



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



FABRINY BORGES SILVA MELO

**EFEITO DE DIFERENTES PARÂMETROS DO LED VERMELHO
NA VIABILIDADE E MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM CÉLULAS DO TECIDO PULPAR DE DENTES
DECÍDUOS**

UBERLÂNDIA

2017

FABRINY BORGES SILVA MELO

**EFEITO DE DIFERENTES PARÂMETROS DO LED VERMELHO
NA VIABILIDADE E MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM CÉLULAS DO TECIDO PULPAR 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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula
Turrión Hidalgo

UBERLÂNDIA

2017



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

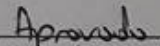
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A)
DISCENTE **Fabriny Borges Silva Melo** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia **10 de novembro de 2017**, 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) **Fabriny Borges Silva Melo**, COM O TÍTULO: - **"EFEITO DE DIFERENTES PARÂMETROS DO LED VERMELHO NA VIABILIDADE E MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DO TECIDO PULPAR 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 encontra-se 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.

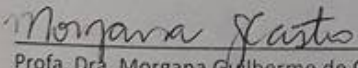
Uberlândia, 10 de novembro de 2017



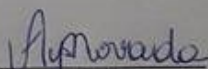
Profa. Dra. Ana Paula Turriani Hidalgo
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



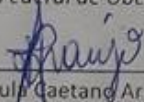
Aprovado/Reprovado



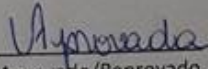
Profa. Dra. Morgana Guilherme de Castro
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



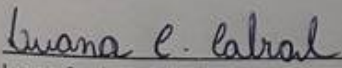
Aprovado/Reprovado



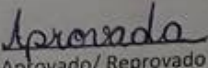
Profa. Dra. Paula Gaetano Araújo
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



Aprovado/Reprovado



Luana Cardoso Cabral
Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU



Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus por sempre me dar força para superar as dificuldades e por ter sempre guiado os meus passos durante essa longa jornada.

À minha orientadora, Ana Paula Turrioni Hidalgo, pela paciência e confiança em mim depositada e principalmente pelo total empenho e dedicação à elaboração deste trabalho, caso contrário nada disso seria possível.

Aos meus pais Fabio e Edivaine, agradeço por acreditarem em mim e sempre me incentivarem e me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos. Ao meu irmão, pelo companheirismo de sempre.

Aos meus colegas de sala, que estiveram junto a mim durante esses cinco anos de aprendizado, e principalmente aqueles que se tornaram meus amigos e segunda família durante todo esse tempo, agradeço a AAAMT (Associação Atlética Acadêmica Márcio Teixeira) por todos os momentos e todas as histórias que serão sempre lembradas com muito carinho e saudade.

Aos meus amigos, que mesmo a distância sempre fizeram de tudo para se manterem próximos.

E por fim, a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação por todos esses anos, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODO.....	9
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	15
CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	18
ANEXOS.....	21

Efeito de diferentes parâmetros do LED vermelho na viabilidade e modulação da produção de óxido nítrico em células do tecido pulpar de dentes decíduos

Effect of different parameters of the red LED on the viability and modulation of nitric oxide production by cells from pulp tissue of primary teeth

Fabriny Borges Silva **Melo**^{*}, Jéssica Fernanda Sena **Bonvincini**^{*}, Fernanda Gonçalves **Basso**^{**}, Carlos José **Soares**^{***}, Carlos Alberto **de Souza Costa**^{****}, Ana Paula **Turrioni**^{*****}

^{*} Alunas de Graduação, Faculdade de Odontologia, UFU- Universidade Federal de Uberlândia.

^{**} Mestre e Doutora em Estomatopatologia - Área de Patologia Bucal, Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP Univ - Estadual Paulista.

^{***} Mestre e Doutor em Clínica Odontológica - Área de Dentística, Departamento de Dentística Restauradora, Faculdade de Odontologia, UFU - Universidade Federal de Uberlândia.

^{****} Mestre e Doutor em Biologia e Patologia Buco-Dental, Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESPUniv - Estadual Paulista.

^{*****} Mestre e Doutora em Ciências Odontológicas – Área de Odontopediatria, Departamento de Odontologia Pediátrica, Faculdade de Odontologia, UFU – Universidade Federal de Uberlândia.

Autor correspondente

Ana Paula Turrioni

Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Departamento de Odontologia Pediátrica

Avenida Pará, s/n, Bloco 2G sala 02 - Campus Umuarama, CEP 38405-320

Tel: 34 3225-8146

e-mail: apturrioni@ufu.br

Efeito de diferentes parâmetros do LED vermelho na viabilidade e modulação da produção de óxido nítrico em células do tecido pulpar de dentes decíduos

Effect of different parameters of the red LED on the viability and modulation of nitric oxide production by cells from pulp tissue of primary teeth

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de diferentes parâmetros do LED vermelho na modulação do estresse oxidativo e viabilidade de células pulpares de dentes decíduos. Células obtidas de dois dentes hígidos esfoliados foram cultivadas (100.000 células/compartimento) utilizando meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, as células foram expostas ao LPS (10µg/mL) e submetidas a uma única irradiação (630nm, 40mW/cm² e 80 mW/cm²) nas doses de energia (DE) 0 (controle), 4, 15 e 30J/cm². Após 24 horas, a viabilidade e a quantificação de óxido nítrico (ON) foram avaliados por meio dos testes de MTT e reagente de Griess, respectivamente. Os dados foram analisados pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (nível de significância de 5%). Na presença de LPS, as DE de 15 e 30J/cm², na irradiância de 40mW/cm² e as DE de 4 e 15J/cm², na irradiância de 80mW/cm², aumentaram a viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (p<0,05). Além disso, na presença de LPS, a DE de 4 J/cm², na irradiância de 40 mW/cm² e as DE de 15 e 30J/cm², na irradiância de 80mW/cm² reduziram a produção de óxido nítrico pelas células pulpares quando comparado ao grupo não irradiado (p<0,05). Foi possível concluir que a densidade de energia de 15 J/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.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo, Fototerapia, Polpa Dentária

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different red LED parameters on cell viability and nitric oxide modulation by pulp cells from primary teeth. Cells obtained from two exfoliated healthy teeth were cultured (100,000 cells/compartment) using culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After 24 hours, the cells were exposed to LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) and submitted to a single irradiation (630 nm, 40 mW/cm^2 and 80 mW/cm^2) at the radiant exposure (RE) 0 (control), 4, 15 and 30 J/cm^2 . After 24 hours, the viability and quantification of nitric oxide (NO) were evaluated by the MTT Assay and Griess reagent tests, respectively. Data were analyzed by the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests (significance level of 5%). In the presence of LPS, the RE of 15 and 30 J/cm^2 , at the irradiance of 40 mW/cm^2 and the RE of 4 and 15 J/cm^2 , at the irradiance of 80 mW/cm^2 , increased the cell viability when compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, in the presence of LPS, the RE of 4 J/cm^2 at the irradiance of 40 mW/cm^2 and the RE of 15 and 30 J/cm^2 at the irradiance of 80 mW/cm^2 reduced the production of NO by the pulp cells when compared to the non-irradiated group ($p < 0.05$). It was possible to conclude that the radiant exposure of 15 J/cm^2 and irradiance of 80 mW/cm^2 was the most effective irradiation parameter to stimulate and modulate oxidative stress in pulp cells from deciduous teeth.

Key-words: Oxidative Stress, Phototherapy, Dental Pulp

INTRODUÇÃO

A utilização de fontes luminosas como forma de terapia é um ramo da saúde que tem ganhado destaque nos últimos anos, sendo que seu uso vem aumentando consideravelmente ^{1,2}. Dentre as fontes existentes, estão os diodos emissores de luz (LED), que se têm apresentado com uma opção eficiente para a fototerapia de diversos tecidos, incluindo o tecido pulpar.³⁻⁷

Quando utilizada em padrões determinados, a irradiação com LED ou laser infravermelho e vermelho pode propiciar o aumento da proliferação de células da polpa de dentes humanos ^{6,8}, de células pulpares de roedores ⁵ e células odontoblastóides ^{4,9}. Além disso, a expressão e a formação de proteínas relacionadas com a produção de dentina também podem ser estimuladas após o uso destas fontes de luz ^{4,8}. A fototerapia também é capaz de formar tecido mineralizado, diminuir o infiltrado inflamatório e estimular a vascularização após exposição pulpar em molares de ratos ³. 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 o comprometimento da circulação sanguínea e linfática do dente, já que a chegada e saída dos vasos acontecem pelo forame apical ^{10,11}. Dentre os diversos produtos que participam do processo inflamatório, o radical livre Óxido Nítrico (ON), produzido pela enzima ON sintetase, é um componente importante produzido após a injúria tecidual e tem o poder de danificar células saudáveis dos tecidos ¹². Assim, o ON e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), que são moléculas instáveis, precisam ser moduladas.

Mesmo tendo o conhecimento de que a luz emitida pelo LED infravermelho é capaz de reduzir as concentrações de ON e ERO em células pulpares expostas ao LPS ⁷, 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 escassas. Não existem informações a respeito dos parâmetros de irradiação e doses que podem ser benéficas ou nocivas ao tecido

pulpar 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 ^{5,9} ser de fácil uso e ser uma fonte luminosa de baixo custo, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação de diferentes parâmetros do LED 630nm (vermelho) na viabilidade e modulação da produção de óxido nítrico em células do tecido pulpar de dentes decíduos.

MATERIAL E MÉTODO

Aprovação do Projeto pelo CEP

O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia sob o número de protocolo CAAE 54488816.2.0000.5152.

Obtenção e manutenção das células pulpares

Células de dois dentes decíduos hígidos e próximos ao período de esfoliação foram utilizadas para os experimentos. Os dentes, após a extração, foram colocados dentro de um tubo Falcon com meio de cultura e instantaneamente levados ao laboratório para a extração da polpa, utilizando uma colher de dentina afiada e previamente esterilizada. O tecido pulpar foi mergulhado por 1 h, à temperatura de 37 °C, em solução contendo 3 mg/mL de collagenase 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*, que posteriormente foi ressuspendido em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*- DMEM (Sigma-Aldrich). As células obtidas foram plaqueadas em frascos de 25cm² e incubadas por 4 dias a 37°C com 5% CO₂¹³. 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. As células foram expandidas até a 4^a passagem e congeladas para posterior realização do protocolo experimental. A Figura 1 ilustra o processo de obtenção e expansão das células pulpares.

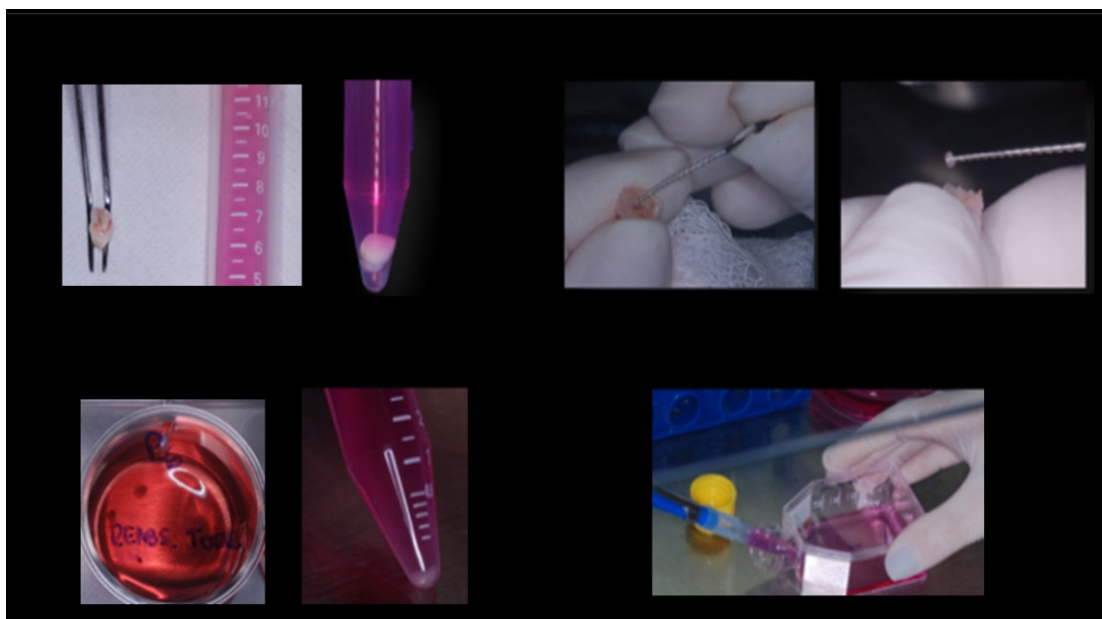


FIGURA 1 (a, b, c, e d): Processo de obtenção e expansão das células pulpare. a) Dente decíduo logo após a extração – Dente em DMEM sem SFB, b) Remoção do tecido pulpar c) células em contato com a solução de enzimas e pellet formado após digestão tecidual, d) células sendo plaqueadas na garrafa de 25 cm².

Indução da produção de mediadores inflamatórios por LPS

As células pulpare de dentes decíduos (CPDDs) foram semeadas (10^5 células/compartimento) em placas de 24 compartimentos (CostarCorp., Cambridge, MA, EUA), utilizando DMEM (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 10µg/mL de meio de cultura, para a indução da formação de mediadores inflamatórios. As células foram irradiadas (LED 630nm, 40 mW/cm² e 80 mW/cm²) nas doses 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 estão indicados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Tempos de irradiação utilizados para cada dose de energia

Potência	Dose de energia	Tempo de irradiação
40 mW/cm ²	4 J/cm ²	3 min 20 s
	15 J/cm ²	12 min 30 s
	30 J/cm ²	25 min
80 mW/cm ²	4 J/cm ²	1 min 40 s
	15 J/cm ²	6 min 15 s
	30 J/cm ²	12 min 30 s

Testes

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 desidrogenasesuccínica 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 2 ilustra as diferentes etapas do teste de MTT.

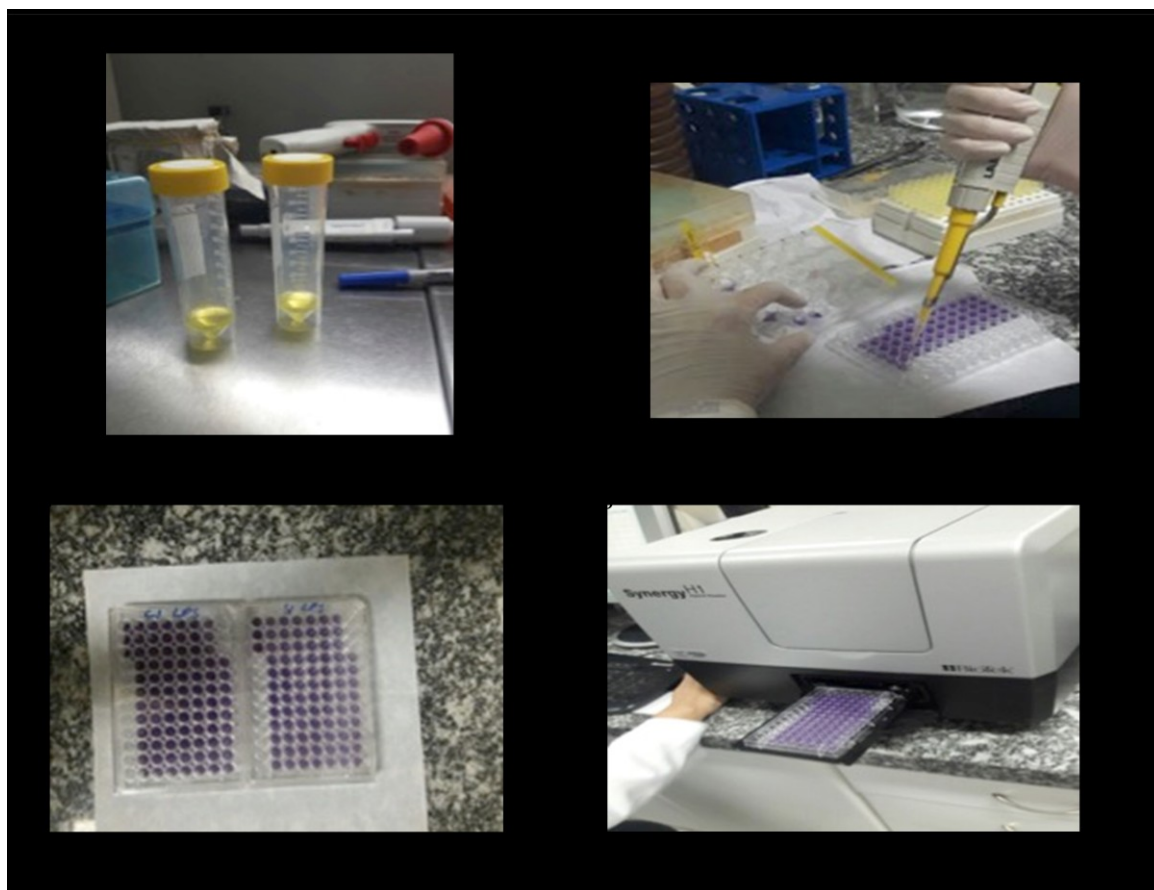


FIGURA 2 (a,b,c e d): Diferentes etapas do teste de MTT. **a)** Preparo da solução de MTT em tubo falcon de 50mL, **b)** Adição de Isopropanol às amostras para diluição dos cristais de formazan, **c)** Amostras após homogeneização, **d)** Leitura das amostras em espectrofotômetro.

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 diazotização 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 100 μ L do sobrenadante de cada amostra (em triplicata) e 100 μ L 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.

RESULTADOS

Avaliação da viabilidade celular (MTT)

Os resultados da viabilidade celular apresentada pelas células pulpaes de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo podem ser observados no Gráfico 1 abaixo.

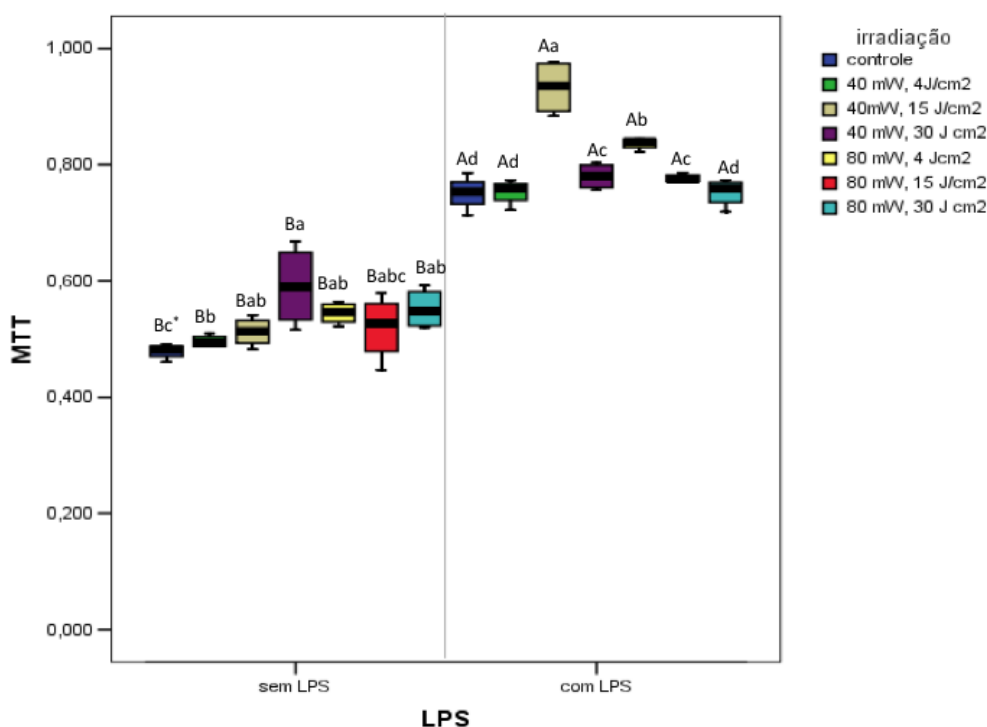


GRÁFICO 1: Viabilidade celular (MTT) apresentada pelas células pulpaes de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo.

* 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 ($p < 0,05$), $n = 8$.

Quando comparamos os grupos “com LPS” e “sem LPS” para cada parâmetro de irradiação, observamos que todas 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/cm^2 , na potência de 40 mW/cm^2 se destacou das demais. Na presença de LPS, os parâmetros: $40 \text{ mW/cm}^2, 15 \text{ J/cm}^2$; $40 \text{ mW/cm}^2, 30 \text{ J/cm}^2$; $80 \text{ mW/cm}^2, 4 \text{ J/cm}^2$ e $80 \text{ mW/cm}^2, 15 \text{ J/cm}^2$ apresentaram maior viabilidade celular quando comparado ao grupo controle (não irradiado), com significância estatística ($p < 0,05$). Sendo que a dose de energia de 15 J/cm^2 , na potência de 40 mW/cm^2 apresentou os melhores resultados.

Quantificação de óxido nítrico (reagente de Griess)

Os resultados da produção de óxido nítrico pelas células pulpares de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo podem ser observados no Gráfico 2 abaixo.

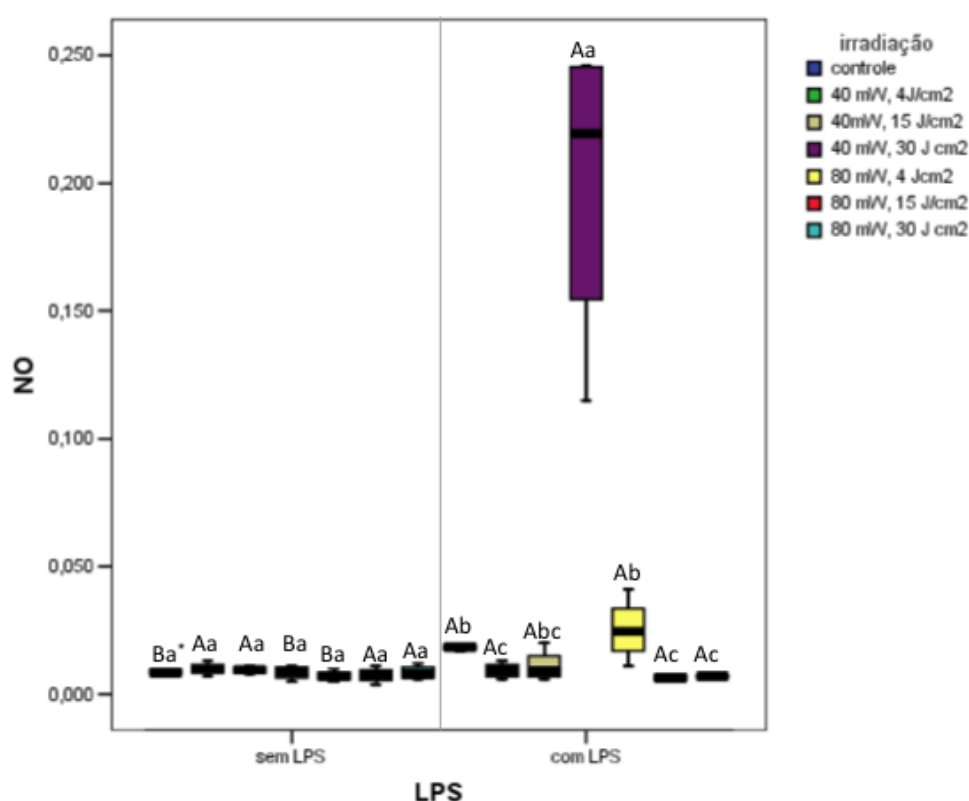


GRÁFICO 2: Produção de óxido nítrico pelas células pulpares de dentes decíduos, considerando presença de LPS e os diferentes parâmetros de irradiação utilizados no estudo.

* 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 ($p < 0,05$), $n=8$.

Quando comparamos os grupos “com LPS” e “sem LPS” para cada parâmetro de irradiação, observamos que os grupos “controle”, “30J/cm² - 40mW/cm²” e “4 J/cm²-80mW/cm²” apresentaram maior produção de óxido nítrico na presença de LPS quando comparado com os mesmos parâmetros de irradiação na ausência de LPS ($p < 0,05$). Tais doses parecem ter potencializado a ação do LPS, causando aumento de NO, com destaque para a dose de 30 J/cm², na potência de 40 mW/cm². As doses de 4 e 15 J/cm², na potência de 40 mW/cm², e as doses de 15 e 30 J/cm², na potência de 80 mW/cm² apresentaram as mesmas concentrações de NO observadas nos grupos de suas respectivas doses de energia sem LPS ($p > 0,05$), o que pode indicar um efeito modulador da luz sobre a produção de NO induzida por LPS.

Ao compararmos os diferentes parâmetros de irradiação, dentro de uma mesma condição, foi observado que, na ausência de LPS, nenhum parâmetro de irradiação apresentou maior produção de óxido nítrico quando comparado ao grupo controle (não irradiado) ($p > 0,05$). Na presença de LPS, o parâmetro 30 J/cm²-40 mW/cm² apresentou maior produção de óxido nítrico quando comparado ao grupo controle (não irradiado), com significância estatística ($p < 0,05$). Sendo que a dose de 4 J/cm² na potência de 40 mW/cm² e as doses de energia de 15 e 30 J/cm², na potência de 80mW/cm² apresentaram menores valores de produção de óxido nítrico quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

O interesse a respeito dos efeitos da irradiação sobre o tecido pulpar tem 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^{3,5,6,14-17}. Além de parâmetros de irradiação capazes de promover o restabelecimento 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, no metabolismo e modulação de óxido nítrico por células pulpares submetidas a estímulo com LPS.

Os resultados de MTT demonstraram que as células expostas ao LPS apresentaram maior metabolismo 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 o metabolismo das células presentes na amostra. Clinicamente o estímulo seria compatível a uma pulpíte reversível, onde não ocorre morte de odontoblastos e o tecido se esforça para reverter o quadro de inflamação¹⁸.

Com relação a ação da irradiação sobre o metabolismo 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^{5, 7, 8, 19}. Na presença de LPS, os parâmetros 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 comparado ao grupo controle, sendo que a dose de energia de 15J/cm², na potência de 40mW/cm² apresentou os melhores resultados. No estudo⁷, as células pulpares foram expostas a um protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo. Os autores encontraram que todas as doses testadas promoveram aumento do metabolismo celular, na ausência de LPS. Já na presença de LPS, não houve aumento significativo do metabolismo. 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. Estudos têm demonstrado a relação da fototerapia com a produção de ON, por meio do estímulo de vias que ativam a enzima ON sintase^{5,13,20,21}. Alguns estudos 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)⁵. O ON pode exercer efeito pró-inflamatório ou anti-inflamatório, dependendo de sua concentração no tecido¹³. Durante a inflamação ou estresse celular, altos níveis de NO impedem a atividade da citocromo c oxidase, limitando a capacidade de reparo do tecido²². Além disso, enzimas pró-apoptóticas

podem ser ativadas, levando a morte celular²³. Em concentrações moderadas, o ON pode apresentar efeitos positivos como efeito vasodilatador durante a primeira resposta vascular à inflamação²⁴, efeito estimulante na expressão de citosinas²⁵, ou no estímulo a diferenciação celular⁵. Portanto, a manutenção de ON em concentrações moderadas, que não causem danos ao tecido, após a fototerapia, torna-se importante.

O presente estudo indicou que as doses de 4 e 15 J/cm², na potência de 40 mW/cm², e as doses de 15 e 30 J/cm², na potência de 80 mW/cm² apresentaram as mesmas concentrações de ON observadas nos grupos de suas respectivas doses de energia sem LPS ($p>0,05$), o que pode indicar um efeito modulador da luz sobre a produção de ON induzida por LPS. Montoro et al. (2014), assim como no presente estudo, observaram que a dose de 15 J/cm² na potência de 40 mW/cm² foi a mais efetiva para a modulação de ON após irradiação infravermelha de células pulpares. 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 irradiação²⁶.

CONCLUSÃO

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.

De acordo com os parâmetros utilizados no estudo, foi possível concluir que a densidade de energia de 15 J/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.

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; 10(4): e0123833-47.
- 2 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 Clin Diagn Res*. 2016;10(1): ZC67-70.
- 3 Ferreira ANS, Silveira S, Genovese WJ, Cavalcante de Araújo V, Frigo L, DE Mesquita RA, et al. Effect of GaAlAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24 (3): 358–5.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Turrioni AP, Montoro LA, Basso 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;26(4):409-15.
- 9 Turrioni AP, Basso FG, Alonso JR, de Oliveira CF, Hebling J, Bagnato VS, de Souza Costa CA. Transdental cell photobiomodulation using different wavelengths. *Oper Dent*. 2015;40(1):102-11.
- 10 Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010; 36 (5):781-9.

- 11 Bletsa 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;15;573(Pt 1):225-36.
- 12 Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases.* 2001; 7 (1), 2–10.
- 13 Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97 (25):13625-30.
- 14 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;29(4):813-22.
- 15 Marques NC, Neto NL, Rodini Cde 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;30(7):1815-22.
- 16 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;31(3):523-30.
- 17 Turrioni AP, Basso FG, Montoro LA, Almeida LFD, de Souza Costa CA, Hebling J. Transdermal photobiostimulation of stem cells from human exfoliated primary teeth. *Int Endod J.* 2017;50(6):549-559.
- 18 Coll JA, Seale NS, Vargas K, Marghalani AA, Al Shamali S, Graham L. Primary Tooth Vital Pulp Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Dent.* 2017. 15;39(1):16-123.
- 19 Almeida LF, 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;27(4):375-80.
- 20 Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose response*; 2009. 7 (4):358-83.
- 21 Mowbray M, 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;129(4):834-42.

- 22 Karu TI. Multiple roles of cytochrome C oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010; 62 (8):607-610.
- 23 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*. 2000;1459(2-3):405-12
- 24 Liew FY, Cox FE. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today*. 1991; 12 (13): 17–21.
- 25 Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizons*. 1995; 3 (1): 2–32.
- 26 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; 31(4):789-809.

ANEXOS

ANEXO1 –Regras de formatação do artigo segundo periódico em que o artigo será submetido (ROBRAC)

Robrac REVISTA ODONTOLÓGICA DO BRASIL-CENTRAL

ABC ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA SEÇÃO DE GOIÁS

CAPA SOBRE ACESSO CADASTRO PESQUISA ATUAL

ANTERIORES NOTÍCIAS

Capa > Sobre a revista > **Submissões**

SUBMISSÕES

- » Submissões Online
- » Diretrizes para Autores
- » Declaração de Direito Autoral
- » Política de Privacidade

SUBMISSÕES ONLINE

Já possui um login/senha de acesso à revista Revista Odontológica do Brasil Central?
[ACESSO](#)

Não tem login/senha?
[ACESSE A PÁGINA DE CADASTRO](#)

O cadastro no sistema e posterior acesso, por meio de login e senha, são obrigatórios para a submissão de trabalhos, bem como para acompanhar o processo editorial em curso.

DIRETRIZES PARA AUTORES

DIRETRIZES PARA AUTORES

ESCOPO

A ROBRAC, órgão trimestral, destina-se à publicação de pesquisa básica e aplicada, artigos de divulgação e de atualização que representem contribuição efetiva para a área do conhecimento odontológico. Não são aceitas revisões de literatura, exceto em caráter excepcional, mediante convite do Editor.

NORMAS GERAIS

Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida sua apresentação simultânea em outro periódico. A ROBRAC reserva-se os direitos autorais do trabalho publicado, inclusive de tradução, permitido, entretanto, sua posterior reprodução como transcrição, desde que com a devida citação de fonte.

A ROBRAC receberá para publicação trabalhos redigidos em português ou inglês, ficando os textos dos mesmos sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do Editor-Chefe ou Corpo Editorial.

A ROBRAC reserva o direito de submeter todos os originais à apreciação do Corpo Editorial, que dispõe de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto. Os artigos que não se enquadrarem nas normas da revista serão devolvidos aos autores, antes de serem submetidos aos Consultores Científicos. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se também, perante os relatores, os nomes dos autores.

Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos ou animais, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos, devendo ter o consentimento por escrito do paciente e aprovado pela Comissão de Ética da Unidade.

A revista endossa os princípios incorporados na Declaração de Helsinki e insiste que todas as pesquisas que envolvam seres humanos, e que sejam publicadas na revista, sejam conduzidas em conformidade com esses princípios e que tenham aprovação nos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa das respectivas instituições de origem dos autores. O editor e seus associados se reservam o direito de recusar artigos que não demonstrem uma

Ajuda do sistema

USUÁRIO

Login

Senha

☐ Lembrar usuário

IDIOMA

Português (Brasil)

CONTEÚDO DA REVISTA

Pesquisa

Todos

Procurar

Por Edição

Por Autor

Por título

Outras revistas

INFORMAÇÕES

Para leitores

Para Autores

Para Bibliotecários

evidencia clara de que esses princípios foram seguidos ou que, ao julgamento dos mesmos, os métodos empregados não foram apropriados para o uso de humanos ou animais nos trabalhos submetidos à revista.

SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

Os manuscritos deverão ser submetidos eletronicamente pelo endereço www.robrac.org.br; seguindo os seguintes passos:

PASSO 1. INICIAR SUBMISSÃO

- Confirmação das condições de submissão.
- Ler e concordar com a declaração de direito autoral.

PASSO 2. METADADOS DA SUBMISSÃO (INDEXAÇÃO)

- Incluir todos os autores do artigo com respectivos dados pessoais.
- Na janela "Resumo da Biografia", incluir o resumo do currículo.
- O título deve ser preenchido de forma idêntica ao apresentado nos arquivos texto.
- O resumo deve estar estruturado: objetivo, material e método, resultados e conclusões. Deve conter o máximo de 250 palavras e ser em parágrafo único. Não deve incluir citações Bibliográficas.

PASSO 3. TRANSFERÊNCIA DO MANUSCRITO

- O **Documento de Submissão** se refere ao **Arquivo Texto** do artigo.

*Importante: O Documento de Submissão / Arquivo Texto não deve conter os nomes ou dados pessoais dos autores.

O arquivo texto deve conter as seguintes partes:

-Título

Em português e inglês, não devendo haver qualquer informação que possa identificar os autores.

-Resumo e *Abstract*

Conforme explicado no passo 2 - METADADOS DA SUBMISSÃO.

-Palavras-chave/ *Keywords*

Indicar um mínimo de 3 (três) e um máximo de 7 (sete) palavras logo após o resumo ou *abstract*. Identificam o conteúdo do artigo, e para determiná-las, consultar o "DECS - Descritores em Ciência da Saúde", disponível no endereço (<http://decs.bvs.br>).

-Texto

O texto deverá apresentar Introdução, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

-Introdução

Devem ser citadas apenas as referências pertinentes, resumindo a proposta do estudo e estabelecendo a hipótese do trabalho.

-Material e Método

Devem ser relatados em detalhes, tornando o trabalho reproduzível e permitindo a confirmação dos resultados. Métodos publicados devem ser referenciados. Após a primeira menção dos produtos ou equipamentos, incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes. Indicar métodos estatísticos utilizados.

-Resultados

Enfatizar somente as observações importantes. Valorizar apresentação dos resultados na forma de tabelas, gráficos e ilustrações. As tabelas devem ser colocadas após as referências bibliográficas;

*Importante: As figuras deverão ser submetidas como arquivos suplementares (não devem ser inseridas no corpo do arquivo texto);

-Discussão

-Destacar os aspectos importantes e inéditos do estudo e as conclusões resultantes. Relatar observações de outros estudos relevantes e implicações e limitações de seus achados. Não repetir em detalhes informações citadas na introdução ou resultados.

-Conclusões

-Definir, dentro do que foi proposto ao trabalho, os achados relevantes do estudo.

-Referências

As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto. Deverão seguir o Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver, JAMA, 1997;277:927-34. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com Index Medicus/Base de Dados MEDLINE, sem negrito, itálico ou grifo. Referência a comunicação pessoal, trabalhos em andamento e submetidos a publicação não deverão constar da listagem de referências. Citar apenas as referências de relevância para o estudo.

Exemplos de referências

-Livros

Estrela C. Metodologia científica: ciência, ensino e pesquisa. São Paulo: Artes Médicas; 2005. 794 p.

-Capítulos de livros

Alencar Jr. FGP, Batista AUD, Oliva EA. Dores neuropáticas. In: Alencar Jr. FGP. Oclusão, dores orofaciais e cefaléia. São Paulo: Ed. Santos; 2005. p. 133-46.

-Monografia, dissertações e teses

Rocha SS. Efeito da concentração do líquido especial e da temperatura do molde de revestimentos na desadaptação marginal de coroas fundidas em titânio [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2005.

-Artigos de periódicos

Adabo GL, Zanarotti E, Fonseca RG, Cruz CAS. Effect of disinfectant agents on dimensional stability of elastomeric materials. J Prosthet Dent. 1999; 81 (5): 621-4.

-Volume com suplemento, número especial

Leles CR, Compagnoni MA, Souza RF. Study of complete denture movement related to mucosa displacement in edentulous patients. [abstract 848]. J Dent Res. 2002; 81(special issue): B-133.

-Trabalho em congresso ou similar

Pereira CM, Correa MEP, Costa FF, Souza CA, Almeida OP, Castro MLRB. Investigação do Herpes humano 6 em fluidos bucais de pacientes portadores de doença do enxerto contra o hospedeiro crônico. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Estomatologia; 2004 jul. 18-22; Cabo Frio (RJ). Rio de Janeiro: SOBE; 2004. p. 44.

OBS.: Publicações e/ou documentos com até seis autores, citam-se todos; acima de seis autores, citam-se os seis primeiros seguidos da expressão "*et al.*"

-Citação no texto

Utilizar sistema numérico único para todo o documento, em algarismo arábico, na forma sobrescrita; números sequenciais - separar por hífen; números aleatórios - separar por vírgula; Citar nome do autor seguido do número de referência somente quando estritamente necessário. Caracteres de pontuação como "pontos" e "vírgulas" deverão ser colocados depois da citação numérica dos autores. No caso de dois autores, devem ser separados por e. Mais de dois autores, indicar apenas o sobrenome do primeiro seguido de *et al.*

Exemplos:

De acordo com Rocha¹⁵ (2004), é prudente que se aguardem estudos longitudinais...

Para Fonseca e Cruz¹³ (2005) a escolha de um material...

Ferreira *et al.*²² (2003) destacaram que apesar do...

PASSO 4. TRANSFERÊNCIA DE DOCUMENTOS SUPLEMENTARES

São documentos suplementares:

- **Arquivo de identificação dos autores**, que deve conter: 1- título em português e inglês; 2- nomes completos dos autores, incluindo principal titulação e nome do departamento e da instituição aos quais são filiados; 3- endereço para correspondência,

incluindo email, do autor responsável pelo artigo;

- **Figuras, Gráficos, esquemas e demais ilustrações.**

PASSO 5. CONFIRMAÇÃO

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. O preenchimento dos metadados de todos os autores do manuscrito foi realizado, assim como o preenchimento dos campos Título e Resumo (o resumo deverá ser estruturado: objetivo, material e método, resultados e conclusões).
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, fonte arial 11 e espaço 1,5. As tabelas estão inseridas ao final do texto, e as figuras como arquivos suplementares (formato .jpg, .tif ou .gif).
4. O arquivo de identificação do autores está em documento separado do corpo do manuscrito, e será enviado como arquivo suplementar.

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Transferência de direitos

Considerando a aceitação do trabalho acima descrito. Nós, os autores, transferimos para a revista Robrac, todos os direitos, título e interesse nos direitos autorais do artigo mencionado acima. Este documento se aplica a todas as traduções do mesmo, assim como a apresentação preliminar, sob quaisquer meio de divulgação, do trabalho aceito e ainda não publicado. Se alguma mudança na autoria (ordem, acréscimo ou eliminação) ocorrer após a submissão do trabalho, um documento de concordância de todos os autores deve ser enviado para ser mantido nos arquivos do editor. O nome de um autor (a) somente poderá ser removido mediante solicitação do (a) mesmo (a);

Responsabilidade dos autores

Eu atesto que: - o trabalho é original e não contém dados falsificados, plagiados ou fraudulentos; - o trabalho não se encontra atualmente em apreciação, e nem será submetido para publicação em outro periódico, até que uma decisão final de não aceitação seja emitida por esta revista; - fiz uma contribuição científica significativa para o trabalho e estou familiarizado com os dados originais descritos no mesmo; - assumo a responsabilidade pelo conteúdo completo da versão final que foi submetida, entendendo que, se o trabalho ou parte dele for considerada deficiente ou fraudulenta, assumirei a responsabilidade junto com os autores.

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 1981-3708

ANEXO 2- 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 decíduos
Pesquisador Responsável: Ana Paula Turioni Hidalgo
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 54488816.2.0000.5152
Submetido em: 23/08/2016
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_682505