

## **Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos.**

**LETÍCIA REGINA MORELLO SARTORI<sup>1</sup>; GUSTAVO DANILO NASCIMENTO LIMA<sup>2</sup>; MARIA AMÁLIA GONZAGA RIBEIRO<sup>2</sup>; MARCUS CRISTIAN MUNIZ CONDE<sup>2</sup>; FLÁVIO FERNANDO DEMARCO<sup>2</sup>; LUIZ ALEXANDRE CHISINI<sup>3</sup>.**

*1Universidade Federal de Pelotas – letysartori27@gmail.com*

*2Universidade Federal de Sergipe – Gustavo-danilo@hotmail.com*

*1Universidade Federal de Pelotas – marcusconde82@gmail.com*

*3 Universidade Federal de Pelotas – ffdemarco@gmail.com*

*3 Universidade Federal de Pelotas – luizalexandrechisini@hotmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

Apesar dos avanços científicos dos materiais utilizados na endodontia eles ainda não são capazes de erradicar todos os microrganismos no sistema de canais radiculares (SCR). Essa dificuldade pode ser devida à resistência da microbiota aos processos e à complexa morfologia dos SCR (LANA 2009).

Para isso são utilizados medicamentos intracanais como hidróxido de cálcio e o iodoformio, que devem ser biocompatíveis, não carcinogênicos e não genotóxicos, além de possuir a capacidade de induzir o reparo da região lesada sem interferir na osteogênese e na amelogênese (HEWARD et al. 2011). Visando conhecer os efeitos tóxicos da medicação intracanal, por meio de testes, busca-se analisar a citotoxicidade desses compostos sobre as células do periodonto. Para tentar minimizar esses efeitos, foi proposto a utilização da fotobiomodulação à laser (FTL). A FTL é uma fonte de radiação eletromagnética com características peculiares, que a confere propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e trófico-regenerativas, além da capacidade de estimular a proliferação de diversos tipos celulares, a atividade mitocondrial e a síntese de RNA e proteínas. A fotobiomodulação à laser causa alterações nos fotorreceptores das mitocôndrias que amplificam e transportam o sinal, ativando uma fotorresposta, que geralmente é caracterizada pela proliferação ou diferenciação celular, ou ainda ativação de síntese protéica (FRANASSIS et al. 2014).

Desta forma, o presente estudo avaliou a associação (in vitro) entre diferentes quantidades de exposição celular à FTL e a medicações intracanais na viabilidade de fibroblastos.

### **2. METODOLOGIA**

Fibroblastos (3T3) de camundongos foram obtidos no banco de células do Laboratório de Cultivo Celular NCTBIO da Faculdade de Odontologia de Pelotas, da Universidade Federal de Pelotas-UFPEL. Os fibroblastos foram cultivados com Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) e suplementados com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Uma garrafa de cultivo foi incubada em ambiente controlado (37°C, 95% de umidade e 5% CO<sub>2</sub>). Quando as células apresentaram 80% de confluência elas foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) para que todos os metabólitos presentes fossem removidos. Utilizou-se então, tripsina por cinco minutos, para desagregar as células da garrafa de cultivo. A tripsina foi inativada pela técnica de diluição, onde foi acrescentado volume duas vezes superior de DMEM/SFB ao volume inicial de tripsina. Então, a solução

contendo as células foi inserida em um tubo de 15ml e centrifugado por 5 min. a 1000 rpm, ocorrendo assim a deposição das células no fundo do recipiente. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em DMEM+ 10% de SFB. As células foram homogeneizadas e 20 µL foram removidos para contagem celular na câmara de Neubauer. Desta forma  $2 \times 10^4$  células foram semeadas com 200 µL de DMEM + 10% SFB em cada poço da placa de 96 poços e armazenadas na incubadora por 24hs para que ocorresse a adesão celular no fundo de cada poço.

Para a confecção dos corpos de prova do grupo do hidróxido de cálcio (HC) utilizou-se 1g de hidróxido de cálcio PA (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil) + 1.1ml de água destilada. Para o Grupo do Iodofórmio (IO) utilizou-se 1.5g de iodofórmio (K-dent, Quimidrol, SC, Brasil) + 600 µL de água destilada. Os materiais dos dois grupos foram espatulados e inseridos em uma matriz com formatos seguindo orientações da ISO para ensaios de citotoxicidade. Os mesmos foram esterilizados com radiação UV por 1 hora. Eludatos foram produzidos mergulhando os corpos de prova em uma solução de 1ml de DMEM + 10% de SFB e armazenando-os em uma estufa a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas de adesão celular, as células aderidas na placa foram lavadas com PBS e 200 µL do eludato foi adicionado em cada poço. Cada eludato preencheu 4 poços da placa.

Após uma hora foi realizado a irradiação das placas experimentais com o laser de forma intercalada e diretamente na monocamada celular dos diferentes grupos. Depois da irradiação, as placas voltaram à atmosfera úmida, para testes de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h (Figura 1). A viabilidade celular foi determinada através do método colorimétrico (MTT 5 mg/mL de DMEM). O MTT ficou em contato com as células por 4 horas em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir que o sal metiltetrazólio da solução de MTT fosse reduzido pelas desidrogenases presentes nas mitocôndrias dos fibroblastos, formando assim, cristais de formazan. Após o período, o meio foi sugado e os cristais de formazan ressuspensos com 200µL de dimetil sulfoxido (DMSO). O DMSO ficou em contato com as células por 15 minutos e em seguida a placa foi colocada por mais 5 minutos em um agitador (150 rpm). Os resultados foram avaliados por meio de espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA, em um comprimento de onda de 540 nm, onde foram considerados os valores de absorbância como indicador da viabilidade celular.

Os dados resultantes não apresentaram normalidade nem homogeneidade de variâncias, sendo colocados em postos, base da avaliação não-paramétrica de ANOVA de 3-vias, seguido pelo Teste de Tukey. O programa utilizado para análise estatística foi o Sigmastat 3.5.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FTL vem despertando cada vez mais o interesse da Odontologia, com aplicabilidade cada vez maior no âmbito odontológico. A FTL foi utilizada neste estudo, com a perspectiva de minimizar possíveis efeitos citotóxicos de medicamentos endodônticos em contato com células presentes na região periapical. O parâmetro de irradiação utilizado nesta pesquisa teve como base o fato de que, a irradiação no comprimento de onda visível é absorvida pelos fotorreceptores das mitocôndrias, resultando em efeitos fotoquímicos, desencadeando uma cascata de eventos metabólicos que tem como resposta final a biomodulação (RISO 2009). Estudos prévios (PEREIRA et al. 2002. BASSO et al. 2012) relatam que a densidade de energia utilizada neste estudo

apresenta resultados positivos no estímulo a fibroblastos aumentando o metabolismo celular, o número de células viáveis e a sua proliferação.

Os resultados encontrados nesta pesquisa, apresentaram diferença significativa entre o grupo não irradiado e irradiado, apresentando uma maior viabilidade nas células irradiadas. Para interação “tempo x uso do laser”, na ausência da FTL, observou-se uma tendência a diminuição na viabilidade celular com o passar dos períodos experimentais atingindo os menores valores em 72h, demonstrando um aumento da citotoxicidade dos medicamentos com o passar do tempo. Diferentemente, na presença da FTL esta alteração na viabilidade celular não foi observada. Este fato parece estar relacionado a capacidade da FTL promover o aumento na concentração de ATP, estimulando a proliferação de fibroblastos e consequentemente a liberação de fatores de crescimento celular (PDGF, IGF-I, TGF) é favorecida (ALMEIDA-LOPES et al. 2001). A FTL por sua vez, altera o redox celular, que induz a ativação de numerosas vias de sinalização intracelular, e altera a afinidade de fatores de transcrição relacionados com a proliferação celular, sobrevivência, reparação de tecidos e de regeneração.

Em relação à interação “medicamento x tempo”, os grupos HC e IO apresentaram menor viabilidade que o controle, indicando citotoxicidade dos medicamentos. A pasta de HC apresentou-se mais citotóxica que IO nos tempos de 24 e 48h, e, quando comparada ao grupo controle menor viabilidade foi observada em todos os tempos experimentais, porém, quando da associação com o laser, observou-se que a FTL não promoveu mudanças positivas em relação ao resultado. Este fato pode estar relacionado ao aumento do pH (GUIGAND et al. 1999) que promove desnaturação enzimática e destruição da membrana celular, levando a célula à morte.

Pode-se observar em outro estudo (RUPAREL et al. 2012) que o  $\text{Ca(OH)}_2$  apresentou alta citotoxicidade em 24h, com proliferação celular com o passar do tempo em contato com as células. Essa discrepância pode estar relacionada a diversidade de etapas, tipo celular utilizado e metodologias existentes entre as pesquisas.

Já em 72hs, não houve diferença entre HC e IO. Resultados semelhantes foram encontrados por (SARIGOL et al. 2010), no qual, uma substância à base de iodofórmio apresentou aumento da citotoxicidade em fibroblastos com o passar do tempo. O que pode estar relacionado a, provavelmente, função dos componentes do IO agirem mais sobre tecidos necróticos, além de sua ação tixotrópica, que é a capacidade de uma substância sólida absorver líquidos. Tornando-se mais lenta a evidência de sua citotoxicidade.

Já o grupo IO, na ausência de irradiação a laser, apresentou uma maior viabilidade celular do que os submetidos à FTL. Os mecanismos biomoduladores da terapia a laser ainda não são totalmente compreendidos. Supõe-se que alguns efeitos da associação da FTL e IO podem estar relacionados ao aumento da produção da espécie reativa oxigênio singlet o qual reage produzindo o peróxido de hidrogênio, modulando a atividade redox da mitocôndria e/ou o estado redox da célula podendo estimular o ciclo celular e a síntese de proteína em concentrações mais baixas, mas que são muito citotóxicos em concentrações mais elevadas (VLADIMIROV et al. 2004).

#### 4. CONCLUSÕES

Diante da metodologia utilizada, conclui-se que todas as medicações intracaneais mostraram-se citotóxicas. O hidróxido de cálcio foi o mais citotóxico

dos medicamentos testados em todos os tempos experimentais, e, a pasta de iodofórmio apresentou menor citotoxicidade nas primeiras 48hs, em 72h não houve diferença estatística entre os grupos IO e HC. A FTL amenizou os efeitos citotóxicos das medicações intracanaís quando da associação destas duas terapias, pois nenhuma diferença foi observada entre os tempos na presença de irradiação com laser. Já na ausência da irradiação com laser foi observado uma diminuição da viabilidade com o passar dos períodos experimentais. A FTL promoveu uma maior viabilidade celular em 72h.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LANA PEP; SCELZA MF; SILVA LE; MATTOS-GUARALDI AL De; HIRATA JR. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J.* v. 20, n.1, p.32–6, 2009

HEWARD SSC. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes simulated root surface resorption defects: An in vitro study using matched pairs of human teeth. *J Endod.* v.37, p.40–4, 2011

FRANASSIS BO; ROCHA GG; Low-level lighth therapy (LLLT) in the human movement optimization and performance. *Rev Acta Bras do Mov Hum.* v.4, n.1, p.52–60, 2014

PEREIRA AN; EDUARDO CDP; MATSON E; MARQUES MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* v.31, n.4, p.263–7, 2002

RISO AADL. Proliferação e viabilidade de fibroblastos após irradiação sequencial em baixa intensidade por dois comprimentos de onda (660 e 780 nm). Autarquia associada à universidade de São Paulo. 2009.

PEREIRA NA; EDUARDO CDP; MATSON E; MARQUES MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* v.31, n.4, p.263–7, 2002

BASSO FG; PANSANI TN; TURRIONI APS; BAGNATO VS; HEBLING J. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* v.7, n.19, p.452, 2012

ALMEIDA-LOPES L; RIGAU J; ZÂNGARO RA; GUIDUGLI-NETO J; JAEGER MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med.* v.29, n.2, p.179–84, 2001

GUIGAND M; PELLEN-MUSSI P; GOFF AL. Vulcain J-M, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *J Endod.* v.25, n.6, p.419–23, 1999

RUPAREL NB; TEIXEIRA FB; FERRAZ CCR; Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod.* v.38, n.10, p.1372–5, 2012

SARIGOL CG; COGULU D; ONCAG O; DELILOGLU IG. Cytotoxic Effects of Primary Tooth Root Canal Filling Materials on L929 Cell Line. *J Dent Child.* p.72–7, 2010

VLADIMIROV YA; OSIPOV NA; KLEBANOV GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry.* v.69, n.1, p.81–90, 2004