



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara

CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE AS
CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES**

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Araraquara
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Oliveira, Camila Fávero de.

Efeito direto do laser de baixa intensidade sobre as células odontoblastóides / Camila Fávero de Oliveira. – Araraquara: [s.n.], 2008.

95f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora : Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

1. Terapia a laser de baixa intensidade
2. Odontoblastos
3. Lasers. I. Título

CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE AS
CÉLULAS ODONTOBLASTÓIDES**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

2º Examinador: Profa. Dra. Rosane Lizarelli

3º Examinador: Prof. Dr. Claudio Miguel da Costa Neto

DADOS CURRICULARES

CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA

NASCIMENTO	14 de Julho de 1983 – São Paulo/SP
FILIAÇÃO	Antonio Carlos Oliva de Oliveira Maria Helena Fávero de Oliveira
2001/2004	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2005/2006	Estágio de Atualização na Disciplina de Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2002/2005	Estágio de Atualização na Disciplina de Cirurgia e Traumatologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006/2008	Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria. Nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

DEDICO ESSA DISSERTAÇÃO ...

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação,
Abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito boa para ser insignificante.”*
(Charles Chaplin)

À DEUS,

por fazer parte de mim, me auxiliando e fortalecendo nos momentos necessários, sendo a luz guia e protetora nas incertezas e a força na decisão. O crescimento verdadeiro só é conquistado em sua presença.

AOS MEUS QUERIDOS PAIS,

por toda uma vida de dedicação sem esforços ou medidas. Presentes não apenas nos sonhos, mas também nas lutas e principalmente nas conquistas. Uma presença essencial, visto que são as forças que nunca faltam, o ar que motiva, a alegria que fortalece e a vida que busca. Amor é pouco para definir tudo o que sinto por essas duas pessoas que são meus exemplos, minhas verdades e minha vida. O incentivo adotado com todo seu amor permitiu-me chegar até aqui..... e certamente alcançar vãos maiores.

AO AMADO IRMÃO,

por completar minha existência ensinando o verdadeiro sentido de amar. Sua paciência dedicada, seu apoio e suporte emocional foram essenciais para mais uma vitória. Obrigada por ser tão solícito em todas as minhas dificuldades, mesmo quando essas são apenas gramaticais. Simplesmente... te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....

“Não existe um caminho lógico que nos conduza às grandes leis do Universo. Elas só podem ser atingidas por meio de intuições baseadas em algo semelhante a um amor intelectual pelos objetos da experiência.” (Albert Einstein)

Ao mestre e amigo **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, pela paciência desafiadora em me orientar não apenas na pesquisa, mas também no crescimento pessoal e profissional. Suas atitudes refletem o profissional determinado e batalhador ao qual aprendi a admirar e a respeitar. Sua dedicação e motivação foram essenciais para me auxiliar nessa conquista tão importante e tão singela.

Um mestre para toda a vida.....

As minhas doces professorinhas **Tia Jô e Tia Elisa**, muitos momentos divididos e diversos ensinamentos compartilhados. Agradeço por toda a força e apoio ao longo desses anos, um carinho de mãe que muitas vezes foi determinante para traçar soluções.

Aos meus queridos **Tio Thomé e Tia Irene**, por me aceitarem como uma filha e cuidarem tão carinhosamente de mim, todos esses anos. A vida com vocês tornou-se mais preenchida em Araraquara. Respeito, admiração e amor refletem o que sinto por vocês!

Aos meus amigos, em especial ao **Matheus, Danilo, Bárbara, Júlia, Maíra, Mirna, Carla, Viviane e Sérgio**, um sentimento mágico e sincero. Por toda uma história traçada e conquistada ao longo desses anos....., muitas risadas, lágrimas, vitórias e desafios divididos e outros mais a serem compartilhados... Amigos de verdade existem!!! O sucesso também é de vocês!

A doce e meiga **Marina** e ao **Pde. Marcos** pessoas que me ensinam um novo caminho para vida, as quais em pouco tempo aprendi a amar.

Aos **Padrinho** (in memorian) e **madrinha** queridos tanto amor dedicado, todos os colos e beijos trocados..... A saudade fica, mas o carinho reina e torna a distancia irrisória em momento tão especiais..... Nossa ligação é divina e nosso amor está muito além desse mundo. Seus ensinamentos me auxiliaram a chegar até aqui!

A **Tia Marli**, um amor especial e diferente....., agradeço não a tia mas a amiga companheira que preenche minha existência. Seus ensinamentos e sua tolerância são importantes no trilhar da caminhada.

Aos **meus tios**, pelo carinho e apoio dedicados em todos esses anos, muitas risadas e verdades surgiram nessa convivência.

Aos **meus avós** (in memorian), uma presença espiritual em todos os momentos da minha vida, de onde estiverem sei que intercedem por mim.....

Ao **Adriano** pela força e incentivo principalmente nas etapas finais, sua amizade foi determinante. A **Nancy** pelas diversas aventuras, pelos finais de semana enfiados nos estudos, pela atenção e amizade descoberta e respeita nesse curto tempo. Ao **Kina** pelo suporte psicológico, sua amizade é para uma vida.

À **Cristiane** uma amizade verdadeira construída diariamente com muito carinho e respeito. Sua paciência foi essencial nessa etapa, mas sua amizade mostrou o quanto se pode ser feliz quando se tem amigos..... Obrigada por todo seu carinho!!!

À **Vovo Bruna, Tio João, Tia Arlete** (in memorian), **Claúdia e Paulo** por me apoiarem sempre, sendo para mim uma segunda família. Meu amor por vocês é imenso. Claúdia meus passos seguiram o caminho que você muitas vezes me ensinou..... Obrigada por tudo!!!!

AGRADECIMENTOS.....

“A gente não faz amigo
reconhece-os”

Vinicius de Moraes

À Faculdade de Odontologia de Araraquara –UNESP, nas pessoas da ex-diretora **Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio** e atual diretor **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla**.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria, pelos ensinamentos e motivações. Ao **Prof. Dr. Fábio César Braga de Abreu-e-Lima** pela convivência e ensinamento durante o estágio e ao **Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani** pelos conselhos e discussões cirúrgicas e de vida pessoal.

À minha turma do mestrado, **Laine, Indri, Hérica e Ana**, a convivência fortaleceu os traços de amizade, apesar das desavenças ou tropeços a vitória é única e sincera..... Cada uma aprendeu a respeitar os limites alheio, espero que o tempo não apague essa conquista.

Ao **Pedro Paulo Chaves de Souza** que foi essencial não apenas na parte experimental desse projeto, mas como um amigo que soube me ensinar o valor da vida acadêmica.

Aos amigos da pós-graduação **Junia, Murilo, Érica, Luciana, Jonas, Hermes, Fábio, Fernanda, Andreza, Micheli, Simone, Cármem, Juliana, Marcela, Juliana, Débora e Fabiano**, todo momento dividido promoveu o surgimento de uma lembrança sincera e verdadeira.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria **Soninha, D. Odete, Dulce, Cristina, Tânia, Pedrinho, Totó e Celinha** pela ajuda e colaboração diária.

À minha turma do CEPOF, **Merê, Orlando, Didi, Lili** essa amizade surgiu sem compromisso..... os desafios exigiram a convivência e essa rendeu frutos, vocês

fazem parte de uma turminha chamada amigos. Orlando e Mere obrigada pela paciência e auxílio no desenvolvimento do meu sonho.

A **Profa. Dra. Rosane de Fátima Zanirato Lizarelli** que acreditou em mim, me apoiou e hoje olhe aonde chegamos..... Obrigada por me guiar nos desafios, me incentivar nas incertezas e por ser uma amiga.

Aos co-orientadores **Prof. Dr. Vanderlei Bagnato e Cristina Kurachi** com muita paciência vocês me mostram como é possível traçar sonhos e conquistá-los. O aprendizado é diverso, a admiração magnífica e o carinho eterno. Obrigada por comporem meu quadro de mestres.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Miguel da Costa Neto** pelo carinho e atenção dedicados no frequentar do seu laboratório. Meu crescimento pessoal foi incrementado por seus conselhos

À turminha do Laboratório **Ana Paula, Flávia, Nancy, Adriano, Kina, Fernanda, Andreza, Flávia Coimbra, Carmem, Fernanda, Joyce e Lígia** uma nova família que com muito respeito aprendeu a conviver e respeitar as doideras de cada um.

A querida **Juliana Pirola**, pela paciência em ensinar repetidamente os mistérios da química e socorrendo sempre que preciso nas técnicas do laboratório. Sua amizade é auxílio nos momentos de dificuldade....

Aos **funcionários**, em especial à **Silvana, e professores do Departamento de Fisiologia e Patologia** por me receberem tão carinhosa e por me apoiarem em todas as dificuldades auxiliando com suas palavras e conhecimentos.

Aos amigos vigias e da portaria da faculdade **Eliezer, Euclides, Gea, Guiomar, Luis, Marta, Noêmia, Nunes, Rodrigo e Denilson** pelas horas de conversa, cuidados e preocupações principalmente quando a noite virava dia, essa amizade preenchia a ausência da família.

Aos funcionários da pós-graduação, **Rosângela, Alexandre, Flávia** e em especial a **Mara** com seu jeito meigo e carinhoso sempre me ajudando a resolver os

problemas mais impossíveis. Mesmo que você não saiba tenho um carinho muito grande por ti.

A todos os funcionários da Biblioteca que me auxiliaram desde a graduação, em especial a *Ceres* e a *Maria Helena*, pelas correções na tese. A amizade de vocês torna o ambiente mais prazeroso.

Aos funcionários da cirurgia, em especial ao *Toninho*, por me defender e me apoiar em tudo. Horas de conversa..... naqueles cafezinhos da cozinha ou na salinha dos prontuários.

Aos funcionários da manutenção, da triagem, esterilização e emergência pelos socorros prestados, amizade e carinho dedicados nesses anos.

À todos os professores da Faculdade por me orientarem na formação profissional, me incentivarem no cuidado aos outros e me mostrarem o tratamento holístico.

A *Profa. Dra. Regina* pelos conselhos e orações e a grande *Malu* e ao *Claúdião* uma amizade conquistada para sempre.

Ao *Miguel* que desde a graduação me incentiva e mesmo de longe continua a ser meu grande maninho.

Principalmente a *Fapesp* por visabilizar economicamente a execução desse projeto e desse meu sonho.

A TODOS QUE FIZERAM PARTE DA MINHA VIDA POR UM LONGO OU
CURTO PERÍODO DE TEMPO, PELOS QUE ME APOIARAM E ME
INCENTIVARAM MEU SINCERO OBRIGADO.....

A Estrela Verde

“Haviam milhões de estrelas no céu. Estrelas de todas as cores, brancas, prateadas, verde, douradas, vermelhas e azuis. Um dia, elas procuraram Deus e Lhes disseram:

- Senhor Deus, gostaríamos de viver na Terra entre os Homens.

- Assim será feito, respondeu o Senhor. Conservarei todas pequeninas como são vistas e podem descer para a Terra.

Conta-se que naquela noite, houve uma linda chuva de estrelas. Algumas se aninharam nas torres das igrejas, outras foram brincar de correr com os vagalumes nos campos, outras misturaram-se com os brinquedos das crianças e a Terra ficou maravilhosamente iluminada.

Porém, passando o tempo as estrelas resolveram abandonar os homens e voltar para o céu deixando a Terra escura e triste.

- Porque voltaram? Perguntou Deus à medida que elas chegavam até ao céu.

- Senhor, não nos foi possível permanecer na Terra. Lá existe muita miséria e violência, muita maldade e injustiça.

E o Senhor Deus disse: - Claro! O lugar de vocês é aqui no céu. A Terra é o lugar transitório, daquilo que passa, cai, que erra, que morre, nada é perfeito. O céu é lugar da perfeição, do imutável, do eterno, onde nada perece.

Depois que chegaram todas as estrelas e conferindo seu número, Deus falou de novo:

- Mas está faltando uma estrela! Perdeu-se no caminho?

Um anjo que estava perto retrucou: - Não Senhor, uma estrela resolveu ficar entre os homens. Ela descobriu que seu lugar é exatamente onde existe a imperfeição, onde há limites, onde as coisas não vão bem, onde há luta e dor.

- Mas que estrela é essa? Voltou Deus a perguntar?

É a estrela verde senhor, a única desta cor. E quando olharam para a Terra, ela já não estava mais sozinha. A Terra novamente iluminada porque havia uma estrela verde no coração de cada pessoa. Porque o único sentimento que o homem tem e Deus não têm é a *Esperança*.

Deus já conhece o futuro, e a “esperança” é própria da pessoa humana. Própria daquele que erra, que não é perfeito e que não sabe como será o futuro.

Que cada Homem saiba receber sua estrelinha verde em seu coração, ou seja, a esperança, não deixando que ela fuja, nem se apague. Essa estrelinha iluminará o coração e o caminho.

Deus não prometeu dias sem dor, risos sem sofrimento, sol sem chuva. Ele prometeu força para o dia, conforto para as lágrimas e luz para o caminho. “

Autor Desconhecido.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
3 PROPOSIÇÃO	50
4 MATERIAL E MÉTODO	52
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	84
8 REFERÊNCIAS	86

Oliveira CF. Efeito direto do laser de baixa intensidade sobre as células odontoblastóides. [dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

O laser de baixa intensidade, também conhecido como laser terapêutico, tem sido recomendado para uma variedade de procedimentos clínicos, dentre eles o tratamento da hipersensibilidade dentinária. Pesquisas *in vivo*, onde dentes foram tratados com laser, demonstraram aumento na síntese de matriz de dentina e menor intensidade na reação inflamatória pulpar. Entretanto, o mecanismo que rege este processo permanece desconhecido. Mediante ao exposto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar, *in vitro*, o metabolismo (MTT assay), expressão de fosfatase alcalina e síntese de proteínas quando células de linhagem odontoblástica MDPC-23 foram submetidas à irradiação com laser de baixa intensidade. A expressão dos genes que codificam para colágeno tipo-1 (Col-I) e fibronectina (FN) foi analisada por meio de RT-PCR. Para isto, células foram previamente cultivadas em placas de Petri (15.000 células/cm²) e submetidas a condições de estresse pelo período de 12 horas. Subseqüentemente, 6 aplicações do laser em parâmetros específicos foram realizadas em intervalos de 12 horas. Como grupo controle foi utilizado células não irradiadas. Tanto os valores do MTT quanto os níveis de proteína total não apresentaram valores estatisticamente diferentes daqueles observados para o grupo controle. Em contrapartida, as células irradiadas reduziram sua atividade de fosfatase alcalina. Os resultados de RT-PCR demonstraram haver uma tendência à redução específica, porém não estatística, na

expressão dos genes avaliados após irradiação das células. Desta maneira, foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que os parâmetros do laser de baixa intensidade utilizados na presente pesquisa não influenciaram o metabolismo celular, porém reduziram discretamente a expressão de algumas proteínas específicas.

PALAVRAS – CHAVE: Terapia a laser de baixa intensidade; odontoblastos; lasers.

Oliveira CF. Effect of low-level laser irradiation on odontoblast-like cells. [dissertação de mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

Low-level laser therapy (LLLT), also referred to as therapeutic laser, has been recommended for a wide array of clinical procedures, among which the treatment of dentinal hypersensitivity. In vivo studies in which teeth were treated with LLLT have demonstrated an increase in dentin matrix synthesis and lower intensity of pulp inflammatory reaction. However, the mechanism that guides this process remains unknown. Therefore, the objective of this study was to evaluate in vitro the effects of LLL irradiation on cell metabolism (MTT assay), alkaline phosphatase (ALP) expression and total protein synthesis. The expression of genes that encode for collagen type-1 (Col-I) and fibronectin (FN) was analyzed by RT-PCR. For such purposes, odontoblast-like cell line (MDPC-23) was previously cultured in Petri dishes (15,000 cells/cm²) and submitted to stress conditions during 12 h. Thereafter, 6 applications with a monochromatic near infrared radiation (GaAlAs) set at predetermined parameters were performed at 12-h intervals. Non-irradiated cells served as a control group. Neither the MTT values nor the total protein levels of the irradiated group differed significantly from those of the control group (Mann-Whitney test; $p > 0.05$). On the other hand, the irradiated cells showed a decrease in ALP activity (Mann-Whitney test; $p < 0.05$). RT-PCR results demonstrated a trend to a specific reduction in gene expression after cell irradiation, though not significant statistically (Mann-Whitney test; $p > 0.05$). It may be concluded that, under the tested conditions, the

LLLT parameters used in the present study did not influence cell metabolism, but reduced slightly the expression of some specific proteins.

KEY WORDS: Low level laser therapy; odontoblast-like cells; lasers.



1 INTRODUÇÃO

A hipersensibilidade dentinária é uma condição sintomática comum na clínica odontológica e que causa muito desconforto ao paciente e pode resultar em inflamação pulpar (Pashley⁶¹, 1990, Dababenh et al.¹⁸, 1999, Schwarz et al.⁶⁷, 2002). Tal patologia é caracterizada como uma dor transitória a partir da dentina exposta, em resposta a estímulos térmicos, táteis ou químicos (Friedmann et al.²², 1991, Dababenh et al.¹⁸, 1999). Qualquer local de dentina exposta pode exibir tal acometimento, localizando-se, em geral, na região vestibulo cervical de caninos e pré-molares. A etiologia da exposição dentinária é considerada multifatorial envolvendo incorreta escovação, recessão gengival, dieta inapropriada (Tate et al.⁷⁰, 2006) bem como forças oclusais excêntricas (Kimura et al.⁴², 2000). A prevalência varia de 10% a 20%, dependendo do estudo e da população.

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar o mecanismo da hipersensibilidade dentinária, porém, nenhuma delas conduz a um perfeito entendimento de como os estímulos aplicados na superfície de uma dentina sensível são transmitidos para a polpa (Dababenh et al.¹⁸, 1999). Todavia, três teorias têm sido sugeridas para explicar este fenômeno: das Terminações Nervosas, Odontoblástica e Hidrodinâmica. Esta última tem sido a mais aceita pela comunidade científica (Banfield et al.⁵, 2004), foi proposta por Brännström⁶ (1986), e sugere que os movimentos de deslocamento atípico dos fluídos dentinários ou do conteúdo dos túbulos ocorrem em resposta ao estímulo tátil, térmico, químico ou osmótico (Dababenh et al.¹⁸, 1999). O rápido deslocamento do fluído no sentido da polpa ou em sentido contrário promove alterações na pressão intrapulpar e a conseqüente estimulação das terminações nervosas,

causando dor. Em geral, os tratamentos visam obliterar os túbulos dentinários para reduzir a movimentação do fluido dentinário (Kimura et al.⁴², 2000). Dentre eles, pode-se citar: aplicação tópica de substâncias químicas na superfície da dentina (monofluorofosfato de sódio, fluoreto de sódio, oxalato de potássio), uso de dentifrícios contendo substâncias ativas (SrCl₂, Na₂, PO₃F, SnF₂); impregnação de material restaurador na dentina exposta (West et al.⁷⁶, 1998, Dababenh et al.¹⁸, 1999), laser de baixa intensidade (Villa et al.⁷⁴, 2007).

O tratamento ideal da hipersensibilidade deve ser indolor, de fácil aplicação, com ação rápida e efetiva por um longo período, sem ser irritante para os tecidos pulpares ou induzir efeitos colaterais (Ciaramicoli et al.¹¹, 2003). Recentemente, a aplicação do laser para o tratamento da hipersensibilidade dentinária tem sido muito pesquisada (Kimura et al.⁴¹, 2000, Schwarz et al.⁶⁷, 2002, Ciaramicoli et al.¹¹, 2003). O efeito bioestimulante do laser de baixa intensidade sobre odontoblastos resulta em neoformação dentinária, através da produção de matriz de dentina reacional (Dababenh et al.¹⁸, 1999). Além disso, existe um efeito analgésico concomitante, devido à liberação da endorfina na sinapse das terminações nervosas localizadas nos túbulos dentinários (Coombe et al.¹³, 2001).

O laser interage com diferentes tipos de tecido, causando diversas reações. Muitas pesquisas têm demonstrado que a foto-estimulação pelo laser de baixa intensidade (LLLT) além de aumentar na síntese de ATP (Lubart et al.⁵⁰, 1992), resulta em efeito analgésico (Karu et al.^{31, 33}, 1987, 1995) e estímulo da divisão celular (Kikuchi et al.³⁹, 1996), acelerando o processo de cura tecidual (Koutná et

al.⁴³, 2003), Alguns tipos específicos de laser apresentam também capacidade de estimulação da síntese e deposição de matriz de colágeno por fibroblastos (Nara et al.⁵⁹, 1992, Romanos et al.⁶⁵, 1995, Reddy et al.⁶⁴, 1998), aumento na atividade mitocondrial, no metabolismo (Colls¹², 1986, Karu et al.³², 1996) e na proliferação celular (Koutná et al.⁴³, 2003). Também foi demonstrado que o laser induz uma reação foto-química, ou seja, há uma indução direta na síntese de enzimas pela ação primária da luz nas mitocôndrias (Karu et al.^{30,31}, 1995, 2005). Entretanto o potencial de penetração no tecido é dependente do comprimento de onda, ou seja, enquanto a luz vermelha é transmitida através da camada celular, o infra-vermelho próximo tem a capacidade de penetrar profundamente no tecido e estimular as funções celulares (Parker⁶⁰, 2007). As alterações no potencial de membrana causadas pela energia de fótons no infra-vermelho próximo induzem a efeitos foto-físicos e foto-elétricos (MacDougall et al.⁵¹, 1995), resultando em choque entre células, o que é traduzido, intracelularmente, por um aumento na síntese de ATP (Karu et al.³¹, 1995).

A janela terapêutica específica para cada tipo de célula ainda não foi determinada (Coombe et al.¹³, 2001, Almeida-Lopes et al.², 2001) e dessa maneira, diversos estudos in vitro têm sido desenvolvidos. O laser visível promove uma proliferação do crescimento celular em culturas de fibroblastos (Almeida-Lopes et al.², 2001, Pereira et al.⁶², 2002) e um aumento dos níveis de ATP mitocondrial e da adesão celular em células do tipo tumoral (HeLa) (Karu et al.^{30,31,32}, 1995, 1996, 2005).

A irradiação com o laser infravermelho em culturas diversas tais como, queratinócitos, células endoteliais, osteoblastos e de mucosa de hamsters induz à proliferação celular (Grossman et al.²³, 1998, Khadra et al.^{36,37}, 2005, Moore et al.⁵⁶, 2005), diferenciação (Aihara et al.¹, 2006), aumento na síntese de DNA (Yamada et al.⁷⁷, 1991) e de proteínas ósseas (Hamajima et al.²⁴, 2003, Khadra et al.³⁵, 2005, Stein et al.⁶⁹, 2005), além da formação de tecido ósseo com ausência de danos genotóxicos ou mesmo citotóxicos (Kujawa et al.⁴⁶, 2004).

Em estudo in vivo, a aplicação do laser infravermelho em molares de rato induziu a formação de dentina terciária, sem causar danos significantes ao tecido pulpar (Tate et al.⁷⁰, 2006). Em humanos a aplicação do laser vermelho sobre dentina do assoalho cavitário causou bioestimulação dos odontoblastos, resultando em aumento na síntese de colágeno tipo III, tenastina e fibronectina (Ferreira et al.²⁰, 2006).

O mecanismo de resposta dessas células odontoblásticas, em nível molecular, frente à irradiação com o laser, ainda permanece indefinido (Khadra et al.^{35,36}, 2005). Com a finalidade de observar e entender o metabolismo das células secretoras de matriz extracelular (ECM) na presença de substâncias sintéticas, biológicas ou estímulos externos, alguns pesquisadores desenvolveram modelos de estudo in vitro que mimetizam o funcionamento de tais células em situações fisiológicas (MacDougall et al.⁵¹, 1995, Kikuchi et al.³⁹, 1996, Hanks et al.²⁵, 1998). Destes modelos experimentais, os que têm maior reprodutibilidade de resultados e maior facilidade de manipulação são os de células odontoblastóides imortalizadas mantidas em cultura. Algumas linhagens estabelecidas deste tipo de

Introdução

célula estão sendo efetivamente descritas na literatura (MacDougall et al.⁵¹, 1995, Costa et al.¹⁶, 1999, He et al.²⁶, 2004, Aihara et al.¹, 2006). Todas estas linhagens apresentam evidências científicas de síntese de proteínas típicas dos odontoblastos, tais como sialoproteína e fosfoforina da dentina, e que está diretamente associada à alta atividade de fosfatase alcalina e síntese de proteínas da matriz de dentina (particularmente colágeno tipo I). Desta maneira, assim como todas as linhagens de células com fenótipo de odontoblastos disponíveis atualmente, a linhagem imortalizada MDPC-23 também apresenta características que permitem uma avaliação detalhada do efeito de fatores estimulantes (tal como o laser de baixa intensidade e proteínas bioativas), que podem sobre-regular sua atividade sintética e secretora. Estas células odontoblastóides MDPC-23 estabelecidas por Hanks et al.²⁵ em 1998, foram determinadas como sendo uma linhagem imortalizada proveniente da papila dentária do molar de camundongo (Mouse Dental Papillae Cells), as quais apresentam características semelhantes às células odontoblásticas in vivo, tais como alta atividade de fosfatase alcalina, formação de múltiplos nódulos e crescimento em multicamadas celulares, bem como a expressão de sialoproteína e fosfoforina (Hanks et al.²⁵, 1998). Tais células têm sido alvo de intensas pesquisas para avaliação do metabolismo quando colocadas em diferentes situações de estímulo biológico ou de estresse (Costa et al.^{14,15,16,17}, 1999, 2003, 2003, 2007, He et al.²⁶, 2004, Aranha et al.⁴, 2006, Souza et al.⁶⁸, 2006). Assim, baseado nos conhecimentos acima descritos, pode-se sugerir que os odontoblastos que revestem internamente a dentina relacionada com a área de exposição dos túbulos ao ambiente externo (área de

Introdução

hipersensibilidade dentinária), estejam em condições contínuas de estresse químico (produtos bacterianos e outros) e/ou mecânico (movimentação do fluido dentinário dentro dos túbulos). Desta forma, os resultados clínicos positivos, relatados através da aplicação da laserterapia, poderiam estar relacionados com o estímulo transdentinário destes odontoblastos, os quais passariam a participar efetivamente do processo de reparo tecidual, através da síntese e expressão de algumas proteínas específicas da matriz dentinária, resultando em esclerose dos túbulos e/ou deposição de dentina terciária reacional intrapulpar. Tem sido demonstrada a real propagação do laser através da dentina, a qual ocorre por dispersão da luz através da microestrutura dos túbulos dentinários (Kienle et al.³⁸, 2006). Todavia, os dados científicos que caracterizam a propagação transdentinária do laser e sua relação com a redução da hipersensibilidade dentinária através do aumento na atividade metabólica dos odontoblastos ainda não foram demonstrados. Assim, torna-se necessário, neste momento, determinar os parâmetros e técnicas de bioestimulação direta de células de linhagem odontoblástica, para posteriormente estudar, através de pesquisas com câmaras pulpares artificiais, ou mesmo em dentes in vivo, a possível atividade transdentinária do laser.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ação do laser de baixa intensidade

Desde que o laser foi desenvolvido, vários pesquisadores têm estudado suas possibilidades de aplicação na área da saúde, sendo que especial atenção tem sido dispensada para a Odontologia. Segundo Parker⁶⁰ (2007), o primeiro laser foi desenvolvido por Mester e colaboradores, em 1960, mas as primeiras pesquisas com o laser na área Odontológica tiveram início apenas quatro anos depois (Kimura et al.⁴¹, 2000). Entretanto, a utilização dessa nova tecnologia pelos clínicos permanece limitada pelo fato de que os parâmetros específicos para cada tratamento não estão estabelecidos.

Diversos pesquisadores têm buscado compreender o real efeito do laser nos tecidos. Karu et al.³¹ (1995) utilizaram o laser de He-Ne, no comprimento de onda de 632,8 nm, para irradiar células HeLa em suspensão. Os autores dosaram a quantidade de ATP produzida em diversos períodos, variando de 5 até 45 min após a irradiação. O pico de produção de ATP ocorreu no período de 20 minutos após a irradiação. Para a dosagem de ATP realizada em dias diferentes, sempre 20 min após a irradiação, o pico ocorreu aos 8 dias. A presente pesquisa demonstrou que a irradiação aumenta a quantidade de ATP; contudo o mecanismo de ativação da síntese de ATP pelo laser não foi completamente elucidado. Foi sugerido que a irradiação ativa as moléculas fotoceptoras (cyt a/a₃ e NADH hidrogenase) e por meio dessa ativação o ATP é sintetizado. A luz visível ativa, também, a síntese de superóxido, o qual atua como fonte de elétron para a fosforilação do ADP. Durante a irradiação, uma fração da energia pode, ainda, ser convertida em calor e

assim ser absorvido pelos cromóforos promovendo alterações celulares. Entretanto esse aumento não é avaliado em doses baixas. Conclui-se, dessa maneira, que vários mecanismos podem ser ativados quando a célula é irradiada com laser de He-Ne no comprimento de onda de 632,8 nm.

Em 1996, Karu et al.³², após irradiarem suspensão de células HeLa com laser de He-Ne, avaliaram a adesão célula-célula e célula-recipiente. A adesão célula-recipiente foi dependente do intervalo de tempo decorrido da irradiação, do comprimento de onda e da dose. Entretanto quando o tempo foi fixado em 30 min após a irradiação e as doses e os comprimentos de onda foram variados, observou-se uma adesão ascendente na dose de 50 J/m² para os comprimentos de onda de 620, 680, 750 e 830 nm. Quando a irradiação foi realizada no comprimento de onda de 632,8 nm com 100 J/m² a adesão célula-célula aumentou no grupo irradiado, chegando ao limiar aos 30 min após a irradiação. Esse processo de adesão é importante para os processos de crescimento, diferenciação e morfogênese, porém o mecanismo de ativação pela laserterapia permaneceu não inteiramente elucidado. Provavelmente, as alterações de adesão ocorram como resultado do efeito direto da excitação eletrônica de moléculas fotoceptoras. Essa excitação gera sinais na cascata de reações, que são amplificados e transduzidos para o núcleo, resultando em aumento da síntese de DNA e RNA. Nessa pesquisa, foi demonstrado que a irradiação monocromática com a luz visível e infravermelha próxima foi capaz de alterar a adesão celular tendo sido dependente da dose, do comprimento de onda e do tempo de avaliação após a irradiação.

Para avaliar a síntese de ATP por tecidos irradiados com laser, Mochizuki-Odaa et al.⁵⁵ (2002) irradiaram cortes confeccionados na região do córtex parietal da seguinte maneira: 1) de um lado com laser no comprimento de onda de 830 nm, aplicado 3 mm acima da cavidade, e 2) do outro lado com o LED no comprimento de 652 nm. A irradiação a 830 nm resultou num aumento de ATP, mas não no ADP. Nenhuma alteração foi identificada no grupo irradiado com LED, ou seja, no comprimento de 652 nm. O efeito térmico sobre o aumento de ATP foi eliminado, visto que a medição de temperatura durante o procedimento foi de $34,4 \pm 3,56^{\circ}\text{C}$ no comprimento de 830 nm e $34,7 \pm 0,49^{\circ}\text{C}$ aos 652 nm. Dessa maneira, a presente pesquisa sugere que a alteração de ATP visualizada decorre da interação do laser, especificamente no comprimento de 830 nm, com os componentes celulares. Mais pesquisas são necessárias com o intuito de se determinar o efeito da irradiação sobre as moléculas que constituem as células.

Avaliando a resposta celular ao laser, Jia et al.²⁷ (2004) cultivaram condrócitos de articulações de coelho em diferentes concentrações de SFB. Os autores determinaram que a melhor condição para simular o estresse celular foi a adição de 2% de SFB ao meio de cultura. O laser utilizado foi o de He-Ne (632,8 nm), o qual era posicionado a 24 mm de distância das células cultivadas em placa petri. As densidades de energia avaliadas foram de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 J/cm^2 , as quais foram aplicadas 3 vezes sobre as células em cultura, com intervalos de 24 horas. Não houve alteração ou dano celular e as doses de 4, 5 e 6 J/cm^2 apresentaram um maior crescimento celular. A quantidade de glicosaminoglicanos e de colágeno tipo-II (Col-II) aumentou no grupo irradiado. A presente pesquisa demonstrou que

o laser pode estimular a proliferação celular, mas mediante a aplicação de parâmetros específicos. As diferenças de resultados decorrem do efeito cumulativo, ou seja, pequenas doses com tempo suficiente de metabolização podem resultar em efeito curativo. Os autores especularam, também, que a luz atua nos aceptores celulares promovendo a transmissão do sinal que pode ser traduzido intracelularmente como proliferação e expressão gênica. Mais pesquisas são necessárias para comprovar o efeito in vivo dessa terapia.

Buscando avaliar a interação do espectro de ação especificamente com seu cromóforo, Karu et al.³⁴ (2004) irradiou células HeLa com o laser nos comprimentos de onda de 600 a 860 nm, dose de 52 J/m² e com GaAIs no comprimento de onda de 820 nm, 8 a 120 J/m². O processo de irradiação foi realizado com a aplicação de antioxidantes (amiloride, ouabain, e azida sódica) sobre as células antes e após a irradiação. Para esse experimento, o espectro de ação coincidiu com o espectro de absorção dos fotoceptores. Com a adição da azida sódica, o espectro de ação da adesão celular foi modificado discretamente no infra-vermelho próximo (760 e 820-830 nm). Com a ouabain, adicionada após a irradiação, o aumento da adesão foi identificado em baixas doses de energia (8 a 48 J/m²) e a amiloride causou discreta modificação na banda de absorção para o comprimento de onda de 820 a 830 nm. Esses dados sugerem a existência de um canal de sinalização celular mediante a irradiação entre o fotoceptor e a resposta celular, e entre a cadeia respiratória e a membrana plasmática. A presente pesquisa demonstrou que os inibidores dos fotoceptores do citocromo c oxidase

são capazes de modificar a interação do laser frente à irradiação. Isso sugere a existência de canais de sinalização entre o citocromo c oxidase e a adesão celular.

Em 2005, Stein et al.⁶⁹ utilizaram laser de He-Ne para irradiar osteoblastos cultivados em meio de cultura com 2% de SFB. Após 2 ou 3 dias de cultivo, as células foram irradiadas por 2 vezes com intervalos de 24 hs. A elevação da temperatura ambiente com a irradiação foi de $\pm 0,1\%$. Nos dias 4 e 5 pós-irradiação foram realizados os protocolos de proliferação celular, histoquímica para a fosfatase alcalina (ALP) e imunohistoquímica para a osteopontina (OPN) e para sialoproteína óssea (BSP). O número de células aumentou em torno de 25% e o metabolismo em 40%. O aumento foi significativo após a irradiação com $1,43 \text{ J/cm}^2$ para a atividade de ALP assim como para a expressão de OPN e BSP, avaliadas por imunohistoquímica. Essas proteínas atuam na maturação do osteoblasto, sendo a ALP no estágio inicial e a OPN e BSP na pós-proliferação. O presente trabalho demonstrou que a terapia com o laser de baixa intensidade (LLLT) foi capaz de estimular a proliferação do osteoblasto in vitro, sendo que tal efeito sugere que o laser possui a propriedade de estimular a reparação em humanos.

Karu et al.³⁰ (2005) buscaram compreender o exato espectro de ação na resposta celular. Células HeLa foram irradiadas nos comprimentos do 580 ao 860 nm. A adesão celular aumentou 30 minutos após a irradiação com 52 J/m^2 , mas o pico de estimulação de DNA e RNA, na dose de 100 J/m^2 , localizou-se na região do infra-vermelho próximo (NIR). O espectro de ação no NIR, mais

especificamente aos 830 nm, é a banda de absorção da forma oxidada do citocromo c oxidase, sendo que o complexo dímero Cu_A , com 4 ligantes, possui 77% do espectro de absorção entre 810 e 820 nm e a porção heme-a e heme a_3/Cu_B 18 e 5 %, respectivamente. Com relação aos comprimentos de onda dos 750 aos 770 nm, a mitocôndria absorve aproximadamente 50%. Ao adicionar o monóxido de carbono, identificou-se um deslocamento de banda, sendo que após sua dissociação, a situação retornou a original. De acordo com a regra de reciprocidade, as reações fotoquímicas são diretamente proporcionais à dose total de energia e acredita-se que os parâmetros de irradiação, intensidade e o tempo interferem com o aparecimento de diferentes bandas para um mesmo espectro de ação.

Buscando avaliar os efeitos do laser sobre o VEGF e o iNOS, Tuby et al.⁷² (2006), após a indução de infarto no miocárdio em ratos, irradiaram o tecido lesado com laser do tipo GaAs a 804 nm com $0,96 J/cm^2$ e realizaram as avaliações após os períodos de 2,5; 24; 48 e 72 hs. Outro grupo de não infartado e infartado foram irradiados após o 7º dia, com as doses de 0,6; 1,44 e $2,04 J/cm^2$ e as avaliações processadas após o 21º dia. As biópsias obtidas foram processadas de tal maneira que foi possível dosar a quantidade de iNOS e VEGF, sendo que os cortes histológicos corados com H/E permitiram avaliar a formação de novos vasos. A quantidade de VEGF aumentou nos períodos de 24 e 48 hs pós irradiação, mas no tempo de 72 hs houve uma redução. Para o grupo irradiado, o número de vasos sanguíneos estava aumentado e a área de infarto foi reduzida. A cardioproteção, avaliada pela dosagem de iNOS, aumentou em 2,5 hs nos

períodos de 1 e 2 dias após a irradiação. O aumento na produção de VEGF resultou em maior quantidade de vasos sanguíneos na região. Dessa forma, esse trabalho demonstrou que o laser pode auxiliar na regulação angiogênica e na proteção cardiomuscular, mas o mecanismo exato que rege esse processo permanece desconhecido.

No ano de 2007, Tuby et al.⁷³ irradiaram células cardíacas (CSCs) e mesenquimais (MSCs) de ratos com GaAs a 804 nm posicionada a 2 cm de distância das células, com doses de 1 ou 3 J/cm². As células foram avaliadas 1, 2, 3 e 4 semanas após irradiação por meio da imunohistoquímica e de testes de proliferação. As células MSCs apresentaram proliferação celular para ambas as doses testadas, sem diferença estatística entre elas. A análise imunohistoquímica demonstrou um aumento de 2,3 vezes na proliferação das células irradiadas, quando comparadas às células não irradiadas (controle). Para as CSCs, o aumento foi de 7 vezes para a dose mais baixa e de 3,2 para a maior, mas não houve diferença estatística entre os grupos, sendo que a imunohistoquímica expressou uma proliferação de 2 vezes em relação ao controle. O presente estudo demonstrou a proliferação de ambos os tipos de cultura celular e sua importância abrange a área da medicina regenerativa, mas seu mecanismo permanece sem explicação.

Em pesquisa recente, Matsui et al.⁵⁴ (2007) irradiou cultura primária de células de polpa humana com o laser do tipo GaAlAs, no comprimento de onda 810 nm e dose de energia de 7,643 J/cm². Foi realizada quantificação do íon

hidroxila (OH⁻), formação de nódulos, de heat-shock 27 (HSP 27), proteína morfogênica óssea tipo-2 (BMP-2) e proteína morfogênica óssea tipo-4 (BMP-4) e ALP. O aumento na concentração de OH⁻ foi potência-dependente, mas sem diferença entre os diversos períodos de irradiação. O grupo OH⁻ participa dos processos de apoptose, inflamação, dano ao DNA, sinal de transdução celular e da mineralização. A formação de nódulos e expressão de ALP estava aumentada no grupo irradiado, bem como a expressão gênica para HSP27 em 1 hora, para a BMP-2 em 6 horas e para a BMP-4 em 12 horas. O principal papel das BMPs, avaliadas na presente pesquisa, envolve a diferenciação de osteoblastos para a mineralização, crescimento e regeneração e a síntese de HSP é ativada pela produção de espécies reativas pela célula em decorrência do estresse oxidativo. Dessa forma, pode-se sugerir que o laser ativa a mineralização dos tecidos por meio do aumento da expressão de HSP e BMPs.

2.2 Alterações térmicas na polpa

Zach, Cohen⁷⁸ (1965) realizaram uma pesquisa onde foram avaliadas, em dentes de primatas, as alterações pulpares decorrentes de variações de temperatura. Um termistor foi posicionado na parede pulpar dos dentes por meio de uma cavidade confeccionada na parede lingual dos dentes anteriores e oclusal dos posteriores. Um instrumento de ferro aquecido foi aplicado na região cervical da superfície vestibular dos dentes pelo período de 5 a 20 segundos. Os dentes homólogos foram utilizados para avaliação histológica das condições pulpares após os tempos de 2, 7, 14, 56 e 91 dias após a aplicação do calor. O aumento de temperatura de 4°C, com 2 dias, provocou uma discreta alteração da camada

odontoblástica próxima a área de aplicação do calor, com presença de vacúolos evidentes na pré-dentina. Para o aumento de 10°C, a grande maioria das polpas reagiu a agressão térmica após 2 dias, caracterizando-se pela grande desorganização tecidual com destruição da camada odontoblástica, núcleos picnóticos e aspirados para os túbulos, estroma edematoso, desnaturação da matriz e fibrilas destruídas. O aumento de 20°C apresentou nos dentes com ausência de sensibilidade o quadro de abscesso. Porém, em alguns casos, houve destruição completa dos odontoblastos no período de 2 dias após a aplicação do calor, associado a presença de vasos sanguíneos repletos de células inflamatórias. Para aumento de 30°C, todos os dentes demonstraram necrose pulpar com apenas 2 dias, ou seja, destruição da arquitetura pulpar com massas de hemorragia e debris fragmentados e liquefação posterior. Dessa maneira, esse trabalho demonstrou que polpas intactas são capazes de responder negativamente à alteração de temperatura, porém a intensidade desse aumento é de suma importância para a resposta fisiológica desse tecido.

Kreisler et al.⁴⁴ (2002) irradiaram incisivos extraídos e posicionados paralelamente a uma superfície plana para aplicação do laser do tipo GaAlAs no comprimento de onda de 809 nm. A ponta ativa do laser foi posicionada perpendicularmente ao longo eixo da raiz e a superfície do dente (1, 2 e 3 mm), a qual foi determinada por exame radiográfico. Um aparelho para dosar a variação de temperatura foi inserido através do ápice dentário, até a região abaixo da aplicação do laser. Nos resultados identificou-se um atraso entre a ativação do laser e a primeira medida de temperatura, sendo que isto ocorreu devido ao tempo

de propagação do calor através das estruturas dentárias. A variação de temperatura foi dose e tempo dependentes. Os maiores acréscimos estavam relacionados às maiores doses de laser e as menores espessuras dos tecidos dentários. Com relação à espessura de 3mm, mesmo para os maiores parâmetros de laser, a temperatura elevou-se em 3,5°C. Para 2 mm de espessura, o limite crítico de 5°C ocorreu com 1W aplicado por 20s e 1,5W aplicado por 10s. Todavia, para o remanescente de 1 mm, a variação atingiu 30°C em quase todos os parâmetros, com exceção da irradiação com 0,5W por 10s que não promoveu aumento maior que 5°C. Os autores concluíram que novos estudos são necessários para se determinar a resposta pulpar frente aos danos térmicos provenientes da irradiação, uma vez que o limite tolerável pelo tecido pulpar é de 5,5°C.

Amano et al.³ (2006) avaliou o estresse térmico em células de polpa de rato mantidas a 42°C por 30 minutos e avaliadas nos períodos 0, 1, 3, 6 hs por Western Blot (HSP25, HSP70, CX43), por imunohistoquímica a conexina-43(CX43) e dosagem do gap-juncional da comunicação intracelular e fosfatase alcalina. A produção do HSP70 aumentou até o período de 6 hs. A destruição e a redução da forma fosforilada do CX43 ocorreu no tempo 0, identificada entre corpos ou processos celulares pela imunohistoquímica. Porém, esse processo foi reversível ao retornar a condição de normalidade com 3 hs. O aquecimento provocou ruptura da comunicação gap-juncional. Os valores de ALP reduziram no tempo 0 e aumentaram com 3 e 6 hs. As HSPs auxiliam no processo de reparação tecidual, sendo expressas mediante a variação de temperatura, podendo ocorrer com alta velocidade e/ou laser. Desde que essa variação não seja lesiva, a hipertermia local

auxilia na remodelação e neoformação tecidual. A presente pesquisa demonstrou a presença das HSP após o aquecimento local, bem como o aumento da ALP, sugerindo dessa maneira que o estresse térmico controlado pode induzir reparação celular.

2.3 Hipersensibilidade dentinária e a laserterapia.

Em 2003, Marsilio et al.⁵³ selecionaram pacientes que apresentavam hipersensibilidade dentinária (HD) com o intuito de realizar um estudo in vivo. Os pacientes totalizavam o número de 25, com idades entre 14 e 58 anos. A HD foi avaliada por meio de jato de ar, aplicado a 3 mm de distância, por 5 segundos, e por uma escala visual de dor (EVD). Os pacientes foram divididos homogeneamente em dois grupos, e o laser utilizado era do tipo GaAlAs, com potência de 1,5 mW e comprimento de onda de 670 nm. O grupo A recebia a dose de 3 J/cm² por 114 segundos, e o grupo B 5 J/cm² por 190 segundos, sendo 6 aplicações por dente com intervalo de 72 horas. Uma nova avaliação da HD era realizada com 15 e 60 dias após a irradiação. A redução da sensibilidade dolorosa para o grupo A foi de aproximadamente 86,53% e para o grupo B por volta de 88,88%. Foi encontrada diferença estatística entre os períodos de avaliação de 15 e 60 dias, não sendo observada tal diferença entre as doses aplicadas. Concluiu-se que o tratamento a laser foi efetivo para a terapia da hipersensibilidade dentinária.

Em 2004, Ladalardo et al.⁴⁷ avaliaram o efeito do laser em 20 pacientes que apresentavam um quadro de HD. A amostra foi distribuída segundo: o critério idade (dos 25-35 anos e dos 35-45 anos) e o comprimento de onda (o vermelho

com 660,14 nm, e o infravermelho com 830,05 nm. Em ambos os grupos o aparelho utilizado foi o Laser Beam DR 500 Power, GaAlAs, com densidade de energia de 4 J/cm² a 35 mW. O laser foi aplicado pontualmente na parede vestibular do dente e em contato na porção cervical, em 4 sessões, com intervalo de 7 dias. Os pacientes foram reavaliados através do teste de variação térmica e com escala de dor em dois períodos distintos: efeito imediato, 15 a 30 minutos finalizada a sessão; e efeito tardio, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. A redução na sensibilidade dentária foi verificada em todas as sessões em ambos os grupos. Porém, na idade de 25-35 anos, a redução foi mais significativa para o laser vermelho e no período imediato. Nas avaliações tardias, o grupo de 25-35 anos apresentou elevada dessensibilização para os dois comprimentos de onda. Esse estudo demonstrou que o laser de diodo a 660 nm foi efetivo para as duas faixas etárias e o diodo a 830 nm foi efetivo na primeira faixa etária.

Mais recentemente, Lizarelli et al.⁴⁸ (2007) compararam os efeitos do laser e do LED no tratamento da HD em 144 dentes. Após uma avaliação local, com jato de ar, os pacientes foram randomicamente divididos em três grupos: A – Grupo tratado com laser de baixa intensidade (LILT) B – Grupo tratado com LED (LEDT) e o C – controle. Foram realizadas 3 irradiações, em 3 pontos na cervical e 2 apical, com 7 dias de intervalo, e retornos 15, 30 e 60 dias após a terapia. O laser utilizado, Twin Laser, emitia comprimento de onda de 660 nm a 25 mW, 10 segundos, com densidade de energia de 5,4 J/cm² e a área do spot de 4 mm². Já o LED (protótipo), apresentava comprimento de onda de 630 nm, potência de 230 mW, 10 segundos, densidade de energia de 51,75 J/cm² e mesmo spot. Em três

pré-molares extraídos, foi verificada a variação de temperatura, tendo sido de 2,0°C para o LED e 0,5°C para o laser. Ambos os tratamentos apresentaram-se efetivos na redução da dor imediatamente após a primeira sessão, sem diferença estatística entre eles. Aos 30 dias, o LLIT demonstrou-se discretamente mais efetivo em relação ao LED. Uma discreta agressão ao tecido pulpar foi encontrada no grupo do LED. Aos 60 dias, os três grupos foram semelhantes. Foi possível concluir que o laser, nos parâmetros utilizados na presente pesquisa, foi efetivo na redução da HD. Porém, mais experimentos são necessários.

2.4 Ação do laser na cultura celular

Para melhor compreender o efeito da laserterapia em sistemas biológicos, os autores iniciaram suas pesquisas em modelos in vitro com diversos tipos de culturas celulares.

Em 1998, Grossman et al.²³, realizaram uma pesquisa com queratinócitos na densidade de $1,3 \times 10^4$ células/compartimento (cel/well) em placas de 96 poços. A irradiação era chaveada (CW) no comprimento de onda de 780 nm, potência de 6,5 mW, 2 cm abaixo da monocamada. O plantio foi realizado intercalando-se nos poços laterais uma solução de trypan blue a 0,4%, visando proteger os demais compartimentos com células da luz laser durante o procedimento de irradiação o qual era realizado isoladamente. O Power Meter garantia a utilização dos parâmetros em questão. A irradiação foi realizada 48 horas após plantadas as células, recebendo as doses de 0,35 J/cm² a 3,6 J/cm² a cada 24 horas (total de 3 exposições) ou a cada 48 horas (total de 2 exposições). Quatro dias após a

primeira exposição às células eram contadas e comparadas com o grupo controle. A síntese de DNA foi dosada por meio do protocolo ^3H -timidina. A proliferação foi dose-dependente. Após 24hs de irradiação a proliferação aumentou nas exposições de 0,42 a 0,7 J/cm^2 , sendo o pico observado a 0,42 J/cm^2 . Densidades inferiores não afetavam a proliferação, já valores acima de 1 J/cm^2 reduziam-na. Em 48hs o aumento ocorreu na densidade de 0,55 a 0,8 J/cm^2 , e o pico a 0,55 J/cm^2 . Os parâmetros que resultaram no aumento da síntese de DNA foram de 0,6 a 1,2 J/cm^2 . Com esse estudo pode-se sugerir que o “threshold”, para esse tipo celular, inicia-se a 1 J/cm^2 ao se observar uma redução da proliferação celular, mas a 4 J/cm^2 possivelmente ocorre uma inibição.

Em 2001, Almeida-Lopes et al.² com o intuito de comparar a resposta celular a diferentes comprimentos de onda, desde o vermelho até o infra-vermelho, realizaram uma cultura celular primária de fibroblastos. A pesquisa envolveu o grupo experimental cultivado em meio de cultura com 5% de soro fetal bovino (SFB), para simular o estresse celular in vitro, o grupo com 10% (situação ideal de cultivo) e o controle (sem laser). Os grupos foram divididos de acordo com os parâmetros de irradiação (comprimento de onda e potência) em: L1- 670 nm a 10 mW; L2- 780 nm a 50 mW; L3- 692 nm a 30 mW e L4- 786 nm a 30 mW. Para todos a densidade de energia foi de 2 J/cm^2 . As células foram plantadas em placas de Petri e incubadas por 12 horas, em seguida 4 irradiações foram realizadas com intervalo de 12 horas de aplicação. De todas as amostras três foram utilizadas para a realização da contagem celular, nos dias 2, 4 e 6 após a irradiação. Os grupos irradiados com o vermelho e o infra-vermelho apresentaram alta taxa de

proliferação, mas o grupo do infra-vermelho teve o crescimento mais efetivo quando comparado ao vermelho. Tal crescimento foi maior para o grupo de 5% em relação ao de 10%, sendo que nesse último o crescimento foi similar ao controle para todos os grupos. Em conclusão, esse trabalho observou que a redução do soro fetal bovino foi ideal para avaliar o efeito do laser, sendo que a administração da dose de energia de 2 J/cm^2 estimulou a proliferação celular em condições de estresse, e o laser infra-vermelho foi mais efetivo quando comparado ao vermelho.

Coombe et al.¹³, em 2001 analisaram a cultura celular de osteosarcoma humana, também cultivadas com redução de SFB (condição de estresse), irradiada com GaAlAs no comprimento de onda de 830 nm, potência de 90 mW e energia de 0,5; 1; 2 e 4 J. O protocolo de irradiação era realizado uma vez ao dia, de 1 a 10 dias. Um Power meter era utilizado para assegurar os parâmetros utilizados. As células foram plantadas na placa de 96 compartimentos na densidade de 1×10^4 cel/well. As células foram avaliadas quanto ao metabolismo e proliferação celular, dosagem da proteína heat shock (produzida em presença de agressão por aquecimento), alteração na síntese de DNA e expressão de proteínas. O protocolo de fosfatase alcalina foi realizado 1h e 24hs após a irradiação e nesse período de 24hs o fluxo de cálcio também foi avaliado. A viabilidade celular foi em torno de 90% nos grupos experimentais e controle, não se observando diferenças nos 10 dias de avaliação. Identificou-se uma tendência de aumento no número celular ao redor do dia 7, com 2 e 4J, porém o efeito foi passageiro e não reprodutível. Em relação ao heat shock o pico foi observado em 1,5hs após a irradiação. A dosagem

de proteína e de DNA não expressou diferenças estatísticas entre os grupos. A quantidade de fosfatase aumentou com o passar dos dias para ambos os grupos experimentais e controle, observando-se uma leve tendência de redução após 3 dias de irradiação na dose de 1 a 4J. O fluxo de cálcio elevou-se, mas uma leve redução foi analisada após 5 min. Esse trabalho conclui que a divergência desses resultados com a literatura decorre dos diferentes tipos celulares, bem como dos parâmetros e da forma de irradiação.

Seguindo essa linha de estudo da laserterapia em culturas submetidas ao estresse celular, Pereira et al.⁶² (2002), cultivaram células do tipo NIH 3T3 em placas com 35 mm de diâmetro na concentração de 1×10^3 células/placa e em meio com 2,5% de SFB (condição de estresse celular). A irradiação foi realizada no comprimento de onda de 904 nm, potência de 120 mW, no tempo de 8 a 24 segundos. Os grupos foram divididos em: I - controle; II – 2 aplicações de 2 J/cm²; III – 1 aplicação com 1 J/cm² e outra com 2 J/cm²; IV – 1 aplicação de 2 J/cm² e a segunda de 3 J/cm². Para todos os grupos, o intervalo de aplicação foi de 6 horas. As células foram analisadas quanto a viabilidade celular nos períodos de 2, 4, 5 e 6 dias. Para o ensaio de imunoprecipitação de procolágeno apenas o pellet de células foi irradiado com 3 J/cm², em seguida as células foram plantadas e o protocolo realizado após 4 dias. Com o resultado foi observado que o número do grupo controle aumentou até o dia 6, mas não entrou em confluência. As culturas irradiadas a 4 J/cm² apresentaram um crescimento mais rápido do que o controle, porém tal diferença de proliferação reduziu no final do experimento. O grupo irradiado com 3 J/cm², também, apresentou um crescimento maior do que o

controle, principalmente após o dia 4. Entretanto para o grupo irradiado com 5 J/cm² o crescimento foi similar ao controle. Não houve diferença estatística entre os grupos II e III para o ensaio de imunoprecipitação. Dessa forma foi demonstrado que a redução na concentração de SFB reduziu a proliferação celular, mas não foi suficiente para matá-las. E o aumento da proliferação foi observado com 3 e 4 J/cm² (sem diferença estatísticas entre ambos os grupos), porém a 5 J/cm² não houve tal diferença em relação ao controle.

A expressão de osteoglicina foi alterada quando, Hamajima et al.²⁴ em 2003, irradiaram células da linhagem MC3T3-E1, com 10% SFB, com GaAIs no comprimento de onda de 830 nm, potência de 500 mW e densidade de energia de 7,64 J/cm². O grupo controle foi submetido às mesmas condições de manipulação com exceção da luz. O controle de carregamento interno utilizado foi o Gapdh. As avaliações de expressão de osteoglicina foram realizadas 0, 2, 4 e 8 horas após a irradiação. A expressão desse gene foi aumentada em 2,3 vezes após 2 horas. Para os outros períodos a diferença não foi estatisticamente significativa. Quando o PCR em tempo real foi realizado para os mesmos genes a diferença foi identificada para os períodos de 2 e 4 horas, sendo que com 8 horas e expressão retornou ao normal. Esse estímulo da expressão de osteoglicina pode estar relacionado a efeitos nas moléculas da matriz extracelular, entretanto mais estudos são necessários para clarear o real efeito do laser nas células.

Em 2003, Kreisler et al.⁴⁵ corroboraram com o estudo da laserterapia em cultura celular, utilizando as culturas primárias de fibroblastos (entre a 3^o e 8^o passagens) que foram irradiadas com o laser GaAIs no comprimento de onda de

809 nm, potência de 10 mW, posicionadas a 9 mm de distância. Os períodos de irradiação foram de 75, 150 e 300 segundos, referentes às densidades de energia 1,96; 3,92; 7,84 J/cm². Foram realizadas 2 irradiações com intervalos de 24hs, três vezes consecutivas. O teste de proliferação foi realizado nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação. A atividade do metabolismo celular foi aumentada para o grupo do laser, para todas as densidades avaliadas, sendo mais pronunciadas nos dias 1 e 2 após a irradiação, sendo seu pico a 72 horas, a partir do qual há uma redução brusca de tal efeito. Os resultados obtidos são muito interessantes e promissores, porém mais estudos são necessários para se entender o real efeito do laser ao nível molecular.

Contudo, Vinck et al.⁷⁵ (2003) estudou uma cultura similar de fibroblastos obtidos de embriões de galinha, plantadas em placas de 96 compartimentos na densidade de 7X10⁴ cel/well. Posteriormente tal cultura foi irradiada, a uma distância de 0,6 cm, com o laser infra-vermelho e com o LED. Os parâmetros eram: laser - GaAlAs no comprimento de onda de 830 nm, potência de 40 mW, na densidade de energia de 1 J/cm² por 5 segundos e o LED – a) comprimento de onda de 570 nm (verde), potência de 10 mW e densidade de energia de 0,1 J/cm²; b) comprimento de onda de 660 nm (vermelho), potência de 80 mW e densidade de energia de 0,53 J/cm²; c) comprimento de onda de 950 nm (infra-vermelho), potência de 160 mW e densidade de energia de 0,53 J/cm². Era realizada uma aplicação ao dia, durante 3 dias consecutivos, sendo que para o processo de irradiação o meio foi aspirado restando apenas 25% do mesmo. O teste de viabilidade celular foi realizado 24 e 72 horas após a irradiação. Os resultados, 24

horas após a irradiação, revelaram um aumento significativo no número celular em relação ao grupo controle (sem irradiação). Os grupos com o LED verde e vermelho apresentaram um efeito mais significativo no metabolismo celular, quando comparado ao laser, sendo o resultado com o LED verde maior do que os demais grupos com LED e o vermelho maior do que o infra-vermelho. Porém o grupo do laser apresentou uma proliferação mais significativa do que o grupo controle. Entretanto para a avaliação realizada a 72 horas, os efeitos foram opostos sendo que o grupo controle apresentou uma proliferação mais efetiva do que o grupo do LED infra-vermelho, seguido pelo vermelho e verde, e o laser resultou em uma redução significativa dos fibroblastos em relação ao grupo controle. Este estudo sugere alguns efeitos positivos do uso do laser e LED, porém investigações futuras são de extrema importância para explicar os mecanismos da biomodulação com o LED e com o LLLT, bem como para traçar parâmetros mais efetivos para cada tipo de tratamento.

Marques et al.⁵², em 2004, cultivaram fibroblastos humanos em placas de Petri com meio de cultura a 5% SFB e posteriormente dividiu-os em dois grupos: controle e experimental. A irradiação foi aplicada a 2 mm de distância, com 3 J/cm², com comprimento de onda de 904 nm, potência de 120 mW e por 24 segundos. Após 3 dias foi realizado o protocolo de imunoprecipitação de colágeno, dosagem de proteína total e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise da densitometria das bandas revelou não haver diferenças entre ambos os grupos em relação à síntese de procolágeno, mas a síntese do colágeno tipo I foi menor no grupo experimental, bem como a quantidade total de proteína.

Após irradiação a MEV revelou um núcleo condensado com diversos nucléolos, um citoplasma eletrodense com abundantes vilosidades e mitocôndrias edematosas e retículo endoplasmático rugoso (RER) dilatado. No grupo controle tal exame ultra-estrutural da linhagem celular demonstrou características típicas de fibroblastos. Conclui-se, assim, que apesar da quantidade total de proteína e de colágeno tipo I ser inferior no grupo experimental, a quantidade de procolágeno não foi alterado em ambos os grupos, contudo a irradiação, nesses parâmetros, originou alterações importantes nas organelas, em especial no RER e mitocôndrias.

Em 2004, Kujawa et al.⁴⁶, realizaram uma pesquisa importante, na qual foram analisada a alteração de temperatura no meio e o estresse oxidativo. Para isso culturas de células, de hamster chinês B14 e de eritrócitos humanos, obtidos de sangue fresco, foram irradiadas no comprimento de onda de 810 nm, potência de 200 mW e densidades de energia de 3,75 a 15 J/cm². Após a irradiação a alteração de temperatura visualizada foi de apenas 0,5°C. Com relação ao estresse oxidativo, as células foram avaliadas por meio de danos no DNA e acúmulo de proteínas carbonílicas e grupo SH, bem como a viabilidade foi dosada pelo método de Mossman. Danos no DNA só foram observados em altas exposições (15 J/cm²), e a irradiação não produziu alterações substanciais no metabolismo celular, mas reduziu discretamente o nível de proteínas carbonílicas, porém o grupo SH não foi alterado. Nesse trabalho a irradiação reduziu as proteínas produzidas no dano oxidativo, justificando os efeitos do laser em processos inflamatórios. O estado redox foi desequilibrado em resposta a atuação da luz. Os

danos citotóxicos não foram observados nem mesmo para altas doses. Entretanto o tipo de laser, bem como a fluência e a dose são importantes para o tecido ou organismo a ser irradiado.

As células endoteliais e fibroblásticas foram isoladas de rato adulto C3H, por Moore et al.⁵⁶, em 2005. Tais células foram plantadas em placas de 96 compartimentos, deixadas em incubadora por 24 horas, e, posteriormente, o meio foi trocado por HEPES em HBSS. Esse período de incubação foi importante para que as células atingissem a fase G_0/G_1 , quando, então foi aplicado a irradiação, que se caracterizava por comprimentos de onda no vermelho (625, 635, 645, 655, 665, 675 nm) e no infra-vermelho (810 nm), na densidade de energia de 10 J/cm^2 e potência de 5 mW/cm^2 . Logo após a única irradiação o HBSS foi removido e o meio foi reaplicado. Setenta e duas horas após a irradiação o protocolo de proliferação celular foi realizado. O grupo irradiado apresentou uma proliferação celular, sendo o máximo observado para o vermelho com 665nm e 675 nm. Em contrapartida o comprimento de onda de 810 nm foi inibitório para o fibroblasto. Já para as células endoteliais tal proliferação só foi identificada no comprimento de onda de 655nm. A variedade de resultados é proveniente do diversos fatores que interferem na pesquisa, entre eles: parâmetros de irradiação (comprimento de onda, densidade de energia, potência); tipo celular; efeito sistêmico.

Outro estudo importante foi delineado por Khadra et al.³⁶ (2005). As células de cultura primária osteoblástica foram plantadas em placas de Petri e irradiadas com as densidades de energia de 1,5 e 3 J/cm^2 no comprimento de onda de 830 nm, potência de 84 mW a uma distância de 9 cm para garantir que toda a placa

fosse irradiada. Logo em seguida essas células foram ressuspensas e semeadas na densidade de 2×10^4 cel/well em placas de 24 compartimentos sobre discos de titânio. Após 24 horas o grupo experimental foi irradiado por três dias consecutivos com os parâmetros previamente relatados. A adesão celular ao disco de titânio foi maior para o grupo que recebeu irradiação, porém entre os grupos irradiados não houve diferenças. A proliferação também originou tal efeito sendo mais pronunciado no período de 96 horas, sem diferença para os períodos de 48 e 72 horas. A viabilidade foi de 90% para todos os grupos. Para a atividade de fosfatase alcalina não foi verificada diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle, já com relação à produção de osteocalcina e fator de crescimento β_1 estiveram pronunciada para o grupo irradiado com a densidade de energia de 3 J/cm^2 . O aumento na síntese de osteocalcina e TGF- β_1 podem sugerir que o laser estimula a diferenciação de células do tipo osteoblásticas, porém tal efeito é dose-dependente.

Em 2005, Khadra et al.³⁵, utilizaram o laser de GaAlAs, no comprimento de onda de 830 nm, potência de 84 mW e a fibra óptica foi posicionada a 9 cm de distância da cultura primária do tipo fibroblástica, mantida a 5 % SFB (condição de estresse celular). Os grupos foram divididos em: Grupo I - controle; Grupo II - uma única dose de 3 J/cm^2 no tempo 0h sendo posteriormente incubadas por 6 e 24 horas; Grupo III - doses de 0,75; 1,5 e 3 J/cm^2 no tempo 0 e 3 horas e as células incubadas por 6 horas, ou irradiadas nos tempos 0, 3 e 6 horas e incubadas por 24 horas sendo o protocolo repetido por 3 dias consecutivos. Não foram observadas variações térmicas antes e durante a irradiação. As células irradiadas

apresentaram uma adesão celular maior do que a do grupo controle, entretanto nenhuma diferença foi verificada entre os grupos experimentais, com exceção da irradiação com $0,75 \text{ J/cm}^2$ que se igualou ao controle. Com relação à proliferação celular, as doses de $1,5$ e 3 J/cm^2 demonstraram-se superiores ao controle após 72 horas. A viabilidade celular foi superior a 90% em todos os grupos. Essa pesquisa não foi suficiente para elucidar a dose ótima a ser aplicada sobre os fibroblastos com o intuito de aprimorar sua adesão em tratamentos com implantes.

2.5 Estudos in vivo da laserterapia

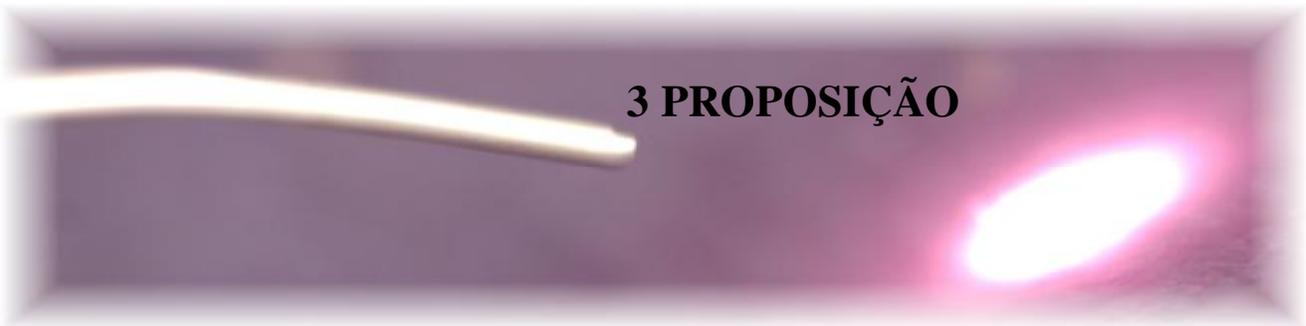
Num estudo in vivo atual Kim et al.⁴⁰ (2007) avaliaram os efeitos do laser no processo de reparação óssea após colocação de implantes na fíbula de ratos. No grupo experimental, 6 pontos determinados ao redor do implante foram irradiados com laser de GaAlAs (comprimento de onda de 808 nm, potência de 96 mW e irradiância de 830 mW/cm^2 , diâmetro da fibra óptica 3,84 mm e energia total por sessão 6,72 J) durante 7 dias. Os animais foram sacrificados nos dias 1, 3, 7, 14, 21 após a irradiação. A expressão de VEGF foi identificada no dia 1 com níveis moderados na matriz óssea. No dia 3 houve aumento nas taxas de expressão do VEGF e a secreção foi intracelular. No dia 7 ocorreu uma alta expressão de VEGF, sendo que sua distribuição foi similar ao dia 3. Nos dias 14 e 21, altas taxas de VEGF foram expressas no osso. O VEGF foi mais expresso no grupo experimental que no controle. Foi identificado, também, um aumento significativo na densidade óssea no grupo experimental. No dia 14 a matriz óssea estava calcificada ao redor do implante. O efeito bioestimulatório do laser estimulou a

expressão do VEGF e dessa forma houve um aumento de angiogênese ao redor do implante local com conseqüente aprimoramento da cicatrização inicial.

Ainda dentro da área de pesquisas do efeito de laser in vivo, Villa et al.⁷⁴ (2007) realizaram preparos cavitários profundos em vinte porcos, divididos em três grupos: controle (GI) ; experimental GII (densidade de energia de 12.8 J/cm², potência de 10 mW); experimental GIII (densidade de energia de 89.7 J/cm², potência de 70 mW). Após realizados os preparos cavitários, o laser com comprimento de onda de 780 nm e potência de 1 mW foi aplicado por 3 vezes nas cavidades, com intervalo de 72 horas. A irradiação foi realizada no centro do preparo e na parte apical, sobre o tecido gengival, sendo as cavidades restauradas com cimento de ionômero de vidro. Para o grupo GI, após 8 dias de preparo cavitário, observou-se um processo inflamatório mononuclear na região da polpa relacionada com o preparo cavitário, vasos hiperemiados, leve edema, camada odontoblástica predominantemente poliédrica e discreta alteração vacuolar e dentina reacional amorfa. Após 14 dias, a inflamação estava menos evidente, sendo observada uma formação de dentina reacional com túbulos paralelos na porção interna. Para o grupo GII, após 8 dias, o mesmo processo inflamatório observado para o grupo GI foi identificado. Após 14 dias havia uma discreta hiperemia, associada à deposição de uma dentina mais regular. No grupo GIII, aos 8 dias, o processo inflamatório foi semelhante ao controle, bem como a qualidade da dentina reacional, a qual era significativamente delgada. Após 28 dias, o aspecto estrutural era similar aos dois outros grupos experimentais. Com essa metodologia, foi possível verificar a formação de dentina reacional após a

Revisão de Literatura

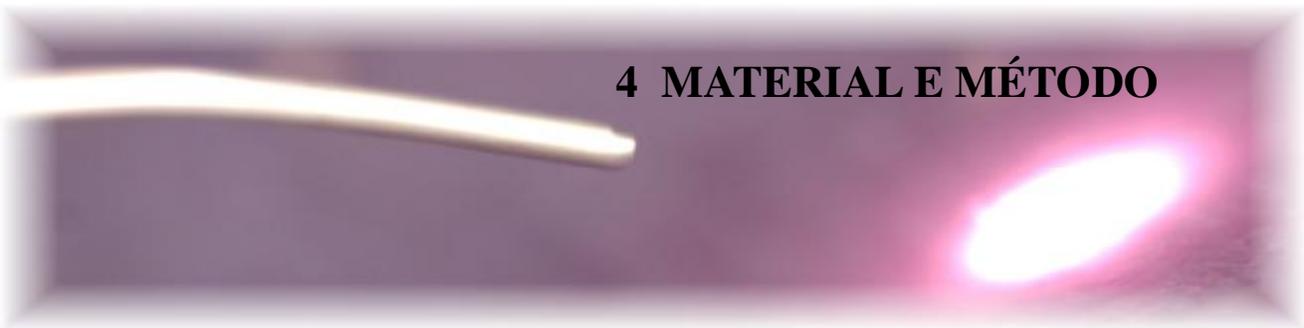
aplicação das duas dosagens de laser. A polpa foi capaz de ser estimulada pelo laser a depositar matriz de dentina reacional.



3 PROPOSIÇÃO

3 Proposição:

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito direto do laser de baixa intensidade em parâmetros específicos sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. Para isso foi avaliado o metabolismo das células irradiadas, bem como a regulação da síntese e expressão de fosfatase alcalina, o conteúdo de proteína total e a expressão de genes que codificam para colágeno tipo I (Col-I) e fibronectina (FN).



4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Determinação das condições do experimento

Previamente ao início do experimento de bioestimulação direta das células, foi realizada a seleção do meio de cultura celular a ser empregado no experimento, visto que essa determinação depende diretamente das características da radiação utilizada no aparelho. Assim, dois meios de cultura baseados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA), foram avaliados através da medida de seus espectros de absorção. O primeiro meio possuía cor avermelhada enquanto que o segundo meio era límpido. A medida foi realizada usando um espectrógrafo de transmitância VIS-NIR USB2000 (Ocean Optics, Ca, EUA).

Com a informação dos coeficientes de absorção dos meios de cultura, foi efetuado o monitoramento da variação de temperatura destas soluções durante a irradiação, utilizando-se para isto um multímetro e um termistor calibrado e fixado à base dos compartimentos da placa. Neste experimento, diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) foram adicionadas ao meio de cultura (DMEM sem SFB, DMEM + 2% SFB, DMEM + 5% SFB e DMEM + 10% SFB), os quais foram irradiados por um tempo total de 600 segundos. As duas avaliações citadas anteriormente foram realizadas no Laboratório de Biofotônica do IFSC (Instituto de Física de São Carlos - USP - São Carlos, SP)

Somente após esse delineamento, as células imortalizadas de linhagem odontoblástica MDPC-23 (Hanks et al.²⁵, 1998) foram cultivadas em garrafas plásticas de 25cm² (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA Chemical Co., St. Louis,

MO, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina, e 2 mmol/L de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, USA) em incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂, 95% de ar e na temperatura de 37°C (Isotemp Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). As células foram sub-cultivadas a cada 3 dias até que fosse obtido o número adequado de células para a realização da pesquisa.

4.2 Experimento: Bioestimulação direta das células

Células MDPC-23 foram semeadas (15.000 células/cm²) em placas de Petri com dimensões de 35 mm x 10 mm, com meio de cultura completo suplementado com 10% SFB e mantidas em incubadora em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C por 48 horas. O meio de cultura foi, então, aspirado e substituído pelo DMEM sem SFB para indução de estresse celular (Coombe et al.¹³, 2001). Após 12 horas de cultura, o laser foi aplicado individualmente na base de cada uma das 24 placas do Grupo experimental (laser), de acordo com parâmetros previamente estabelecidos (Khadra et al.^{35,36}, 2005).

O aparelho de laser utilizado na presente pesquisa foi o THERA-LASE (DMC Equipamentos Ltda, São Carlos, Brasil), com parâmetros relacionados ao aparelho estabelecidos da seguinte maneira: Comprimento de onda (λ) – 830 nm, Diâmetro da ponteira (\varnothing) - 0,6 mm, Área da ponteira - 0,002826 cm², Potência - 240 mW, Densidade de energia (fluência) - 2,89 J/cm², Energia - 8,16 J e

Material e Método

Densidade de potência - $84,9 \text{ mW/cm}^2$. Uma ponteira especificamente desenvolvida para este experimento foi posicionada na extremidade ativa da fonte de luz, a qual permaneceu a uma distância de 13 cm da base da placa de Petri, para permitir que todas as células cultivadas pudessem ser irradiadas, ou seja, para que toda a placa de petri recebesse a irradiação uniformemente (Figura 1a e b). Desta maneira, foram consideradas as perdas de Energia e Potência que alcançaram estas células, sendo que o laser que atingiu as placas de cultura (área da placa de Petri = $9,62 \text{ cm}^2$) apresentava os seguintes parâmetros: Comprimento de onda (λ) - 830 nm, Potência que alcança a placa - 90 mW, Densidade de energia (fluência) que alcança a placa - $0,32 \text{ J/cm}^2$, Energia (E) - 3,06 J e Densidade de potência (DP) - $9,3 \text{ mW/cm}^2$. O tempo de irradiação das células foi de 34 segundos.

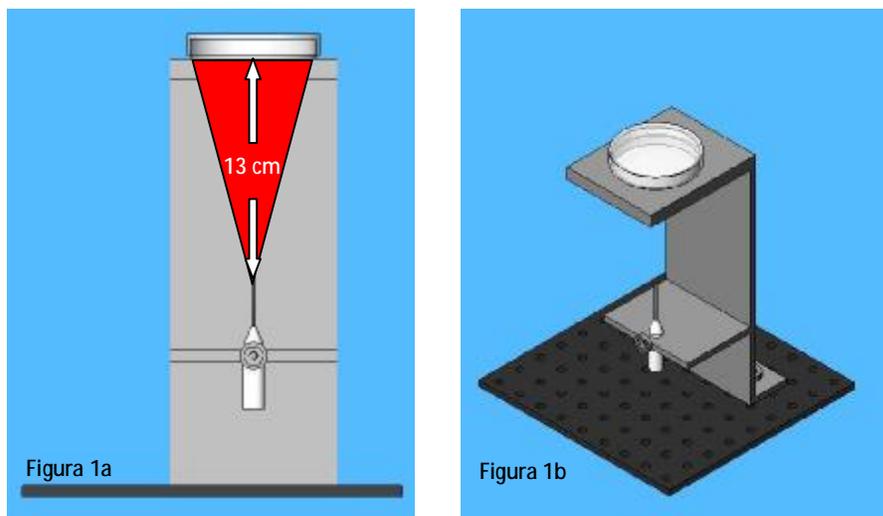


FIGURA 1 - Esquema ilustrativo do modelo de irradiação utilizado na pesquisa. **1a** - vista frontal do aparato enfatizando a distância de 13 cm da placa, **1b** - vista isométrica com a centralização do feixe

Após irradiação inicial, as células foram recolocadas na incubadora, sendo estas submetidas a novas irradiações periódicas a cada 12 horas, num total de 6 aplicações durante três dias consecutivos.

Imediatamente após a última irradiação, as placas de Petri foram colocadas em incubadora, em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ na temperatura de 37°C, onde permaneceram pelo período adicional de 3 horas. Após este tempo, foi realizada a avaliação do metabolismo das células irradiadas, bem como da expressão de proteínas específicas. A relação entre os grupos experimental e controle de acordo com o número de amostras distribuídas em seus respectivos protocolos de avaliação estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Apresentação do número de amostras por grupo experimental e controle de acordo com a avaliação das atividades das células MDPC-23

PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO	GRUPO	
	EXPERIMENTAL	CONTROLE
MTT	8	8
Proteína Total e Fosfatase Alcalina	8	8
RT-PCR	8	8

* N= 24 - total de amostras por grupo.

Para o grupo controle (24 placas), os mesmos procedimentos de manipulação das células foram realizados, inclusive o posicionamento do laser na base de cada placa de petri. Todavia, o laser não foi ativado.

4.3 Análise da viabilidade celular (MTT assay)

Oito amostras do Grupo experimental e do controle foram utilizadas para a avaliação do metabolismo celular. Esta avaliação foi realizada por meio da técnica do metiltetrazolium (MTT Assay), o qual determinou a atividade da enzima

desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias presentes nas células (Mosmann⁵⁷, 1983).

Sobre as células cultivadas individualmente em placas de Petri aplicou-se 900 µL de meio de cultura (DMEM) associado a 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL do sal metiltetrazolium em PBS). As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37°C pelo tempo de 4 horas. Decorrido este período, a solução de MTT foi aspirada cuidadosamente e substituída por 700 µL da solução de isopropanol acidificada (0,04 N de HCl). Este procedimento teve o objetivo de dissolver os cristais violeta resultante da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica das mitocôndrias das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade das soluções, três alíquotas de 100 µL de cada compartimento foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos (Costar Corp., Cambridge, MA, USA). Avaliou-se viabilidade celular de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (Multiskan, Ascent 354, Labsystems CE, Lês Ulis, France)

Os dados numéricos obtidos pela técnica de MTT foram submetidos à análise estatística de Mann-Whitney.

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

Como descrito anteriormente, do total de 24 amostras por grupo, 8 foram usadas para determinação da dosagem de proteína total, sendo que destas mesmas

amostras foram obtidas alíquotas para análise da atividade de fosfatase alcalina pelas células MDPC-23 irradiadas ou não.

4.4.1 Dosagem da proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada para cada grupo experimental e controle, 3 horas após a última irradiação com o laser, segundo protocolo de Read, Northcote⁶³ (1981). O meio de cultura foi aspirado e as amostras lavadas três vezes com 2 mL de PBS aquecido a 37°C. A lise das células foi realizada adicionando-se 2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) em cada compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então homogeneizadas e 1 mL de cada compartimento transferido para tubos Falcon (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) devidamente identificados (tubos testes), sendo que para o tubo representando o branco, foi acrescentado 1 mL de água destilada. Em seguida, 1 mL de Solução de Reagente de Lowry (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) foi adicionado em todos os tubos, sendo agitados por 10 segundos em agitador de tubos (Phoenix AP 56, Araraquara, SP, Brasil) e permanecendo por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se em cada tubo, 500 µL de Solução de Folin e Ciocalteu's Phenol Reagent (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) e novamente agitou-se por 10 segundos em agitador de tubos. Trinta minutos após, três alíquotas de 100 µL de cada tubo foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e a absorbância dos tubos testes e branco foi lida no comprimento de onda de 655 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD, modelo 3550-UV, microplate reader, Hercules, Califórnia, USA).

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

4.4.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi realizada 3 horas após a última irradiação, seguindo protocolo do Kit de Fosfatase Alcalina – Ensaio de Ponto Final (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil). Este ensaio utilizou o substrato de timolftaleína monofosfato, um substrato do éster do ácido fosfórico. A fosfatase alcalina hidrolisou a timolftaleína monofosfato liberando timolftaleína. Assim, foi possível medir diretamente o produto da hidrólise, alterando-se o pH, pois essa alteração promoveu a interrupção da atividade enzimática e a formação de cor azul característica do produto da reação, que foi medida fotometricamente (Roy⁶⁶, 1970).

O meio de cultura foi aspirado e as amostras lavadas três vezes com 2 mL de PBS aquecido a 37° C. A lise das células foi realizada adicionando-se 2 mL de Lauril Sulfato de Sódio 0,1% (Sigma – Aldrich, St Louis, USA) em cada compartimento por 40 minutos em temperatura ambiente. Enquanto isso, os tubos Falcon (testes, padrão e branco) foram devidamente identificados e 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato 22 mmol/L - reagente nº 1 do Kit) e 500 µL de tampão (300 mmol/L, pH 10,1 - reagente nº 2 do Kit) foram adicionados em cada tubo. Apenas no tubo padrão foi acrescentado 50 µL do padrão 45 U/L (reagente nº 4 do Kit). Decorridos os 40 minutos da lise celular, os tubos foram colocados no banho-maria (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil) a 37° C por 2 minutos. As amostras foram, então, homogeneizadas e 50 µL de cada compartimento

transferidos para os tubos testes, mantidos em banho-maria e gentilmente agitados. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado 2 mL de Reagente de Cor (carbonato de sódio 94 mmol/L e hidróxido de sódio 250 mmol/L – reagente nº 3 do Kit). A absorbância dos tubos testes, padrão e branco foi determinada em espectrofotômetro (Micronal B382, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda de 590 nm.

A atividade de fosfatase alcalina foi calculada multiplicando-se a absorbância do teste pelo fator de calibração. Em seguida, os valores obtidos foram normalizados pelo valor do padrão, dividindo-se o valor da ALP pelo valor obtido com o padrão [U/(Lxmg)].

4.5 Avaliação da expressão dos genes que codificam para Col-I e FN

4.5.1 Extração de RNA

O meio de cultura das placas petri, foi aspirado e substituído por 1 mL de Trizol (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA). As amostras foram, então, homogeneizadas com o intuito de remover todas as células dos discos de dentina. O Trizol, contendo as células, foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Para cada mL de Trizol utilizado na homogeneização foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V, Xalostoc, México). Os tubos foram agitados vigorosamente na mão por 15 segundos e incubados por 2 ou 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rcf (microcentrífuga Eppendorf modelo 5415R – Hamburg - Germany) por 15 minutos a 4° C. Depois da centrifugação, a mistura foi dividida em uma fase baixa

correspondente ao trizol/ clorofórmio/DNA, uma interfase (proteína), e uma fase aquosa superior correspondente à fase onde está o RNA (água e RNA). O volume desta fase corresponde a 60% do volume de Trizol utilizado na homogeneização.

A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Para cada mL de Trizol utilizado na homogeneização foi adicionado 0,5 mL de isopropanol (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V, Xalostoc, México), para precipitar o RNA da fase aquosa. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 rcf por 10 minutos a 4° C. Nessa etapa foi observada a formação de um pellet tipo gel no fundo do tubo.

Após a remoção do sobrenadante, o pellet de RNA foi seco brevemente colocando-se o tubo em uma posição invertida sobre um papel por 10 minutos. Para cada mL de Trizol foi adicionado 1 mL de etanol 75% (J.T.Baker - Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V, Xalostoc, México). As amostras foram misturadas em agitador de tubos (Phoenix modelo AP-56 - Phoenix Ind. E Com. de Equipos Científicos Ltda – Araraquara – SP – Brasil) e centrifugadas a 7.500 rcf por 5 minutos a 4° C.

O sobrenadante foi novamente descartado para se proceder a secagem do pellet de RNA sobre um papel por 30 minutos. O RNA foi redissolvido em 10 µL de água ultrapura tratada com DEPC (BioAgency Laboratórios – São Paulo, SP, Brasil) por meio da técnica “up & down” com pipeta. As amostras foram, então, incubadas por 10 minutos a 55° C (Thermomixer Comfort – Eppendorf - Hamburg – Germany).

Uma alíquota do RNA total (1µL) foi diluída em água ultrapura tratada com DEPC na proporção de 1:50 para a realização da quantificação do RNA em biofotômetro (biophotometer Eppendorf – modelo Eppendorf RS – 232C–Hamburg - Germany).

4.5.2 RT- PCR

4.5.2.1 Síntese do cDNA

Para cada RNA total extraído das amostras de cada grupo, foi sintetizado o cDNA (DNA complementar obtido a partir de uma alíquota de mRNA) por meio da reação de RT-PCR. Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foi adicionado 1 µL de Oligo dT 100 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), 1µg de RNAtotal, 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) e água ultra-pura tratada com DEPC para completar um volume total de 13 µL de solução. A solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e então transferida imediatamente para o gelo. Após um “spin” em microcentrífuga, foram adicionados 4 µL de tampão First-Strand 5X (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) e 2 µL de Ditioneitol (DTT 0,1M - Invitrogen – Carlsbad, CA, USA). A solução foi incubada à 42° C por 2 minutos e então se adicionou 1 µL (200UI) da enzima Superscript II (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA). A solução foi homogeneizada gentilmente com o auxílio de uma pipeta e incubada à 42° C por 50 minutos. Após este período de incubação, a reação foi inativada à 70° C por 15 minutos.

4.5.2.2 PCR

Após a síntese do cDNA, foi avaliado o efeito da irradiação com o laser sobre a expressão dos genes que codificam colágeno tipo-I (Col-I) e fibronectina (FN). Para cada um destes genes, primers específicos foram desenhados a partir da sequência de mRNA (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências e aplicações dos primers para *mus musculus* utilizados neste trabalho

Sequências dos primers	Utilização
S: 5'- TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT - 3' AS: 5' - ATG GTG AAG GTC GGT GTG AA - 3'	Amplificação de Gapdh
S: 5'- CTG GGG TCT ACT CCA CCG AA -3' AS: 5' - GCC AAG ATT CAG AGA CCC GG - 3'	Amplificação de FN
S: 5'- TGA GGT CCA GGA GGT CCA - 3' AS: 5' - AAC TTT GCT TCC CAG ATG TCC - 3'	Amplificação de Col-I

Em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, foram adicionados 1 µL do cDNA, 2,5 µL de tampão da Taq DNApolimerase 10X (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), 0,5 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), 0,1 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA), 19,15 µL de água ultrapura tratada com DEPC, 0,5 µL do primer R (Reverse) e 0,5 µL do primer F (Foward). O tubo foi transferido para um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Systems - Singapore) e submetido à seguinte ciclagem térmica: 94° C por 2 minutos, 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos e 72° C por 1 minuto. Os produtos da reação foram separados em gel de agarose 1,5% em cuba eletroforética, operando a 80V por 60 minutos e fotodocumentadas (UVP BioImaging System modelo - UV/ White Darkroom GDS 8000 system - USA). O

Material e Método

gene que foi considerado como controle endógeno para normalização dos níveis de expressão gênica foi o Gapdh de camundongo. O software Image J (Image Processing Analysis in Java) foi utilizado para a realização da densitometria das bandas eletroforéticas. A intensidade das bandas comparou os grupos com o controle de carregamento para se estimar os níveis de expressão dos genes investigados em relação ao controle endógeno Gapdh.

5 RESULTADO



5.1 Determinação das condições do experimento

5.1.1 Espectrografia de transmitância do meio de cultura

Dados obtidos com a dosagem do espectro de absorção do meio de cultura em relação aos diversos comprimentos de onda emitidos pelo diodo estão demonstrados na Figura 2 a e b. Tanto o primeiro meio que possuía a cor avermelhada (Figura 2a) quanto o segundo meio que era incolor (Figura 2b), sendo ambos baseados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA Chemical Co, St. Louis, MO, USA), apresentaram baixo coeficiente de absorção da radiação infravermelha (830 nm). Esta porcentagem de absorção foi aproximadamente de 5%, fato esse que viabilizou a utilização no experimento utilizando os dois tipos de meios de cultura, visto que o corante adicionado não interferiu no espectro de absorção nesse comprimento de onda específico. Tal fato não se repete para o comprimento na região do vermelho.

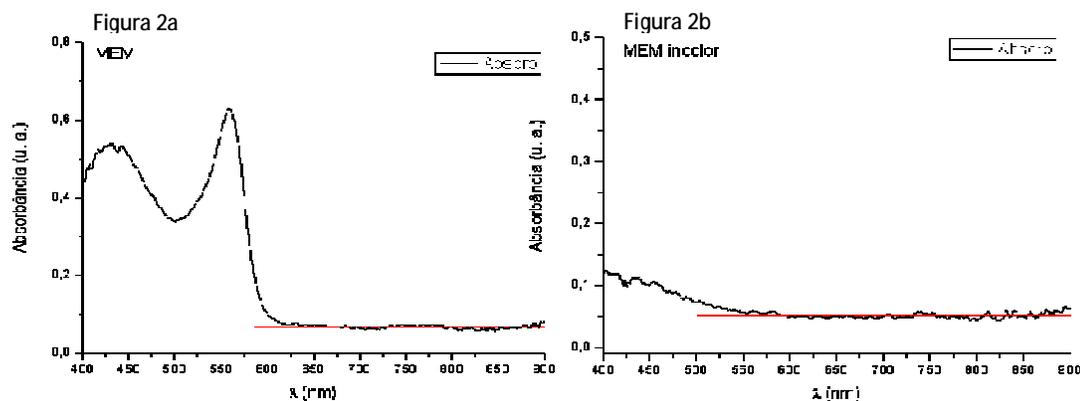


FIGURA 2 - Gráficos representativos da porcentagem de Absorbância do meio de cultura DMEM. **2a** - DMEM vermelho; **2b** - DMEM incolor.

5.1.2 Monitoramento térmico no meio de cultura

A medida da temperatura do meio simulou uma situação experimental real e informou ao pesquisador o tempo disponível para irradiação sem que houvesse um dano térmico indesejado às células. Os dados obtidos nesse procedimento foram avaliados e visualizados por meio de gráficos (Figura 3). Os valores de alteração de temperatura foram medidos para o meio de cultura nas diferentes concentrações de SFB durante um período máximo de 10 minutos de irradiação com o diodo a 830 nm. Sendo assim, foi possível visualizar no DMEM sem SFB uma variação de $0,6^{\circ}\text{C}$ (Figura 3a). Sendo essa variação semelhante às concentrações de 2% SFB (Figura 3b) e de 10% SFB (Figura 3d). Porém para o meio com 5% SFB (Figura 3c) essa variação foi de aproximadamente $0,4^{\circ}\text{C}$.

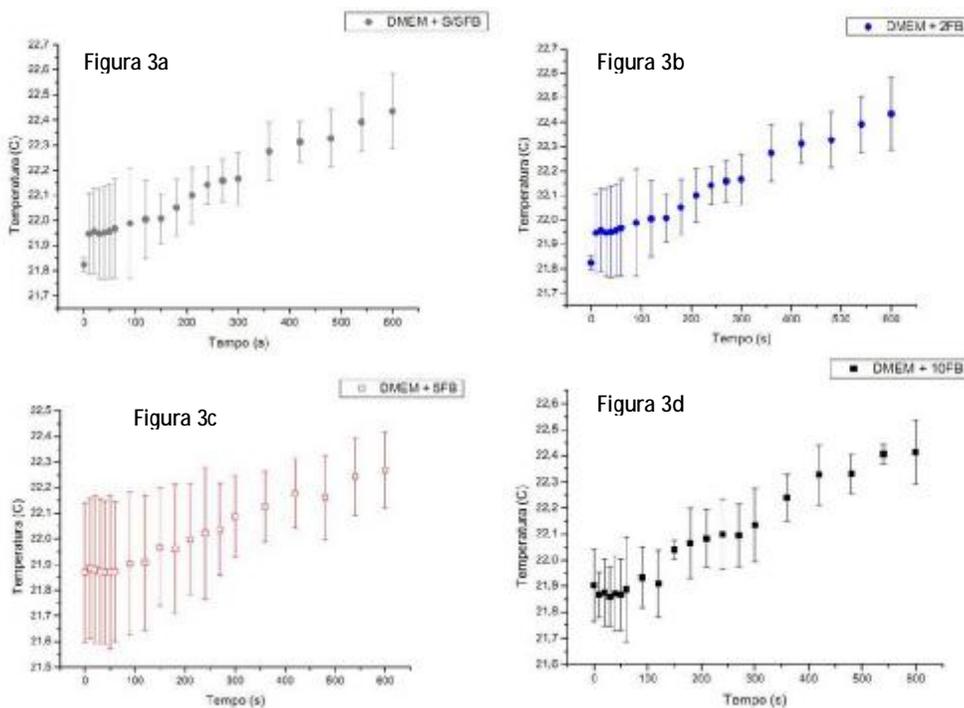


FIGURA 3 - Gráficos representativos da alteração de temperatura no DMEM em diferentes concentrações de SFB. **3a** - DMEM sem SFB; **3b** - DMEM + 2% SFB; **3c** - DMEM + 5% SFB; **3d** - DMEM + 10% SFB

5.2 Experimento: Bioestimulação direta das células

Dados descritivos (medianas e intervalos) para cada um dos produtos metabólicos produzidos pelas células MDPC-23 e quantificados na presente investigação estão apresentados na Tabela 3 e visualizados na Figura 4. A produção de SDH (desidrogenase succínica) e de proteína total foi comparável entre os grupos enquanto que a produção de fosfatase alcalina foi significativamente menor no grupo laser (Tabela 3, Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Tabela 3 - Medianas (intervalos) dos valores obtidos para cada produto metabólico segundo o grupo

Grupo	Produto metabólico		
	Produção SDH [n=5]	Proteína total [n=7]	Fosfatase alcalina [n=7]
Laser	0,4491 (0,1788) a*	60,324 (15,246) a	0,018 (0,073) a
Controle	0,4338 (0,0369) a	39,534 (17,886) a	0,046 (0,078) b

* Nas colunas, medianas (intervalos) seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Quando se comparou, em porcentagem, os valores numéricos obtidos através do teste de MTT (produção de SDH), foi possível determinar que as células irradiadas aumentaram em 3,5% seu metabolismo, caracterizando uma tendência destas células responderem positivamente a bioestimulação. Todavia, o teste estatístico aplicado a estes valores numéricos demonstrou não ter ocorrido diferença entre os grupos experimental e controle (Figura 4a).

Quanto à expressão total de proteínas, foi demonstrado que as células MDPC-23 irradiadas também aumentaram em 34,5% sua atividade. Entretanto, o teste estatístico aplicado não determinou diferença entre os grupos avaliados

Resultado

(Figura 4b). Finalmente, a aplicação do laser sobre as células reduziu em 60,8% a expressão de fosfatase alcalina quando comparado com o grupo controle. Esta diferença foi estatisticamente significativa quando o teste de Mann-Whitney ($p > 0,05$) foi aplicado sobre os valores numéricos obtidos (Figura 4c).

Com relação ao RT-PCR, foi possível identificar na fotodocumentação (Figura 5) a presença de bandas íntegras para os genes Fn, Col-I e o Gapdh tanto para o grupo experimental como para o controle. A intensidade das bandas foi dosada a partir da densitometria das bandas eletroforéticas e os valores obtidos em pixels das amostras dos genes Col-1 e Fn comparados com o controle de carregamento para se estimar os níveis de expressão dos genes investigados em relação ao controle endógeno Gapdh. Os valores em porcentagem das bandas de colágeno e fibronectina não apresentaram diferenças nas suas intensidades, determinando assim que as células não sofreram influência do laser.

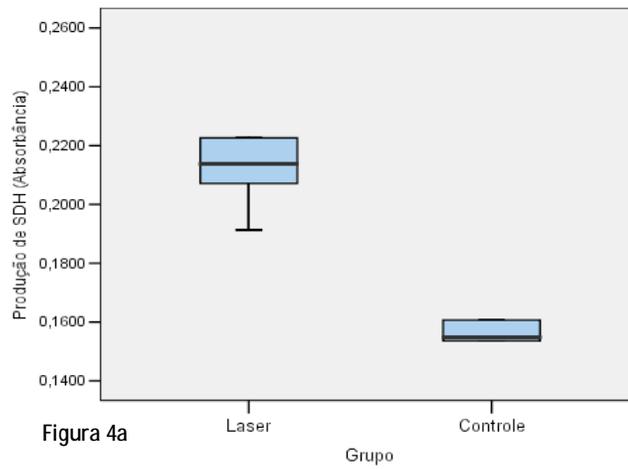


Figura 4a

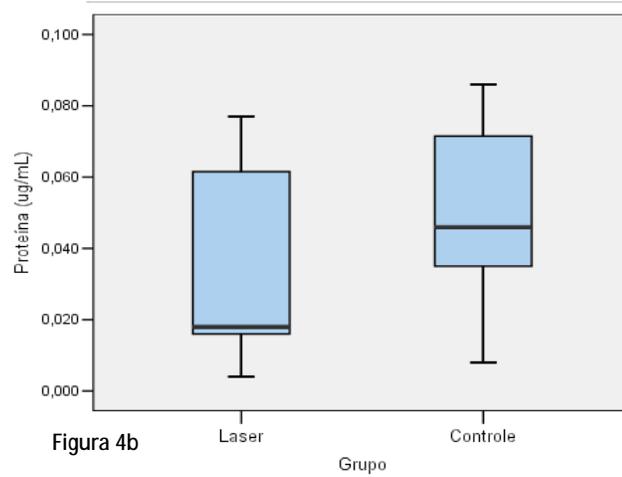


Figura 4b

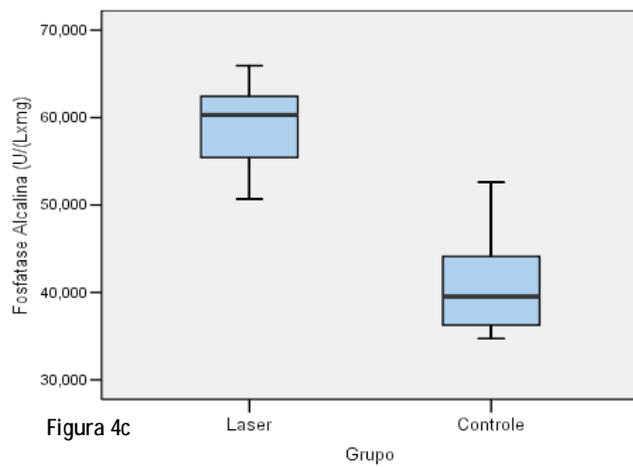


Figura 4c

FIGURA 4 - Visualização dos dados obtidos na pesquisa representados gráficamente. **4a** - metabolismo celular; **4b** - proteínas totais; **4c** - fosfatase alcalina para os grupos laser e controle. Barras indicadas com letras iguais representam grupos que não diferem estatisticamente (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

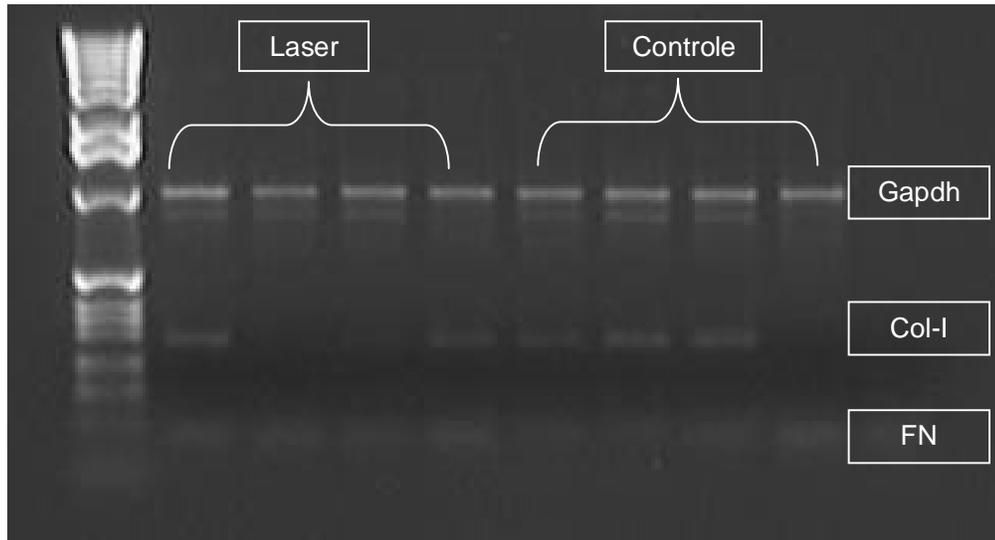


FIGURA 5 - Foto do gel de brometo com as bandas dos genes estudados (Gapdh, Col-I e FN) para o grupo controle e o experimental.



6 DISCUSSÃO

O laser de baixa intensidade tem sido aplicado nas diversas áreas da saúde. Entretanto, pouco se conhece à respeito de seus mecanismos de atuação direta ou indireta sobre as células (Karu et al.³², 1996; Jia et al.²⁷, 2004). Especula-se que, num primeiro momento, a luz laser seja absorvida pelo tecido e em seguida, essa energia seja transferida para componentes intracelulares, promovendo efeitos fotoelétricos que induzem a regulação do sistema celular por meio do processo conhecido como biomodulação (Stein et al.⁶⁹, 2005, Tuby et al.⁷³ 2007). Este processo, o qual pode ser obtido pela irradiação com o laser vermelho e infra-vermelho, possui um limiar de penetração nos tecidos biológicos dependente do comprimento de onda, bem como das propriedades ópticas, espessura e reflectância do tecido irradiado (Mochizuki-Oda et al.⁵⁵, 2002, Jia et al.²⁷, 2004). Para o laser com comprimento de onda que se localiza no infra-vermelho, tal como aquele utilizado na presente pesquisa, a interação ocorre com os cromóforos presentes na mitocôndria, estimulando assim as funções celulares (Karu et al.³¹, 1995). Dentre essas funções, as mais estudadas com relação à biomodulação são a proliferação celular, reparação tecidual associada à liberação de proteínas e citocinas, e a síntese de matriz de colágeno (Kreisler et al.⁴⁵, 2003, Ferreira et al.²⁰ 2006, Matsui et al.⁵⁴, 2007, Tuby et al.⁷³, 2007).

Diversas pesquisas têm demonstrado que o efeito biomodulador do laser de baixa intensidade é específico para os diversos tipos celulares, dentre eles o macrófago, linfócito, queratinócito, célula endotelial, fibroblasto e osteoblasto (Grossman et al.²³, 1998, Almeida-Lopes et al.², 2001, Khadra et al.^{35,36,37}, 2005, Moore et al.⁵⁶, 2005). No caso das células com fenótipo de odontoblasto, a

Discussão

proliferação celular e a síntese de determinadas proteínas estão entre os efeitos biomoduladores mais desejados, pois estas atividades celulares participam diretamente do processo de reparação do tecido pulpar. Tem sido descrito que a irradiação das células com laser promove a excitação eletrônica de moléculas fotoceptoras presentes na cadeia respiratória, o que desencadeia respostas proliferativas juntamente com o aumento na expressão protéica (Karu et al.³⁴, 2004). Na presente pesquisa, dentro dos parâmetros específicos de irradiação selecionados e avaliados, foi possível observar aumento percentual de 3,5% e 34,5% no metabolismo das células odontoblastóides MDPC-23 e na expressão total de proteínas, respectivamente. Todavia, esses dados não foram estatisticamente diferentes daqueles observados para o grupo controle, onde as células não foram irradiadas. Essa baixa proliferação celular, associada ao limitado aumento na síntese de proteínas demonstrou a discreta tendência de resposta positiva a biomodulação, sugerindo, dessa maneira, que a dose aplicada sobre as células não foi suficiente para estimular significativamente suas atividades metabólicas.

O comprimento de onda infra-vermelho utilizado no presente experimento, quando aplicado em doses ideais, pode atingir a membrana mitocondrial da célula, sendo então absorvido pelos cromóforos. Essas estruturas são fotossensíveis e englobam a classe das porfirinas, flavinas, citocromos mitocondriais, membrana plasmática e sistema NADH oxidase, o qual possui flavoproteínas e citocromo b (Kale et al.²⁸, 1992, Fraikin et al.²¹, 1996, Edwards et al.¹⁹, 2001). Esse espectro, mais especificamente no comprimento de onda do 810 ao 830 nm, quando

absorvido pelo citocromo c oxidase da mitocôndria (Mochizuki-Oda et al.⁵⁵, 2002, Kreisler et al.⁴⁵, 2003) promove modificações rápidas da cascata de reações químicas e físicas no interior da célula, promovendo alterações metabólicas (Karu et al.²⁹, 1988). Essas modificações resultam dos elétrons absorvidos na irradiação pelo citocromo e transferidos, na respiração oxidativa, para o receptor Cu_A e posteriormente conduzidos internamente dos receptores Cu_A heme-a para o heme-a₃/Cu_B central, por meio de 7 reações de óxido-redução intermediárias, envolvendo as moléculas de Fe e Cu. Esse processo resulta na redução da molécula de oxigênio e conseqüente produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Karu et al.³⁴, 2004, Tuby et al.⁷³, 2007). Assim, a presença de ROS intracelular altera o estado REDOX da célula (Lubart et al.⁴⁹, 2005), sendo que em concentrações inferiores ao limiar de dano celular, ocorre a produção de diversos efeitos benéficos para as células, tais como: proliferação, diferenciação e regulação de sua sobrevivência (Murrell et al.⁵⁸, 1990, Burdon⁷, 1995, Burdon et al.⁸, 1995, Calaghan et al.¹⁰, 1996). Contudo, na presente pesquisa, as alterações de síntese protéica e metabolismo não foram estatisticamente diferentes quando as células receberam a irradiação. Estes dados científicos nos permitem especular novamente que os parâmetros do laser aplicados sobre as células MDPC-23 não foram suficientes para ativar os cromóforos e assim produzir a quantidade de ROS necessária para promover modificações em toda a cascata de reações positivas sobre este tipo celular. Esta especulação se deve ao fato de que resultados semelhantes aos encontrados no presente experimento também foram demonstrados por outros pesquisadores (Grossman et al.²³, 1998), os quais não

encontraram proliferação celular em cultura de queratinócitos nas doses inferiores a $0,42 \text{ J/cm}^2$. Todavia, Tuby et al.⁷³ (2007), ao irradiar células em cultura com laser num comprimento de onda de 804 nm e doses mais elevadas (entre 1 e 3 J/cm^2), observaram proliferação de células mesenquimais e cardíacas em 4.6 e 3.5 vezes, respectivamente.

O aumento do metabolismo e proliferação celular não são os únicos efeitos desejados na terapia com laser de baixa intensidade. No caso da célula odontoblastóide MDPC-23 utilizada na presente pesquisa, a biomodulação estimularia também a síntese de proteínas típicas da matriz dentinária, tais como colágeno, fibronectina e fosfatase alcalina. Tem sido demonstrado que a fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima envolvida na mineralização dos tecidos (Stein et al.⁶⁹, 2005, Matsui et al.⁵⁴ 2007) e em geral, sua ação está correlacionada com o processo inflamatório (Matsui et al.⁵⁴ 2007). Diversas células pulpares, tais como fibroblastos, osteoblastos e odontoblastos, podem sintetizar e liberar ALP (Tsukamoto et al.⁷¹, 1992). Numa pesquisa recente, Matsui et al.⁵⁴ (2007) aplicaram o laser de GaAlAs sobre células pulpares. Os autores demonstraram a ocorrência de estímulo da atividade e expressão de fosfatase alcalina, a qual, também, é um marcador da diferenciação celular. Todavia, outros pesquisadores verificaram que o laser não influenciou a atividade de síntese de ALP por células em cultura irradiadas (Coombe et al.¹³, 2001, Khadra et al.³⁶, 2005). É possível sugerir que as diferentes linhagens celulares utilizadas nas pesquisas desenvolvidas até o momento podem determinar resultados variados. Apesar das células MDPC-23 utilizadas na presente pesquisa serem mais sensíveis a efeitos

agressivos quando comparadas com fibroblastos L929 (dados laboratoriais ainda não publicados), tais células odontoblastóides responderam aos efeitos do laser na dose utilizada, reduzindo a expressão de ALP em 60,8%, diferentemente de outros tipos celulares utilizados em pesquisas anteriores (Coombe et al.¹³, 2001, Khadra et al.³⁶, 2005).

Outra proteína típica da dentina é o colágeno, responsável pela formação de uma matriz fibrosa, sobre a qual os cristais de apatita são depositados (Coombe et al.¹³, 2001, Marques et al.⁵², 2004, Ferreira et al.²⁰, 2006). Durante o processo de reparação da polpa, ocorre a intensa síntese de matriz dentinária, a qual é basicamente composta por colágeno tipo 1. Esta matriz de dentina rica em colágeno pode ser depositada por fibroblastos, odontoblastos e/ou osteoblastos (Ferreira et al.²⁰, 2006). Apesar de alguns autores relatarem o aumento na proliferação de fibroblastos *in vitro* após terem sido irradiados com laser infravermelho (Almeida-Lopes et al.², 2001, Pereira et al.⁶², 2002), Kreisler et al.⁴⁵ (2003) e Marques et al.⁵² (2004) afirmaram que o aumento no número celular não significa aumento da atividade de síntese celular. Os autores demonstraram ainda que a elevada densidade de energia aplicada sobre células do tipo fibroblastos em cultura, apesar de ativar a proliferação celular, pode reduzir a síntese de colágeno. Na presente pesquisa, a expressão de colágeno não foi influenciada pela irradiação das células MDPC-23 com laser dentro dos parâmetros estabelecidos. Mais uma vez, pode-se sugerir que a metodologia de irradiação utilizada no presente estudo não foi adequada para ativar células de linhagem odontoblástica a expressar genes que codificam para colágeno tipo 1.

Tem sido relatado que o colágeno participa dos processos reparacionais e possui afinidade, assim como os glicosaminoglicanos, pela fibronectina (FN). Quando em condições de normalidade, o tecido pulpar expressa FN por meio das células odontoblásticas (Ferreira et al.²⁰, 2006). Tal proteína pode ser abundantemente encontrada ao redor das paredes dos vasos sanguíneos e junto à camada de odontoblastos, atuando na diferenciação, polarização e migração destas células durante a formação e reparação dentinária (Ferreira et al.²⁰, 2006). A diferença estatisticamente não significativa entre os grupos controle e experimental, com relação à expressão da FN, confirma que a densidade de energia e os demais parâmetros utilizados na presente pesquisa não foram suficientes para estimular a síntese dessa proteína. Em contra partida, Ferreira et al.²⁰ (2006) observaram um aumento significativo na expressão dessa proteína ao irradiar pré-molares humanos com dose de 4 J/cm².

Na presente pesquisa tanto o colágeno quanto a fibronectina foram avaliados por meio de expressão gênica. O sinal eletrônico proveniente da irradiação excita as moléculas fotoceptoras localizadas na mitocôndria. Tal sinal é amplificado e transduzido para o núcleo por meio de reações bioquímicas (Karu et al.³², 1996), resultando na produção de enzimas, tais como: Na⁺-ATPase, K⁺-ATPase e Na⁺/K⁺ exchangers (NHEs). Todas estas enzimas desempenham importante função na regulação de genes e nos sinais de transdução (Karu et al.³², 1996). O final dessas reações fotobiológicas ocorre no núcleo, resultando em aumento da taxa de síntese de DNA e RNA (Karu et al.³⁴, 2004). Hamajima et al.²⁴ (2003) ao irradiarem células odontoblastóides em cultura com laser em dose

de 7,64 J/cm², observaram uma expressão de osteoglicina aumentada em 2,3 vezes. Contudo, ao se analisar os genes que codificam para Col-I e FN na presente investigação, não foi possível identificar uma ampliação na expressão gênica decorrente do laser, sugerindo que a dose não foi suficiente para ativar a liberação das enzimas Na⁺-ATPase, K⁺-ATPase e NHEs.

Destarte a contrariedade de efeitos obtidos na literatura, sugere-se que a dificuldade na compreensão dos efeitos biomoduladores não apenas nas células odontoblastóides, mas também em outros tipos, decorre da existência de diversos protocolos e modelos experimentais. Assim sendo, para a terapia com o laser não existe uma padronização das técnicas de aplicação, potência e fluência ideal para cada procedimento, interferindo dessa maneira, na resposta celular (Moore et al.⁵⁶, 2005) frente a um determinado tratamento. Desta forma, a determinação dos parâmetros de irradiação que englobam o comprimento de onda, densidade de energia e irradiância são essenciais para o delineamento de uma pesquisa científica confiável, uma vez que pode ocorrer a interação do comprimento de onda com o acrílico havendo perda de energia ou ainda com o corante do meio de cultura promovendo aquecimento local (Moore et al.⁵⁶ 2005). Assim sendo, o delineamento do estudo faz-se importante para que a resposta identificada no trabalho seja única e exclusivamente decorrente da ação da luz laser na célula.

No delineamento de um experimento para análise da resposta celular à irradiação, a escolha do meio de cultura para as células deve estar diretamente relacionada com as características do laser a ser utilizado. Isto porque o meio de cultura pode conter um corante avermelhado (fenolftaleína) na sua composição, o

qual apresenta um coeficiente de absorção para os diversos comprimentos de onda (Almeida-Lopes et al.², 2001). Este corante vermelho presente no meio de cultura é importante para o cultivo celular, uma vez que possíveis contaminações ou alterações de pH da solução durante a realização do experimento, podem ser facilmente observadas devido à alteração na cor do meio de cultura. Entretanto, a absorção do comprimento de onda pelo corante pode ser convertida em calor pelo método de relaxação molecular e transferência de energia e essa variação de temperatura no microambiente celular, dependendo de sua intensidade, pode causar danos celulares. Assim, na presente pesquisa, após a espectroscopia de transmitância, foi possível identificar que o meio de cultura (DMEM) com ou sem o corante vermelho apresentavam um coeficiente de absorção de 5% para o comprimento de onda na região do infravermelho. Esse valor de coeficiente não foi suficiente para alterar a temperatura do meio. Diante disto, e devido aos benefícios de alteração de cor já descritos, o meio de cultura selecionado para a execução desse projeto foi o meio de cultura (DMEM) avermelhado.

Como relatado previamente, a variação de temperatura é de extrema importância para avaliação da resposta celular (Zach et al.⁷⁸,1965, Kreisler et al.⁴⁴, 2002, Mochizuki-Oda et al.⁵⁵,2002, Kadhra et al.^{35,36},2005, Amano et al.³, 2006). O limite de acréscimo de temperatura suportado pelas células da polpa foi demonstrado por Zach, Cohen⁷⁸ (1965) ao aquecer um instrumento e aplicá-lo sobre a superfície dentária. Esses autores identificaram a morte desta célula com uma variação de temperatura do meio ambiente celular acima de 5,5°C. Na presente pesquisa o monitoramento térmico permitiu visualizar a variação de

temperatura de 0,6°C no meio de cultura sem SFB, e nas concentrações de 2% e 10% de SFB. Porém, para a concentração de 5% de SFB, a variação foi de 0,4°C. Esses valores eliminam os possíveis danos térmicos a célula, permitindo, assim, que as respostas identificadas sejam exclusivas da atuação do laser no metabolismo celular.

A resposta celular frente à laserterapia também pode ser influenciada pela condição de estresse, visto que sob estas condições, o mecanismo de resposta celular é mais sensível ao efeito biomodulador do laser (Almeida-Lopes et al.², 2001, Marques et al.⁵², 2004, Khadra et al.^{35,36}, 2005). Essa condição envolve desde uma alteração dos agentes oxidativos até mesmo uma carência nutricional (redução na porcentagem de SFB no meio de cultura), sendo esta última mais efetivamente utilizada para estudar os efeitos do laser sobre o metabolismo celular (Almeida-Lopes et al.², 2001, Cagnie et al.⁹, 2003, Jia et al.²⁷, 2004, Stein et al.⁶⁹, 2005). Diversos autores têm utilizado essa condição previamente ao processo de irradiação, sendo que a biomodulação, na maioria das vezes, têm resultados efetivos, como observado por Pereira et al.⁶² (2002), os quais relataram a ocorrência de aumento da proliferação celular nas células NIH 3T3 colocadas em condição de estresse (meio de cultura suplementado com apenas 2,5% de SFB). Mediante a tal fato, no presente experimento o meio de cultura, após 24 horas de cultivo, foi substituído por um meio sem a presença de SFB. Entretanto, Almeida-Lopes et al.² (2001) demonstrou que fibroblastos cultivados em meio de cultura sem SFB não foram capazes de apresentar crescimento, enquanto que a adição de 5% SFB proporcionou uma taxa de proliferação menor do que a ideal (10%),

porém suficiente para induzir a uma condição de estresse *in vitro*. Sendo assim, a condição experimental utilizada na presente pesquisa pôde de alguma maneira ter prejudicado a avaliação do real efeito da laserterapia sobre as células MDPC-23. Novas pesquisas são necessárias com o intuito de determinar a melhor condição de estresse em cultura para células com fenótipo de odontoblasto.

As respostas positivas do laser são influenciadas também pelo período de repetição da irradiação (Kreisler et al.⁴⁵, 2003, Khadra et al.^{35,36}, 2005). Na presente pesquisa, foram realizadas 6 aplicações do laser com intervalos de 12 horas, ou seja, todas as avaliações da resposta das células à laserterapia foram executadas 72 horas após o cultivo celular. Os efeitos mais positivos da bioestimulação celular encontrados na literatura seguem o mesmo período de avaliação (Khadra et al.³⁵, 2005, Almeida –Lopes et al.², 2001). Contudo, Kreisler et al.⁴⁴ (2002) demonstrou, para fibroblastos, que o efeito de estimulação do LLLT foi observado apenas com 24 horas. Diante dos resultados contraditórios expostos anteriormente, conclui-se que mais estudos sobre a resposta celular frente a diferentes tipos de laser, períodos de irradiação e seus parâmetros específicos, são de suma importância para se identificar o protocolo de irradiação mais apropriado para a bioestimulação de cada tipo isolado de célula (Khadra et al.^{36,37}, 2005), evitando-se, com isso, avaliações precoces ou tardias que poderiam camuflar o real efeito da terapia.

Desta maneira, novas investigações utilizando diferentes valores de densidade de energia e outros parâmetros de laser são necessárias para promover o entendimento dos reais efeitos da laserterapia nas células odontoblastóides

Discussão

MDPC-23 em cultura, uma vez que a dose ou mesmo os parâmetros específicos para esse tipo celular não foi, até o presente momento, descrito da literatura.

7 CONCLUSÃO



Foi possível concluir, dentro das condições experimentais, que as células irradiadas com a luz laser, de acordo com os parâmetros utilizados na presente pesquisa, apresentaram discreta redução na expressão de colágeno, fibronectina e fosfatase alcalina. Sendo assim, a dose (fluência) da luz laser oferecida às células odontoblastóides MDPC-23 em cultura ficou aquém da necessária para sobreregular a expressão de proteínas específicas.

8 REFERÊNCIAS

Referências *

1. Aihara N, Yamaguchi M, Kasai K. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK express in vitro. *Lasers Med Sci.* 2006; 21:24-33.
2. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on culture irradiance an same fluency. *Lasers Surg Med.* 2001; 29:179-84.
3. Amano T, Muramatsu T, Amemiya K, Kubo K, Shimonon M. Responses of rat pulp cells to heat stress in vitro. *J Dent Res.* 2006; 85: 432-5.
4. Aranha AMF, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J, Costa CAS. Effect of curing regime on the cytotoxicity of resin-modified glass-ionomer cements applied to an odontoblast-cell line. *Dent Mater.* 2006; 22: 864-9.
5. Banfield N, Addy M. Dentine hypersensitivity: development and evaluation of a model in situ to study tubule patency. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 325–35.
6. Brännström M. The hydrodynamic theory of dentinal pain: sensation in preparations, caries, and the dentinal crack syndrome. *J Endod.* 1986; 12: 453-7.
7. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 775–94
8. Burdon RH, Alliangana D, Gill V. Hydrogen peroxide and the proliferation of BHK-21 cells. *Free Radic Biol Med.* 1995; 23: 471–86.
9. Cagnie EMVB, Cornelissen MJ, Declerecq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and power laser irradiation. *Lasers Surg Med.* 2003; 18:95-9.

*De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Referências

10. Callaghan GA, Riordan G, Gilmore WS, McIntyre IA, Allen JM, Hannigan BM. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in the haemopoietic cell line U937. *Lasers Surg Med.* 1996; 19: 201–6.
11. Ciaramicoli TM, Carvalho CRR, Eduardo PC. Treatment of cervical dentin hypersensitivity using Neodymium: Yttrium–Aluminum–Garnet laser. Clinical evaluation. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 358–62.
12. Colls J. *La terapia laser, hoy.* Barcelona: Centro Documentación Laser; 1986.
13. Coombe AR, Ho CTG, Darendeliler MA. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod.* 2001; 4:3–14.
14. Costa CAS, Hebling J, Hanks CT. Effects of light-curing time on the cytotoxicity of a restorative resin composite applied to an immortalized odontoblast-cell line. *Oper Dent.* 2003; 28: 365-70.
15. Costa CAS, Hebling J, Garcia-Godoy F, Hanks CT. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials.* 2003; 24:3853-8.
16. Costa CAS, Vaerten MA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater.* 1999; 25: 434-41.
17. Costa CAS, Duarte PCT, Souza PPC, Giro EMA, Hebling J. Cytotoxic effects and pulpal response caused by a mineral trioxide aggregate formulation and calcium hydroxide. *Am J Dent.* 2007 (In press).
18. Dababneh RH, Khouri AT, Addy, M. Dentine hypersensitivity— an enigma? a review of terminology, epidemiology, mechanisms, aetiology and management. *Br Dent J.* 1999; 187: 606–61.

Referências

19. Edwards AM, Silva E. Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids. *J Photochem Photobiol. B* 2001; 63: 126–31.
20. Ferreira ANS, Silveira L, Genovese WJ, de Araújo VC, Frigo L, de Mesquita RA, et al. Effect of GaAIIAs laser on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 358-65.
21. Fraikin GY, Strakhovskaya MG, Rubin AB. The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. *J Photochem Photobiol. B Biol.* 1996; 34: 129–35.
22. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol Biol.* 1991; 11: 87-95.
23. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 212-8
24. Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagama T, Kawahara M, Ohta M, et al. Effect of low-level irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci.* 2003; 18: 78-82.
25. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, et al. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.* 1998; 3: 1-17.
26. He WX, Niu ZY, Zhao SL, Jin WL, Gao J, Smith AJ. TGF – β activated leads to a Smad3 – mediated down – regulation of DSPP in an odontoblast cell line. *Arch Oral Biol.* 2004; 49: 911–8.
27. Jia YL, Guo ZY. Effect of low-power He-Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. *Lasers Surg Med.* 2004; 34: 323-8.

Referências

28. Kale H, Harikuman P, Kulkarni SB, Nair PM, Netrawali MS. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin B. Effect of light. *Mutat Res.* 1992; 298: 17–23.
29. Karu T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1988; 2: 52-74.
30. Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effect of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* 2005; 36:307-14.
31. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol.* 1995; 27: 219-23.
32. Karu T, Pyatibrat LV, Kalendo GS, Esenaliev RO. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of hela cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 1996; 18: 171-7.
33. Karu TI. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE J Quantum Electron.* 1987; 23:1703-17.
34. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004, 3: 211-6.
35. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res* 2005; 73: 55–62.
36. Khadra M, Lyngstadaas PS, Haanaes RH, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26: 3503–9.
37. Khadra M, Kasem N, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behavior of human oral fibroblasts

- cultured on titanium implant material. A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2005; 16: 168–75.
38. Kienle A, Hibst R. Light guiding in biological tissue due to scattering. *Phys Rev Letters.* 2006; 97: 018104.1-018104.4.
39. Kikuchi H, Sawda T, Yanagisawa T. Effects of a functional agar surface on in vitro dentinogenesis induced in proteolytically isolated, agar-coated dental papillae in rat mandibular incisors. *Arch Oral Biol.* 1996; 41: 871-83.
40. Kim Y-D, Kim S-S, Hwang D-S, Kim G-C, Shin S-H, Kim U-K, et al. Chung. Effect of low level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor: an experimental study in rats. *Laser Phys. Lett.* 2007; 4: 1–5.
41. Kimura Y, Wilder-Smith P, Matsumoto K. Laser in endodontics: a review. *Int Endod J.* 2000; 33: 173-85.
42. Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 715–21.
43. Koutná M, Janisch R, Veselska R. Effects of low-power irradiation on cell proliferation. *Scr Med (BRNO).* 2003; 76: 163-72.
44. Kreisler M, Al-Haj H, d’Hoedt B. Intrapulpal temperature changes during root surface irradiation with an 809-nm GaAlAs laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 93:730-5.
45. Kreisler M, Christoffer AB, Willerstaussen B, d’Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 353-8.

Referências

46. Kujawa J, Zavodnik IB, Lapshina A, Labieniec M, Bryszewska M. Cell survival, DNA, and protein damage in b14 cells under low-intensity near-infrared (810 nm) laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 504-8.
47. Ladalardo TCCGP, Pinheiro A, Campos RAC, Brugnera Júnior A, Zanin F, Albernaz PLM, et al. Laser therapy in the treatment of dentine hypersensitivity. *Braz Dent J.* 2004; 15: 144-50.
48. Lizarelli RFZ; Miguel FAC; Villac GEP; Carvalho Filho E; Pelinoe JEP; Bagnato VS. Clinical effects of low-intensity laser vs light-emitting diode therapy on dentin hypersensitivity. *J Oral Laser Applications.* 2007; 7: 129-36.
49. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-Energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 3-9.
50. Lubart R, Friedmann H, Levinshal T, Lavie R, Breitbart H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. *J Photochem Photobiol Biol.* 1992; 15: 337-41.
51. MacDougall M, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML. Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line. *Connect Tissue Res.* 1995; 33: 97-103.
52. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers in Surg Med* 2004; 34: 260–5.
53. Marsilio AL, Rodrigues JR, Borges AB. Effect of the clinical application of the GaAlAs laser in treatment of dentin hypersensitivity. *J Clin Laser Med Surg.* 2003; 21:291-6.

Referências

54. Matsui S, Tsujimoto Y, Matsushima K. Stimulatory effects of hydroxyl radical generation by ga-al-as laser irradiation on mineralization ability of human dental pulp cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30: 27-31.
55. Mochizuki-Oda N, Kataoka Y, Cui Y, Yamada H, Heya M, Awazu K. Effects of near-infra-red laser irradiation on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. *Neurosci Lett.* 2002; 323: 207–10.
56. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005; 36: 8–12.
57. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
58. Murrell GAC, Francis MJO, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J.* 1990; 265: 659–65.
59. Nara Y, Tsukamoto Y, Fukutani S, Yamaguchi N, Mori M, Morioka T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. *Lasers Life Sci.* 1992; 4: 249-56.
60. Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J.* 2007; 202: 131-8.
61. Pashley DH. Mechanisms of dentine sensitivity. *Dent Clin North Am.* 1990; 34: 449–74.
62. Pereira SN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 31: 263–7.

Referências

63. Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal Biochem.* 1981; 116: 53-64.
64. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281-7.
65. Romanos GE, Pelekanos S, Strub JR. Effects of Nd:YAG laser on wound healing processes: clinical and immuno-histochemical findings in rat skin. *Lasers Surg Med.* 1995; 16: 368-79.
66. Roy AV. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. *Clin Chem.* 1970; 16: 431-6.
67. Schwarz F, Arweiler N, Georg T, Reich E. Desensitizing effects of an Er:YAG laser on hypersensitive dentine. A controlled, prospective clinical study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29: 211-5.
68. Souza PPC, Aranha AMF, Hebling J, Costa CAS. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater.* 2006; 22: 838-44.
69. Stein A, Benayahu D, Maltz D, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005; 23: 161-6.
70. Tate Y, Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Odontoblast responses to GaAlAs laser irradiation in rat molars: an experimental study using heat-shock protein-25 immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114: 50-7.
71. Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, et al. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 1992; 37: 1045-55.

Referências

72. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 682-8.
73. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 373-8.
74. Villa GEP, Catirse ABCED, Lia RCC, Lizarelli RFZ. In vivo analysis of low-power laser effects irradiation at stimulation of reactive dentine. *Laser Phys. Lett.* 2007; 4: 690-5
75. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003;18: 95-9.
76. West N, Addy M, Hughes J. Dentin hypersensitivity: the effects of brushing desensitizing toothpastes, their solid and liquid phases, and detergents on dentin and acrylic: studies in vitro. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 885-95.
77. Yamada K. Biological effects o low power laser irradiation on clonal osteoblastics cells (MTC3T3-E1). *J Jpn Orthop Assoc.* 1991; 65: 787-99.
78. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol .* 1965; 19: 515-30.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 01 de agosto de 2008.

CAMILA FÁVERO DE OLIVEIRA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)