



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



JÉSSICA FERNANDA SENA BONVICINI

**EFEITO DO LED VERMELHO SOBRE O
NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS,
MORFOLOGIA E MODULAÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)
POR CÉLULAS PULPARES DE DENTES
DECÍDUOS**

UBERLÂNDIA

2018

JÉSSICA FERNANDA SENA BONVICINI

**EFEITO DO LED VERMELHO SOBRE O
NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS,
MORFOLOGIA E MODULAÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)
POR CÉLULAS PULPARES DE DENTES
DECÍDUOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da UFU, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Paula Turrioni

UBERLÂNDIA

2018



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Jéssica Fernanda Sena Bonvicini** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **09 de novembro de 2018**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Jéssica Fernanda Sena Bonvicini**, COM O TÍTULO: **“EFEITO DO LED VERMELHO SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS, MORFOLOGIA E MODULAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) POR CÉLULAS PULPARES DE DENTES DECÍDUOS”**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

Uberlândia, 09 de novembro de 2018.

Prof.ª, Dr.ª, Ana Paula Turroni Hidalgo
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Prof.ª, Dr.ª, Andréa Gomes de Oliveira
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Prof.ª, Dr.ª, Juliana Pereira da Silva Faquim
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Andomar Bruno Fernandes Vilela
 Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU

Aprovado/Reprovado

AGRADECIMENTOS

“Redimida por seu grande favor, minha alma louva a Deus, que pela luz da Palavra sinto que me conduziu com sincero amor, virtude e saber. Amo ao Senhor pois ouvi-me quando clamei, Ele inclinou seus ouvidos quando orei. Tive tristeza e aflição, mas Cristo me consolou.”

Aos meus pais, pelo incentivo, amor e respeito, que mesmo diante dos obstáculos, se esforçaram para que eu nunca desistisse.

Ao meu noivo por todo o amor e carinho, apoio incondicional nos momentos bons e ruins, que me inspirou com gestos e palavras para superar todas as dificuldades.

A minha querida e amável orientadora Prof^a Ana Paula Turrioni, pelo suporte em tudo que lhe coube, que acreditou no meu potencial e nunca negou uma palavra de incentivo. Mesmo diante das minhas limitações, sempre compartilhou seus conhecimentos e me serviu de exemplo para que eu me esforçasse sempre mais. Sou imensamente grata pela paciência.

A professora e coordenadora de curso Prof^a Alessandra Castro, que acompanhou a minha jornada acadêmica de perto, por no momento mais sombrio da minha vida, ter estendido a sua compaixão e ternura. Serei eternamente grata por seu otimismo e conforto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig Universal: APQ 00315-16) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (Bolsa PIBIC/CNPq/UFU IC: 2016-SAU045) pelo financiamento deste estudo.

SUMÁRIO

Resumo.....	07
Abstract.....	08
Introdução.....	09
Materiais e Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discussão.....	22
Conclusão.....	24
Referências bibliográficas.....	24
Anexos.....	28

EFEITO DO LED VERMELHO SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS, MORFOLOGIA E MODULAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) POR CÉLULAS PULPARES DE DENTES DECÍDUOS

EFFECT OF RED LED ON CELL NUMBER, MORPHOLOGY AND MODULATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) BY PULP CELLS FROM DECIDUOUS TEETH

Jéssica BONVICINI¹, Fernanda BASSO², Carlos Alberto de Souza COSTA³, Carlos José SOARES⁴, Ana Paula TURRIONI⁵

1 - Graduanda em Odontologia, Departamento de Odontologia Pediátrica, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

2 – Professor Assistente do Departamento de Patologia, Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

3 - Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista – UNESP.

4 - Professor Associado do Departamento de Dentística e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia. – UFU.

5 - Professor Adjunta do Departamento de Odontologia Pediátrica, Faculdade de Odontologia de Uberlândia, Universidade Federal de Uberlândia – UFU

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Prof^a. Dra. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Departamento de Odontologia Pediátrica

Faculdade de Odontologia de Uberlândia – UFU.

Av. Pará 1720, Umuarama. CEP: 38400902, Uberlândia, MG, Brasil

Tel: +55-16-3301-6478

E-mail: apturrioni@ufu.br

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito de diferentes parâmetros do LED vermelho sobre o número de células viáveis, metabolismo celular, morfologia e modulação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (ON) por células pulpares de dentes decíduos.

Material e método: células pulpares de dentes decíduos foram obtidas de 2 dentes hígidos esfoliados e cultivadas em placas de acrílico de 24 compartimentos (1×10^5 células/compartimento) utilizando DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24 horas, foi realizada a indução da produção de mediadores inflamatórios pela aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) de *E.Coli*, na concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ de meio de cultura. Logo após a aplicação do LPS as células foram irradiadas uma única vez (630 nm , 40 mW/cm^2 e 80 mW/cm^2) nas doses de 4 J/cm^2 , 15 J/cm^2 e 30 J/cm^2 . Foram realizadas as análises de viabilidade celular (MTT), número de células viáveis (azul de Tripano), morfologia celular (MEV) bem como a quantificação de ON (reagente de Griess) e de espécies reativas de oxigênio (EROs) utilizando uma sonda de fluorescência (DCFH-DA). Todas as avaliações foram realizadas 24 horas após a irradiação. Os testes estatísticos foram Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com inferências estatísticas baseadas no nível de significância de 5%.

Resultado: Na presença de LPS, as doses de 15 e 30 J/cm^2 (40 mW/cm^2) e 4 e 15 J/cm^2 (80 mW/cm^2) apresentaram maior viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (não irradiado) ($p < 0,05$). Para o número de células viáveis, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Pôde-se observar células pulpares de aspecto normal, com formato fusiforme, recobrando a lamínula de vidro na MEV. Na presença de LPS, os parâmetros irradiados com 40 mW/cm^2 apresentaram os menores valores de ON, com diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros de irradiação e o grupo controle (com LPS) ($p < 0,05$). Todas as doses foram capazes de modular a concentração de EROs, com exceção da dose de 4 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 , que não apresentou diferença estatística quando comparada com o grupo controle positivo ($p > 0,05$). As imagens geradas após a utilização da sonda para detecção de EROs confirmam os achados quantitativos.

Conclusão: As densidades de energia de 15 e 30 J/cm^2 e irradiância de 80 mW/cm^2 foram os parâmetros de irradiação mais efetivos para modular o estresse oxidativo nas células pulpares de dentes decíduos, sem causar danos ao metabolismo e morfologia celular.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiomodulação, polpa dentária, técnicas de cultura celular, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effect of different red LED parameters on the number of viable cells, cellular metabolism, morphology and modulation of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) by cells from deciduous teeth.

Material and method: Cells from 2 sound exfoliated teeth were cultured in 24-chamber acrylic plates (10^5 cells/compartment) in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). After 24 hours, the induction of the production of mediators was carried out, using LPS in the concentration of $10\mu\text{g/ml}$ of culture medium. Soon after LPS application, the cells were irradiated once (630 nm , 40 mW/cm^2 and 80 mW/cm^2) at the doses of 4 J/cm^2 , 15 J/cm^2 and 30 J/cm^2 . Cellular metabolism (MTT), number of viable cells (trypan blue), cell morphology (scanning electron microscopy- SEM) and quantification of NO and reactive oxygen species (ROS) were performed using a fluorescence probe (DCFH-DA). All evaluations were performed 24 hours after irradiation. The statistical tests were Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, with comparative inferences at the significance level of 5%. **Results:** In the presence of LPS, the doses of 15 and 30 J/cm^2 and 4 and 15 J/cm^2 (80 mW/cm^2) presented greater cellular viability when compared to the control group (non-irradiated) ($p < 0.05$). For the number of viable cells, there was no difference between groups ($p > 0.05$). It was possible to observe pulp cells of normal aspect, with fusiform format, covering the cover glass in the SEM. Moreover, in the presence of LPS, the parameters irradiated with 40 mW/cm^2 had the lowest NO values, with a statistically significant difference between the irradiation parameters and the control group (with LPS) ($p < 0.05$). All doses were able to modulate the ROS concentration, except for the dose of 4 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 , which did not present statistical difference when compared to the positive control group ($p > 0.05$). The images generated after the use of the probe for the detection of ROS confirm the quantitative findings.

Conclusion: The energy densities of 15 and 30 J/cm^2 and the irradiance of 80 mW/cm^2 were the most effective irradiation parameters for the cellular oxidation modulation, with no damages for cellular metabolism and morphology.

Keywords: photobiomodulation, dental pulp, cell culture techniques, oxidative stress

INTRODUÇÃO

As fontes luminosas como laser ou LED, ultimamente têm sido usadas como alternativas terapêuticas, sendo alvo de estudos em diversos ramos das ciências voltadas a saúde^{1,2,3,4,5}. Pesquisas clínicas e laboratoriais têm avaliado o efeito da irradiação de baixa energia, conhecida como fototerapia, em reparos de diversos tecidos como o muscular e cartilaginoso^{6,7}, em células do sistema nervoso^{8,9}, em reparo ósseo^{10,11} e também do complexo dentino-pulpar^{12,13,14}. O emprego do LED ou laser tem sido bem aceito para aplicação no reparo do tecido pulpar^{13,14,15,16,17,18,19}.

Quando utilizada em padrões determinados, a irradiação com LED ou laser infravermelho e vermelho foi suficiente para propiciar o aumento da proliferação de células da polpa de dentes humanos^{18,19}, de células pulpares de roedores¹⁷ e odontoblastóides^{13,16}. Além disso, a expressão e a formação de proteínas relacionadas com a produção de dentina também foram estimuladas após o uso destas fontes de luz^{16,19}. A fototerapia também foi capaz de formar tecido mineralizado, diminuir o infiltrado inflamatório e estimular a vascularização após exposição pulpar em molares de ratos¹⁵. Sugere-se que a luz possa ser utilizada clinicamente, após a retirada do tecido cariado, em cavidades médias e profundas, para estimular o reparo do tecido pulpar.

A câmara pulpar é delimitada por dentina (tecido mineralizado) e tal característica não permite que o edema inflamatório tenha o seu extravasamento. A intensidade do processo inflamatório pode ser agravada, o que é prejudicial ao reparo tecidual, devido ao comprometimento da circulação sanguínea e linfática do dente, já que a chegada e saída dos vasos acontecem pelo forame apical^{20,21}. Como exemplo, o radical livre Óxido Nítrico (ON), produzido pela enzima ON sintetase, é um produto do processo inflamatório após a injúria tecidual e tem o poder de danificar células saudáveis dos tecidos²². Assim, o ON e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), que são moléculas instáveis, precisam ser moduladas. Deste modo, a regulação do processo inflamatório se faz necessária. Mesmo tendo o conhecimento de que a luz emitida pelo LED infravermelho é capaz de reduzir as concentrações de ON e EROs em células pulpares expostas ao LPS²³, ainda não se tem definido quais parâmetros de irradiação seriam positivos ou negativos para a modulação do processo inflamatório pulpar.

O uso da luz como método modulador de processos inflamatórios é importante, entretanto, as informações a respeito são poucas. Não existem afirmações no tocante de parâmetros de irradiação e doses que podem ser benéficas ou nocivas ao tecido e também sobre os efeitos do comprimento de onda vermelho nesta modulação.

Considerando que o LED pode promover a estimulação da proliferação celular da polpa dental^{13,17}, ser de fácil uso e ser uma fonte luminosa de baixo custo, deve-se acentuar a magnitude do efeito da irradiação vinda do LED vermelho no processo de modulação inflamatória em tecido pulpar da dentição decídua. Esse método pode resultar em dados que serão alvos de pósteros estudos em âmbito laboratorial e clínico que salientem o uso desta revolucionária técnica de bioestimulação de células do tecido pulpar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e expansão das células pulpares

Dois dentes decíduos hígidos e próximos à época de exfoliação foram coletados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no decorrer do atendimento a pacientes na Clínica Infantil, posteriormente à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU sob o número de protocolo 54488816.2.0000.5152. Os dentes foram doados pelos responsáveis dos pacientes que assinaram um termo de doação e consentimento. Os dentes, após a extração, foram colocados dentro de um tubo Falcon com meio de cultura e instantaneamente levados para o LABIOCEL - Laboratório de Biomateriais e Biomimetismo celular. No LABIOCEL, de forma mecânica, no interior de uma capela de fluxo laminar vertical, ocorreu a extração da polpa do interior da câmara pulpar usando uma colher de dentina afiada e limas endodônticas previamente esterilizadas. O tecido pulpar foi mergulhado no período de 1 h, em temperatura de 37°C, em solução de seguinte conteúdo: 3 mg/ml de colagenase tipo I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e 4 mg/ml de dispase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A solução foi centrifugada a 1200 rpm por 2 minutos. No fundo do tubo Falcon foi formado o *pellet* e ressuspendido em meio basal. As células obtidas foram plaqueadas em frascos de 25cm² e incubadas por 4 dias a 37°C com 5% CO₂ (Gronthos et al., 2000). A primeira substituição de meio de cultura aconteceu após 3 dias de incubação e, a partir desta troca, o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. No décimo e no vigésimo dia, aconteceram os repiques, quando as células estavam em sub-confluência. As células foram expandidas até a 4^o passagem e congeladas para posterior realização do protocolo experimental. Os experimentos foram conduzidos em dois momentos diferentes (duplicata), utilizando as células dos dois dentes em ambos os momentos, para confirmação das respostas encontradas.

Protocolo experimental

Indução da produção de mediadores inflamatórios

As células pulpares de dentes decíduos (CPDDs) foram semeadas (1×10^5 células/compartimento) em placas de 24 compartimentos (CostarCorp. Cambridge, MA, EUA), utilizando DMEM/F12 (Gibco, Langley, OK, EUA) suplementado com 5 mmol/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (Gibco, Langley, OK, EUA), 100 unidades de penicilina/ml, 0,23 mg estreptomicina/ml (Gibco, Langley, OK, EUA), e incubadas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37 °C. O meio de cultura foi trocado por DMEM (Gibco, Langley, OK, EUA) sem soro fetal bovino após 24 horas, sendo realizada a aplicação de LPS (LPS, Ultra-pure grade, Escherichia coli O111: B4, InvitroGen, San Diego, CA, EUA) na concentração de 10 µg/ml de meio de cultura, para a indução da formação de mediadores inflamatórios. As células foram irradiadas uma única vez (LED 630nm, 40 mW/cm² e 80 mW/cm²) nas doses propostas de 4 J/cm², 15 J/cm² e 30 J/cm², logo após a aplicação do LPS. Os tempos de irradiação utilizados para cada dose de energia foram: 4J/cm²-40mW por 3'30", 15J/cm²-40mW por 12'30", 30J/cm²-40mW por 25', 4J/cm²-80mW por 1'40", 15J/cm²-80mW por 6'15" e 30J/cm²-80mW por 12'30".

Viabilidade celular – MTT

Passadas 24 horas após a irradiação, foi realizada a análise da viabilidade celular. O teste utilizado foi o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e para isso, o meio de cultura precisou ser substituído por 900 µL de DMEM sem soro fetal bovino e 100 µL de solução de MTT (5mg/ml em PBS -Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As células ficaram em contato com a solução de MTT por 4 horas em incubadora a 37°C, e, após esse período, a solução foi aspirada e trocada por 700 µL de isopropanol acidificado (0,04 N de HCL), com a finalidade de diluir os cristais de formazan resultantes da clivagem do sal metil tetrazólio pela enzima desidrogenase succínica existente em células viáveis. Três alíquotas de 100 µL foram transferidas para uma placa com 96 compartimentos CostarCorp, Cambridge, MA, EUA), após homogeneização do soluto.

Azul de Tripano

O número de células viáveis foi avaliada utilizando o teste de azul de tripano²⁵. Após 24 horas da irradiação, o meio de cultura foi removido e as células tripsinizadas por meio da adição de 300 µL de Trypsina 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 10 minutos. Após este período, 50 µL da suspensão de células e 50 µL de 0,04% de solução Trypan Blue (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) foram transferidos para uma placa de 96 compartimentos.

As células ficaram incubadas por 2 minutos em temperatura ambiente e 10 µL de cada amostra foi transferida para um hemocitômetro, utilizado para contar o número total de células viáveis e não viáveis, por meio de um microscópio de luz invertida (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Com o auxílio de um contador manual, foi realizada a contagem de células totais e células coradas (não viáveis) e a proliferação celular foi obtida pela subtração das células não viáveis das células totais da amostra.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada uma análise qualitativa da cultura celular com o objetivo de avaliar, principalmente, a morfologia das células pertencentes aos grupos experimentais e controle. Além da morfologia, outras características como a presença de mitoses, lesão de membrana e adesão celular ao substrato também pôde ser avaliada. Alguns estudos têm usado a técnica de MEV para avaliar células submetidas à irradiação com laser ou LED de baixa potência^{16,18,24}. Porém, não foi observado na literatura atual, estudos que correlacionam as possíveis alterações morfológicas de células pulpare de dentes humanos e a irradiação com LED vermelho. Tal metodologia permitiu uma avaliação inédita, a qual complementou a análise de metabolismo celular, sendo as imagens geradas relevantes para a interpretação do comportamento das células pulpare irradiadas.

As células foram semeadas em lamínulas de vidro e ao final do protocolo foram fixadas por 1 hora em glutaraldeído a 2,5% (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). Após fixação das células, estas foram lavadas três vezes com 1 ml de PBS (5 minutos cada lavagem) e então pós-fixadas por 1 hora em 200 µL de tetróxido de ósmio 1% (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). As amostras foram desidratadas em trocas ascendentes de soluções de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 minutos em cada solução), sendo em seguida submetidas à secagem por meio do solvente de baixa

tensão superficial 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS-ACROS Organics, Rutherford, NJ, EUA) e mantidas em dessecador durante 1 semana. Finalmente, as amostras foram fixadas em “stubs”, metalizadas com ouro, e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL –EUA Inc., Peabody, MA, EUA).

Quantificação de Óxido Nítrico (ON)

No sobrenadante da cultura celular, após 24 horas da irradiação, foi mensurada a produção de Óxido Nítrico (ON). O nitrito se forma pela reação de diazotação com o reagente de Griess, composto de 1 g de sulfanilamida (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha), 0,1 g de dicloreto de N (1-naftil) etilenodiamina (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Alemanha), 2,5 ml de ácido ortofosfórico (MallinckrodtChemical, St. Louis, MO, EUA) e 100 ml de água deionizada. Foram adicionados 100µL do sobrenadante de cada amostra (em triplicata) e 100 µL de reagente de Griess, em uma placa de 96 compartimentos e a absorbância foi realizada em espectrofotômetro (ThermoPlate, Shenzhen, China) com filtro de 540 nm, logo após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e sala escura.

Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada quantitativamente pelos valores de intensidade de fluorescência da amostra após utilização da sonda 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA; InvitroGen, San Diego, CA, EUA). Após 24 h da irradiação, o meio de cultura foi removido e 300 µL de solução contendo a sonda fluorescente (5 µmol/L de PBS) foi adicionada a cada compartimento. Após 5 minutos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS e analisadas no equipamento de leitor de microplacas multimodal de fluorescência GLOMAX® (Promega Corporation, São Paulo, Brasil) para aquisição dos dados quantitativos. Para a geração de imagens, as amostras foram avaliadas no microscópio de fluorescência EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil).

RESULTADOS

Avaliação da viabilidade celular (MTT)

Os resultados da avaliação de viabilidade celular estão demonstrados na Figura 1a. Quando comparamos os grupos “com LPS” e “sem LPS” para cada parâmetro de irradiação, observamos que todos os grupos apresentaram maior viabilidade celular na presença de LPS quando comparado com os mesmos parâmetros de irradiação na ausência de LPS ($p < 0,05$).

Ao compararmos os diferentes parâmetros de irradiação, dentro de uma mesma condição, foi observado que, na ausência de LPS, todos os parâmetros de irradiação apresentaram maior viabilidade celular quando comparados ao grupo controle (não irradiado), com significância estatística ($p < 0,05$) sendo que a dose de energia de 30 J/cm², na potência de 40mW/cm² se destacou das demais. Na presença de LPS, os parâmetros de 15 J/cm²-40 mW/cm², 30 J/cm²-40 mW/cm², 4 J/cm²-80 mW/cm² e 15J/cm²-80 mW/cm² apresentaram maior viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (não irradiado), com significância estatística ($p < 0,05$). Sendo que a dose de energia de 15J/cm², na potência de 40mW/cm² apresentou os melhores resultados.

Avaliação do número de células viáveis (Azul de Tripano)

Este teste verifica o número de células que sofreram lesão de membrana celular em relação ao total de células intactas presentes na amostra. Os resultados da avaliação do número de células viáveis estão demonstrados na Figura 1b. Para o número de células viáveis, não houve diferença entre os grupos, mostrando que nem o LPS, nem o parâmetro de irradiação interferiram nessa variável ($p > 0,05$).

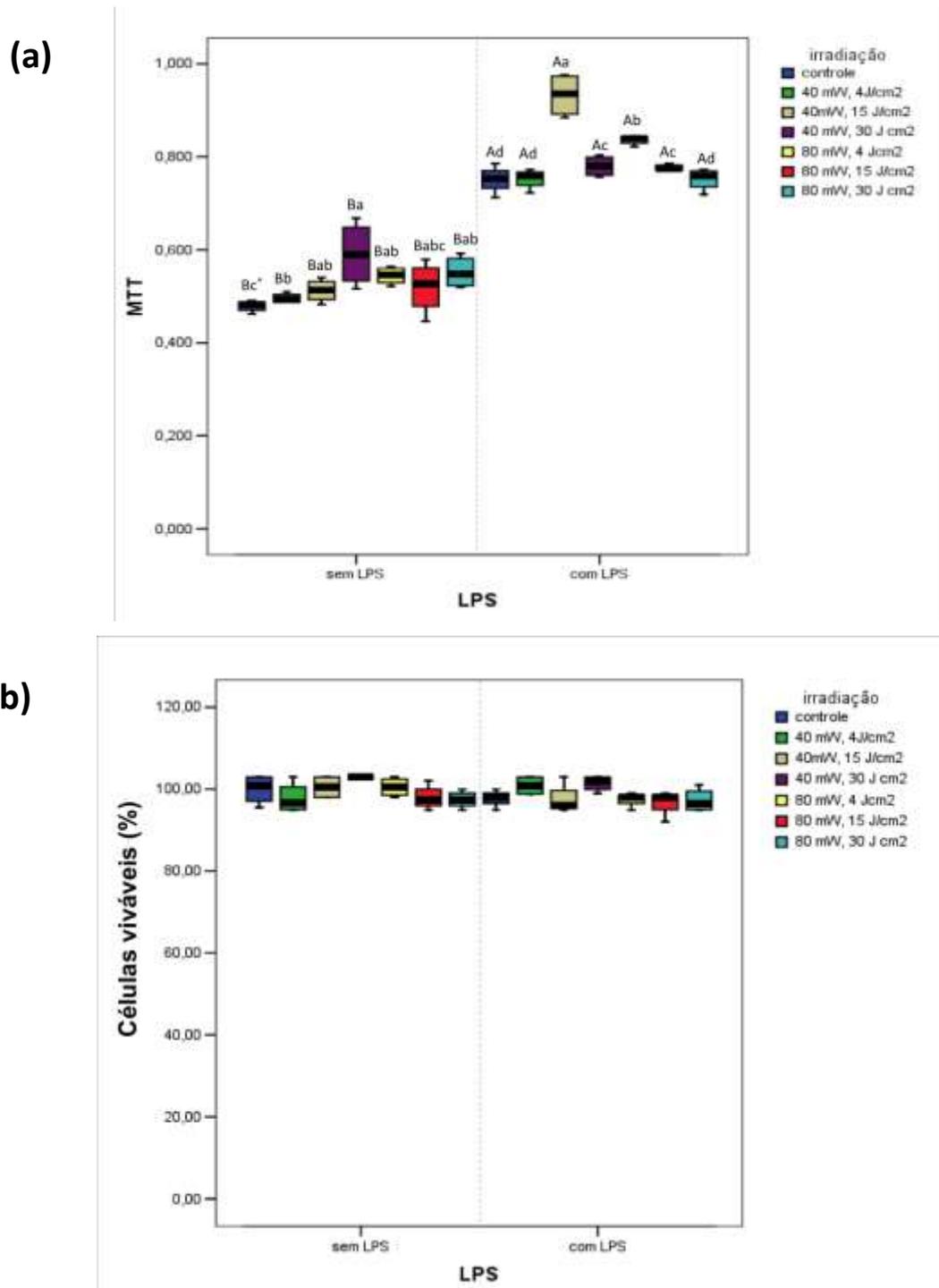


FIGURA 1 (a,b): Viabilidade celular (MTT) (a) e número de células viáveis (b) de células pulpares de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo.

*Letras maiúsculas permitem comparação entre grupos “sem LPS” e “com LPS”, para um mesmo parâmetro de irradiação. Letras minúsculas permitem comparação entre os diferentes parâmetros de irradiação para uma mesma condição (com ou sem LPS). Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), $n = 8$.

Análise da Morfologia celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens representativas da morfologia celular obtidas pelo uso de microscópio eletrônico de varredura estão indicadas nas Figuras 2 (40mW/cm²) e 3 (80 mW/cm²). Para ambas as potências utilizadas (40 mW/cm² ou 80 mW/cm²), pôde-se observar células pulpareas de aspecto normal, com formato fusiforme, recobrando a lamínula de vidro (L) e com seus prolongamentos citoplasmáticos (c) intactos. No grupo “15 J/cm²-40mW com LPS”, foi possível registrar as células em mitose (indicadas pelo círculo vermelho).

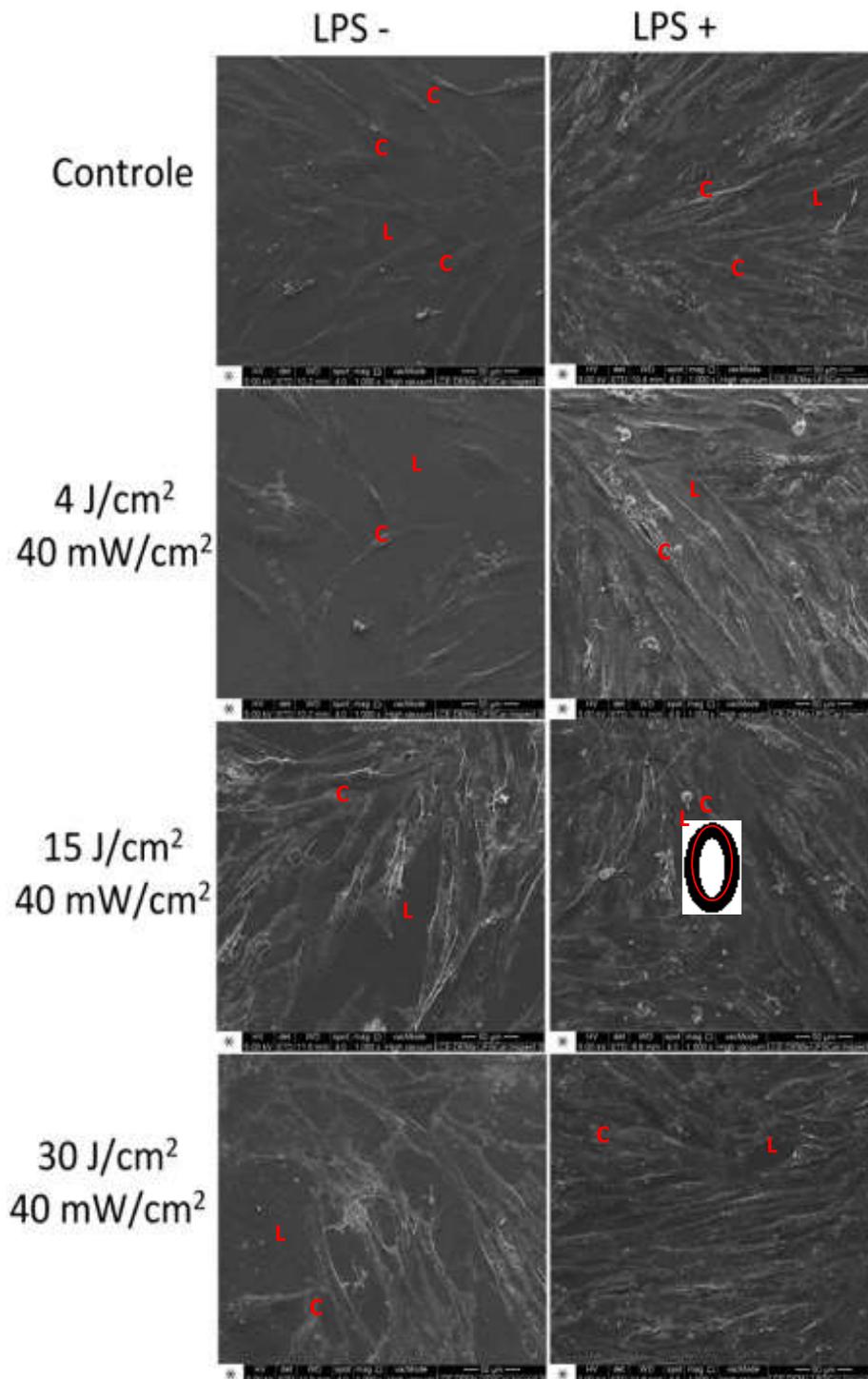


FIGURA 2: Imagens representativas da morfologia celular obtidas pelo uso de Microscópio Eletrônico de Varredura, considerando presença ou não de LPS, para as diferentes doses de energia, na potência de 40 mW/cm² (aumento 1000x). Os espaços da lamínula de vidro com ausência de células estão representados pela letra L e os prolongamentos citoplasmáticos pela letra C.

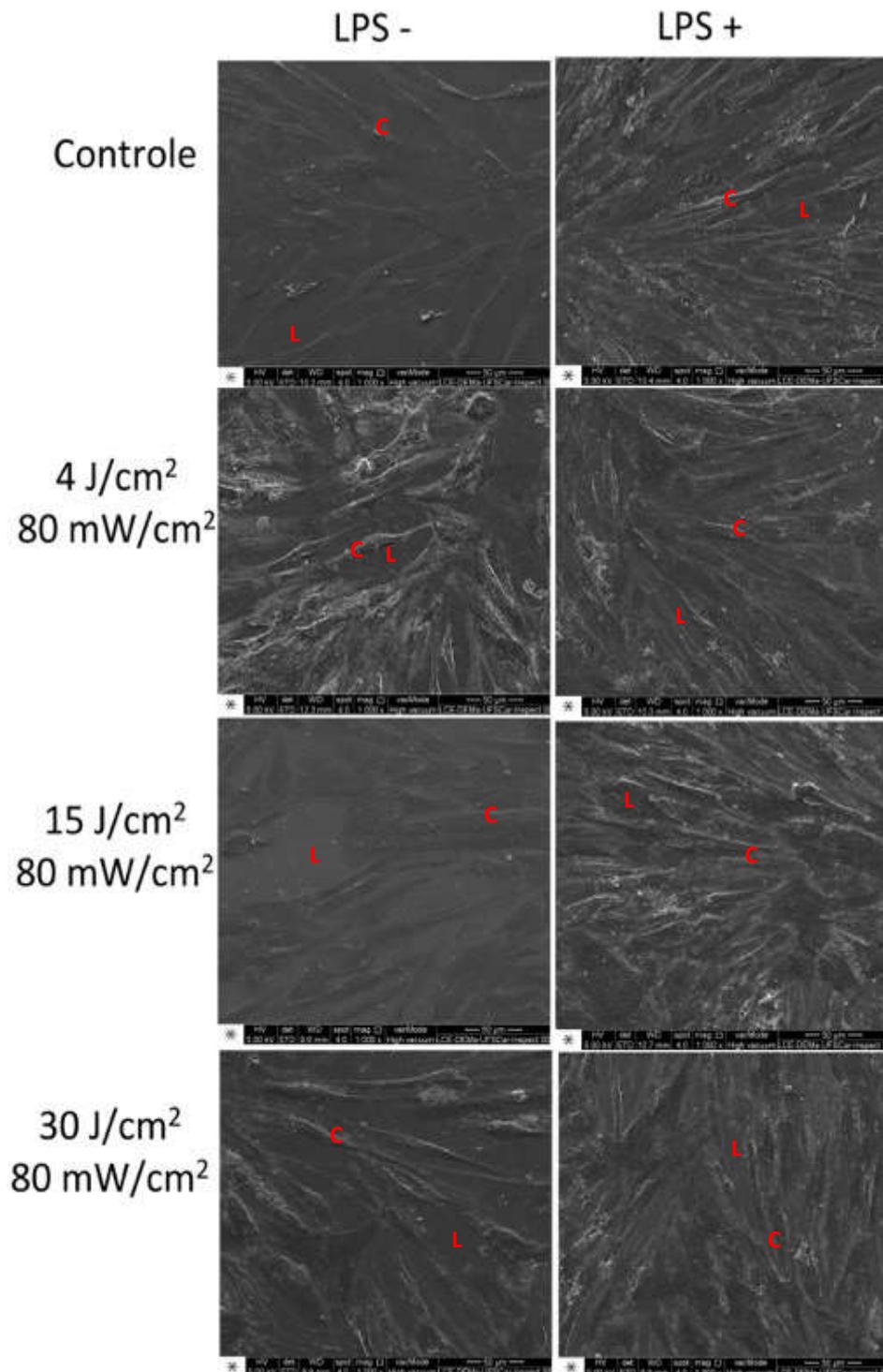


FIGURA 3: Imagens representativas da morfologia celular obtidas pelo uso de Microscópio Eletrônico de Varredura, considerando presença ou não de LPS, para as diferentes doses de energia, na potência de 80 mW/cm² (aumento 1000x). Os espaços da lamínula de vidro com ausência de células estão representados pela letra L e os prolongamentos citoplasmáticos pela letra c.

Quantificação de óxido nítrico (reagente de Griess)

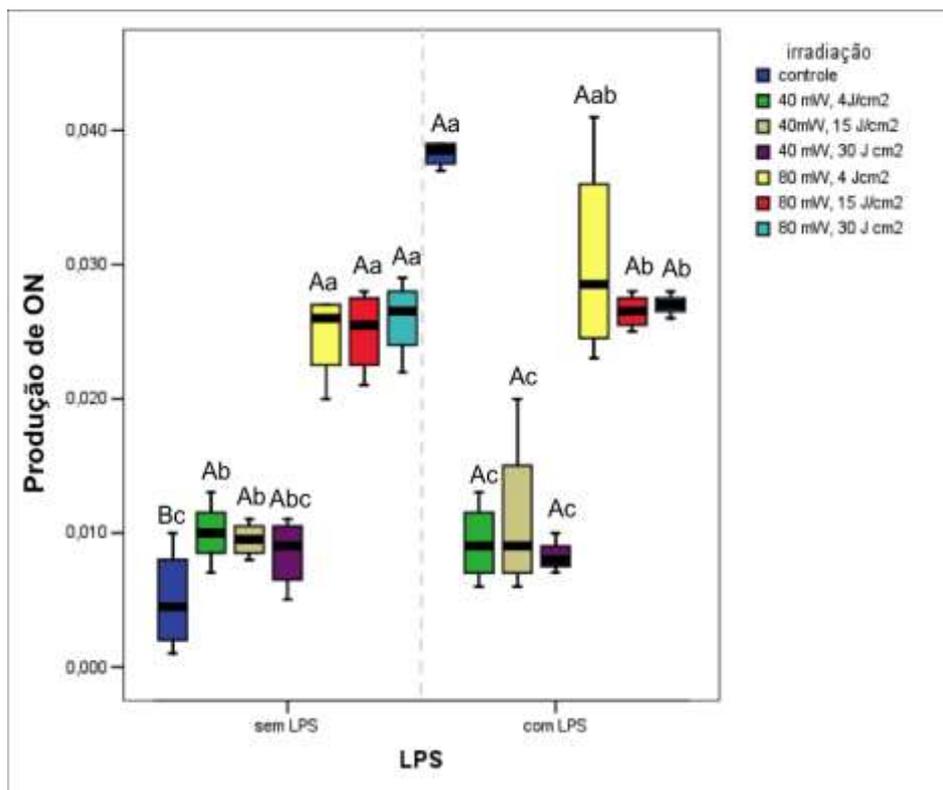
Os resultados gerados após quantificação de ON estão demonstrados na Figura 4a. Quando comparamos os grupos “com LPS” e “sem LPS” para cada parâmetro de irradiação, observamos que apenas o grupo controle apresentou maior produção de óxido nítrico na presença de LPS ($p < 0,05$).

Ao compararmos os diferentes parâmetros de irradiação, dentro de uma mesma condição, foi observado que, na ausência de LPS, todos os parâmetros de irradiação apresentaram maior produção de óxido nítrico quando comparado ao grupo controle (não irradiado) ($p < 0,05$). Sendo que os grupos irradiados utilizando 80 mW/cm^2 apresentaram os maiores valores de ON. Na presença de LPS, os parâmetros irradiados com 40 mW/cm^2 apresentaram menores valores de ON, sendo que houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros de irradiação e o grupo controle (com LPS) ($p < 0,05$), indicando que todos os parâmetros utilizados foram capazes de modular as concentrações de ON, com destaque para as irradiações utilizando 40 mW/cm^2 .

Quantificação e imagem de EROs

Ao comparar os grupos com e sem LPS, observou-se que, para o grupo controle e o grupo irradiado com 4 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 , os grupos com LPS apresentaram valores maiores de EROs ($p < 0,05$). Para os demais grupos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (Figura 4b). Quando comparados os diferentes parâmetros de irradiação, dentro da mesma condição, para grupos sem LPS, a dose de 4 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 e 15 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 apresentaram valores maiores quando comparados com os demais parâmetros ($p < 0,05$). Para os grupos com LPS, todas as doses foram capazes de modular a concentração de EROs, com exceção da dose de 4 J/cm^2 - 80 mW/cm^2 , que não apresentou diferença estatística quando comparada com o grupo controle positivo ($p > 0,05$). As imagens geradas após a utilização da sonda para detecção de EROs confirmam os achados quantitativos, onde o grupo controle com LPS apresentou maior fluorescência, seguido dos grupos irradiados com 80 mW/cm^2 , em todas as doses. O grupo controle sem LPS e os grupos irradiados com 40 mW/cm^2 apresentaram menor fluorescência (Figura 5).

(a)



(b)

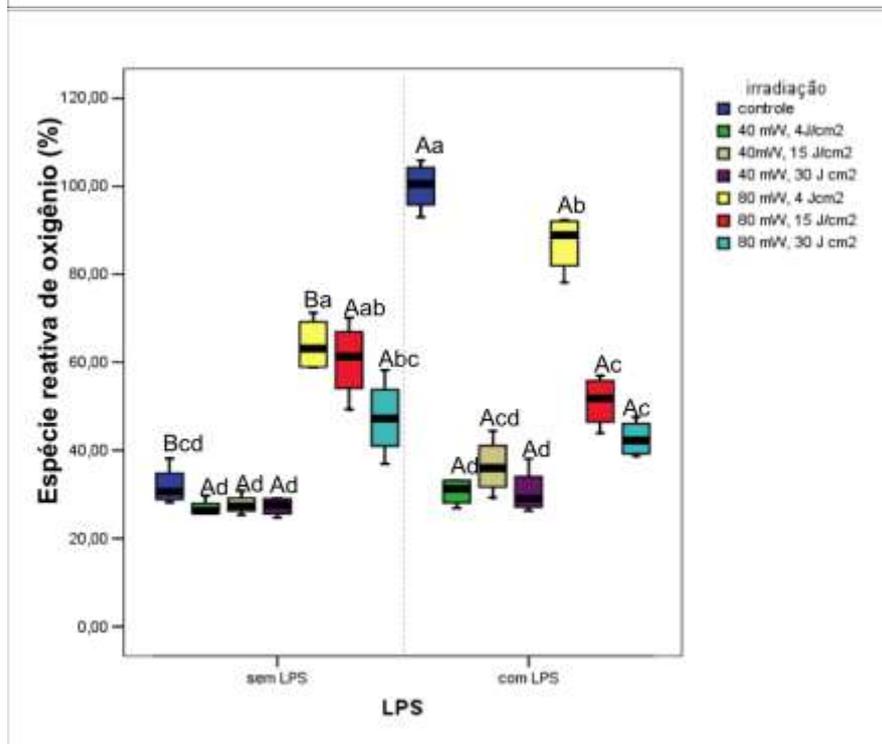


FIGURA 4 (a,b): Produção de ON (a) e de EROs (b) por células pulpares de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo.

*Letras maiúsculas permitem comparação entre grupos “sem LPS” e “com LPS”, para um mesmo parâmetro de irradiação. Letras minúsculas permitem comparação entre os diferentes parâmetros de irradiação para uma mesma condição (com ou sem LPS). Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$), $n = 8$.

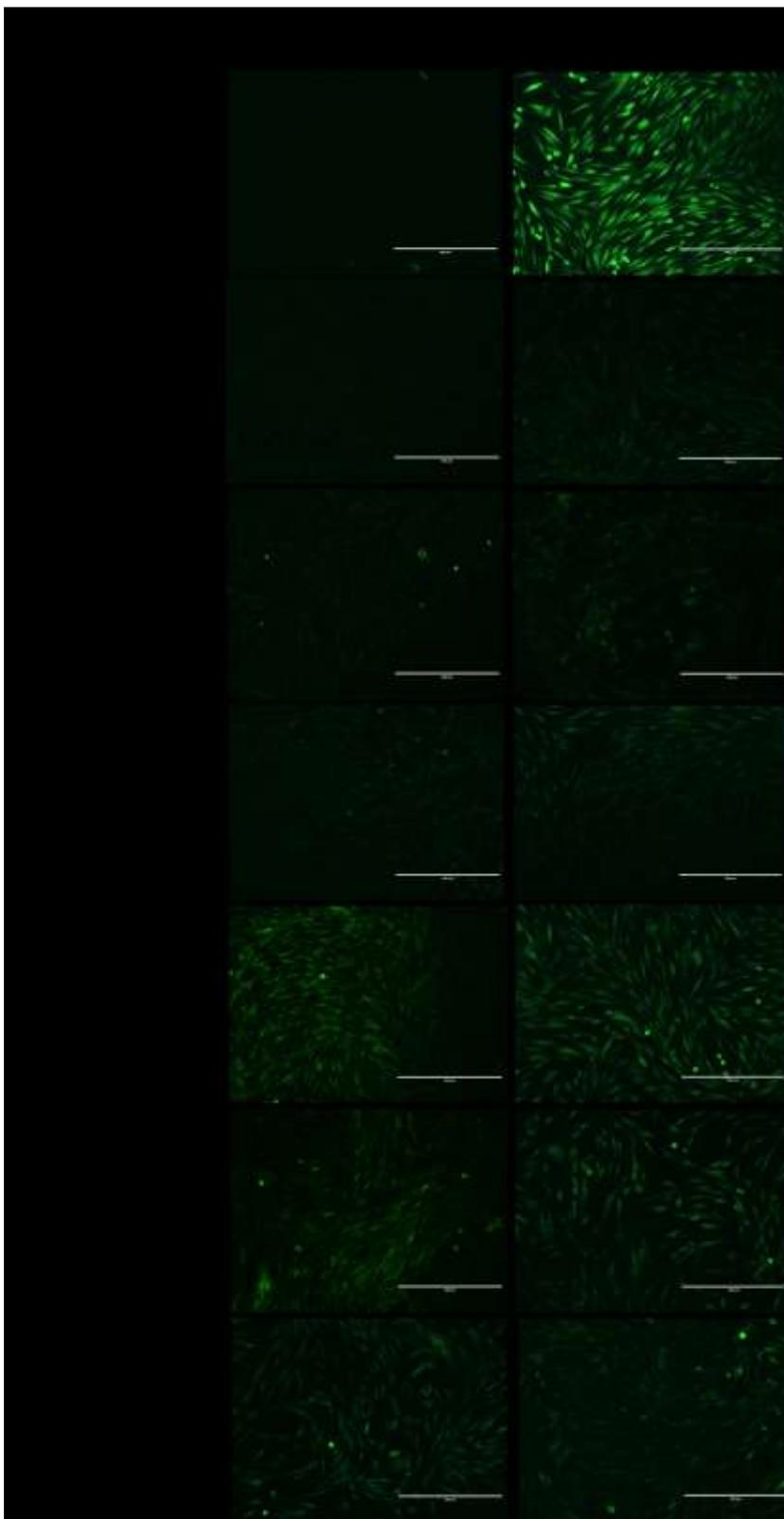


FIGURA 5: Imagens representativas da produção de espécie reativa de oxigênio (EROs) por células pulpares de dentes decíduos, obtidas pelo uso de Microscópio de fluorescência, considerando presença ou não de LPS, para os diferentes parâmetros de irradiação (aumento 10x).

DISCUSSÃO

O interesse a respeito dos efeitos da irradiação sobre o tecido pulpar têm aumentado nos últimos anos. Diversos estudos clínicos, em animais e in vitro têm sido desenvolvidos com o objetivo de definir os melhores parâmetros de irradiação para bioestimulação da polpa dentária^{2,12,14,15,17,18,26}. Além de parâmetros de irradiação capazes de promover o reestabelecimento do tecido pulpar frente a um estímulo agressor, por meio da formação de dentina reacional ou reparadora, também se torna interessante que a fototerapia seja capaz de auxiliar na modulação inflamatória deste tecido. Deste modo, o presente estudo procurou fornecer dados preliminares a respeito do efeito da irradiação, utilizando LED vermelho, na viabilidade celular e modulação inflamatória de células pulpares submetidas a estímulo com LPS.

Os resultados de MTT demonstraram que as células expostas ao LPS apresentaram maior viabilidade celular quando comparadas aos grupos sem LPS. A exposição ao LPS, na concentração utilizada, simulou uma agressão de baixa intensidade, sem causar lesão ou morte celular. De forma contrária, estimulou a viabilidade das células presentes na amostra. Clinicamente o estímulo seria compatível a uma pulpite reversível, onde não ocorre morte de odontoblastos e o tecido se esforça para reverter o quadro de inflamação²⁷. As imagens de MEV complementou os resultados de viabilidade celular, onde foi possível observar um maior número de células aderidas nos grupos estimulados com LPS, quando comparados aos grupos sem LPS. Também pôde-se constatar que as células apresentaram morfologia normal e aderidas ao substrato. Com relação a ação da irradiação sobre a viabilidade celular, observou-se que todos os parâmetros de irradiação testados foram capazes de aumentar a viabilidade celular na ausência de LPS, reforçando os dados da literatura que indicam o efeito positivo da irradiação no metabolismo de células pulpares^{13,17,23,25}. Na presença de LPS, os parâmetro 40 mW/cm²-15 J/cm²; 40 mW/cm²-30 J/cm²; 80 mW/cm²-4 J/cm² e 80 mW/cm²-15 J/cm² apresentaram maior viabilidade celular quando comparados ao grupo controle, sendo que a dose de energia de 15J/cm², na potência de 40mW/cm² apresentou os melhores resultados. No estudo de Montoro et al²³. (2014), as células pulpares foram expostas a um protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo. Os autores encontraram que todas as doses testadas promoveram aumento da viabilidade celular, na ausência de LPS. Já na presença de LPS, não houve aumento significativo da viabilidade. Vale ressaltar que o comprimento de onda testado foi o infravermelho (840 nm), na potência de 40 mW/cm², diferentemente do utilizado no presente estudo (comprimento de onda vermelho –630nm, nas potências de 40 e 80 mW/cm²).

O presente estudo também avaliou o efeito da irradiação na produção de óxido nítrico (um tipo específico de EROs) e de espécies reativas de oxigênio em geral. Estudos têm demonstrado a relação da fototerapia com a produção de ON/EROs, por meio do estímulo de vias que ativam a enzima ON sintase^{17,28,29}. Holder *et al*¹⁷ (2012) bloquearam a enzima ON sintase in vitro e detectaram que, mesmo sob a inativação desta enzima, houve aumento da produção de ON após irradiação com LED vermelho, sugerindo que o ON também pode ser liberado via cascata respiratória (pela enzima citocromo c oxidase). As EROs podem exercer efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório, dependendo de sua concentração no tecido³⁰. Segundo Karu³¹ (2010), durante a inflamação ou estresse celular, altos níveis de EROs impedem a atividade da citocromo c oxidase, limitando a capacidade de reparo do tecido. Além disso, enzimas pró-apoptóticas podem ser ativadas, levando a morte celular³². Em concentrações moderadas, as EROs podem apresentar efeitos positivos como efeito vasodilatador durante a primeira resposta vascular à inflamação³³, efeito estimulante na expressão de citosinas³⁴, ou no estímulo a diferenciação celular¹⁷. Portanto, a manutenção de ON/EROs em concentrações moderadas, que não causem danos ao tecido, após a fototerapia, torna-se importante. O presente estudo indicou que todos os parâmetros de irradiação foram capazes de modular as concentrações de ON/EROs, após a aplicação de LPS. Com destaque, para as irradiações utilizando 40 mW/cm². Montoro *et al*²³ (2014), assim como no presente estudo, observaram que a parâmetros de irradiação LED utilizando a potência de 40 mW/cm² foram os mais efetivos para a modulação de ON/EROs após irradiação infravermelha de células pulpares.

Considerando o conjunto de dados apresentados, os parâmetros de irradiação que apresentaram resultados positivos para a modulação inflamatória, foram as doses de 15 e 30 J/cm², na potência de 80mW/cm². Pois tais doses foram capazes de apresentar concentrações de ON/EROs mais baixas quando comparadas ao grupo controle positivo (com LPS), porém apresentaram concentrações mais elevadas de ON/EROs quando comparadas ao controle negativo (sem LPS). Ao mesmo tempo, não causaram diminuição no metabolismo e tampouco alteração de morfologia das células pulpares de dentes decíduos.

Futuros estudos in vitro e clínicos são necessários para confirmar a efetividade deste parâmetro de irradiação na modulação inflamatória. Muitos são os fatores limitantes para a definição de um parâmetro específico ideal para bioestimulação tecidual. O principal é a falta de informação, cedida pelos autores, sobre todos os parâmetros utilizados em cada estudo, bem como a falta de informação a respeito da medição ou calibração dos equipamentos de irradiação³⁵. Além disso, estudos in vitro

como este, apenas sugerem os possíveis efeitos positivos da fototerapia no tecido pulpar. Tais resultados devem ser confirmados em estudo clínicos controlados antes de serem utilizados com segurança na clínica odontológica.

CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros utilizados no estudo, foi possível concluir que a densidade de energia de 15J/cm², 30J/cm² e irradiância de 80 mW/cm² foi o parâmetro de irradiação mais efetivo para estimular e modular o estresse oxidativo nas células pulpares de dentes decíduos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig Universal: APQ 00315-16) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (Bolsa PIBIC/CNPq/UFU IC: 2016-SAU045) pelo financiamento deste estudo.

REFERÊNCIAS

- 1 - Fukuzaki Y, Shin H, Kawai HD, Yamanoha B, Kogure S. 532 nm Low-Power Laser Irradiation Facilitates the Migration of GABAergic Neural Stem/Progenitor Cells in Mouse Neocortex. *PLoS One*. 2015 Apr 28;10(4):e0123833.
- 2 - Ballini A, Mastrangelo F, Gastaldi G, Tettamanti L, Bukvic N, Cantore S, *et al*. Osteogenic differentiation and gene expression of dental pulp stem cells under low-level laser irradiation: a good promise for tissue engineering. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Oct-Dec;29(4):813-22.
- 3 - Cotler HB, Chow RT, Hamblin MR, Carroll J. The Use of Low Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain. *MOJOR*. 2015; 2 (5).
- 4 - Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, *et al*. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microsc Res Tech*. 2016 Feb 8.
- 5 - Uloopi KS, Vinay C, Ratnaditya A, Gopal AS, Mrudula KJ, Rao RC. Clinical Evaluation of Low Level Diode Laser Application For Primary Teeth Pulpotomy. *J ClinDiagn Res*. 2016 Jan;10(1):ZC67.
- 6 - Bublitz C, Medalha C, Oliveira P, Assis L, Milares LP, Fernandes KR, *et al*. Low-level laser therapy prevents degenerative morphological changes in an experimental model of anterior cruciate ligament transection in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Sep;29(5):1669-78.

- 7 - Zagatto AM, de Paula Ramos S, Nakamura FY, de Lira FS, Lopes-Martins RÁ, de Paiva Carvalho RL. Effects of low-level laser therapy on performance, inflammatory markers, and muscle damage in young water polo athletes: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Lasers Med Sci*. 2016 Apr;31(3):511-21.
- 8 - Dong T, Zhang Q, Hamblin MR, Wu MX. Low Level light in combination with metabolic modulators for effective therapy of injured brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015 Sep;35(9):1435-44.
- 9 - Sotoudeh A, Jahanshahi A, Zareiy S, Darvishi M, Roodbari N, Bazzazan A. The influence of low-level laser irradiation on spinal cord injuries following ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras*. 2015 Sep;30(9):611-6.
- 10 - Mostafavinia A, Masteri Farahani R, Abbasian M, Vasheghani Farahani M, Fridoni M, Zandpazandi S, *et al*. Effect of Pulsed Wave Low-Level Laser Therapy on Tibial Complete Osteotomy Model of Fracture Healing With an Intramedullary Fixation. *Iran Red Crescent Med J*. 2015 Dec28;17(12):e32076.
- 11 - Tim CR, Bossini PS, Kido HW, Malavazi I, von Zeska Kress MR, Carazzolle MF, *et al*. Effects of Low Level laser therapy on inflammatory and angiogenic gene expression during the process of bone healing: A microarray analysis. *J PhotocHem Photobiol B*. 2016 Jan;154:8-15.
- 12 - Marques NC, Neto NL, RodiniCde O, Fernandes AP, Sakai VT, Machado MA, *et al*. Low-level laser therapy as an alternative for pulpotomy in human primary teeth. *Lasers Med Sci*. 2015 Sep;30(7):1815-22.
- 13 - Turrioni AP (a), Basso FG, Alonso JR, de Oliveira CF, Hebling J, Bagnato VS, *et al*. Transdental cell photobiomodulation using different wavelengths. *Oper Dent*. 2015 Jan-Feb;40(1):102-11.
- 14 - Alonso JR, Turrioni AP, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J. Synthesis of dental matrix proteins and viability of odontoblast-like cells irradiated with blue LED. *Lasers Med Sci*. 2016 Apr;31(3):523-30.
- 15 - Ferreira ANS, Silveira S, Genovese WJ, Cavalcante de Araújo V, Frigo L, DE Mesquita RA, *et al*. Effect of GaAIs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg* 2006; 24: 358–65
- 16 - 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
- 17 - Holder MJ, MilwardMR, Palin WM, Hadis MA, Cooper PR. Effects of red light-emitting diode irradiation on dental pulp cells. *J Dent Res* 2012; 91:961-6
- 18 - 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 Oct;42(10):1292-9.

- 19 - Turrioni AP (b), Montoro LA, Basso FG, de Almeida L de F, Costa CA, Hebling J. Dose-responses of Stem Cells from Human Exfoliated Teeth to Infrared LED Irradiation. *Braz Dent J.* 2015 Jul-Aug;26(4):409-15.
- 20 - Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod* 2010 36:781-9.
- 21 - Bletsas A, Berggreen E, Fristad I, Tenstad O, Wiig H. Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *J Physiol.* 2006 May 15;573(Pt 1):225-36.
- 22 - Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases.* 2001 7, 2–10.
- 23 - 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 Aug;47(8):747-55.
- 24 - Tagliani MM, Oliveira CF, Lins EMM, Kurachi C, Hebling J, Bagnato, VS, *et al.* Nutritional stress enhances cell viability of odontoblastlike cells subjected to low level laser irradiation. *Laser Phys Lett* 2010; 7: 247-51
- 25 - Almeida L de F, Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Souza-Costa CA, Hebling J. Red LED Photobiomodulates the Metabolic Activity of Odontoblast-Like Cells. *Braz Dent J.* 2016 Jul-Aug;27(4):375-80.
- 26 - Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida LFD, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdental photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J.* 2017 Jun;50(6):549-559.
- 27 - Coll JA, Seale NS, Vargas K, Marghalani AA, Al Shamali S5, Graham L. Primary Tooth Vital Pulp Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Dent.* 2017 Jan 15;39(1):16-123
- 28 - Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009 7:358-383
- 29 - Mowbray M1, McLintock S, Weerakoon R, Lomatschinsky N, Jones S, Rossi AG, *et al.* Enzyme-independent NO stores in human skin: quantification and influence of UV radiation. *J Invest Dermatol.* 2009 Apr;129(4):834-42
- 30 - Yu FTH, Chen X, Straub AC, Pacella JJ. The Role of Nitric Oxide during Sonoreperfusion of Microvascular Obstruction. *Theranostics.* 2017 Aug 18;7(14):3527-3538. doi: 10.7150/thno.19422. eCollection 2017.
- 31- Karu TI. Multiple roles of cytochrome C oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life.* 2010 Aug; 62:607-610.

- 32 - Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000 Aug; 1459, 405–12.
- 33 - Liew FY, Cox FE Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology Today*. 1991 Mar; 12, 17–21.
- 34 - Szabó C Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizons*. 1995 Feb; 3, 2–32
- 35 - Hadis MA, Zainal SA, Holder MJ, Carroll JD, Cooper PR, Milward MR, *et al*. The dark art of light measurement: accurate radiometry for low-level light therapy. *Lasers Med Sci*. 2016 May; 31(4):789-809

ANEXOS

ANEXO I - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEP UFU

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Efeito de diferentes parâmetros de irradiação do LED vermelho e infravermelho na modulação do estresse oxidativo e na viabilidade de células pulpares de dentes deciduos	
Pesquisador Responsável: Ana Paula Turroni Hidalgo	
Área Temática:	
Versão: 3	
CAAE: 54488816.2.0000.5152	
Submetido em: 23/09/2016	
Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_662505	