



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIDADE DE ODONTOPEDIATRIA**



LAYANE CRISTINA SILVA

**EFEITOS DE DIFERENTES PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO
DO LED INFRAVERMELHO (850NM) NO METABOLISMO E
MORFOLOGIA DE CÉLULAS PULPARES DE DENTES DECÍDUOS**

UBERLÂNDIA

2021

LAYANE CRISTINA SILVA

**EFEITOS DE DIFERENTES PARÂMETROS DE IRRADIAÇÃO
DO LED INFRAVERMELHO (850NM) NO METABOLISMO E
MORFOLOGIA DE CÉLULAS PULPARES DE DENTES DECÍDUOS**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula
Turrioni Hidalgo

UBERLÂNDIA

2021

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me capacitar e me abençoar todos os dias da minha vida. Sou muito grata pela sua misericórdia e por ser meu guia. À minha família, em especial a minha mãe que esteve sempre ao meu lado me apoiando em cada momento, vivendo todos os meus sonhos. Sem ela eu não estaria onde estou, não seria quem eu sou. Não consigo expressar em palavras meu agradecimento e amor por ela. Agradeço muito a minha avó que esteve sempre comigo, me apoiando e cuidando de mim. Agradeço ao meu pai que não está mais ao meu lado, mas sei que onde ele estiver está torcendo por mim. Agradeço aos meus tios, tias, primos e primas. Aos meus amigos que estiveram sempre ao meu lado, sonhando esse sonho comigo. Desde os meus amigos de infância, em especial a Marcielle, até as amigas que conquistei com o passar dos anos, os amigos que fiz durante o ensino médio, principalmente o Raphael e Iane, e também os amigos do cursinho pré-vestibular em especial a Bruna e Natália. Agradeço em especial aos amigos que a Odonto me proporcionou. À Thamiris, minha amiga desde antes da faculdade, que considero minha irmã de outra mãe, a Gabrielli, minha dupla que passou todos os momentos da graduação ao meu lado, Marcus Vinícius e Vanessa que juntos formamos nosso quarteto e dividimos todos os dramas da graduação e que espero levar a amizade de vocês para o resto da vida. Agradeço a Allyne, Andressa e Pedro, que mesmo não sendo da minha turma construímos uma amizade que é extremamente importante na minha vida. Agradeço a minha turma 84^o por todos os momentos vividos. À minha orientadora Ana Paula Turrioni por ter aceitado me orientar e compartilhado seu conhecimento comigo. Agradeço também à Jéssica Bonvicini que esteve ao meu lado durante o tempo que eu era aluna de iniciação científica e me guiou nessa pesquisa tão rica. À liga de estomatologia e PROCEDE, essas extensões que me proporcionaram um vasto conhecimento. À toda equipe da FOUFU, os professores, que foram fundamentais na minha formação e que levarei para toda a vida o conhecimento adquirido, os técnicos administrativos que sempre trabalharam duro para fazer nosso bloco funcionar da melhor maneira. Agradeço infinitamente aos pacientes que confiaram em mim, mesmo sendo uma aluna de graduação. Enfim, sou muito grata por ter tido a oportunidade de formar na Universidade Federal de Uberlândia.

EPÍGRAFE

“A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência, mas pela capacidade de começar
de novo.”

- F. Scott Fitzgerald

LISTA DE ABREVIATURAS

LED – Light emitting Diodes (Diodos emissores de luz)

CPDDs- Células pulpare de dentes decíduos

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EROs- Espécies reativas de oxigênio

LPS- Lipolissacarídeos

MEV- Microscópio Eletrônico de Varredura

ON – Oxído Nítrico

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes doses de energia e diferentes potências do LED infravermelho (850 nm) sobre o metabolismo e morfologia de células pulpares de dentes decíduos (CPDDs). Para isto, as células foram obtidas de 3 dentes hígidos esfoliados e cultivadas em placas de 24 poços (10^5 células/poço) 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 lipopolissacarídeos (LPS) 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 (40 mW/cm^2 e 80 mW/cm^2) nas doses de 0 (grupo controle), 4 J/cm^2 , 15 J/cm^2 e 30 J/cm^2 . Para a análise do metabolismo celular, número de células viáveis e morfologia celular, foram realizados os testes de MTT, Trypan Blue e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) respectivamente. Todas as avaliações foram realizadas 24 horas após a irradiação. Foram utilizados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$). Na presença de LPS, os parâmetros que apresentaram maior viabilidade com relação ao grupo controle foram 40 mW/cm^2 - 15 J/cm^2 e 80 mW/cm^2 - 30 J/cm^2 ($p < 0,05$). Adicionalmente, todos os parâmetros de irradiação apresentaram maior número de células viáveis quando comparados ao grupo não irradiado, com exceção do parâmetro de 80 mW/cm^2 - 30 J/cm^2 que não se diferiu do grupo controle ($p > 0,05$). Nas imagens em MEV, pôde-se observar células pulpares de aspecto normal, com formato fusiforme, recobrando a lamínula de vidro e com seus prolongamentos citoplasmáticos intactos. Concluiu-se que a fotobiomodulação de CPDDs estimuladas pelo LPS utilizando uma única irradiação com o LED infravermelho aumentou a viabilidade celular e o número de células viáveis, sem alteração da morfologia celular. Dentre as doses utilizadas, a irradiância de 15 J/cm^2 na potência de 40 mW/cm^2 foi a mais eficaz.

Palavras-chave: Polpa Dentária; Fotobiomodulação; Metabolismo Celular, Técnicas de Cultura.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effect of different energy doses and different powers of infrared LED (850 nm) on the metabolism and morphology of pulp cells from deciduous teeth (PCDT). Cells were obtained from 3 sound exfoliated teeth and seeded in 24-well plates (10^5 cells/well) using DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). After 24 hours, the production of inflammatory mediators was induced by the application of lipopolysaccharides (LPS) at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ of culture medium. Immediately after LPS application, cells were irradiated once (40 mW/cm^2 and 80 mW/cm^2) at doses of 0 (control group), 4 J/cm^2 , 15 J/cm^2 and 30 J/cm^2 . For analysis of cell metabolism, number of viable cells and cell morphology, MTT, Trypan Blue and Scanning Electron Microscopy (SEM) tests were performed, respectively. All assessments were performed 24 hours after irradiation. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney statistical tests were used ($p < 0.05$). In the presence of LPS, the parameters that presented greater viability compared to the control group were 40 mW/cm^2 -15 J/cm^2 and 80 mW/cm^2 -30 J/cm^2 ($p < 0.05$). Additionally, all irradiation parameters had greater number of viable cells when compared to the non-irradiated group, with the exception of the parameter of 80 mW/cm^2 -30 J/cm^2 which did not differ from the control group ($p > 0.05$). In the SEM images, pulp cells with a normal appearance could be observed, with a fusiform shape, covering the glass coverslip and with its cytoplasmic extensions intact. It was concluded that a photobiomodulation of LPS-stimulated PCDT using a single infrared LED irradiation increased cell viability and the number of viable cells, without changing cell morphology. Among the doses used, the irradiance of 15 J/cm^2 at the power of 40 mW/cm^2 was the most effective.

Keywords: Dental Pulp; Photobiomodulation; Cell Metabolism, Culture Techniques.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
METODOLOGIA.....	11
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

INTRODUÇÃO

Os efeitos da fototerapia de baixa potência com o laser ou LED têm sido investigados em diferentes áreas de saúde (Ballini *et al.*, 2015; Cotler *et al.*, 2016; Brassolatti *et al.*, 2016; Uloopi *et al.*, 2016; Peplow *et al.*, 2010;), incluindo a odontologia (Pires *et al.*, 2008; Holder *et al.*, 2012;). Com relação ao reparo do complexo dentino-pulpar, o principal mecanismo de ação desta terapia é a estimulação do metabolismo celular e reparo tecidual, favorecendo uma resposta mais efetiva e rápida do tecido quando exposto a uma agressão (Ferreira *et al.*, 2018).

Tem sido sugerido que a fotobiomodulação com LED vermelho e infravermelho pode auxiliar o reparo do tecido pulpar após a remoção da cárie dentária ou um trauma, modulando a inflamação e estimulando a deposição de matriz dentinária.

A cárie dentária não tratada em dentes permanentes afeta uma estimativa de 2,4 bilhões de pessoas em todo o mundo e 7,8% das crianças são afetadas durante a dentição decídua (Peres *et al.*, 2020). Além disso, o tratamento da doença cárie gera um custo em torno de \$ 297,67 bilhões em todo o mundo, impactando significativamente a economia global (Listl *et al.*, 2015). Tratamentos mais conservadores, como capeamento pulpar ou pulpectomia, seriam uma alternativa para reduzir gastos com tratamentos odontológicos mais invasivos e onerosos.

O traumatismo dentário é considerado um problema de saúde pública que muitas vezes acaba sendo negligenciado, tendo sua frequência aumentada na sociedade, apresentando maior incidência em crianças e adolescentes (Antunes *et al.*, 2011), com maior prevalência entre 2 e 3 anos de idade, quando a coordenação motora está em desenvolvimento (Nirwan, M. *et al.*, 2016).

O traumatismo dentário pode ocasionar perdas dentais irreparáveis em alguns casos, tanto no momento do acidente como do decorrer do tratamento ou até mesmo anos após. Dessa forma, esta condição pode criar sérios danos estéticos, psicológicos, sociais além de produzir significativos custos para a vítima do traumatismo. No caso de crianças, esses danos afetam também seus pais e o profissional que presta o atendimento, uma vez que a sua resolução adequada e "definitiva" nem sempre é simples e rápida (Antunes *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que, quando utilizados em parâmetros específicos de irradiação, o LED ou laser vermelho propiciam um aumento na proliferação de células da polpa humana (Ferreira *et al.*, 2006; Holder *et al.*, 2012; Turrioni *et al.*, 2015b) e modulam a produção de radicais livres em células pulpares (Turrioni *et al.*, 2021). Adicionalmente, a fototerapia com luz vermelha também foi capaz de formar tecido mineralizado, diminuir o infiltrado inflamatório e estimular a vascularização após exposição pulpar em molares de ratos (Ferreira *et al.*, 2006).

Com relação ao LED infravermelho, apesar dos dados encorajadores, onde se verificou a estimulação da produção de proteínas relacionadas à formação e mineralização da matriz dentinária (Turrioni *et al.*, 2014) e modulação do estresse oxidativo em células pulpares (Montoro *et al.*, 2014), ainda não se tem estabelecido uma curva dose-resposta deste tipo de irradiação sobre células pulpares. Ou seja, será que potências maiores do LED infravermelho poderiam ocasionar efeitos negativos às células pulpares?

Além disso, preocupações com os parâmetros de irradiação, erros de cálculo da dose e uso indevido da luz, impedem uma padronização do melhor parâmetro de irradiação a ser utilizado (Hopkins *et al.*, 2004; Stergioulas *et al.*, 2004; Aimbire *et al.*, 2006).

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi examinar o resultado de três doses de energia diferentes de LED 850 nm, aplicadas em duas doses de potência distintas, na viabilidade e morfologia de células do tecido pulpar de dentes decíduos.

METODOLOGIA

Dispositivo de irradiação

Foi utilizado o dispositivo LEDTable, elaborado na Universidade de São Paulo (USP), pelo grupo de Óptica (GO) do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC). Foram montados 24 diodos de InGan (nitreto de índio e gálio) dispostos de modo que, quando há ativação, de forma concomitante, cada um deles, irradie uma placa de cultura de células de 24 divisões (Figura 1).

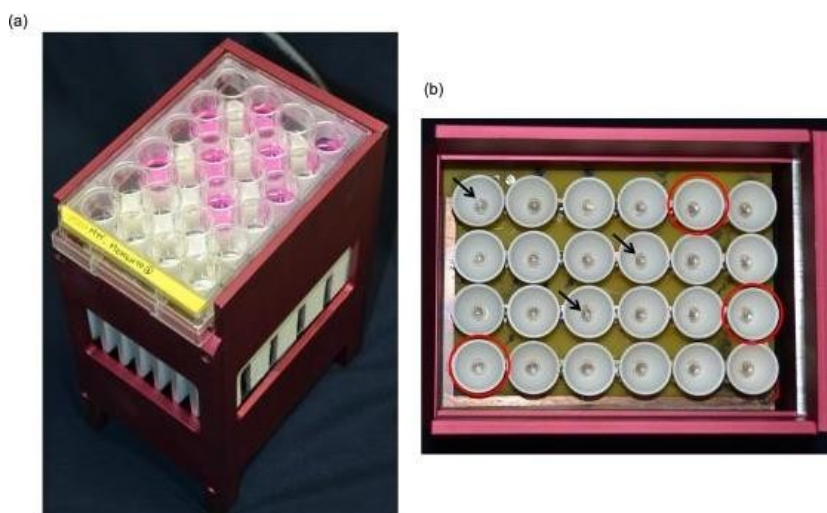


Figura 1. (a) Vista lateral do LEDTable onde uma placa de cultura estéril de 24 compartimentos foi posicionada. (b) Vista da parte superior do LADTable, onde podem ser observados os diodos (setas) acompanhado por colimadores (círculos vermelhos) posicionados para irradiar de forma homogênea cada compartimento da placa de acrílico.

Foram emitidas pelos LEDs doses de potência de $40\text{mW}/\text{cm}^2$ e $80\text{mW}/\text{cm}^2$, sendo que a dosagem da potência total de irradiação foi realizada observando a redução óptica em cada divisão devido ao acrílico (composição do fundo do compartimento). Com dados em mãos e levando em consideração a extensão de cada divisória, foram calculados os tempos de irradiação necessários para os parâmetros propostos no projeto de pesquisa (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais e controle de acordo com a exposição ao LPS e os parâmetros de irradiação utilizados.

Irradiância (mW/cm ²)	Dose de energia (J/cm ²)	Tempo de irradiação	LPS	
			-	+
40	4	3 min e 20 seg	G1 (controle)	G8 (experimental)
40	15	12 min e 30 seg	G2 (controle)	G9 (experimental)
40	30	25 min	G3 (controle)	G10 (experimental)
80	4	1 min e 40 seg	G4 (controle)	G11 (experimental)
80	15	6 min e 15 seg	G5 (controle)	G12 (experimental)
80	30	12 min e 30 seg	G6 (controle)	G13 (experimental)
0	0	-----	G7 (controle)	G14 (controle)

Obtenção e expansão das células pulpares

Três dentes decíduos hígidos e próximos à época de exfoliação foram obtidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) posteriormente à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU (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, aconteceu a extração da polpa do interior da câmara pulpar usando uma colher de dentina afiada e esterilizada. 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 1200rpm por 2 minutos. No fundo do tubo Falcon foi formando o *pellet*, que foi ressuspenso em meio basal. As células obtidas foram plaqueadas em frascos de 25cm² e incubadas por 4 dias a 37°C com 5% CO₂. A primeira substituição de meio de cultura aconteceu após o período de incubação e, a partir desta troca, o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana e quando em sub-confluência, foram realizados os repiques. Para

o protocolo experimental, células de 4^a à 6^a passagem foram utilizadas. A Figura 2 abaixo ilustra o processo de obtenção e expansão das células pulpareis.

A Figura 1 abaixo ilustra o processo de obtenção e expansão das células pulpareis.

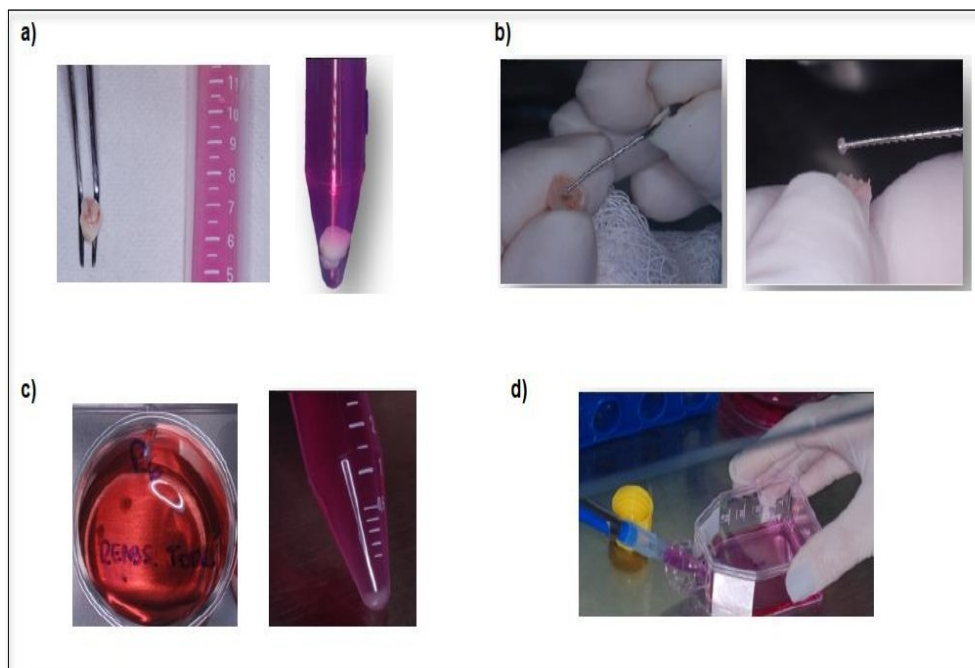


Figura 2. (a) Processo de obtenção e expansão das células pulpareis. (b) Remoção do tecido pulpar. (c) Células em contato com a solução de enzimas e pellet formado após digestão tecidual. (d) Células sendo plaqueadas na garrafa de 25 cm².

A Figura 3 abaixo ilustra o crescimento celular durante os dias de cultura.

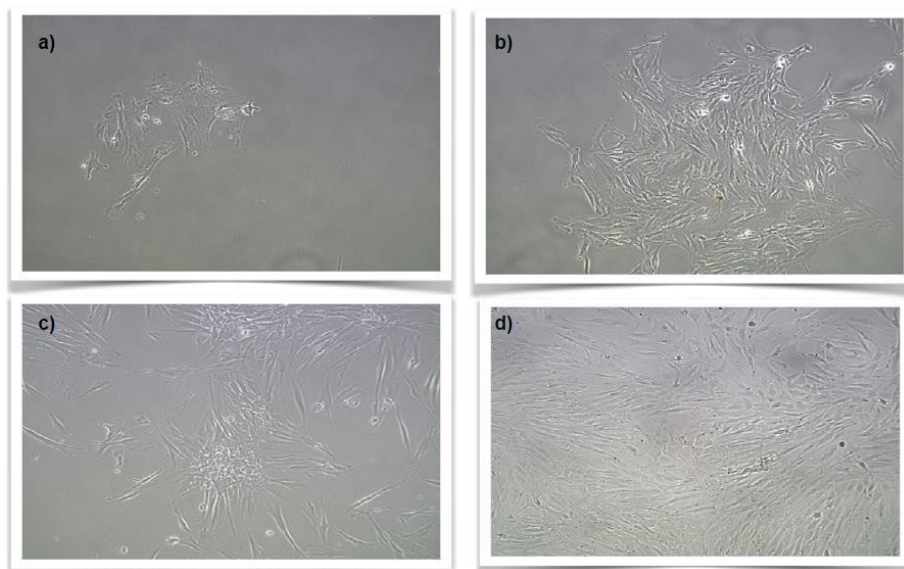


Figura 3: (a) Células inicialmente formando pequenos nichos. (b) Nichos celulares em crescimento. (c) Garrafa com 60% de confluência celular. (d) Garrafa com 90% de confluência celular.

Indução da produção de mediadores inflamatórios por LPS

As CPDDs foram semeadas (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, foram realizadas aplicação de LPS (LPS, Ultra- pure grade, Escherichia coli O111 : B4, InvitroGen, San Diego, CA, EUA) na concentração de 10µg/mL de meio de cultura, para a indução da formação de mediadores inflamatório. As células foram irradiadas (LED 850nm, 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.

Metabolismo celular – MTT

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para avaliação da atividade metabólica celular. O meio de cultura foi 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). O meio de cultura ficou 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.

A figura 4 abaixo ilustra as diferentes etapas do teste de MTT.

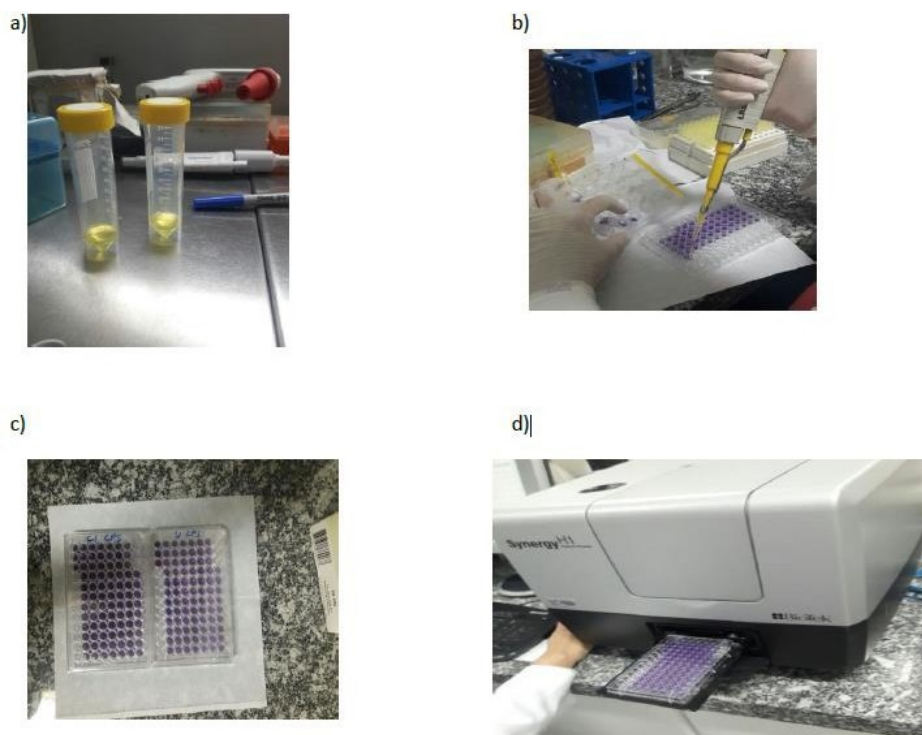


Figura 4: (a) Preparo da solução de MTT em tubo falcon de 50mL. (b) Adição de Isopropanol às amostras para diluição dos cristais de formazan. (c) Amostras após homogeneização. (d) Leitura das amostras em espectrofotômetro.

Número de células viáveis – Azul de Tripano

O número de células viáveis foi realizado utilizando o teste de Azul de Tripano (de Almeida et al., 2016). Após 24 horas da irradiação, o meio de cultura foi removido e as células tripsinizadas por meio da adição de 300 μ L de tripsina 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 10 minutos. Após este período, 50 μ L da suspensão de células e 50 μ L de 0,04% de solução azul de tripano (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 μ L de cada amostra foi transferido 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). Células não viáveis apresentaram o citoplasma corado em azul, devido à penetração do corante azul de tripano no interior das células que apresentaram ruptura da membrana plasmática. O número de células viáveis foi determinado subtraindo-se o número de células não viáveis do número total.

Morfologia celular em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células foram semeadas em lamínulas de vidro e, após o protocolo experimental, fixadas por 2 horas em glutaraldeído a 2,5% (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com 1mL de PBS no tempo de 5 minutos a cada lavagem e pós-fixadas por 60 minutos em 200 µL de tetróxido de ósmio 1% (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). As amostras foram desidratadas em soluções de etanol (30%, 50% e 70%, 2x 95% e 2x 100% - 30 minutos em cada solução), sendo submetidas à secagem por meio do solvente de baixa tensão superficial logo em seguida com 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS - ACROS Organics, Rutherford, NJ, EUA) e mantidas em dessecador durante 12 horas. Ao final, as amostras foram fixadas em "stubs", metalizadas com ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV, JEOL-JMS-T33A ScanningMicroscope, JEOL – EUA Inc., Peabody, MA, EUA). Os resultados foram apenas qualitativos das imagens das células.

RESULTADOS

Análise da viabilidade celular – MTT

A viabilidade celular das CPDDs, determinada pelo ensaio de MTT, é demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2: Análise da Viabilidade de células pulpareas (%), considerando aplicação de LPS e diferentes parametros de irradiação com LED infravermelho

	LPS -	LPS +
Controle	100,09 (95,13-103,20) Ba*	92,12 (89,89-93,57) Cb
40 mW,4 J/cm ²	80,99 (76,26-90,25) Da	82,44 (76,55-87,92) Da
40 mW,15 J /cm ²	131,05 (125,68-140,22) Aa	108,52 (104,26-111,42) Ab
40 mW, 30 J cm ²	101,21 (98,45-105,10) Ba	91,12 (86,63-93,45) Cb
80 mW, 4 J/cm ²	87,14 (82,60-90,77) Da	75,74 (73,53-79,23) Eb
80 mW, 15 J/cm ²	85,54 (82,55-88,07) Da	75,84 (69,99-81,57) Eb
80 mW, 30 J cm ²	93,09 (88,83-97,29) Ca	96,70 (91,30-98,73) Ba

*Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Ao comparar os grupos com e sem LPS, foi possível observar que, em todos os parâmetros de irradiação a presença de LPS promoveu uma diminuição do metabolismo com significância estatística ($p < 0,05$), com exceção dos parâmetros “40 mW,4J/cm²” e “80 mW, 30 J cm²”, onde a presença do LPS não exerceu efeito na viabilidade celular ($p > 0,05$).

Considerando os diferentes parâmetros de irradiação para uma mesma condição (com LPS ou sem LPS), pôde-se observar que na condição de ausência de LPS, o único parâmetro que apresentou maiores valores de viabilidade com diferença estatística em relação ao grupo controle foi “40mW,15J /cm²” ($p < 0,05$). O parâmetro “40 mW, 30 J cm²” não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Os demais parâmetros testados apresentaram valores de viabilidade estatisticamente menores quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Na presença de LPS, os parâmetros que apresentaram maior viabilidade com relação ao grupo controle foi “40mW,15J /cm²” e “80 mW, 30 J cm²” ($p < 0,05$). O parâmetro “40

mW, 30 J cm² não se diferiu estatisticamente do grupo controle (p<0,05), sendo que os demais parâmetros apresentaram menores valores de viabilidade quando comparados ao grupo controle (P<0,05).

Número de células viáveis – Azul de Tripano

A análise do número de células viáveis por Azul de Tripano, é demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3: Análise do número de células viáveis (%), considerando aplicação de LPS e diferentes parâmetros de irradiação com LED infravermelho

	LPS -	LPS +
Controle	100,88 (87,24-110,64) Fa*	72,35 (55,32-82,13) Db
40 mW, 4 J/cm ²	225,53 (175,16-344,68) Ba	280,85 (255,32-357,45) Aa
40 mW, 15 J/cm ²	174,47 (112,45-255,32) Da	155,43 (113,99-233,52) Ca
40 mW, 30 J/cm ²	297,87 (240,43-342,56) Aa	222,35 (142,55-261,70) Bb
80 mW, 4 J/cm ²	185,22 (113,19-285,11) Da	132,98 (115,48-152,66) Ca
80 mW, 15 J/cm ²	204,26 (144,68-300,00) Ca	116,60 (111,43-157,45) Cb
80 mW, 30 J/cm ²	117,13 (113,73-165,96) Ea	62,87 (36,17-82,98) Db

*Letras minúsculas permitem comparação nas linhas e letras maiúsculas permitem comparação nas colunas. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, p<0,05).

Comparando os grupos na presença ou ausência de LPS, foi possível observar que para os grupos “controle”, 40 mW, 30 J cm², 80 mW, 15 J/cm² e 80 mW, 30 J cm², a presença de LPS promoveu menor número de células viáveis (p<0,05). Para os demais parâmetros, o LPS não exerceu efeito para esta variável.

Comparando os diferentes parâmetros de irradiação para uma mesma condição (com LPS ou sem LPS), pôde-se observar que na condição de ausência de LPS, todos os parâmetros de irradiação apresentaram um maior número de células viáveis com relação ao grupo controle (p<0,05), sendo que o grupo 40 mW, 30 J cm² apresentou maior valor de número de células viáveis. Na presença de LPS, todos os parâmetros de irradiação apresentaram maior número de células viáveis quando comparados ao grupo controle, com exceção do parâmetro de 80 mW, 30 J cm² que não se diferiu do grupo controle (p>0,05). O parâmetro que apresentou maior número

de células viáveis foi 40 mW,4J/cm².

Análise morfológica (MEV)

A análise da morfologia celular obtida através de imagens representativas pelo uso de microscópio eletrônico de varredura, complementaram os testes de MTT e Azul de Tripano quanto a viabilidade celular e estão indicadas na Figura 5 (40mW/cm²) e (80 mW/cm²).

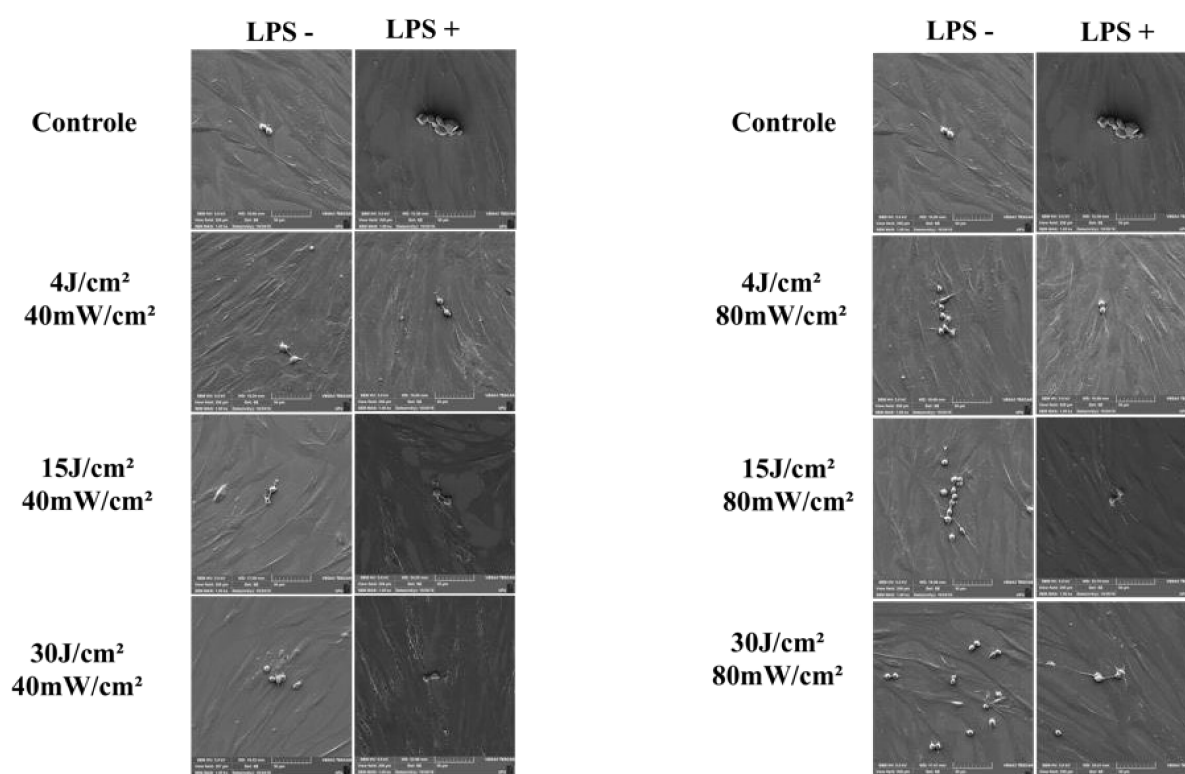


Figura 5: Imagens representativas da morfologia celular obtidas com microscopia eletrônica de varredura (MEV), considerando a presença ou ausência de LPS para as diferentes irradiâncias (40mW/cm² e 80 mW/cm² (aumento de 1000x). Observa-se células pulpares de aspecto normal, com prolongamentos citoplasmáticos intactos, recobrando a lamínula de vidro.

Para ambas as potências utilizadas (40 mW/cm² ou 80 mW/cm²), pôde-se observar células pulpares de aspecto normal, com formato fusiforme, recobrando a lamínula de vidro (L) e com seus prolongamentos citoplasmáticos (c) intactos. Foi possível registrar as células em mitose em todos os grupos e parâmetros de irradiação confirmando os resultados positivos sobre a viabilidade celular.

DISCUSSÃO

A fotobiomodulação do tecido pulpar por meio do LED tem mostrado resultados promissores em estudos *in vitro* e em animais, desenvolvidos com o objetivo de definir os melhores parâmetros de irradiação para bioestimulação da polpa dentária (Turrioni *et al.*, 2014, Montoro *et al.*, 2014, Oliveira *et al.*, 2011, Turrioni *et al.*, 2015, Turrioni *et al.*, 2017). Considerando o potencial dessa metodologia, no presente estudo, o uso do LED infravermelho foi avaliado em relação ao estímulo da viabilidade e morfologia de CPDDs, utilizando os parâmetros específicos: 4 J/cm², 15 J/cm² ou 30 J/cm² (40mW e 80mW/cm²).

Sabe-se que existe uma dose de energia ideal para qualquer aplicação específica da fotobiomodulação, denominada dose bifásica. Dessa forma, uma densidade de energia que seja menor que o valor ideal, determinará uma resposta terapêutica reduzida, enquanto uma densidade de energia aumentada pode levar a efeitos prejudiciais (Huang *et al.*, 2009). Nesse sentido, estudos anteriores mostram que baixos níveis de luz apresentam melhores efeitos quanto à estimulação e reparo tecidual do que níveis mais altos de luz (Hamblin *et al.*, 2011). Encontrar um parâmetro que apresente resultados positivos em todas as avaliações é fundamental para uma futura aplicação clínica dessa técnica. No presente estudo, os parâmetros de irradiação foram determinados a partir de estudos prévios onde os autores encontraram resultados positivos quanto a proliferação de células da dentina e polpa humana, assim como a modulação inflamatória de células pulpares submetidas a estímulo com LPS (Montoro *et al.*, 2014, Turrioni *et al.*, 2014, Turrioni *et al.*, 2015, Turrioni *et al.*, 2017).

Para os resultados da viabilidade celular foi observado que, todos os parâmetros de irradiação diminuíram a viabilidade, exceto as doses de 15 J/cm²-40mW/cm² que, independente da presença ou ausência de LPS, promoveu um aumento de 30% na viabilidade. O LPS induz respostas imunes, como proliferação e liberação de citocinas pró-inflamatórias. No presente estudo, o LPS foi aplicado com intuito de aproximar a realidade clínica quanto ao processo inflamatório decorrente de cárie ou até mesmo de um trauma dental. A principal via de sinalização do LPS é dada pelo receptor TLR4 (Hoshino *et al.*, 1999), responsável por ativar respostas imunes natas, desencadeando mecanismos de defesa do hospedeiro.

Ainda com a diminuição da viabilidade celular em alguns parâmetros de irradiação, sugere-se que a presença do LPS tenha estimulado a proliferação celular frente a agressão. A ação isolada da irradiação nos grupos sem LPS promoveu um aumento considerável de mais de 74% no número de células viáveis, exceto para o parâmetro de $30\text{J}/\text{cm}^2 - 80\text{mW}/\text{cm}^2$. Ainda que a presença do LPS tenha gerado uma diminuição de 28% no número de células viáveis, os parâmetros de irradiação conseguiram reverter este efeito sendo que as doses de 15 e $30\text{J}/\text{cm}^2 - 40\text{mW}/\text{cm}^2$ apresentaram efeitos positivos quanto a integridade celular ou proliferação.

Dentre os métodos empregados para medir as taxas de viabilidade celular, são amplamente utilizados os testes de exclusão de células mortas pelo Trypan Blue e o ensaio colorimétrico de MTT. Resumidamente, o princípio do teste de exclusão do azul de tripano consiste na penetração do corante nas membranas celulares danificadas, excluindo células com membranas funcionais (Strober, 2015).

Em relação ao ensaio de MTT, o reagente salino entra nas células por endocitose e é reduzido a cristais de formazan coloridos por mitocôndrias ativas (Mosmann, 1983). Em geral, os resultados do ensaio do Azul de Tripano mostraram aumento da viabilidade das células para todos os grupos experimentais em comparação com o controle.

No entanto, o aumento da viabilidade das células ocorreu apenas com parâmetros de irradiação específicos quando o ensaio de MTT foi empregado. Isso pode estar relacionado ao fato de que o primeiro teste avalia a viabilidade das células indiretamente. Pode-se sugerir que a viabilidade/atividade mitocondrial das células pode estar comprometida, mesmo observando a integridade de sua membrana. Talvez, o rompimento da membrana das células possa se reparar, tornando-as totalmente viáveis com o tempo (Strober, 2015). A combinação desses métodos permite a avaliação de princípios complementares para detectar qualquer possível efeito adverso e aumentar a validade dos resultados.

Diferentes tempos de avaliação para detectar a viabilidade das células pulpares após a fotobiomodulação usando LED infravermelho têm sido usados. Turrioni et al., 2015b avaliaram as células em dois tempos diferentes de pós-irradiação (12h e 72h) e encontraram maior viabilidade para 72h em comparação com 12h, para todos os parâmetros usados (850 nm , $40\text{ mW}/\text{cm}^2$, $2\text{ J}/\text{cm}^2$ a $30\text{ J}/\text{cm}^2$). Diferentemente, células MDPC-23 semelhantes a odontoblastos irradiadas com LED infravermelho (840 nm , $88\text{mW} / \text{cm}^2$, $4\text{ J}/\text{cm}^2$ e $25\text{ J}/\text{cm}^2$) através de uma barreira dentinária, mostraram metabolismo diminuído após 72 horas de irradiação (Turrioni et al. 2015b). Montoro et

al., 2014, assim como no estudo apresentado, avaliaram a viabilidade celular 24 horas após a irradiação (840 nm, 40 mW/cm², variando de 2 a 30 J/cm²) e não encontraram diferença entre os grupos controle e irradiados. Parece que os resultados para a viabilidade celular pulpar após fototerapia com LED infravermelho pode variar dependendo da irradiância utilizada e da presença da barreira dentinária. Considerando que o período de 24 horas é suficiente para que as células se adaptem ao meio de cultura e possibilitem a aquisição de respostas celulares (Marques *et al.* 2017), as avaliações no presente estudo foram realizadas 24 horas após o tratamento.

Os resultados da MEV permitiram complementar os encontrados no número de células viáveis e indicou que mesmo ocorrendo uma diminuição significativa sobre a viabilidade celular, não houve alteração morfológica em nenhum dos grupos demonstrando seu formato inalterado sendo possível observar até mesmo a ocorrência de mitoses.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam os efeitos benéficos da irradiação de baixa intensidade utilizando o LED infravermelho (850nm), sugerindo uma aplicabilidade clínica após a remoção de tecido cariado em cavidades médias a profundas, antes do protocolo restaurador ou em dentes traumatizados.

Futuramente, sugere-se a confecção de um aparelho semelhante a um dispositivo de fotopolimerização, onde o feixe de irradiação seja aplicado diretamente sobre a cavidade preparada. A efetiva utilização desse protocolo deve ser confirmada em estudo clínicos controlados para um segurança maior de utilização na clínica odontológica.

CONCLUSÃO

A fotobiomodulação de CPDDs estimuladas pelo LPS utilizando uma única irradiação com o LED infravermelho aumentou o número de células viáveis, sem alteração da morfologia celular. Dentre as doses utilizadas, a irradiância de $15\text{J}/\text{cm}^2$ na potência de $40\text{mW}/\text{cm}^2$ foi a mais eficaz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- A. Aderem, R.J. Ulevitch, **Toll-like receptors in the induction of the innate immune response**, Nature. (2000). doi:10.1038/35021228.
- 2- Aimbire F, Albertini R, Pacheco MTT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PSLM, Iversen VV, Martins L, Bjordal JM **Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of TNF α levels in acute inflammation**. Photomed LaserSurg. (2006) 24: 33-37
- 3- Antunes, Lívia Azeredo Alves; LEÃO, Anna Thereza; MAIA, Lucianne Cople. The impact of dental trauma on quality of life of children and adolescents: a critical review and measurement instruments. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S. l.], p. 3417-3424, 13 out. 2011.
- 4- Ballini A, Mastrangelo F, Gastaldi G, Tettamanti L, Bukvic N, Cantore S, Cocco T, Saini R, Desiate A, Gherlone E, Scacco S. **Osteogenic differentiation and gene expression of dental pulp stem cells under low-level laser irradiation: a good promise for tissue engineering**. **J BiolRegulHomeost Agents**. 2015 Oct-Dec;29(4):813-22.
- 5- Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, Retto Da Silva De Avó L, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA. **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. doi: 10.1002/jemt.22632.
- 6-Bonvicini, J.F.S., Basso, F.G., de Souza Costa, C.A. et al. **Photobiomodulation effect of red LED (630 nm) on the free radical levels produced by pulp cells under stress conditions**. Lasers Med Sci (2021). <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03309-x>
- 7- Cotler HB, Chow RT, Hamblin MR, Carroll J. **The Use of Low-Level Laser Therapy (LLLT) For Musculoskeletal Pain**. MOJ OrthopRheumatol. 2015;2(5). de Almeida LF, Basso FG, Turrioni AP, de-Souza-Costa CA, Hebling J. **Metabolic activity of odontoblast-like cells irradiated with blue LED (455 nm)**. Lasers Med Sci. 2016 Jan;31(1):119-25.
- 8- Ferreira ANS, Silveira S, Genovese WJ, Cavalcante de Araújo V, Frigo L, DE Mesquita RA, et al. **Effect of GaAlAs laser on reactionaldentinogenesis induction in human teeth**. Photomed Laser Surg 2006; 24: 358–65.

9- Ferreira, L. S., Diniz, I. M. A., Maranduba, C. M. S., Miyagi, S. P. H., Rodrigues, M. F. S. D., Moura-Netto, C., & Marques, M. M. **Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells.** *Lasers in Medical Science*. 2018. doi:10.1007/s10103-018-2637-z

10- 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.

11- 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; 91:961-6.

12- Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter DG. **Low level lasertherapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple blind, sham controlled study.** (2004). *J Athl Train* 39:226–229

13- K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, S. Akira, **Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product.**, (1999). *J. Immunol*.

14- Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W **Global economic impact of dental diseases.** *J Dent Res* 94(10):1355–1361. (2015) <https://doi.org/10.1177/0022034515602879>

15- M.R. Hamblin, Y.Y. Huang, S.K. Sharma, J. Carroll, **Biphasic dose response in low level light therapy - an update, Dose-Response.** (2011). doi:10.2203/dose-response.11-009.Hamblin.

16- MENDES, Anyssa Camila Belo; BORGES, Viviane Almeida **Traumatismo dentário em incisivos centrais superiores: incidência, danos e tratamento.** Anderson Lessa Siqueira. 2018. P. 1-17. Relato de caso. *Odontologia*. Universidade Tiradentes. Aracaju.

17- Montoro LA, Turrioni AP, Basso FG, de Souza Costa CA, Hebling J. **Infrared LED irradiation photobiomodulation of oxidative stress in human dental pulp cells.** *IntEndod J*. 2014 Aug;47(8):747-55.

18- NIRWAN, M. et al. **Awareness in Primary School Teachers regarding Traumatic Dental Injuries in Children and Their Emergency Management: A**

Survey in South Jaipur. Int J Clin Pediatr Dent, v. 9, n. 1, p. 62-6, 2016 Jan-Mar 2016. ISSN 0974- 7052.

19- Oliveira CF, Basso FG, Lins EC, et al. **In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells.** (2011). Laser Phys Lett 2: 155-163.

20- 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.

21- Peres MA, Daly B, Guarnizo-Herreño CC, Benzian H, Watt RG **Oral diseases: a global public health challenge** -(2020), authors' reply. Lancet 18;395(10219):186-187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32997-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32997-6).

22- Pires Oliveira DA, Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. **Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells.** Photomed Laser Surg 2008; 26:401-404.

23- S.L. Tomchuck, K.J. Zwezdaryk, S.B. Coffelt, R.S. Waterman, E.S. Danka, A.B. Scandurro, **Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses,** Stem Cells. (2008).

24- Stergioulas A **Low-level laser treatment can reduce edema in second degree ankle sprains.** (2004) J Clin Laser Med Surg 22:125– 128

25- Strober, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology A,** [S. l.], p. 50-62, 5 nov. 2015.

26- Turrioni AP (b), Montoro LA, Bas0so FG, de Almeida Lde 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.

27- Turrioni AP, Basso F, Alonso J, C. de Oliveira, J. Hebling, V. Bagnato, C. de Souza Costa, **Transdental Cell Photobiomodulation Using Different Wavelengths,** Oper. Dent. 40 (2014) 102–111.

28- Turrioni AP, Basso FG, Montoro L, Almeida LFD, Souza Costa CA de, Hebling J, **Transdental photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth,** Int. Endod. J. 50 (2017)

29- 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.

30- Y.Y. Huang, A.C.H. Chen, J.D. Carroll, M.R. Hamblin, **Biphasic dose response in low level lighththerapy,** Dose-Response. (2009).