dentin are known factors that change the direction of light propagation [38,39]. Therefore, future investigations should also consider the effect of dentin on the light propagation. That would better simulate a clinical situation where odontoblast cells would be irradiated through a dentin barrier in deep and very deep cavities.

The lack of standardization of studies makes it extremely difficult to make comparisons between the results [40], and at times makes the clinical use of the therapy unfeasible. Once it has been demonstrated that each cell type presents an optimal energy dose for exposure, known as the biphasic effect [41], other studies may be conducted, with variation of the physical parameters, so that pulp cells receive the ideal stimulus for potentiating their action of pulp tissue defense and repair.

## **CONCLUSIONS**

Considering the physical parameters investigated, blue LED (455 nm) had no biostimulatory effects on MDPC-23 odontoblast-like cells. When irradiated with 2 J/cm<sup>2</sup>, the metabolism of these cells was negatively influenced.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors acknowledge with thanks the financial support provided by the Brazilian financing agencies FAPESP (São Paulo State Research Supporting Foundation - grant 2012/17552-2). We declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Rueggeberg FA (2011) State-of-the-art: dental photocuring--a review. *Dent Mater.* 27:39-52. doi: 10.1016/j.dental.2010.10.021.
2. Attik GN, Pradelle-Plasse N, Campos D, Colon P, Grosogeat B (2013) Toxicity evaluation of two dental composites: three-dimensional confocal laser scanning microscopy time-lapse imaging of cell behavior. *Microsc Microanal* 19 :596-607. doi: 10.1017/S1431927613000433.
3. Michaud PL, Price RB, Labrie D, Rueggeberg FA, Sullivan B (2014) Localised irradiance distribution found in dental light curing units. *J Dent* 42: 129-139. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.014.
4. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Weiss MA, Beasley KL, Munavalli GM, Bellew SG (2005) Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg* 31: 1199-1205.
5. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V (2010) Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol* 130 :259-69. doi: 10.1038/jid.2009.194.
6. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2012) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 27:237–249. doi: 10.1007/s10103-011-0885-2.
7. Holder MJ, Milward MR, Palin WM , Hadis MA, Cooper PR (2012) Effects of red Light-emitting Diode Irradiation on Dental Pulp cells. *J Dent Res* 91: 961-966.
8. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM (2014) Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater* 30: 465-475. doi: 10.1016/j.dental.2014.02.006.
9. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR (2009) Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response* 7:358–383. doi: 10.2203/dose-response.09-027.Hamblin.
10. Lewis JB, Wataha JC, Messer RL, Caughman GB, Yamamoto T, Hsu SD (2005) Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 72 :223-229.
11. Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL (2004) Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater* 20 :150-157.
12. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida Lde F, Costa CA, Hebling J (2014) Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent* 42: 1292-1299. doi: 10.1016/j.jdent.2014.07.014.
13. Krämer N, Lohbauer U, García-Godoy F, Frankenberger R (2008) Light curing of resin-based composites in the LED era. *Am J Dent* 21 :135-142.
14. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA

- (2011) In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett* 8:155-63.
15. Kushibiki T, Tajiri T, Ninomiya Y, Awazu K (2010) Chondrogenic mRNA expression in prechondrogenic cells after blue laser irradiation. *J Photochem Photobiol B* 98 :211-215.
16. Jenkins PA, Carroll JD (2011) How to report low-level laser therapy (LLLT)/photomedicine dose and beam parameters in clinical and laboratory studies. *Photomed Laser Surg* 29:785-787. doi: 10.1089/pho.2011.9895.
17. Buravlev EA, Zhidkova TV, Osipov AN, Vladimirov YA (2015) Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? *Lasers Med Sci* 30: 173-180. doi: 10.1007/s10103-014-1639-8.
18. Emelyanov AN, Kiryanova VV (2015) Photomodulation of proliferation and differentiation of stem cells by the visible and infrared light. *Photomed Laser Surg* 33:164-174.
19. Montoro LA, Turrioni AP, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J (2013) Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 47 :747-55. doi: 10.1111/iej.12211.
20. de Souza PP, Hebling J, Scalon MG, Aranha AM, Costa CA (2009) Effects of intrapulpal temperature change induced by visible light units on the metabolism of odontoblast-like cells. *Am J Dent* 22:151-156.
21. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2007) The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 22: 1304-1309.
22. Wiegand C, Hipler UC (2008) Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 3:Doc12.
23. Basso FG, Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA (2013) Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol* 58: 467-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.09.016.
24. Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, Cooper PR (2009) Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 45 :693-703. doi: 10.1016/j.bone.2009.06.018.
25. Ladalardo TC, Pinheiro A et al (2004) Laser Therapy in the Treatment of Dentine Hypersensitivity. *Braz Dent J* 15: 144-150.
26. Amid R, Kadkhodazadeh M, Ahsaie MG, Hakakzadeh A (2014) Effect of low level laser therapy on proliferation and differentiation of the cells contributing in bone regeneration. *J Lasers Med Sci* 5:163-70.
27. Rotenberg S, Lewis JB et al (2006) Extracellular environment as one mediator of blue light-induced mitochondrial suppression. *Dent Mater* 22: 759-64.
- 28 Karu TI (1988) Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser

- radiation. *Lasers in the Life Sciences* 2: 53-74.
29. Castano AP, Dai T, Yaroslavsky I, Cohen R, Apruzzese WA, Smotrich MH, Hamblin MR (2007) Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg Med* 39:543-50.
30. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA (2012) In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent* 2012:719452.
31. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA (2013) Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci* 28:367-374.
32. Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ, Jarrett SG, Davies S, Boulton M (2005) Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* 280 :21061-2116.
33. Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RLW, Hsu SD (2005) Blue light generated reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dental Mater* 21:683–688.
34. Roehlecke C, Schaller A, Knels L, Funk RH (2009) The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol Vis* 15:1929-1938.
35. Arana-Chavez VE, Massa LF (2004) Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36 :1367-1373.
36. Taoufik K, Mavrogonatou E, Eliades T, Papagiannoulis L, Eliades G, Kletsas D (2008). Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. *Dent Mater* 24:895-900. doi: 10.1016/j.dental.2007.10.006.
37. Gritsch K, Ponsonne L, Schembri C, Farge P, Pourreyaon L, Grosgeat B (2008) Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. *Materials Science and Engineering C* 28: 805–810.
38. Kienle A, Michels R, Hibst R (2006) Magnification--a new look at a long-known optical property of dentin. *J Dent Res* 85:955-959.
39. Turrioni AP, Alonso JR, Basso FG, Moriyama LT, Hebling J, Bagnato VS, De Souza CC (2013) LED light attenuation through human dentin: a first step toward pulp photobiomodulation after cavity preparation. *Am J Dent* 26: 319-323.
40. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M (2005) Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg* 31:334-340.
41. Hamblin MR, Demidova TN (2006) Mechanisms of low level light therapy. *Proc. of SPIE* 6140: 614001–614012. doi:10.1117/12.646294.

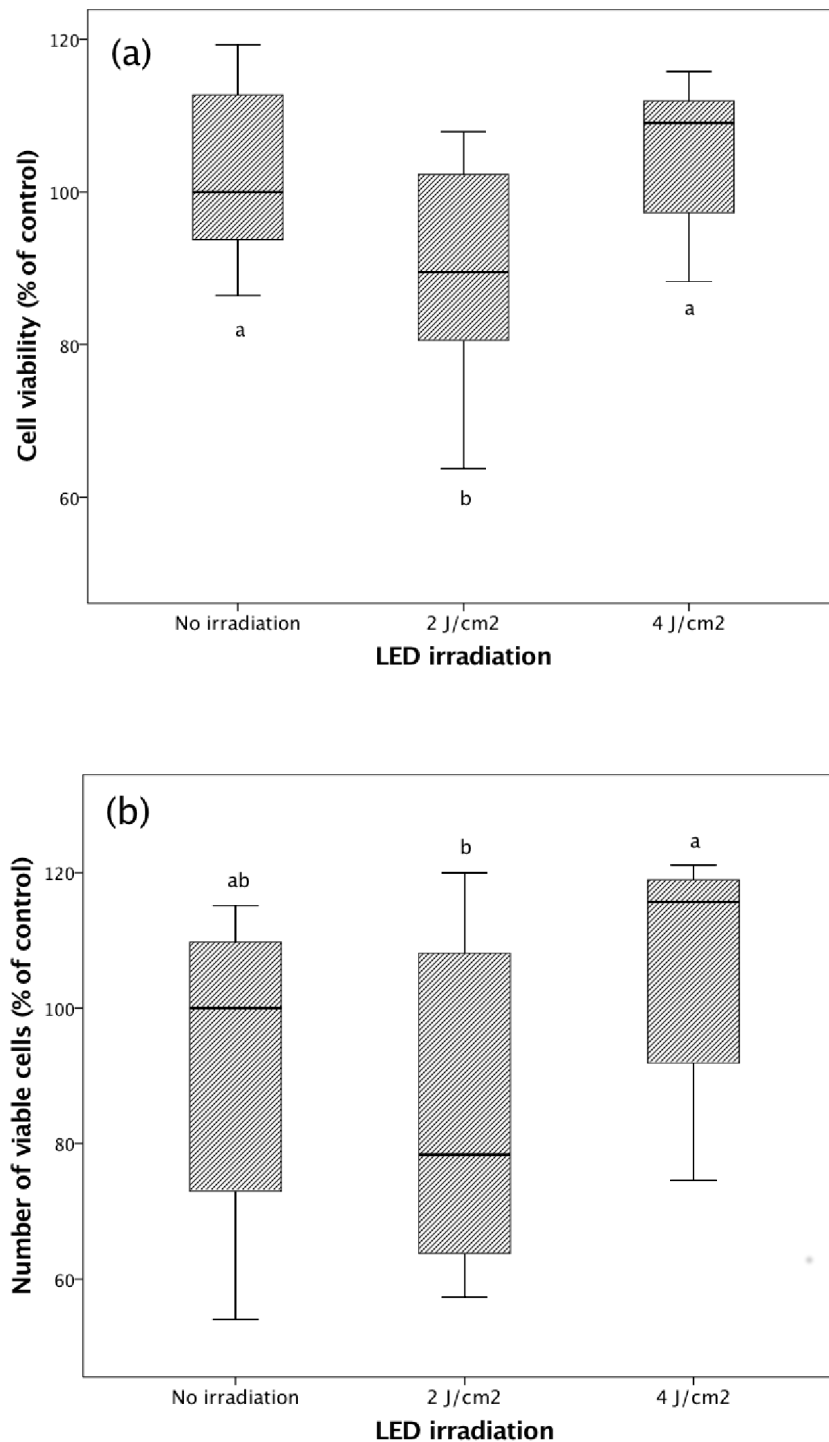
Table 1: Nucleotides sequence of primers used for gene expression analysis.

Gene	Sequence/ Taqman Assay
<i><math>\beta</math>-actin</i>	R: 5' AGCCATGTAAGCCATCC 3' F: 5' CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA 3'
<i>Alpl</i>	R: 5' GCTGATCATTCCCACGTTTT 3' F: 5' CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT 3'
<i>Coll1a1</i>	R: 5' CAGGGAAGCCTCTTTCTCCT 3' F: 5' ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC 3'
<i>Dmp-1</i>	Rn01450122_m1

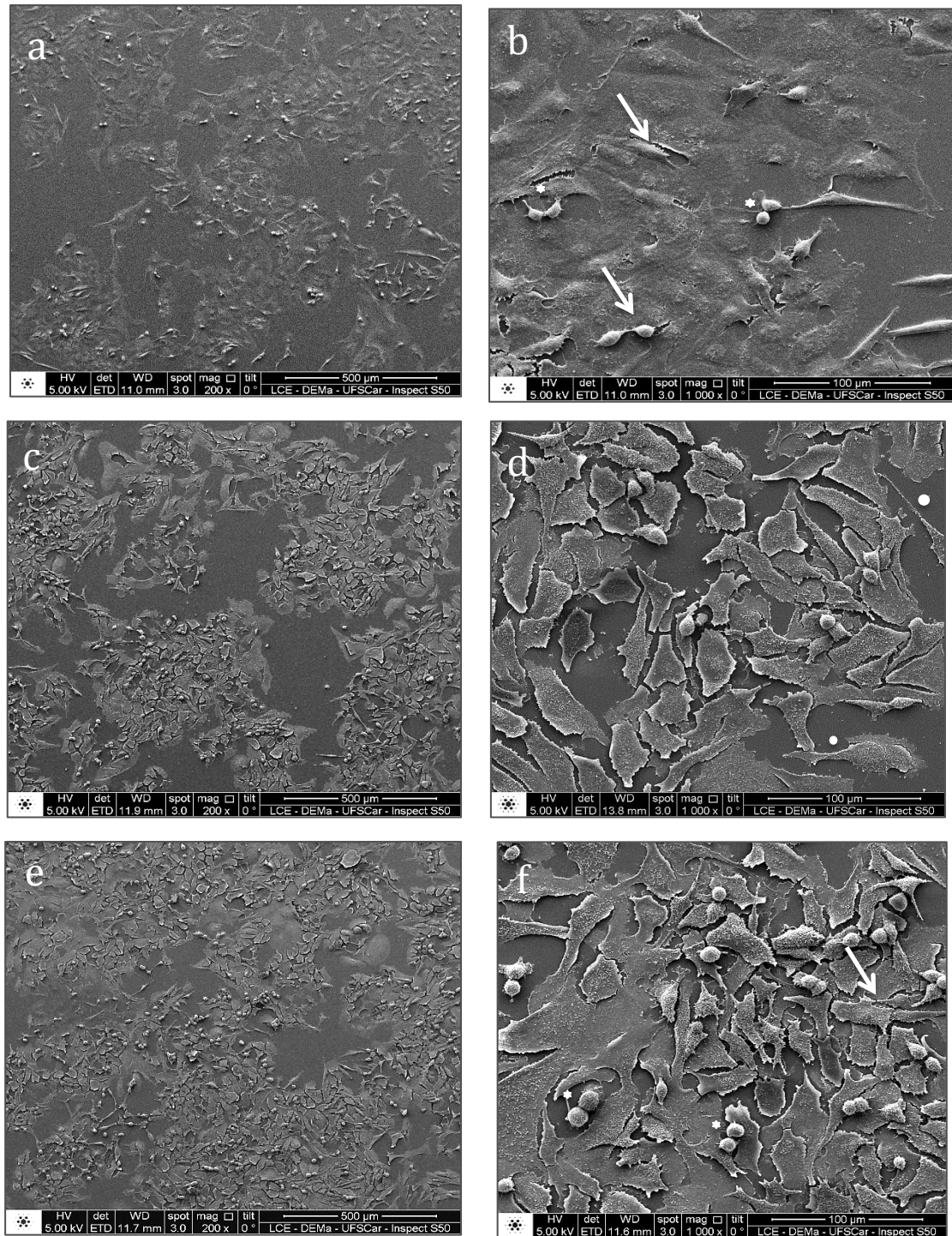
Table 2: Relative gene expression of alkaline phosphatase (*Alp*), collagen type I (*Colla1*), and dentin matrix protein (*Dmp1*) in MDPC-23 after blue LED irradiation. The housekeeping gene ( $\beta$ -*actin*) normalized the expression of target genes. Analysis of gene expression within groups was made as a percentage of control.

Energy doses	Gene expression		
	<i>Alpl</i>	<i>Colla1</i>	<i>Dmp1</i>
0 (control)	100,0±13,2 <sup>a</sup>	100,0±14,5 <sup>a</sup>	100,0±13,6 <sup>a</sup>
2 J/cm <sup>2</sup>	67,4±8,7 <sup>b</sup>	84,1±10,2 <sup>a</sup>	81,4±36,5 <sup>a</sup>
4 J/cm <sup>2</sup>	70,8±8,6 <sup>b</sup>	83,4±23,5 <sup>a</sup>	117,4±38,7 <sup>a</sup>

Numbers are mean  $\pm$  standard deviation, n=6. <sup>a</sup> Within each gene (column), groups identified by the same letter do not differ statistically (Tukey,  $p>0.05$ ).



**Figure 1.** Cell viability (a) and number of viable cells (b) of groups after LED irradiation are expressed as a percentage of control. MDPC-23 cells were irradiated with blue LED (455 nm) at energy doses of 2 or 4 J/cm<sup>2</sup>. Non-irradiated cells were used as control. Boxes comprise 50% of data; being the lower limit the 25 percentile and the upper limit the 75 percentile. The horizontal lines within the boxes consist of the median and the lines outside bars above and below the boxes indicate maximum and minimum values, respectively, of the dataset within each group (n=12). Groups with the same letter do not differ statistically (Mann-Whitney, p>0.05).



**Figure 2.** SEM photomicrographs representative of MDPC-23 cell morphology. Non-irradiated cells (control group) are shown on panels (a) and (b) indicate. (a) General vision of adhered cells on glass cover slip (b) MDPC-23 cell exhibited typical morphological, spindle-shape, as well wide cytoplams with cytoplasmic processes (arrow) originating from their membrane that seemed to keep them attached to the glass substrate. It was observed also total adhesion to glass and some mitosis (asterisc). Representative images of cells after irradiation with blue LED (455 nm) delivering the energy dose of  $2 \text{ J/cm}^2$  are presented on panels (c) and (d). Overall view of adhered cells on the glass cover slip (c). It was seen that MDPC-23 cells exhibited typical spindle-shape, as well as multiple thin cytoplasmatic processes (arrow). Some cells had a contracted cytoplasm (pointer). Representative images of cells irradiated with blue LED (455 nm) delivering  $4 \text{ J/cm}^2$  are shown on panels (e) and (f). General view of adhered cells on glass cover slip (e) and (f) MDPC-23 cell exhibiting typical spindle-shape morphology and normal cytoplams with several cytoplasmatic processes (arrow). It was also observed total adhesion to the glass slip and some mitosis (asterisks) as seen in the control group.

### 3.3 PUBLICAÇÃO 3

#### **Metabolismo de células odontoblastóides submetidas à irradiação transdentária com LED azul e vermelho**

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida<sup>1</sup>, Fernanda Gonçalves Basso<sup>2</sup>, Ana Paula Silveira Turrioni<sup>2</sup>, Carlos Alberto de Souza Costa<sup>3</sup>, Josimeri Hebling<sup>2</sup>

<sup>1</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Dentística Restauradora, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>3</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Fisiologia e Patologia, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Autor de Correspondência:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josimeri Hebling, "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil. Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brasil – 14801-903

e-mail: [jhebling@foar.unesp.br](mailto:jhebling@foar.unesp.br)

Telefone: +55 (16) 3301-6334 – Fax: +55 (16) 3301-6329

## Resumo

O presente estudo avaliou o efeito transdentinário da fototerapia de baixa intensidade com diodos emissores de luz (LEDs) sobre o metabolismo de células odontoblastóides MDPC-23. Setenta e oito discos de dentina humana (0,2 mm de espessura) foram utilizados para a semeadura de células MDPC-23 (20.000 células/disco), utilizando-se DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 12h, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo 0,5% de SFB. Decorridas 24h do cultivo, LEDs azul ( $455\pm 10\text{nm}$ ) ou vermelho ( $630\pm 10\text{nm}$ ) foram utilizados nas densidades de potência de 80 e 40  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , respectivamente. As doses de energia foram fixadas em 2 ou  $4\text{J}/\text{cm}^2$ . A viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), produção de proteína total e quantificação de colágeno foram avaliadas 72h após a irradiação. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ( $\alpha < 0,05$ ). A luz vermelha promoveu efeitos proliferativos para a dose de energia de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , enquanto a dose de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  emitida pela luz azul reduziu a viabilidade celular. A produção de ALP foi fotoestimulada pela luz vermelha em comparação a luz azul, quando as células foram irradiadas com  $4\text{J}/\text{cm}^2$ . A produção de proteína total foi reduzida após exposição a luz azul na dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , enquanto nenhum efeito foi observado em relação a produção de colágeno. Em conclusão, a irradiação com LED vermelho em uma dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  foi capaz de fotobioestimular as células odontoblastóides, enquanto que o LED azul não exerceu efeito significativo.

**Palavras chave:** Fototerapia. Odontoblastos. Proliferação de células.

## Introdução

Danos causados ao complexo dentino pulpar são frequentes na clínica odontológica, devido à progressão das lesões de cárie (Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014), ausência de selamento dos túbulos dentinários (Oliveira et al.<sup>26</sup>, 2011) ou ainda uso de materiais restauradores (Goldberg, Smith,<sup>12</sup> 2004; Nicholson, Czarnecka,<sup>25</sup> 2008). Esses danos podem apresentar caráter de reversibilidade, principalmente por meio da modulação da inflamação e reparo do tecido, o qual culmina com a deposição de matriz dentinária (Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014), seja pelos odontoblastos primários ou células mesenquimais indiferenciadas (Tjäderhane, Haapasalo,<sup>34</sup> 2012).

Assim, mecanismos que permitam a bioestimulação destas células podem ser alternativas ao reparo pulpar (Cooper et al.<sup>8</sup>, 2014). A fototerapia de baixa intensidade tem sido avaliada na modulação da reação inflamatória e produção de matriz extracelular em tecidos como pele e em culturas celulares de fibroblastos, osteoblastos e queratinócitos (Basso et al.<sup>5</sup>, 2013; Carroll et al.<sup>7</sup>, 2014; Frigo et al.<sup>11</sup>, 2010; Pyo et al.<sup>31</sup>, 2013). Entretanto, tem sido pouco avaliada quanto a resposta pulpar (Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014).

Dispositivos como LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou LED (Diodos Emissores de Luz), empregados em baixos valores de densidade de potência e dose de energia (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009; Posten et al.<sup>29</sup>, 2005), são utilizados nesta terapia. Os comprimentos de onda mais utilizados estão dentro da faixa de 600 - 800 nm (AlGhamdi et al.<sup>3</sup>, 2012; Carroll et al.<sup>7</sup>, 2014; Posten et al.<sup>29</sup>, 2005). Apesar do comprimento de onda azul não estar inserido dentro da janela óptica (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009), este tem sido extensivamente usado na área odontológica para a fotoativação de materiais restauradores e forradores cavitários (Krämer et al.<sup>18</sup>, 2008).

Embora alguns estudos tenham avaliado os efeitos da fototerapia com luz azul (Kushibiki et al.<sup>19</sup>, 2010; Lewis et al.<sup>20</sup>, 2005; Liebmann et al.<sup>21</sup>, 2010; Wataha et al.<sup>38</sup>, 2004), ainda não há um consenso sobre os reais resultados promovidos pela exposição a este comprimento de onda, principalmente quanto ao tecido pulpar ou

culturas celulares como fibroblastos ou queratinócitos, que também podem ser expostos ao efeito da luz durante a fotoativação de materiais dentários.

Apesar de alguns estudos terem demonstrado que fontes de luz como o laser infra-vermelho podem promover o aumento de expressão gênica de proteínas como colágeno tipo I (Pyo et al.<sup>31</sup>, 2013) ou que o LED infra-vermelho promova efeitos positivos frente a cultura pulpar humana (Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014), condições clínicas para a aplicação desta terapia na área odontológica são pouco mimetizadas. Comumente, estudos in vitro avaliam os efeitos destas fontes de luz de forma direta sobre culturas celulares, não sendo considerados aspectos como espalhamento da luz quando da presença de dentina. Além disto, também há uma falta de padronização quanto aos parâmetros de dosimetria da luz, dificultando muitas vezes uma possível aplicação clínica da terapia.

Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito biostimulatório dos LEDs azul (455 nm) e vermelho (630 nm) em um modelo transdentinário de cultura de células odontoblastóides MDPC-23, mimetizando a aplicação da fototerapia em cavidades profundas. Além disto, foram avaliadas duas doses de energia,  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e densidades de potências distintas, de acordo com a perda de potência em cada comprimento de onda.

## **Material e Método**

### ***Obtenção dos discos de dentina e medição da atenuação da luz LED***

Foram utilizados 78 terceiros molares humanos, de acordo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 13072813.2.0000.5416) da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Os dentes foram selecionados, cortados e lixados (Oliveira et al.<sup>27</sup>, 2013; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2013) para a obtenção de discos de dentina com espessura final de 0,2 mm. A remoção da *smear layer* foi realizada pela aplicação de solução de EDTA 0,5 M (pH 7,2) durante 30 segundos em ambas as faces dos discos, seguida de lavagem durante 60 segundos.

Em seguida, os discos de dentina foram submetidos a avaliação da atenuação da luz, para cada comprimento de onda. Assim, utilizando um sensor de alta sensibilidade para comprimentos de onda entre 400 e 1060 nm acoplado a um potenciômetro (LM-2, Coherent, California, EUA), a atenuação da luz gerada pelos discos foi determinada. Inicialmente a face pulpar de cada espécime foi posicionada em contato com o sensor e a face oclusal foi iluminada pelo LED, de acordo com cada comprimento de onda, durante 5 segundos (Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2013). Os valores de potência foram registrados antes da inserção do disco e após, e a atenuação da luz calculada para cada disco permitindo que esses fossem distribuídos em grupos experimentais de forma homogênea.

### ***Dispositivo e Parâmetros de Irradiação***

A irradiação da cultura celular foi realizada por dois dispositivos denominados LEDTables (Grupo de Óptica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlo, Brasil), os quais apresentavam 24 diodos emissores de luz, nos comprimentos de onda azul ( $455 \pm 10$  nm) e vermelho ( $630 \pm 10$ nm). Os parâmetros de irradiação utilizados foram de densidade de potência de  $80 \text{ mW/cm}^2$  para o comprimento de onda azul e  $40 \text{ mW/cm}^2$  para o vermelho, devido ao espalhamento dos comprimentos de onda e avaliação da perda de potência dos discos de dentina. As doses de energia empregadas foram fixadas em  $2 \text{ J/cm}^2$  e  $4 \text{ J/cm}^2$  sendo os tempos de irradiação calculados considerando-se as distintas densidade de potência e a distância entre a área irradiada e os diodos (11 mm).

Durante a exposição das amostras a luz, o meio de cultura foi substituído por solução de PBS tamponada. Após, a solução foi removida e um novo meio de cultura mantido em contato com as células. Adicionalmente, o monitoramento da temperatura foi realizado por meio de um multímetro e termístor acoplados a base dos diodos.

### ***Cultura Celular***

Células MDPC-23 foram descongeladas e sub-cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 IU/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomina e 2 mmol/L de glutamina

(Gibco, Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até a obtenção do número de células necessárias para os experimentos.

### ***Condições Experimentais***

Após alocação dos discos em grupos homogêneos quanto à atenuação da luz, os mesmos foram reduzidos a um diâmetro final de 8 mm, embalados e esterilizados por óxido de etileno. Para cada disco foi montado um conjunto utilizando um dispositivo metálico e O-rings de silicone, todos esterilizados previamente, para adaptação do disco de dentina e manutenção estável do mesmo na placa de cultura. A face oclusal do disco foi inserida em contato com o acrílico da placa de 24 compartimentos, estando a face pulpar voltada para cima, na qual as células foram cultivadas. As células foram semeadas em uma densidade de 20.000/disco, em meio DMEM acrescido de 10% de SFB. Após 12 horas, o meio de cultura foi aspirado e um novo DMEM suplementado com 0,5% de SFB foi mantido em contato com as células, com o objetivo de induzir déficit nutricional celular (dados não publicados). Após 12 horas adicionais, as amostras foram submetidas a exposição dos LEDs de acordo com os parâmetros propostos. As avaliações de morfologia e metabolismo foram realizadas 72 horas após a irradiação. Grupos controles não irradiados foram executados de acordo com cada comprimento de onda, sendo realizados os mesmos procedimentos que os experimentais, incluindo o posicionamento da placa de cultura na LEDTable, exceto pelo não acionamento dos diodos.

### ***Viabilidade Celular***

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de alamar blue (n=8) na concentração de 10% (Al-Nasiry et al.<sup>1</sup>, 2007). Após 3 horas da incubação da solução, 200 µL do extrato foram transferidos para placas de 96 compartimentos e a fluorescência foi determinada (excitação/emissão- 485 nm/530 nm). Os valores obtidos foram normalizados pela mediana do grupo controle (=100% de viabilidade) e transformados em porcentagem.

### ***Produção de Proteína Total e Atividade de Fosfatase Alcalina***

Inicialmente, as células foram lisadas pela adição de um agente detergente, e em seguida 50 µL do extrato foram utilizados para quantificação de fosfatase alcalina. Os demais 950 µL foram empregados para análise do conteúdo de proteína total (n=8) pelo método proposto por Read e Northcote<sup>32</sup> (1981). A reação colorimétrica foi lida a 655 nm para a determinação da absorbância. Estes valores foram interpolados em uma equação linear (curva padrão), a qual foi construída com base em concentrações conhecidas de albumina bovina (mg/mL). A concentração de proteína total foi normalizada pela mediana do grupo controle (=100%) de cada comprimento de onda e transformada em percentual.

A atividade de fosfatase alcalina (n=8) foi mensurada utilizando-se kit do ensaio do ponto final (Labtest Diagnostico SA, Lagoa Santa, MG, Brazil) (Oliveira et al.<sup>26</sup>, 2011; Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014). Este ensaio colorimétrico determina a atividade enzimática por meio da hidrólise da timoftaleína monofosfato liberando timoftaleína. A absorbância foi determinada a 590 nm, sendo os valores encontrados interpolados em uma curva padrão (U/L). Em seguida os valores foram normalizados pela mediana do grupo controle (=100%) e transformados em percentual.

### ***Produção de Colágeno***

A produção de colágeno (n=8) foi determinada por meio do ensaio de Sirius Red (Saruwatari et al.<sup>33</sup>, 2005). Os extratos foram coletados e armazenados em eppendorf a -20°C. Trezentos microlitros foram transferidos para tubos contendo 300 µL do corante Sirius Red (Direct Reagent) e mantidos sob agitação a 400 rpm, 25°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos. Os *pellets* formados foram lavados com 500 µL de solução de HCl 0,1 M, sendo posteriormente removida e acrescentados 250 µL de NaOH 0,5 M promovendo a dissolução. As amostras foram vortexadas e 200 µL foram transferidos para placas de 96 poços para a leitura da absorbância a 555 nm. Os valores foram normalizados pela mediana do grupo controle (n=100%) e transformados em porcentagem.

### ***Morfologia Celular***

A morfologia foi avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=2). Os discos de dentina foram cuidadosamente removidos do sistema e fixados com glutaraldeído a 2,5% por 120 minutos. Os demais passos de fixação e secagem seguiram o método proposto por Oliveira et al.<sup>26</sup> (2011). Os discos foram montados em *stubs* metálicos e mantidos em dessecador por 1 semana. As amostras foram cobertas em ouro e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (FEG-MEV; JEOL modelo 7500, Japão) em aumentos de 200 e 500 vezes. A morfologia das células MDPC-23 foi observada para cada grupo, e descrita principalmente quanto a área de dentina coberta pelas células e conformação do citoplasma.

### ***Análise do Dados***

O conjunto de dados referentes a viabilidade celular, produção de proteína total, fosfatase alcalina e colágeno não apresentaram distribuição normal. Assim, esses dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis complementado por Mann-Whitney, quando da rejeição da hipótese nula de igualdade entre os grupos. O nível de significância de 5% foi estabelecido para todas as inferências estatísticas.

## **Resultados**

### ***Viabilidade Celular***

A viabilidade celular (Tabela 1) foi afetada negativamente quando a cultura foi exposta a uma dose de 2 J/cm<sup>2</sup> utilizando-se o comprimento de onda azul. Para o LED vermelho o oposto foi observado para as duas doses, ou seja, ocorreu aumento da viabilidade celular. Quando as doses de energia foram comparadas, foram observadas diferenças entre 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> para ambos os comprimentos de onda. Quando foi realizada a comparação dos diferentes comprimentos de onda para a mesma dose de energia, verificou-se que os grupos irradiados pela luz vermelha apresentam melhores resultados em relação a luz azul.

Tabela 1- Viabilidade de células MDPC-23 submetidas a diferentes doses de energia com LED azul ou vermelho.

LED	Dose de energia		
	0	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>
Azul	100,0 (88,4-139,2) a	68,3 (54,6-77,1) b	115,5 (59,3-120,2) a
Vermelho	100,0 (95,7-125,4) B	173,6 (147,2-220,1) A	219,3 (189,3-355,7) A

Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=8. <sup>aA</sup> Para cada tipo de LED (linhas), medianas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente. Medianas conectadas pelo asterisco nas colunas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05).

### ***Produção de Proteína Total e Atividade de Fosfatase Alcalina***

A produção de proteína total (Tabela 2) foi afetada negativamente pela exposição ao LED azul em uma dose de energia de 4 J/cm<sup>2</sup>. Embora diferente do grupo controle, não houve diferença estatística entre essa dose de energia em relação a menor dose de energia (2 J/cm<sup>2</sup>). Para os grupos irradiados com o LED vermelho também não foi revelada diferença entre as doses de energia de 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>, as quais não diferiram do grupo controle. Da comparação entre os dois comprimentos de onda em uma mesma dosimetria, foi observado que 4 J/cm<sup>2</sup> resultou nos maiores valores de produção de proteína total, quando as células MDPC-23 foram irradiadas com LED vermelho.

Tabela 2- Produção de proteína total por células MDPC-23 submetidas a diferentes doses de energia com LED azul ou vermelho.

LED	Dose de energia		
	0	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>
Azul	101,1 (93,8-108,5) a	84,8 (61,8-98,5) ab	57,1 (46,0-76,7) b
Vermelho	102,9 (85,6-115,5) A	75,9 (58,3-93,1) A	89,8 (75,3-103,8) A

Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=8. <sup>aA</sup> Para cada tipo de LED (linhas), medianas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente. Medianas conectadas pelo asterisco nas colunas diferem estatisticamente (Mann-Whitney, p<0,05).

Os dados referentes a atividade de fosfatase alcalina estão apresentados na Tabela 3. A atividade dessa proteína foi reduzida pela exposição aos diodos emissores de luz no comprimento azul em comparação ao grupo controle, independentemente da dose de energia entregue as células. O mesmo foi observado para a irradiado pela luz vermelha para a dose de 2 J/cm<sup>2</sup>, enquanto que 4 J/cm<sup>2</sup> não exerceu nenhum efeito fotobioestimulador. Em relação a comparação fixando-se as doses de energia, células MDPC-23 expostas ao LED vermelho em uma dose de 4 J/cm<sup>2</sup> apresentaram atividade de fosfatase alcalina comparável superior a das células irradiadas com LED azul, enquanto não foi observada diferença estatística para a dose de 2 J/cm<sup>2</sup>.

Tabela 3- Atividade de fosfatase alcalina em células MDPC-23 submetidas a diferentes doses de energia com LED azul ou vermelho.

LED	Dose de energia		
	0	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>
Azul	100,0 (81,3-117,0) a	42,1 (31,0-55,8) b	21,9 (13,5-41,8) b
Vermelho	99,9 (47,5-108,7) A	47,6 (22,9-53,9) B	118,3 (58,4-329,4) A

Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=8. <sup>aA</sup> Para cada tipo de LED (linhas), medianas identificadas com a mesma letra não diferem estatisticamente, enquanto que medianas conectadas pelo asterisco nas colunas são estatisticamente diferentes (Mann-Whitney, p<0,05).

### ***Produção de Colágeno***

A produção de colágeno (Tabela 4) não foi afetada pela exposição aos LEDs azul ou vermelho, independentemente da dose de energia entregue as células MDPC-23. Este parâmetro metabólico não sofreu qualquer efeito pela exposição a luz.

Tabela 4- Produção de colágeno por células MDPC-23 submetidas a diferentes doses de irradiação com LED azul ou vermelho.

LED	Dose de energia		
	0	2 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup>
Azul	100,0 (85,8-106,2)	77,6 (76,1-85,3)	83,3 (76,6-85,7)
Vermelho	99,8 (85,5-111,3)	82,9 (67,7-95,2)	108,5 (62,5-124,0)

Valores são mediana (percentil 25-percentil 75), n=8. Nenhuma diferença estatística foi identificada entre os grupos (Kruskal-Wallis, p>0,05)

### ***Morfologia Celular***

A morfologia celular avaliada em MEV (Figuras 1, 2 e 3) revelou que as células MDPC-23 apresentam características morfológicas compatíveis com normalidade quando irradiadas com ambos os comprimentos de onda (LED azul e vermelho), independentemente da dose de energia (2 J/cm<sup>2</sup> ou 4 J/cm<sup>2</sup>). A morfologia normal das células MDPC-23 caracteriza-se pelo amplo citoplasma celular com múltiplas pequenas projeções citoplasmáticas (figura 1), as quais são responsáveis pela aderência celular ao substrato (Figuras 2 e 3). A principal diferença observada em MEV foi o menor número de células presentes e o consequente aumento da área de exposição da dentina subjacente, observado para o grupo irradiado com o LED azul, na dose de energia de 2J/cm<sup>2</sup> (Figuras 2c e 2d).

Figura 1- Fotomicrografia em MEV de células irradiada com dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$  pelo LED vermelho. Apresentam morfologia normal, com amplo citoplasma e suas projeções. Além disto observa-se a presença de mitose. X1,500.

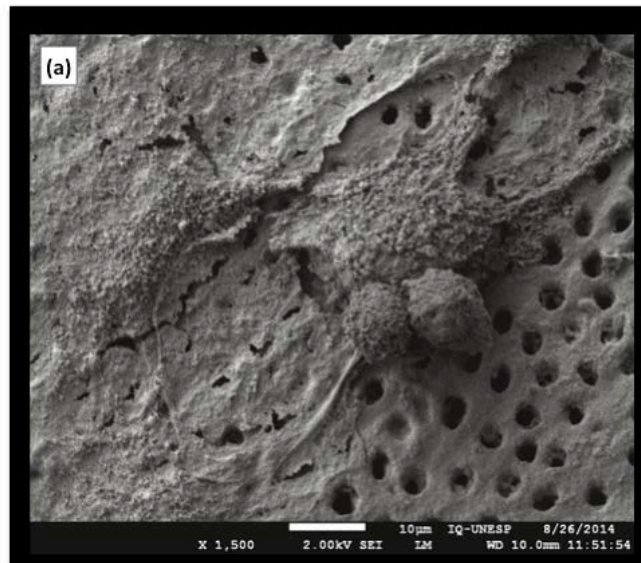


Figura 2- Fotomicrografias em MEV de células submetidas a irradiação com LED azul. (a) e (b) Células não irradiadas (controle); (c) e (d) células irradiadas com  $2 \text{ J/cm}^2$ ; (e) e (f) células irradiadas com  $4 \text{ J/cm}^2$ . No grupo controle as células MDPC-23 recobrem grande parte do substrato dentinário e apresentam amplo citoplasma, característico da morfologia de células normais. Células com morfologia normal também foram observadas para os demais grupos. Entretanto, um menor número de células e conseqüentemente maior exposição da dentina subjacente pode ser visualizado para o grupo de  $2 \text{ J/cm}^2$  de dose de energia (e) e (f). x200 e x500.

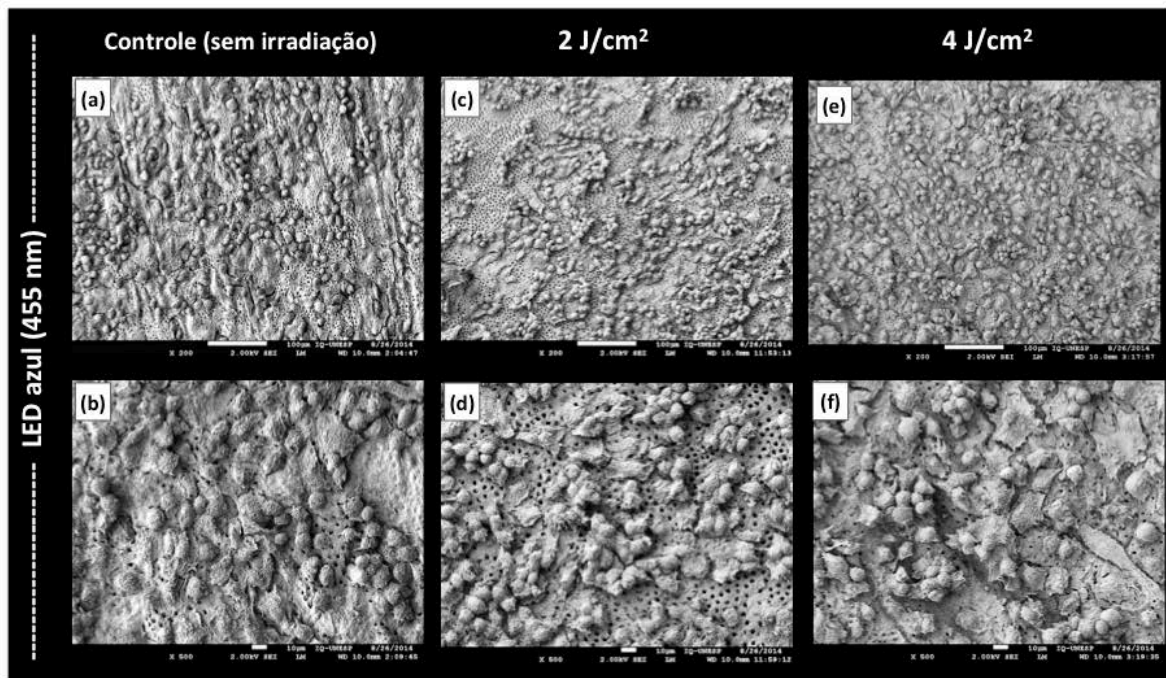
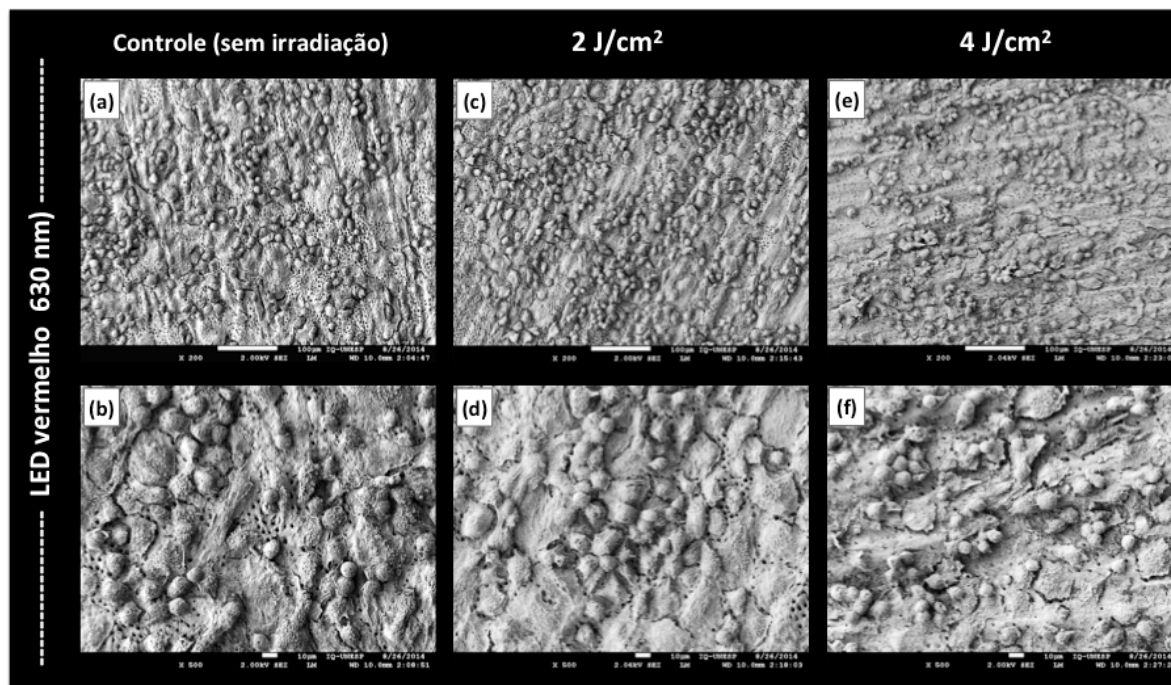


Figura 3- Fotomicrografias em MEV de células submetidas a irradiação com LED vermelho. (a) e (b) Células não irradiadas (controle); (c) e (d) células irradiadas com  $2 \text{ J/cm}^2$ ; (e) e (f) células irradiadas com  $4 \text{ J/cm}^2$ . Células MDPC-23 com morfologia compatível com células saudáveis recobrem grande parte do substrato dentinário. Células com morfologia normal também foram observadas para os demais grupos. Assim como para a irradiação com LED azul, um menor número de células pode ser observado para o grupo de  $2 \text{ J/cm}^2$  de dose de energia, com conseqüente maior exposição da dentina subjacente. x200 e x500.



## Discussão

Os odontoblastos são células presentes no tecido pulpar, especializadas na secreção de matriz dentinária e responsáveis pela transmissão sensorial (Couve et al.<sup>9</sup>, 2013). Portanto, representam a primeira barreira de defesa a estímulos nocivos ao elemento dental (Arana-Chavez, Massa,<sup>4</sup> 2004). Por essa razão, células imortalizadas MDPC-23 foram utilizadas no presente estudo, uma vez que apresentam fenótipo de odontoblastos (Man et al.<sup>22</sup>, 2012). O protocolo de cultivo celular, no qual foi induzido déficit nutricional celular por meio da diminuição da concentração de soro fetal bovino, foi proposto baseado em estudos previamente realizados (dado não publicado). Este tipo de protocolo tem sido respaldado pela literatura (Aleksic et al.<sup>2</sup>, 2010; Oliveira et al.<sup>26</sup>, 2011; Peplow et al.<sup>28</sup>, 2010; Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014) uma vez que a resposta a fotobioestimulação é melhor observada quando as células são

submetidas a carência nutricional ou outro efeito debilitante, como redução nos níveis de oxigênio (Aleksic et al.<sup>2</sup>, 2010; Peplow et al.<sup>28</sup>, 2010).

Adicionalmente, foi utilizado um modelo transdentinário para avaliação da fototerapia, com a interposição de discos de dentina com espessura de 0,2 mm. Esse delineamento objetivou mimetizar cavidades muito profundas, sem exposição pulpar, condição clínica na qual seria necessário o uso de material capeador indireto. Nessas condições, a fototerapia de baixa intensidade atuaria auxiliando a modulação da inflamação e reparo do tecido pulpar via tecido dentinário.

A presença de dentina pode influenciar a direção e o espalhamento da luz (Kienle, Hibs,<sup>16</sup> 2006; Turrioni et al.<sup>35</sup>, 2013) devido ao seu comportamento anisotrópico (Kienle, Hibs,<sup>16</sup> 2006). Portanto, no presente estudo, as densidades de potência foram ajustadas considerando-se a barreira dentinária e também de acordo com o comprimento de onda utilizado, uma vez que comprimentos mais longos, como vermelho ou infra vermelho, determinam maior penetração da luz (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009). A luz azul, por outro lado, tem menor penetração nos tecidos e maior espalhamento (Neupane et al.<sup>24</sup>, 2010).

Embora os espécimes de dentina tivessem a mesma espessura e as potências tivessem sido ajustadas no sentido de homogeneizar as doses de energia, foram notáveis as diferenças encontradas entre as amostras expostas aos diferentes comprimentos de onda, principalmente na avaliação da viabilidade celular. O LED vermelho aumentou a proliferação celular em ambas as doses, fato que não foi observado para o LED azul. É provável que a luz vermelha tenha ultrapassado o limiar de excitação celular e assim mecanismos de resposta passaram a operar, permitindo aumento da proliferação (Emelyanov, Kiryanova,<sup>10</sup> 2015). Além disto, sabe-se que a luz vermelha apresenta menos dispersão e perdas durante seu trajeto quando comparada a luz azul (Neupane et al.<sup>24</sup>, 2010). Pode ser inferido que durante a exposição celular a luz azul tenha ocorrido dissipação dessa luz, a qual não atingiu de forma satisfatória os alvos celulares (Turrioni et al.<sup>37</sup>, 2015).

O efeito primário da fototerapia tem sido designado pelo aumento da produção de ATP, por meio da ativação de cromóforos presentes na cadeia

respiratória celular, com consequente aumento da síntese de DNA (Prindeze et al.<sup>30</sup>, 2012) e proliferação celular (Carroll et al.<sup>7</sup>, 2014; Huang et al.<sup>14</sup>, 2009). Entretanto, estes alvos celulares requerem comprimentos de onda específicos para sua bioestimulação. Destaca-se que enzimas como citocromo c oxidase e flavoproteínas, presentes na cadeia respiratória celular, podem ser estimuladas por fontes de luz nos comprimentos vermelho e azul, respectivamente (Buravlev et al.<sup>6</sup>, 2014; Carroll et al.<sup>7</sup>, 2014; Huang et al.<sup>14</sup>, 2009; Kushibiki et al.<sup>19</sup>, 2010).

Tem sido descrito ainda que o comprimento de onda azul é absorvido por porfirinas, presentes em maiores concentrações na hemoglobina e mioglobina (Medlock et al.<sup>23</sup>, 2015), sendo os produtos metabólicos da degradação destas moléculas considerados tóxicos (Imada et al.<sup>15</sup>, 2014). Assim, sugere-se que este mecanismo possa ter determinado efeitos citotóxicos frente a cultura de MDPC-23 exposta a luz azul em uma dose de 2 J/cm<sup>2</sup>. Já para os grupos irradiados pela luz vermelha, foi observado expressivo aumento da taxa de proliferação celular, de forma a corroborar com outros resultados observados na literatura (Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014).

A dosagem de proteína total e a atividade de fosfatase alcalina foram significativamente reduzidas pela irradiação com LED azul. Já o LED vermelho não promoveu efeitos deletério, exceto para a dose de 2 J/cm<sup>2</sup>, a qual diminuiu a produção de ALP em comparação ao controle concorrente não irradiado. Comumente, relata-se que a fototerapia exerce um efeito bifásico frente a respostas celulares (Hunag et al., 2009), ou seja, a resposta observada frente a fototerapia pode não ser linear, assim necessariamente doses maior podem não causar danos as células.

Embora a luz vermelha (600-700 nm) emitida tanto por LASER como LED tenha resultados promissores vistos na literatura, quando avaliados efeitos sobre a diferenciação de alguns tipos celulares (Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Kim et al.<sup>17</sup>, 2012) os resultados encontrados não são determinantes neste sentido. Observou-se que a maior dose não foi capaz de promover aumento na produção de ALP, enzima fundamental no processo de deposição de matriz dentinária (Tjäderhane, Haapasalo,<sup>34</sup> 2012). Assim, ressalta-se que a fototerapia atua como coadjuvante a

este processo (Hunag et al.<sup>14</sup>,2009), sendo necessárias investigações a cerca da eficácia da terapia na presença de fatores de crescimento, os quais podem ser incluídos ao meio basal celular.

Além da deposição de ALP, células odontoblastóides secretam colágeno tipo I, a principal proteína presente na matriz dentinária (Couve et al.<sup>9</sup>, 2013; Goldberg, Smith<sup>12</sup>, 2004). Assim, a avaliação da produção do colágeno indicaria uma possível capacidade da fototerapia em auxiliar no reparo pulpar. No entanto, ambos os comprimentos de onda não foram capazes de aumentar a produção desta proteína, independentemente do comprimento de onda. Assim, sugere-se que os alvos celulares responsáveis pela produção da proteína não sejam fotoestimulados por estes comprimentos de onda.

A avaliação de parâmetros físicos capazes de promover fotobioestimulação em células pulpares imortalizadas ou mesenquimais tem sido investigada (Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Oliveira et al.<sup>26</sup>, 2011; Turrioni et al.<sup>36</sup>, 2014). Entretanto, a falta de uniformidade entre os estudos em relação a seleção da densidade de potência, dose de energia, área da superfície irradiada e até mesmo regime de cultivo celular determinam resultados controversos para a fototerapia, apesar de promissores. O efeito transdentinário da luz azul, vermelha e infravermelha foi determinado por Turrioni et al.<sup>37</sup> (2015), também utilizando células MDPC-23. Entretanto, doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e 25 J/cm<sup>2</sup> foram avaliadas em uma densidade de potência de 88 mW/cm<sup>2</sup>. Segundo esses autores, o LED vermelho e infravermelho apresentaram resultados superiores em comparação ao azul, assim como observado no presente estudo quando o LED vermelho foi comparado ao azul. Diante do exposto, sugere-se que o reparo do tecido pulpar pode ser favorecido pela fototerapia. Entretanto, a falta de padronização dos métodos de investigação, bem como dos parâmetros físicos de aplicação da luz, pode impedir que tal terapia seja aplicada de forma efetiva e segura.

## **Conclusão**

A irradiação de células MDPC-23 com LED azul não foi capaz de fotobioestimular a proliferação celular, bem como a produção de proteínas

relacionadas a deposição de matriz mineralizada, enquanto que a irradiação com LED vermelho na dose de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> promoveu a viabilidade celular.

### Referências\*

1. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007; 22(5): 1304-9.
2. Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, et al. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci.* 2010; 25(4): 559–69.
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; 27(1):237–49.
4. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(8): 1367-73.
5. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):367-74.
6. Buravlev EA, Zhidkova TV, Osipov AN, Vladimirov YA. Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? *Lasers Med Sci.* 2015; 30(1): 173-80.
7. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014; 30(5) :465-75.
8. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014; 40 Suppl:S46-51.

---

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

9. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013; 92(9): 765-72.
10. Emelyanov AN, Kiryanova VV. Photomodulation of proliferation and differentiation of stem cells by the visible and infrared light. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33(3): 164-74.
11. Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J et al. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg.* 2010;28 Suppl 1:S151-6.
12. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(1): 13-27.
13. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red Light-emitting Diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res.* 2012; 91 (10): 961-6.
14. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response.* 2009; 7(4): 358–83.
15. Imada K, Tanaka S, Ibaraki Y, Yoshimura K, Ito S. Antifungal effect of 405-nm light on *Botrytis cinerea*. *Lett Appl Microbiol.* 2014 ;59(6):670-6.
16. Kienle A, Michels R, Hibst R. Magnification--a new look at a long-known optical property of dentin. *J Dent Res.* 2006; 85(10) :955-9.
17. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Kim DO, Park SJ, Chung JY, Song EK, Yoon TR. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.* 2009; 24(2): 214-22.
18. Krämer N, Lohbauer U, García-Godoy F, Frankenberger R. Light curing of resin-based composites in the LED era. *Am J Dent.* 2008; 21(3) :135-42.
19. Kushibiki T, Tajiri T, Ninomiya Y, Awazu K. Chondrogenic mRNA expression in prechondrogenic cells after blue laser irradiation. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 98 (3) :211-5.

20. 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(2): 223-9.
21. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol.* 2010; 130(1) :259-69.
22. Man J, Shelton RM, Cooper PR, Scheven BA. Low-intensity low-frequency ultrasound promotes proliferation and differentiation of odontoblast-like cells. *J Endod.* 2012; 38(5) :608-13.
23. Medlock AE, Shiferaw MT, Marcero JR, Vashisht AA, Wohlschlegel JA et al. Identification of the mitochondrial heme metabolism complex. *PLoS One.* 2015; 10(8):e0135896.
24. 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(1): 44-9.
25. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dent Mater.* 2008; 24(12): 1702-8.
26. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys. Lett.* 2011; 8(2): 155-63.
27. Oliveira CF, Basso FG, dos Reis RI, Parreiras-e-Silva LT, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. In vitro transdermal effect of low-level laser therapy. *Laser Phys.* 2013; 23(5): 55604-14.
28. Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(5) :285-04.

29. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31(3): 334-40.
30. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(11): 1241-8.
31. Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, Chung IK, Kim YD. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- $\beta$ 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 543-50.
32. 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(1):53-64.
33. Saruwatari Saruwatari L, Aita H, Butz F, Nakamura HK, Ouyang J et al. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. *J Bone Miner Res.* 2005 ;20(11) :2002-16.
34. Tjäderhane L, Haapasalo M. The dentin–pulp border: a dynamic interface between hard and soft tissues. *End Top.* 2012; 20(1): 52-84.
35. Turrioni AP, Alonso JR, Basso FG, Moriyama LT, Hebling J, Bagnato VS et al. LED light attenuation through human dentin: a first step toward pulp photobiomodulation after cavity preparation. *Am J Dent.* 2013; 26(6): 319-23.
36. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida L de F, Costa CA, Hebling J. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent.* 2014; 42(10): 1292-9.
37. Turrioni AP, Basso FG, Alonso JR, de Oliveira CF, Hebling J, Bagnato VS et al. Transdental cell photobiomodulation using different wavelengths. *Oper Dent.* 2015; 40(1) :102-11.
38. Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater.* 2004;20(2): 150-7.

### 3.4 PUBLICAÇÃO 4

#### **Proliferação e diferenciação de cultura primária de polpa humana irradiada com LED azul**

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida<sup>1</sup>, Fernanda Gonçalves Basso<sup>2</sup>, Ana Paula Silveira Turrioni<sup>2</sup>, Carlos Alberto de Souza Costa<sup>3</sup>, Josimeri Hebling<sup>2</sup>

<sup>1</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Dentística Restauradora, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>2</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>3</sup> "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Fisiologia e Patologia, Araraquara, SP, Brasil.

#### **Autor de Correspondência:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josimeri Hebling, "Univ. Estadual Paulista - UNESP", Faculdade de Odontologia de Araraquara, Departamento de Clínica Infantil, Araraquara, SP, Brasil.  
Rua Humaitá, 1680 Araraquara, SP, Brasil – 14801-903.

e-mail: [jhebling@foar.unesp.br](mailto:jhebling@foar.unesp.br).

Telefone: +55 (16) 3301-6334 – Fax: +55 (16) 3301-6329

## Resumo

Avaliou-se a resposta celular de uma cultura primária de polpa dental humana irradiada com LED azul (455 nm). Os parâmetros de irradiação foram: densidade de potência de 20 mW/cm<sup>2</sup> e doses de energia de 2J/cm<sup>2</sup> e 4J/cm<sup>2</sup>, sendo a cultura isolada de pré-molares humanos hígidos. Para avaliar a diferenciação da cultura, as células foram semeadas em uma densidade de 3x10<sup>4</sup> cél/cm<sup>2</sup>, em DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. O meio foi então substituído por um meio de diferenciação osteogênica, e a cultura mantida nestas condições por 14 dias, sendo a exposição aos diodos realizadas no 11º dia. Foram avaliadas a atividade de fosfatase alcalina, produção de proteína total, produção de colágeno, expressão gênica de Colágeno tipo I, Fosfatase Alcalina e OCT3/4, além de nódulos mineralizados. Para avaliação da proliferação, as células foram semeadas em uma densidade de 1x10<sup>4</sup> cél/cm<sup>2</sup>, em DMEM + 10% de SFB. Após 12 h, o meio foi substituído por um novo DMEM contendo 0,5% SFB. A exposição a luz azul foi realizada 24h após a semeadura. Os testes de Alamar Blue, Trypan Blue e análise em MEV foram realizados após 72h da irradiação. Os dados foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ou ANOVA e Tukey (p>0.05). A dose de 2J/cm<sup>2</sup> aumentou a produção de proteína total, não sendo o mesmo efeito observado para 4J/cm<sup>2</sup>, enquanto que a atividade de fosfatase alcalina e produção de colágeno não foram alteradas pela exposição a luz. Já a expressão gênica do colágeno foi aumentada pela dose de 2J/cm<sup>2</sup>, não sendo observadas diferenças para a fosfatase alcalina. Um maior número de matriz mineralizada foi observada para a dose de 4J/cm<sup>2</sup> em comparação ao controle, embora não tenha sido constatada diferença entre este grupo e o irradiado com 2J/cm<sup>2</sup>. A irradiação não exerceu efeito sobre a viabilidade e o número de células viáveis. A maioria das células irradiadas apresentou aspecto fusiforme, enquanto em poucas o citoplasma estava retraído. Concluiu-se que a exposição a luz azul com dose de 2J/cm<sup>2</sup> estimulou a produção de proteína total, enquanto que a dose de 4J/cm<sup>2</sup> foi capaz de aumentar a deposição de matriz mineralizada.

**Palavras chave:** Fototerapia. Polpa dental. Diferenciação celular. Proliferação de células

## Introdução

Células mesenquimais isoladas da polpa dental são caracterizadas como pluripotentes e capazes de autorenovação, podendo ser obtidas facilmente a partir de dentes decíduos ou permanentes (Nor,<sup>21</sup> 2006; Piva et al.<sup>27</sup>, 2014). O estudo a cerca do comportamento destas células tem crescido (Galler et al.<sup>8</sup>, 2011; Patel et al.<sup>24</sup>, 2010; Piva et al.<sup>27</sup>, 2014), bem como a investigação sobre técnicas e biomateriais capazes de bioestimular essas células e de induzir o reparo do tecido pulpar (Cooper et al.<sup>6</sup>, 2014; Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Piva et al.<sup>27</sup>, 2014; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014).

A resposta do tecido pulpar às injúrias depende da progressão e intensidade da reação inflamatória implementada no próprio tecido. Comumente, agressões de moderada intensidade estimulam a deposição de dentina terciária reacional pelos odontoblastos primários (Cooper et al.<sup>6</sup>, 2014; Goldberg, Smith,<sup>10</sup> 2004). Entretanto, quando a intensidade da agressão excede o limiar de tolerância dos odontoblastos primários ou quando o tecido pulpar é exposto, células mesenquimais são recrutadas e sinalizadas para que se diferenciem em novos odontoblastos para repor as células perdidas. Estas novas células depositam dentina terciária reparadora (Cooper et al.<sup>6</sup>, 2014).

Sabe-se que a modulação da resposta inflamatória pode ser a chave para a diferenciação celular e subsequente deposição de matriz dentinária (Colombo et al.<sup>6</sup>, 2014). Diante disto, é importante o desenvolvimento de terapias com potencial imunomodulatório que promovam a reparação pulpar. Terapias moleculares, epigenéticas ou fotomoduladoras tem sido atualmente investigadas com essa finalidade (Cooper et al.<sup>6</sup>, 2014).

A fototerapia de baixa intensidade tem sido utilizada como terapia moduladora da resposta inflamatória em diversas áreas da medicina, como a dermatologia (Peplow et al.<sup>25</sup>, 2010). Essa modalidade da fototerapia destaca-se também quanto aos seus efeitos sobre a proliferação celular e analgesia (Basso et al.<sup>4</sup>, 2013; Huang et al.<sup>14</sup>, 2009; Pelpolw et al.<sup>25</sup>, 2010;). A janela óptica da fototerapia inclui os comprimentos de onda vermelho e infra vermelho (600-1000

nm) (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009), comumente emitidos por LASERs (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) ou LEDs (*Light Emitting Diodes*), empregando parâmetros de energia em baixa dosagem (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009; Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014). Entretanto, apesar de muitos estudos sobre o tema (Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014; Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Oliveira et al.<sup>23</sup>, 2011; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014), esta terapia tem sido pouco avaliada quanto a bioestimulação de células pulpares (Arany et al.<sup>2</sup>, 2014; Godoy et al.<sup>9</sup>, 2007; Holder et al.<sup>13</sup>, 2013; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014).

Na Odontologia, a luz no comprimento de onda azul é utilizada para a irradiação de materiais fotoiniciados. Essa luz pode ser gerada por LASER, arco de plasma e LEDs (Attik et al.<sup>3</sup>, 2013; Michaud et al.<sup>18</sup>, 2014; Wataha et al.<sup>33</sup>, 2004). Os últimos são considerados de alta eficiência energética com baixa produção de calor (Weiss et al.<sup>34</sup>, 2005), além do seu baixo custo. No entanto, apesar de sua constante utilização, pouco se sabe sobre os efeitos da luz no comprimento de onda azul sobre o tecido pulpar. Desta forma, na busca pela otimização do atendimento odontológico, o emprego de uma fonte de luz que auxilie o reparo do tecido pulpar estimulando a deposição de matriz mineralizada e biomodulando a resposta inflamatória pode ser uma alternativa conveniente, considerando que a mesma já é utilizada para outros fins.

Desta forma, o presente estudo avaliou o efeito da irradiação direta com luz no comprimento de onda azul ( $455 \pm 10$  nm) sobre o metabolismo, proliferação e diferenciação de cultura primária de células da polpa humana, empregando doses de energia de  $2/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$ .

## **Material e Métodos**

### **Obtenção, manutenção e cultura de células da polpa dental**

Foram coletados pré-molares humanos hígidos (n=3) extraídos por razões ortodônticas, após aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa em Seres Humanos (CAAE 13072813.2.0000.5416 – Anexo 1) da Faculdade de Odontologia de Araraquara. As culturas primárias foram realizadas por meio da técnica de digestão enzimática (Gronthos et al.<sup>11</sup>, 2002) e as células sub-cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA) acrescido de 10%

de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, USA). Para o presente estudo foram utilizadas culturas entre a terceira e oitava passagem.

O efeito da luz azul foi determinado por meio de dois protocolos distintos para a semeadura das células. Para a avaliação de fatores associados à diferenciação celular, como produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, produção de nódulos mineralizados e colágeno, bem como ensaio da expressão gênica, as células foram semeadas em uma densidade de 30.000 cel/cm<sup>2</sup>, em placas de 24 compartimentos. A cultura foi mantida em meio de diferenciação osteogênica (5 mM de  $\beta$ -gliocerosfosfato, 100 mM de ácido ascórbico; Sigma/Aldrich, St. Louis MO, EUA) durante 14 dias, realizando-se trocas de meio a cada 72 horas. O procedimento irradiação foi realizado no 11º dia.

Para a avaliação da proliferação celular e morfologia, foi utilizada uma densidade de 10.000 cél/cm<sup>2</sup> em DMEM enriquecido com 10% de SFB. Após 12 horas, o meio de cultura foi substituído por um novo DMEM suplementado com 0,5% de SFB, para indução do estresse nutricional. A irradiação foi realizada 24 horas após a semeadura sendo as avaliações realizadas após 72 horas.

### **Procedimentos de Irradiação**

As doses de energia utilizadas foram de 2 J/cm<sup>2</sup> ou 4 J/cm<sup>2</sup>, em uma densidade de potência fixa de 20 mW/cm<sup>2</sup>, parâmetros físicos compatíveis com a fototerapia de baixa intensidade (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009), sendo os tempos de irradiação de 1 min e 40s e 3 min e 20 s. A irradiação foi realizada uma única vez utilizando um dispositivo denominado LEDTable (Montoro et al.<sup>20</sup>, 2014; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014), no qual há 24 diodos emissores de luz, com distância de 11 mm entre a base da placa de 24 compartimentos e os diodos. A luz emitida foi convergida pela presença de colimadores para que irradiasse toda a base de cada compartimento. No momento da exposição, o meio de cultura foi substituído por 1,0 mL de solução tamponada de PBS e após a irradiação as células foram mantidas em contato com novas alíquotas de DMEM.

Os testes foram realizados após 72 horas da exposição a luz azul. Para validar internamente o estudo foi utilizado um grupo controle, no qual as células foram

mantidas fora da incubadora, em PBS, pelo mesmo tempo necessário para a irradiação com  $4 \text{ J/cm}^2$  (3 min e 20s), porém sem exposição a luz azul.

### **Dosagem de proteína total e Atividade de fosfatase alcalina (ALP)**

A dosagem de proteína total foi realizada segundo Read, Northcote<sup>28</sup> (1981). Inicialmente, realizou-se lise celular adicionando-se um detergente (lauril sulfato de sódio 0,1%- Sigma – Aldrich, MO, EUA). Sequencialmente, inseriu-se 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Lowry, seguido da adição de 500  $\mu\text{L}$  de Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich, MO, EUA). Após 30 minutos, transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra para placa de 96 compartimentos e determinou-se o valor de absorvância a 655 nm. Os valores foram interpolados em uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de albumina bovina (mg/mL), normalizados pela média do grupo controle (=100%) e transformados em porcentagem do controle.

Após a lise celular realizada para a dosagem de proteína total, 50  $\mu\text{L}$  foram adicionados a tubos contendo 50  $\mu\text{L}$  de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500  $\mu\text{L}$  de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit) e incubados em banho maria por 2 minutos a 37°C. Após 10 minutos foram 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 das amostras foi lida a 590 nm, sendo os valores obtidos interpolados na curva padrão (U/L) realizada durante o experimento. Em seguida os valores foram normalizados pela média do grupo controle e calculados em porcentagem.

### **Formação de Nódulos de Mineralização**

O teste de vermelho de alizarina foi utilizado para a quantificação de matriz mineralizada. As amostras foram fixadas com etanol 70% por 1 hora, em seguida lavadas e adicionada solução de vermelho de alizarina (40 mM, pH 4,2) por 20 minutos sob agitação. Após lavagem, inseriu-se 1,0 mL de Cloreto de Cetilpiridinium 10% (Sigma – Aldrich, MO, EUA), seguido por agitação durante 15 minutos. Após, homogeneização foram transferidos 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA) e a absorvância determinada a

562 nm (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Vermont, EUA). Os valores obtidos proporcionais à absorbância foram normalizados pela média do grupo controle e transformados em percentual.

### **Ensaio da produção de colágeno (Sirius Red)**

O colágeno produzido foi dosado por meio do teste de Sirius Red (Saruwatari et al.<sup>29</sup>, 2005). Para tanto, foram coletados os extratos das amostras, os quais foram transferidos para tubos eppendorfs e armazenados a -20 °C. Após descongelamento em temperatura ambiente, 300 µL foram inseridos em novos tubos contendo 300 µL do corante Sirius Red (Direct Reagent), agitados (400 rpm) a 25°C por 1 hora, em banho seco. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, seguidos da adição de 500 µL de HCl 0,1M, permitindo a lavagem do *pellet* formado. Acrescentou-se 250 µL de NaOH 0,5M promovendo a dissolução do *pellet*, sendo as amostras vortexadas e aliqüotados 200 µL em placas de 96 poços para a leitura da absorbância em 555 nm. Os valores foram normalizados pela mediana do grupo controle e transformados em percentual.

### **Ensaio q PCR**

A expressão dos genes (n= 8 por gene) que codificam para fosfatase alcalina (ALPL), colágeno tipo I (COL1A1) e fator de transcrição OCT (OCT) foram avaliados por meio da técnica de qPCR. A extração do RNA foi realizada com trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as indicações do fabricante. A concentração de RNA foi determinada utilizando biofotômetro (RS – 232C, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) na concentração de 1:50, verificando-se os valores para a razão 260/280. Assim 1,0 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA, de cada amostra, utilizando-se o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As sequências e especificações para cada primer seguem na tabela abaixo (Tabela 1). As reações foram preparadas com reagentes padronizados para PCR em tempo real TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (β-actina, ALPL, OCT) e Syber Green Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (COL1A). Utilizou-se o equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) para a leitura das

fluorescências, seguido da detecção dos ciclos de amplificações as quais foram analisadas pelo Step One Software 2.1 (Applied Biosystems). Todas as reações foram realizadas de acordo com o proposto por Basso et al.<sup>4</sup> (2013). Os resultados para cada gene foram normalizados de acordo com a expressão do housekeeping selecionado ( $\beta$  Actina).

Tabela 1- Sequências dos *primers* utilizados para determinação da expressão gênica.

Gene	Sequência/ Taqman Assay
B-actina	Hs01060665_m1
ALPL	Hs01029144_m1
COL1a1	R: 5' TTTTGTATTCAATCACTGTCTTGCC 3' F: 5' CAGCCGCTTCACCTACAGC 3'
OCT	Hs04195369_s1

#### **Viabilidade Celular (Alamar Blue) e Número de células viáveis (Trypan Blue)**

A viabilidade celular foi determinada pelo teste colorimétrico de Alamar Blue, o qual avalia a atividade da cadeia transportadora de elétrons da respiração celular (Al-Nasiry et al.<sup>1</sup>, 2007). O meio de cultura foi aspirado e foi adicionada solução de Alamar Blue a 10%. As amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C (Al-Nasiry et al.<sup>1</sup>, 2007), e em seguida 200  $\mu$ L foram transferidos para placas de 96 compartimentos para a determinação da fluorescência (excitação: 485 nm/ emissão: 530 nm) (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Vermont, EUA). Os valores de fluorescência foram normalizados pela média do grupo controle, transformados em percentual e submetidos a análise estatística.

As mesmas amostras analisadas por Alamar Blue foram também submetidas ao teste de Trypan Blue para a determinação do número de células viáveis. As amostras foram analisadas em microscópio de luz invertida (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japão), para contagem do número de células totais e daquelas coradas em azul. O número de células viáveis foi obtido por meio da subtração desses dois dados e apresentado como  $n \times 10^4$  células por mililitro da

suspensão. Foi calculado o valor da mediana do grupo controle, sendo os dados dos grupos experimentais normalizados por este.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A morfologia das células foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura (n=3). As células foram semeadas em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) em placas de 24 compartimentos e submetidas aos mesmos procedimentos de cultura e irradiação realizados para o teste de viabilidade celular (Alamar Blue). O processamento dos espécimes foi realizado como descrito por Oliveira et al.<sup>23</sup> (2011). As amostras foram cobertas em ouro e avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (FEG-MEV; JEOL modelo 7500, Japão). Imagens foram obtidas em 100x de aumento para a análise da distribuição e morfologia celular.

### **Análise estatística**

Os dados referentes à produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e deposição de nódulos mineralizados apresentaram distribuição normal e homocedasticidade. A esses dados foram aplicados os testes estatísticos de ANOVA a um fator fixo (dose de energia), complementado por testes de Tukey para a comparação dos grupos aos pares. Os dados de produção de colágeno, por não apresentarem distribuição normal, foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Todas as inferências estatísticas foram baseadas no nível de significância de 5%, ou seja, grupos foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Produção de proteína total e atividade de fosfatase alcalina (ALP)**

A produção de proteína total (Tabela 2) foi aumentada para ambas as doses em relação ao controle não irradiado ( $p < 0,05$ ). Apesar do aumento numérico proporcionado pela dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos irradiados e o não irradiado (controle) quanto a atividade de fosfatase alcalina ( $p > 0,05$ ).

Tabela 2- Produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina, deposição de nódulos mineralizados e produção de colágeno por HDPC irradiadas com LED azul (455 nm), nas doses de 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup>.

Dose de Energia	Produto celular (% do controle)			
	Proteína total*	Fosfatase alcalina*	Nódulos mineralizados*	Colágeno**
Sem irradiação	100,0±13,8 <sup>b</sup>	98,3±35,1 <sup>a</sup>	100,1±14,1 <sup>b</sup>	100,0 (87,1-129,8) <sup>a</sup>
2 J/cm <sup>2</sup>	112,2±11,1 <sup>a</sup>	89,3±39,9 <sup>a</sup>	118,6±22,9 <sup>ab</sup>	107,1 (86,6-125,6) <sup>a</sup>
4 J/cm <sup>2</sup>	111,0±10,4 <sup>a</sup>	111,4±45,0 <sup>a</sup>	121,0±20,2 <sup>a</sup>	91,6 (86,0-122,1) <sup>a</sup>

Valores estão apresentados como porcentagem do controle (=100%) e representam a \*média±desvio-padrão, ou \*\*mediana (percentil 25-percentil 75), n=12. <sup>a</sup> Para cada coluna, grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (\*Tukey, \*\*Mann-Whitney, p>0,05).

### Formação de Nódulos de Mineralização

A deposição de matriz dentinária pelas células HDPC, com posterior mineralização, foi estimulada pela irradiação LED na dose de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> quando comparado ao grupo não irradiado (p<0,05). Entretanto, a maior dose de energia não diferiu em relação a dose de 2 J/cm<sup>2</sup>, enquanto esta foi comparável ao controle (p>0,05) (Tabela 2).

### Produção de colágeno total (Sirius Red)

A produção de colágeno pela cultura de células pulpares não foi afetada pela luz azul (Tabela 2), uma vez que não foram reveladas diferenças estatísticas entre os grupos irradiados, nas distintas doses de energia, e o grupo não irradiado (controle) (p>0,05).

### Ensaio q PCR

A luz azul não exerceu efeitos sobre a expressão do gene que codifica para ALPL (Tabela 3), em comparação ao grupo controle (p>0,05). No entanto, a expressão de COL1A1 foi reduzida após exposição a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> em relação ao

grupo não irradiado ( $p < 0,05$ ). A expressão para OCT4, marcador de células indiferenciadas, demonstrou que a dose de  $2 \text{ J/cm}^2$  foi capaz de aumentar a taxa de células com fenótipo mesenquimal ( $p < 0,05$ ), enquanto nenhum efeito foi visto para a dose de  $4 \text{ J/cm}^2$  ( $p > 0,05$ ).

### Viabilidade e número de células viáveis

A viabilidade celular (Tabela 4) não foi alterada pela exposição à luz azul, não havendo diferenças entre os grupos irradiados e o não irradiado ( $p > 0,05$ ). O mesmo foi observado para a contagem do número de células viáveis.

Tabela 3- Expressão de genes que codificam para fosfatase alcalina (ALPL), colágeno (COL1A1) e fator de transcrição OCT (OCT) em células HDPC após irradiação com LED azul (455 nm).

Irradiação LED	Expressão gênica		
	ALPL	COL1A1	OCT4
0 (controle)	$100,0 \pm 27,8^a$	$100,0 \pm 31,3^b$	$100,0 \pm 21,6^b$
$2 \text{ J/cm}^2$	$101,5 \pm 14,0^a$	$181,6 \pm 74,9^a$	$134,8 \pm 18,0^a$
$4 \text{ J/cm}^2$	$87,7 \pm 37,3^a$	$93,9 \pm 32,4^b$	$85,9 \pm 32,0^b$

\* Números são média±desvio-padrão,  $n=8$ . <sup>a</sup> Para cada gene (coluna), grupos identificados pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey,  $p > 0,05$ ).

Tabela 4- Viabilidade celular e número de células HDPC após irradiação com LED azul (455 nm), nas doses de  $2 \text{ J/cm}^2$  e  $4 \text{ J/cm}^2$ .

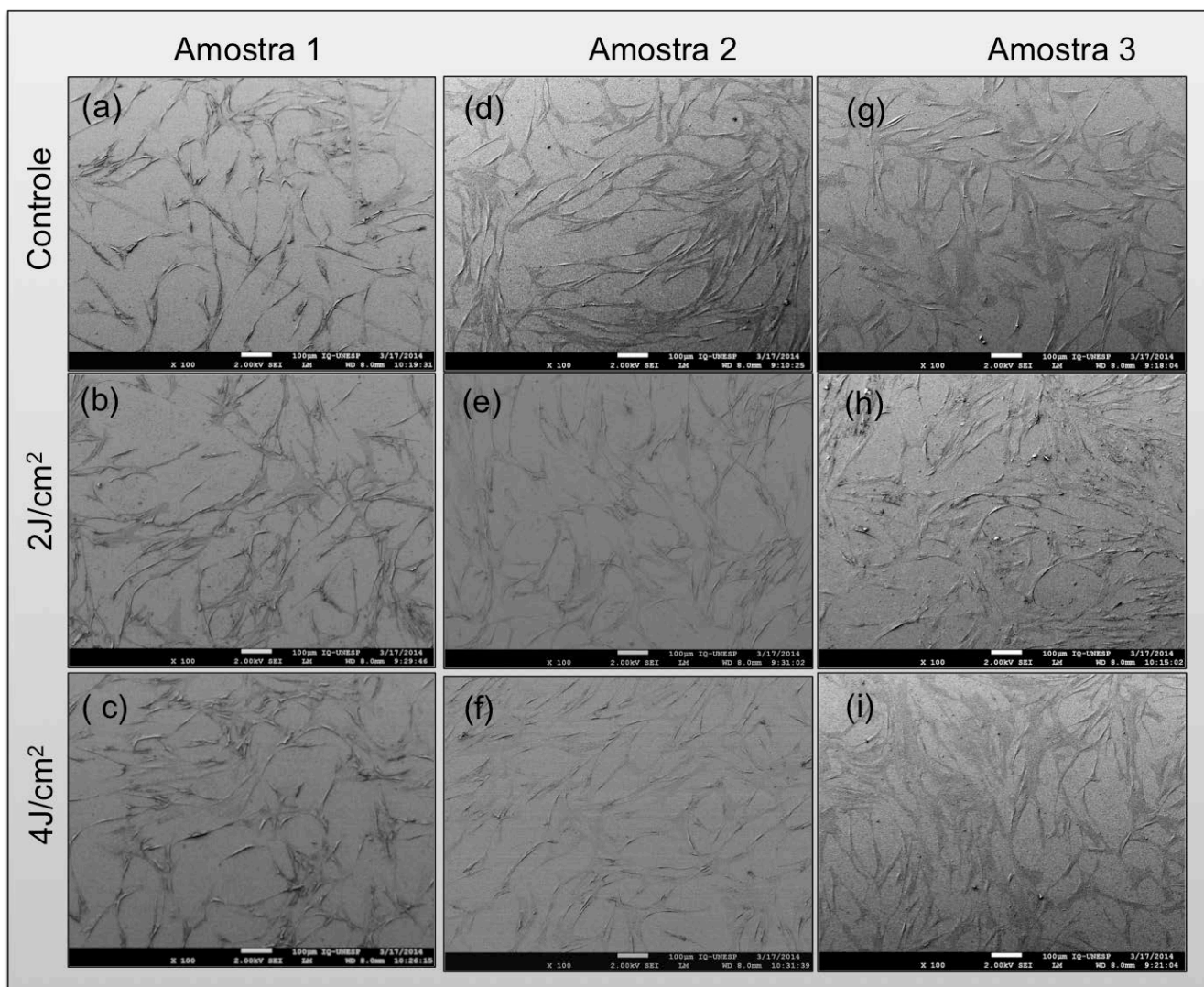
Dose de Energia	Viabilidade celular	Número de células
Sem irradiação	$101,9 (96,1-109,7)^a$	$100,0 (93,4-122,9)^a$
$2 \text{ J/cm}^2$	$105,3 (102,0-115,2)^a$	$93,9 (76,8-133,5)^a$
$4 \text{ J/cm}^2$	$95,5 (88,0-103,1)^a$	$82,1 (74,3-95,5)^a$

\*Valores estão apresentados como porcentagem do controle (=100%) e representam a mediana (percentil 25-percentil 75),  $n=12$  para viabilidade e  $n=11$  para número de células. <sup>a</sup> Para cada coluna, grupos identificados por letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

A análise em MEV demonstrou que as células do grupo controle apresentaram morfologia fusiforme e projeções citoplasmáticas responsáveis por sua aderência à superfície. Nenhuma diferença muito significativa foi observada entre as células irradiadas, independente da dose de energia, e as não irradiadas. Entretanto, para os grupos submetidos a irradiação pela luz azul, algumas células apresentam citoplasma contraído, embora estivessem aderidas ao substrato (Figura 1).

Figura 1- Fotomicrografias em MEV de culturas primárias pulpares humanas submetidas a irradiação com LED azul. (a), (d) e (g) são células não irradiadas, de acordo com cada amostra representada isoladamente; (b), (e) e (h) são células irradiadas com  $2\text{J}/\text{cm}^2$ , de acordo com cada amostra representada isoladamente; (c), (f) e (i) são células irradiadas com  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , de acordo com cada amostra representada isoladamente. Observa-se que as culturas recobrem a superfície de vidro, apresentando citoplasmas bem definido, com características morfológicas normais. Em algumas amostras observam-se células com citoplasma retraído. Aumento: x100.



## Discussão

A fototerapia de baixa intensidade baseia-se na interação de uma fonte de luz, emitida em doses de energia de poucos Joules por segundo, com tecidos e células que os compõem (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009). Comumente não está associada a efeitos fototérmicos (Migliorati et al.<sup>19</sup>, 2013), exercendo efeitos biológicos principalmente via proliferação celular (Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014; Holder et al.<sup>13</sup>, 2012). Entretanto, apesar da fototerapia de baixa intensidade já ser aplicada clinicamente, não existem protocolos bem definidos para sua utilização, especialmente quanto aos parâmetros físicos de dosimetria. A variabilidade dos parâmetros físicos responde pela diversidade dos resultados observados (Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014; Peplow et al.<sup>25</sup>, 2010).

A grande maioria dos estudos sobre fototerapia de baixa intensidade utilizam a luz em comprimentos de onda entre 600 e 800 nm, correspondentes a cor vermelha e ao infravermelho. Esses comprimentos de onda tem sido investigados quanto a sua capacidade de fotobioestimular culturas de células odontoblastóides ou isoladas de polpa dental (Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Oliveira et al.<sup>22</sup>, 2010; Oliveira et al.<sup>23</sup>, 2011; Pereira et al.<sup>26</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014). Entretanto, pouco se sabe a cerca dos efeitos da luz azul (Lewis et al.<sup>17</sup>, 2005; Wataha et al.<sup>33</sup>, 2005), a qual é extensivamente utilizada na clínica para fins restauradores (Attik et al.<sup>3</sup>, 2013). Assim o presente estudo avaliou os efeitos da luz azul, emitida por LEDs, sobre cultura primária de polpa dental humana. As doses de energia de 2 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> foram selecionadas por serem consideradas por alguns autores como as melhores doses terapêuticas (Hirata et al.<sup>12</sup>, 2010; Pereira et al.<sup>26</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014).

Culturas expostas a dose de 2 J/cm<sup>2</sup> foram fotoestimuladas a aumentar a produção de proteína total, não sendo verificado o mesmo efeito para a dose de 4 J/cm<sup>2</sup>. Entretanto, dentre essas proteínas, a produção de colágeno e a atividade de fosfatase alcalina não foram afetadas pela exposição das células pulpares ao LED azul, em ambas as doses. O colágeno tipo I representa 90% do conteúdo orgânico da dentina (Goldberg, Smith,<sup>10</sup>2004; Tjardehane, Haapasalo,<sup>31</sup> 2012) e a frente de mineralização é dependente da atividade da fosfatase alcalina (Tjardehane,

Haapasalo,<sup>31</sup> 2012). Portanto, para que ocorra o reparo do tecido pulpar, é imprescindível que essas proteínas sejam produzidas, e seria importante que a fototerapia fosse capaz de fotoestimular essa produção.

As análises referentes à produção de colágeno e atividade de fosfatase alcalina foram realizadas após 14 dias da cultura celular. Isso pode ter mascarado possíveis efeitos na produção destas proteínas, visto que comumente em ensaios de cultura celular de polpa humana, o pico de produção de ambas as proteínas são visualizados entre 7 e 14 dias (Patel et al.<sup>24</sup>, 2010; Teti et al.<sup>30</sup>, 2013). No presente estudo, o período de 14 dias foi selecionado na tentativa de padronizar o tempo em cultura em meio osteogênico, de modo a permitir melhores comparações entre os resultados.

Verificou-se que a dose de 4 J/cm<sup>2</sup> aumentou a produção de nódulos mineralizados em 21% em comparação ao controle, demonstrando que, apesar da aparente falta de estímulo quanto a produção de colágeno e de fosfatase alcalina, a luz exerceu efeitos positivos na indução da diferenciação celular e deposição de matriz dentinária. A presença de fatores de crescimento adicionados ao meio de cultura potencializa seu efeito indutor de diferenciação celular. Este procedimento se faz necessário uma vez que a fototerapia atua como coadjuvante na diferenciação celular, sendo necessária a presença de moléculas que permitam esse evento. Este mesmo procedimento metodológico foi utilizado em outros estudos (Hirata et al.<sup>12</sup>, 2010; Holder et al.<sup>13</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014).

Tem sido relatado que a fototerapia atua de forma adicional à presença de BMP-2 quando células C2C12 foram expostas ao laser infra-vermelho (805 nm) (Hirata et al.<sup>12</sup>, 2010). Nesse estudo, os autores observaram que a diferenciação celular foi aumentada no grupo exposto a luz na presença do fator de crescimento. De forma semelhante, Turrioni et al.<sup>32</sup> (2014) observaram aumento na produção de colágeno e fosfatase alcalina por células pulpares de dentes decíduos, expostas ao LED infra-vermelho (850 nm).

A regulação da expressão de genes que participam do processo de deposição e maturação dentinária tem sido investigada em culturas de células

odontoblastóides imortalizadas e pulpar humana expostas a fototerapia (Oliveira et al.<sup>22</sup>, 2010; Oliveira et al.<sup>23</sup>, 2011; Turrioni et al.<sup>32</sup>, 2014;). Entretanto, a exposição a luz azul não foi capaz de aumentar a expressão do gene ALPL, enquanto que a dose de 2 J/cm<sup>2</sup> aumentou a expressão dos genes COL1A1 e OCT4, em relação aos demais grupos. Entretanto, é importante lembrar que a expressão gênica isoladamente não está diretamente relacionada à síntese da proteína. Essa síntese do colágeno foi investigada pelo ensaio de Sirius Red, no qual foi observado que a irradiação com LED azul foi incapaz de aumentar a síntese de colágeno, independente da dose de energia entregue as células.

Os efeitos da fototerapia são dependentes do tipo celular avaliado (Wataha et al.<sup>33</sup>, 2004), além dos parâmetros físicos da luz (Huang et al.<sup>14</sup>, 2009). No presente estudo foi utilizada cultura primária extraída de polpa humana de dentes permanentes. Outros estudos avaliaram os efeitos da exposição a luz sobre linhagens de fibroblastos, queratinócitos ou pré-condrócitos, e os resultados variaram entre efeitos deletérios até efeitos indutores de diferenciação ou do aumento da proliferação celular (Lewis et al.<sup>17</sup>, 2005; Kushibiki et al.<sup>16</sup>, 2010; Wataha et al.<sup>33</sup>, 2004). Além disto, uma gama de parâmetros físicos de exposição a luz são utilizadas, dificultando a comparação entre os resultados, de forma a tornar a prática clínica da terapia controversa.

Os efeitos da fototerapia com LED azul sobre a proliferação celular foram avaliados pelos teste de alamar blue e trypan blue. Foi observado que a luz azul não exerceu efeitos sobre a viabilidade das células pulpares em cultura. De forma geral, a luz exerce efeitos na cadeia transportadora de elétrons aumentando a concentração de ATP (Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014; Huang et al.<sup>14</sup>, 2009;) e ativando fatores mitogênicos como MAP (Carroll et al.<sup>5</sup>, 2014) os quais tem papel fundamental na proliferação celular. Entretanto, este resultado não foi observado no presente estudo. Tem sido sugerido que a luz no comprimento de onda do azul é capaz de excitar alvos como flavoproteínas presentes na cadeia de transporte de elétrons (Lewis et al.<sup>17</sup>, 2005). Entretanto, esse efeito ainda não foi demonstrado cientificamente, dificultando o estabelecimento de uma correlação com o aumento da proliferação celular.

Além disto, apenas para os testes de viabilidade celular foi reproduzida a carência nutricional por meio da redução da concentração de soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura basal. Tem sido sugerido que a resposta da cultura celular, especialmente por meio de aumento da proliferação, à fotobioestimulação é melhor observada quando as células são submetidas a carência nutricional (Peplow et al.<sup>25</sup>, 2010). Entretanto apesar desse tipo de estresse celular ter sido induzido no presente estudo, não foram observados resultados positivos quanto à proliferação celular, corroborando com os achados de Pereira et al.<sup>26</sup>(2012).

A análise da morfologia celular em MEV demonstrou que nos grupos irradiados algumas células apresentaram contrações citoplasmáticas em relação ao grupo controle. Entretanto, todas as amostras exibiam morfologia alongada, bem delimitada, com aspecto de fibroblastos. Além disto, as células estavam aderidas ao substrato, não sendo visualizados quaisquer sinais de ruptura de membrana ou morte celular. Assim, diante das análises efetuadas destaca-se que a luz azul não exerceu efeitos deletérios sobre a cultura primária pulpar avaliada, estando em acordo com os testes de viabilidade também realizados.

A definição de parâmetros físicos capazes de maximizar os efeitos bioestimulatórios da terapia de baixa intensidade é fundamental para respaldar a aplicação clínica dessa modalidade terapêutica. Quanto ao processo de reparo do tecido pulpar, é importante que a fototerapia estimule a diferenciação e proliferação celular e a síntese de proteínas relacionadas à deposição e mineralização da matriz dentinária. Uma vez que, nos parâmetros definidos no presente estudo, apenas mínimos efeitos foram observados, novos estudos devem ser realizados com esse objetivo, incluindo a interposição da dentina entre a fonte de luz e as células pulpares já que esse tecido apresenta influência na transferência e espalhamento da luz (Kienle et al.<sup>15</sup>, 2006).

## **Conclusão**

A luz azul (455 nm) emitida por LEDs em uma dose energia de 4 J/cm<sup>2</sup> foi capaz de fotobioestimular a deposição de matriz dentinária por células pulpares

humanas, enquanto em metade dessa dose foi capaz apenas de modular a produção de proteína total.

## Referências\*

1. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007; 22(5): 1304-9.
2. Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- $\beta$ 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med.* 2014 28;6(238):238- 69.
3. Attik GN, Pradelle-Plasse N, Campos D, Colon P, Grosogeat B. Toxicity evaluation of two dental composites: three-dimensional confocal laser scanning microscopy time-lapse imaging of cell behavior. *Microsc Microanal.* 2013; 19(3): 596-607.
4. Basso FG, Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of zoledronic acid on odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(5): 467-73.
5. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014; 30(5) :465-75.
6. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *J Endod.* 2014; 40(4 Suppl):S6-12.
7. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014; 40 Suppl:S46-51.
8. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011; 23(3) :333-9.

---

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

9. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Núñez SC, Ribeiro MS. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(9): 899-903.
10. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(1): 13-27.
11. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher L W, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002, 81(8): 531-5
12. Hirata S, Kitamura C, Fukushima H, Nakamichi I, Abiko Y, Terashita M et al. Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2010; 111 (6): 1445-52.
13. Holder MJ, Milward MR, Palin WM , Hadis MA, Cooper PR. Effects of red Light-emitting Diode Irradiation on Dental Pulp cells. *J Dent Res.* 2012; 91(10): 961-6.
14. Huang YY , Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response.* 2009; 7(4): 358–83.
15. Kienle A, Michels R, Hibst R. Magnification--a new look at a long-known optical property of dentin. *J Dent Res.* 2006; 85(10): 955-9.
16. Kushibiki T, Tajiri T, Ninomiya Y, Awazu K. Chondrogenic mRNA expression in prechondrogenic cells after blue laser irradiation. *J Photochem Photobiol B.* 2010; 98 (3) :211-5.
17. 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(2): 223-9.
18. Michaud PL, Price RB, Labrie D, Rueggeberg FA, Sullivan B. Localised irradiance distribution found in dental light curing units. *J Dent.* 2014; 42(2): 129-39.
19. Migliorati C, Hewson I, Lalla RV, Antunes HS, Estilo CL, Hodgson B et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013; 21(1): 333-41.

20. Montoro LA, Turrioni AP, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J. Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2014; 47(8):747-55.
21. Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent*. 2006; 31(6):633-42.
22. Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS et al. Increased viability of odontoblast-like cells subjected to low-level laser irradiation. *Laser Phys*. 2010; 20(7):1659-66.
23. 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.
24. Patel M, Smith AJ, Sloan AJ, Smith G, Cooper PR. Phenotype and behaviour of dental pulp cells during expansion culture. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(10) :898-908.
25. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of proliferation of cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2010;28(Suppl. 1):S3–40.
26. Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(8): 1079-85.
27. Piva E, Silva AF, Nör JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod*. 2014; 40(4 Suppl):S33-40.
28. 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(1):53-64.
29. Saruwatari L, Aita H, Butz F, Nakamura HK, Ouyang J, Yang Y et al. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(11): 2002-16.
30. Teti G, Salvatore V, Ruggeri A, Manzoli L, Gesi M, Orsini G, Falconi M. In vitro reparative dentin: a biochemical and morphological study. *Eur J Histochem*. 2013; 57(3):e23.

31. Tjäderhane L, Haapasalo M. The dentin–pulp border: a dynamic interface between hard and soft tissues. *Endodontic Topics*. 2012; 20(1): 52-84.
32. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida Lde F, Costa CA, Hebling J. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent*. 2014; 42(10): 1292-9.
33. Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater*. 2004; 20(2): 150-7.
34. 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(9 Pt 2): 1199-205

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fototerapia de baixa intensidade tem sido investigada *in vitro* e *in vivo* (Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Oliveira et al.<sup>25</sup>, 2011; Turrioni et al.<sup>34</sup>, 2014; Villa et al.<sup>35</sup>, 2007) para a determinação de seus efeitos em eventos teciduais e celulares, como reparo, angiogênese e analgesia (Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Posten et al.<sup>30</sup>, 2005). Entretanto, apesar dos resultados promissores, a falta de padronização dos parâmetros físicos limita sua aplicação clínica. Sabe-se ainda que os efeitos produzidos pelo fotoestímulo são coadjuvantes (AlGhamdi et al.<sup>1</sup>, 2012), de tal forma que comumente estão associados ao uso de medicamentos ou materiais também capazes de promover efeitos positivos sobre os tecidos.

Até o momento, pouco se conhece a respeito dos efeitos da luz, emitida por LASERs ou LEDs, sobre o tecido pulpar (Holder et al.<sup>20</sup>, 2012; Turrioni et al.<sup>34</sup>, 2014). Desta forma, o presente estudo avaliou os efeitos das luzes azul (455 nm) e vermelha (640 nm) emitida por LEDs sobre culturas de células pulpares, de distintas origens. Estes estudos objetivaram definir parâmetros físicos para a LEDterapia vislumbrando uma possível aplicação clínica durante a realização do procedimento restaurador, na tentativa de promover proliferação e diferenciação celular, permitindo reparo do tecido pulpar.

Múltiplas irradiações da luz vermelha sobre a cultura imortalizada de células MDPC-23 não são recomendadas com base nos resultados da Publicação 1. Além disto, verificou-se que uma menor densidade de potência (20 mW/cm<sup>2</sup>) foi mais efetiva em promover estímulo a cultura celular.

De forma equivalente, na Publicação 2 foi investigado o efeito fotoestimulador da luz azul (455 nm) emitida pelos LEDs sobre a mesma linhagem celular. Uma única irradiação foi realizada, sendo a dose de potência fixa em  $20 \text{ mW/cm}^2$ , com variação de dosimetria. A luz azul não exerceu efeitos positivos quanto a proliferação de células MDPC-23. Contudo, a fototerapia de baixa intensidade não apresenta efeito linear (AlGhamdi et al.<sup>1</sup>, 2012) e é dependente do tipo celular e dos cromóforos celulares estimulados por cada comprimento de onda da luz (Carroll et al.<sup>6</sup>, 2014; Huang et al.<sup>21</sup>, 2009; Holder et al.<sup>20</sup>, 2012).

Ainda empregando-se cultura de células MDPC-23, o efeito da fototerapia com LEDs em um modelo transdentinário foi investigado na Publicação 3. Esta etapa permitiu mimetizar os possíveis efeitos da LEDterapia quando aplicada na presença de barreira dentinária. Entretanto, novamente não foram observados efeitos relevantes quando as células foram irradiadas com o LED azul, via barreira dentinária. Efeitos positivos quanto a proliferação celular foram encontrados para a dose de  $4 \text{ J/cm}^2$  emitida pela luz vermelha.

Na quarta e última Publicação, a produção de ALP não foi fotoestimulada pela irradiação da cultura com LED azul. Adicionalmente, os efeitos da luz azul sobre a proliferação e diferenciação de cultura primária de células da polpa humana foram determinados, considerando dois modelos para semeadura e manutenção celular de acordo com cada desfecho estudado. Foi observado que a dose de  $4 \text{ J/cm}^2$  exerceu um melhor efeito em comparação a dose menor, a qual não foi capaz de fotoestimular a cultura primária de células pulpares.

Assim, diante dos dados obtidos pela presente investigação foi possível concluir que a luz no comprimento de onda vermelho emitida por LEDs, pode ser

considerada benéfica em relação a proliferação celular. Como esperado, os parâmetros físicos devem ser determinados individualmente para cada comprimento de luz para que seja possível maximizar seu potencial fotoestimulador. Do ponto de vista clínico, seria importante, se possível, definir um conjunto de parâmetros capaz de fotoestimular tanto os odontoblastos primários como as células mesenquimais indiferenciadas para que se diferenciem em novos odontoblastos. Como isso ainda não foi validado cientificamente, cada situação clínica deve ser analisada individualmente quanto à célula alvo da fototerapia. Em exposições pulpares, por exemplo, células mesenquimais indiferenciadas seriam o alvo de eleição, enquanto que em preparos cavitários com presença de dentina recobrando o tecido pulpar as células alvo seriam os odontoblastos primários.

Devido a escassez de dados a cerca dos efeitos da fototerapia de baixa intensidade sobre o tecido pulpar, sugere-se que outros estudos sejam realizados a para o estreitamento desta lacuna, de modo que a fototerapia possa ser seguramente recomendada para uso clínico.

**REFERÊNCIAS\***

1. Al-Ghamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci.* 2011; 27(1): 237–49.
2. Amat A, Rigau J, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ. J. The electric field induced by light can explain cellular response to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. *J Photochem Photobiol B.* 2006; 82 (2):152–60.
3. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33(4):183-4.
4. Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(8): 1367-73.
5. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2):367-74.
6. Carroll JD, Milward MR, Cooper PR, Hadis M, Palin WM. Developments in low level light therapy (LLLT) for dentistry. *Dent Mater.* 2014; 30(5) :465-75.
7. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *JDR.* 2010; 38(9): 687-97.
8. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014; 40 Suppl:S46 51.
9. Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013 ;92(9):765-72.
10. Demarco FF, Conde MCM, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nör JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J.* 2011; 22(1): 3-14.

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

11. 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(2): 121–8.
12. Dungal P, Hartinger J, Chaudary S, Slezak P, Hofmann A, Hausner T et al. Low level light therapy by LED of different wavelength induces angiogenesis and improves ischemic wound healing. *Lasers Surg Med.* 2014; 46(10): 773-80.
13. Emami N, Söderholm KJ. How light irradiance and curing time affect monomer conversion in light-cured resin composites. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(6): 536-42.
14. Emelyanov AN, Kiryanova VV. Photomodulation of proliferation and differentiation of stem cells by the visible and infrared light. *Photomed Laser Surg.* 2015; 33 (3): 164-74.
15. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 2011; 23(3): 333-9.
16. Godoy BM, Arana-Chavez VE, Núñez SC, Ribeiro MS. Effects of low-power red laser on dentine-pulp interface after cavity preparation. An ultrastructural study. *Arch Oral Biol.* 2007;52(9) :899-903.
17. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(1): 13-27.
18. Gritsch K, Ponsonne L, Schembri C, Farge P, Pourreyron L, Grosogeat B. Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. *Mater Sci and Eng C.* 2008 28(5-6): 805–10.
19. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE.* 2006, 6140, 614001.
20. Holder MJ, Milward MR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res.* 2012; 91 (10): 961-6.
21. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response.* 2009; 7(4): 358–83.

22. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23(4): 355-61.
23. 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(2): 223-9.
24. 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 Physics.* 2010; 20(7): 1659–66.
25. 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(2): 155-63.
26. Peng F, Wu H, Zheng Y, Xu X, Yu J. The effect of noncoherent red light irradiation on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27 (3) :645-53.
27. Peplow PV, Chung TY, Ryan B, Baxter GD. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(5): 285-304.
28. Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8) :1079-85.
29. Piva E, Silva AF, Nör JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod.* 2014; 40(4 Suppl): S33-40.
30. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31(3) :334-40.
31. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237(11):1241-8.
32. Rueggeberg FA. State-of-the-art: dental photocuring--a review. *Dent Mater.* 2011; 27(1):39-52.

33. Tjäderhane L, Haapasalo M. The dentin–pulp border: a dynamic interface between hard and soft tissues. *Endod Topics*. 2012; 20, 52–84.
34. Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida Lde F, Costa CA, Hebling J. Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-exfoliated deciduous teeth. *J Dent*. 2014; 42(10): 1292-9.
35. Villa GEP, Catirse ABCEB, Lia RCC, Lizarelli RFZ. In vivo analysis of low-power laser effects irradiation at stimulation of reactive dentine. *Laser Phys Lett* 2007; 4(9): 690–5.
36. Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB, Rueggeberg FA, Messer RL. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater*. 2004; 20(2): 150-7.
37. Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19(6): 305-14.

## ANEXO

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA - UNESP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** FOTOTERAPIA COM LED AZUL SOBRE CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES E CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTAL. EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO REPARO DO TECIDO PULPAR

**Pesquisador:** JOSIMERI HEBLING COSTA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13072813.2.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 252.807

**Data da Relatoria:** 23/04/2013

**Apresentação do Projeto:**

O Projeto de Pesquisa foi apresentado de forma completa, com todo o delineamento da pesquisa, demonstrando a relevância do mesmo para a área odontológica.

**Objetivo da Pesquisa:**

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito direto e transdentinário do LED azul, com comprimento de onda de 455 nm, sobre células odontoblastóides (MDPC-23) e tronco extraídas da polpa dentária, quanto à produção de proteínas relacionadas ao reparo deste tecido.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o pesquisador responsável, não existe riscos previsíveis para o participante do estudo, pois os dentes utilizados serão doados após extração por indicação ortodôntica.

Quanto aos benefícios, os pesquisadores esperam obter dados consistentes que elucidem dúvidas sobre a fotobioestimulação celular, especificamente em relação ao efeito da luz azul sobre o metabolismo celular.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O Pesquisador apresentou embasamento científico adequado, demonstração da relevância e justificativa para a realização do estudo. A metodologia do trabalho foi detalhadamente descrita.

**Endereço:** HUMAITA 1680

**Bairro:** CENTRO

**CEP:** 14.801-903

**UF:** SP

**Município:** ARARAQUARA

**Telefone:** 1633-0164

**Fax:** 1633-0164

**E-mail:** cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
ARARAQUARA - UNESP



**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram incluídos e os ajustes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sugeridos foram realizados.

**Recomendações:**

Nada a declarar.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O estudo demonstra relevância científica e clínica, sendo um tema atual e com contribuição para a área Odontológica. Os ajustes recomendados foram realizados, não havendo pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

APROVADO em sessão de 23 de abril de 2013.

ARARAQUARA, 23 de Abril de 2013

---

Assinador por:  
Maurício Meirelles Nagle  
(Coordenador)

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 04/12/2017

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 4 de dezembro de 2015

LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE ALMEIDA