

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Luan Viana Faria

**Efeitos da fotobiomodulação no processo apoptótico de células do ligamento
periodontal de camundongos**

Juiz de Fora

2020

Luan Viana Faria

Efeitos da fotobiomodulação no processo apoptótico de células do ligamento periodontal de camundongos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia de Paoli

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática
da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

Faria, Luan Viana.

Efeitos da fotobiomodulação no processo apoptótico de células do
ligamento periodontal de camundongos / Luan Viana Faria. -- 2020.
37 p. : il.

Orientador: Flávia de Paoli

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia, 2020.

1. Fotobiomodulação. 2. Apoptose. 3. Caspase-6. 4. Bcl-2. 5.
Ligamento periodontal. I. Paoli, Flávia de , orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
REITORIA - FACODONTO - Coordenação do Curso de Odontologia

Luan Viana Faria

Efeitos da fotobiomodulação no processo apoptótico de células do ligamento periodontal de camundongos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Aprovado em 16 de outubro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Flávia de Paoli - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Dr^a Jacy Gameiro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a Dr^a Leda Marília Fonseca Lucinda
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Flavia de Paoli, Professor(a)**, em 16/10/2020, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Chefe de Departamento**, em 16/10/2020, às 14:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leda Marília Fonseca Lucinda, Professor(a)**, em 19/10/2020, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0165488** e o código CRC **12B27B77**.

Dedico não só este trabalho mas também todas as minhas conquistas aos meus amados pais, Luciano Carvalho Faria e Silvânia Tebas Viana por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim, por todo trabalho árduo que realizam todos os dias na zona rural do meu distrito de Araraí (Alegre – ES), para poder me dar a oportunidade de atingir grandes voos.

A minha irmã Luana, minha melhor amiga, e grande incentivadora, meu exemplo acadêmico, a quem tanto amo e admiro.

E a todos os estudantes de áreas rurais que se esforçam todos os dias na busca da educação de qualidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Luciano Carvalho Faria e Silvânia Tebas Viana, e a minha irmã Luana Viana Faria por todo apoio incondicional, amor e amparo. Deus me presenteou por ter vocês na minha vida.

À minha orientadora Dra. Flávia de Paoli, professora que me deu a primeira aula no meu primeiro dia dessa longa jornada chamada graduação, obrigado por ter me motivado desde aquela aula a ser um aluno e profissional melhor. Tenho muito carinho e admiração por você, agradeço por ter me aberto diversas portas durante a graduação.

A todo grupo de pesquisa vinculado a professora Flávia de Paoli, em especial a Dra. Lúcia Mara e as cirurgiãs-dentistas Ingrid Navarro e Larissa Cerqueira. As agências brasileiras CNPq (APQ 474405/2013), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ 02123/15) e do Estado do Rio de Janeiro (E-26/111.779/2013) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos incentivos financeiros.

Ao Prof. Marcos Vinícios Queiroz de Paula pela orientação nas disciplinas de Trabalho de Conclusão de Curso I e II.

A minha turma “Supranumerários” e todos meus amigos e colegas pelo apoio, ajuda e paciência, vocês se tornaram minha família em Juiz de Fora. À minha dupla João Paulo, por ter alegrado meus dias de graduação e por ter me ensinado a ser uma pessoa cada dia melhor. A Danielle e Yuri por todo companheirismo ao longo destes cinco anos, obrigado por sempre estarem comigo quando precisei.

Aos meus demais familiares, que me ajudam e torcem pelo meu sucesso, sobretudo meus avós maternos e paternos, Laurinda e Gilson, Suely e Altacir, por todo o carinho que tiveram e tem por mim.

A todos os professores e funcionários das instituições de ensino por onde passei, “EEEFM Oscar de Almeida Gama” e “Instituto Federal do Espírito Santo – Campus de Alegre” que participaram da minha carreira acadêmica e me permitiram chegar aqui.

A Universidade Federal de Juiz de Fora, por ter se tornado minha nova casa e por todo apoio especialmente através de seus programas de Iniciação Científica,

Assistência Estudantil, Projetos de Extensão, Treinamento Profissional e alimentação por meio do Restaurante Universitário. A todos os servidores da UFJF, principalmente aos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e da Faculdade de Odontologia pela receptividade e por sempre estarem dispostos a nos ajudar, em especial a equipe de serviços gerais da FO por todos os cafezinhos e dedicação.

A banca examinadora, por ter aceitado o convite e por contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos pacientes que atendi e que me permitiram aprender um pouco dessa linda profissão chamada odontologia.

A vocês serei eternamente grato.

“– Não adianta a gente ficar sentado se preocupando. O que tiver que ser será, e nós o enfrentaremos quando vier” - Rúbeo Hagrid.

RESUMO

A fotobiomodulação (FBM) pelo laser de baixa potência tem sido usada para modular as respostas inflamatórias e imunológicas, aliviar a dor e promover a cicatrização de feridas. Portanto, a FBM é amplamente utilizada na prática odontológica e por isso seus efeitos celulares devem ser investigados. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a FBM altera genes relacionados à morte celular, como caspase-6 e Bcl-2, nas células do ligamento periodontal. Para isso, dezoito camundongos foram divididos em três grupos (n = 6): (I) controle, (II) 3 Jcm⁻² e (III) 30 Jcm⁻². Os parâmetros do laser infravermelho de baixa potência (830 nm) foram: potência a 10 mW, densidades de energia 3 e 30 Jcm⁻² no modo de emissão contínua, tempo de exposição de 15 e 150s, respectivamente, por quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última irradiação, os animais foram eutanaziados e suas mandíbulas foram processadas e encaminhadas para técnica Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (*RT-qPCR*) utilizando primers para Caspase-6 e Bcl-2. Não foram observadas diferenças estatísticas para os níveis relativos de mRNA da Caspase-6 em ambas as densidades de energia (p>0.05), mas um aumento significativo dos níveis relativos de mRNA de Bcl-2 foi observado no grupo 30 Jcm⁻² (p<0,05). Concluindo, a FBM foi capaz de aumentar o nível relativo de mRNA de Bcl-2, mas não foi capaz de alterar o nível relativo de mRNA de Caspase-6, indicando um possível efeito anti-apoptótico nas células do ligamento periodontal.

Palavras-chave: Fotobiomodulação. Apoptose. Caspase-6. Bcl-2. Ligamento periodontal.

ABSTRACT

Photobiomodulation (PBM) by low-power infrared laser has been used to modulate the inflammatory and immune responses, pain relief and to promote wound healing. Therefore, PBM is widely used in dental practice and its cellular effects should be investigated. The aim of this work was to evaluate if PBM could alter caspase-6 and Bcl-2 mRNA relative levels in periodontal ligament cells. Eighteen mice were divided in three groups (n=6): (I) control, (II) 3 Jcm⁻² and (III) 30 Jcm⁻². Low-power infrared laser (830 nm) parameters were: power at 10 mW, energy densities at 3 and 30 Jcm⁻² in continuous emission mode, exposure time of 15 and 150 s, respectively, for four days in a row. Twenty-four hours after last irradiation, the animals were euthanized, their jaws dissected, and Caspase-6 and Bcl-2 mRNA relative levels were analyzed by real time polymerase chain reaction. Statistical differences were not significant to Caspase-6 mRNA relative level in tissues from jaws at both energy densities (p>0.05), but a significant increase of Bcl-2 mRNA relative level was obtained at 30 Jcm⁻² group (p<0.05). In conclusion, PBM can alter Bcl-2 mRNA relative level but cannot alter caspase-6 mRNA relative level, indicating anti-apoptotic effect in periodontal ligament cells.

Keywords: Photobiomodulation. Apoptosis. Caspase-6. Bcl-2. Periodontal ligament.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Níveis relativos de mRNA aos genes da caspase-6 (**A**) e Bcl-2 (**B**) nas mandíbulas de camundongos após fotobiostimulação nas densidades de energia de 3Jcm^{-2} e 30Jcm^{-2} 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Parâmetros físicos do laser	20
Tabela 2	–	Primers usados para RT-qPCR	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FBM	Fotobiomodulação
Bcl-2	Célula B de linfoma tipo 2 / <i>B-celllymphoma 2</i>
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado / <i>Joules per Square Centimeter</i>
mW	Megawatt
s	Segundos / <i>Seconds</i>
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro / <i>Ribonucléique acide messenger</i>
PBM	<i>Photobiomodulation</i>
(RT-qPCR)	Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa qualitativa e quantitativa / <i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
LED	Diodo emissor de luz
Nm	<i>Nanometers</i> / Nanômetros
Cu	Cobre
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Ca ²⁺	Cálcio Iônico
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico da membrana mitocondrial
pHi	Potencial hidrogeniônico intracelular
Eh	Potencial redox intracelular
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappaB</i> / Fator de transcrição nuclear kappa B
RNA	<i>Ribonucléique acide</i> / Ácido Ribonucléico
AP-1	Proteína ativadora 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Acide désoxyribonucléique</i>
NO	Óxido Nítrico / <i>Nitric Oxide</i>
mWcm ⁻²	Watt por centímetro quadrado
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biontin-dUTPnickendlabeling</i> / Quebra e ligação da desoxinucleotídeotranferase terminal biotina-dUTP
AlGaAs	<i>Aluminum Gallium Arsenid</i> / Arseneto de gálio-alumínio
h	Horas

Rpm	Rotações por minuto
Min	Minutos
DEPC	Dietilpirocarbonato de dietilo
cDNA	DNA complementar
$\Delta\Delta Ct$	Delta Delta Ct
Bcl-x	Membro da família anti-apoptótica Bcl-2
Bcl-XL	Membro da família anti-apoptótica Bcl-2
Bcl-XS	Membro da família anti-apoptótica Bcl-2
Bcl-w	Membro da família anti-apoptótica Bcl-2
BAG	Membro da família anti-apoptótica Bcl-2
Bax	Proteína X associada ao BCL-2
Bak	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
Bid	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
Bad	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
Bim	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
Bilk	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
Blk	Membro da família pró-apoptótica Bcl-2
FI	Fator de Impacto

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
=	Igual
>	Maior que
<	Menor que
%	Porcentagem
®	Marca registrada
°	Graus
™	Marca comercial
β	Beta
[]	Concentração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1	ANIMAIS	20
2.2	LASER INFRAVERMELHO DE BAIXO NÍVEL	20
2.3	EXTRAÇÃO DE RNA	21
2.4	ENSAIO RT-QPCR	22
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3	RESULTADOS	23
3	DISCUSSÃO	24
4	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28
	ANEXO A – Publicação na Revista <i>Lasers in Medicine Science</i>	33
	ANEXO B – Aprovação do comitê de ética em uso de animais	35
	ANEXO C – Apresentação dos resultados do qPCR no 37º Congresso Internacional de Odontologia	36
	ANEXO D – Publicação dos resultados do qPCR nos Anais do 37º Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo	37

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta dos efeitos biológicos dos lasers de baixa potência há mais de 50 anos pelo pesquisador Dr. Endre Mester (MESTER; MESTER, 2017), abriu-se uma janela única que marcou o nascimento de um novo campo da ciência fotobiológica, que foi popularmente chamado de terapia a laser / luz de baixa potência, tratamentos com lasers frios ou, mais recentemente, terapia de fotobiomodulação (FBM) (FEKRAZAD; ARANY, 2019).

A palavra laser é um acrônimo para “*(L)ight (A)mplification by (S)timulated (E)mision of (R)adiation*”, a qual significa, amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação (SVELTO; HANNA, 2010). Entre as principais características ópticas da luz laser que tornam os dispositivos a laser atraente para aplicações clínicas está a colimação, a monocromaticidade, a direcionalidade, a coerência e a alta densidade de energia. Já um feixe de luz branca, emitida por lâmpadas convencionais, é divergente, apresenta diferentes comprimentos de onda, fases e, normalmente, baixas densidades de energia (NIEMZ, 2007).

A modificação de nomenclatura de "terapia a laser de baixa potência" para fotobiomodulação (FBM) surgiu devido à dosimetria e os resultados-alvo em tecidos irradiados, que deram origem a uma mistura complexa de estimulação, inibição e variação na irradiação. Ademais, a utilização crescente do diodo emissor de luz (LED), que se caracteriza por ser um feixe de luz não coerente, estreito, e com distribuição fotônica não monocromática, não pôde ser incorporado na terminologia antiga, dando a FBM um escopo mais global (PARKER et al., 2019).

A terapia com laser de baixa potência trabalha com o princípio de induzir uma resposta biológica por transferência de energia; a energia fotônica entregue ao tecido modula os processos biológicos dentro do tecido e dentro do sistema biológico do qual esse tecido faz parte (NIEMZ, 2007; PARKER et al., 2019). Os lasers causam efeitos não térmicos e não destrutivos (como induzir uma mudança estrutural permanente no tecido irradiado), mas alteram os processos biológicos, aumentando o metabolismo e a taxa de divisão celular, um efeito conhecido como bioestimulação ou biomodulação (KARU, 1989; IWAHARA; PAOLI; FONSECA, 2010). Em geral, a FBM pode ser visto

como a manipulação do comportamento celular usando fontes de luz de baixa intensidade (PARKER et al., 2019).

Ao nível intracelular, os acontecimentos ocorridos desde a absorção da radiação a laser e os efeitos biológicos observados na célula envolvem uma série de cascatas de sinalização intracelulares secundárias (KARU, 2008; 2014). Primariamente, os fótons são absorvidos por componentes celulares denominados fotoceptores. Entre os principais fotoceptores celulares destacam-se as proteínas da biomembrana, semiquinonas e citocromo oxidases, flavoproteínas, homeoproteínas, oxihemoglobina, melanina e certas moléculas de cadeia longa (PARKER et al., 2019).

O citocromo c oxidase, o membro terminal da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é um fotorreceptor que medeia muitos dos efeitos benéficos da FBM. Como fotorreceptor, representa o primeiro passo em uma via intracelular de sinalização e suas atividades enzimáticas são responsáveis por gerar as moléculas que servem para iniciar uma cascata de sinalização (POYTON; BALL, 2011). Essa reatividade do citocromo c oxidase é devida a quatro centros metálicos ativos redox: o Cu_A , o Cu_B , o heme a e o heme a_3 , todos com absorvência na faixa espectral do vermelho para o infravermelho. Como resultado, o status redox da molécula do citocromo c oxidase, bem como sua atividade funcional é modulada. A partir de então ocorre uma modulação de elementos de sinalização mitocondriais já bem documentados, entre eles o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de nitrogênio, de íons cálcio (Ca^{2+}) e alteração no potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Estas modificações mitocondriais levam a alterações nos parâmetros homeostáticos celulares como o pH_i , $[Ca^{2+}]_i$, E_h , $[ATP]$ e $[cAMP]$, que provocam a ativação de fatores de transcrição (como a NF- κ B e AP-1), culminando com aumento da síntese de DNA e RNA e expressão de genes relacionados à síntese de proteínas, migração e proliferação celular, sinalização anti-inflamatória, proteínas anti-apoptóticas e enzimas antioxidantes, entre outros eventos (KARU, 2008; 2014; FREITAS; HAMBLIN, 2016, SILVA et al., 2019).

Atualmente, não há relatos na literatura sobre efeitos adversos da terapia de FBM para as radiações vermelha e infravermelha. A ausência de efeitos colaterais pode estar relacionada entre outros fatores ao efeito não térmico e à baixa produção

de EROs. As EROs estão envolvidas nas vias de sinalização intracelular iniciadas após a absorção de fótons pelas mitocôndrias (HAMBLIN, 2018). Por exemplo, as EROs podem ativar o fator nuclear NF- κ B, que induz a expressão de muitos genes, como aqueles envolvidos na ação anti-apoptótica e pró-sobrevivência, migração e proliferação celular (HAMBLIN, 2018; KARU, 2008). No entanto, se a energia fornecida for muito alta, paradoxalmente, as lesões tendem a ser exacerbadas pelo aumento do estresse oxidativo e pela ativação abundante de NF- κ B. Pensa-se que os efeitos da dose bifásica induzida por FBM ocorram devido à geração excessiva de EROs, produção excessiva de óxido nítrico (NO), ativação de algumas vias citotóxicas e ativação excessiva de NF- κ B, levando a inflamação e morte celular (FREITAS; HAMBLIN, 2016).

Além disso, Wu et al. (2009) relataram que o FBM poderia induzir alterações na permeabilidade mitocondrial quando níveis mais altos de EROs são produzidos. Como consequência, a diminuição do $\Delta\Psi_m$ causa permeabilização da membrana externa mitocondrial e, subsequentemente a liberação do citocromo c e o início da cascata de caspases. Como este processo está diretamente relacionada aos parâmetros do FBM, como comprimento de onda (nm), irradiância ($mWcm^{-2}$), tempo (s) de exposição e densidade de energia (Jcm^{-2}), é importante avaliar como diferentes tipos de células respondem a esse estímulo.

As aplicações odontológicas para FBM estão aumentando e mais estudos clínicos foram relatados devido a excelentes resultados no tratamento da dor, respostas inflamatórias e imunes, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. Variadas revisões sistemáticas publicadas nos últimos anos apontam os efeitos benéficos da FBM nas especialidades odontológicas, tais como na disfunção temporomandibular e dor orofacial (PEDRO et al., 2020; TUNÉR; HOSSEINPOUR; FEKRAZAD, 2019; YEH et al., 2019), ortodontia (CRONSHAW et al., 2019), estomatologia (HE et al., 2018; SUTER; SJÖLUND; BORNSTEIN, 2017; ZADIK et al., 2019), endodontia (CHEN et al., 2019), cirurgia (HOSSEINPOUR; TUNÉR; FEKRAZAD, 2019; KULKARNI; MEER; GEORGE, 2019; SANTINONI et al., 2017), periodontia e implantodontia (AL-SHIBANI, 2018; GHOLAMI et al., 2019a, 2019b).

Em relação aos tecidos e estruturas dentárias, as células do ligamento periodontal receberam mais atenção devido à descoberta de células-tronco (SEO et

al, 2004). Portanto, é relevante avaliar se a exposição aos lasers de baixa potência, amplamente utilizados nas práticas clínicas e, na periodontia como complemento ao tratamento periodontal não cirúrgico (REN et al., 2017), poderia alterar a produção de EROs e induzir o processo de apoptose neste tecido. De fato, a apoptose é necessária para a renovação do tecido no ligamento periodontal, mas a exacerbação nos tecidos biológicos pode ser um efeito indesejável, que pode reduzir a eficácia das terapias baseadas em FBM.

A apoptose é desencadeada por vários estímulos externos ou internos da célula, como a ligação dos receptores da superfície celular, por danos ao DNA como causa de defeitos nos mecanismos de reparo do DNA, tratamento com drogas citotóxicas ou irradiação. Duas vias separadas levam à ativação da apoptose e das pró-caspases: a via mediada pelo receptor da morte (ou via extrínseca) e a via mediada pelas mitocôndrias (ou via intrínseca). Em qualquer caminho, o primeiro passo é a ativação das caspases iniciadoras (caspase-8 ou caspase-9), que ativam caspases efetivas (caspase-3, -6 e -7) (LIU; ZHANG e XING, 2011). Como consequência, ocorrem alterações morfológicas, incluindo eventos moleculares e bioquímicos. O mais notável é a ativação de enzimas proteolíticas que eventualmente mediam a clivagem do DNA em fragmentos oligonucleossômicos (SARASTE e PULKKI, 2000), os quais pode ser detectado através de técnicas imunocitoquímicas como TUNEL.

Devido ao grande uso das terapias de fotobiomodulação nos tecidos periodontais, como por exemplo no complemento ao tratamento periodontal não cirúrgico e uma vez que a apoptose ocorre nas células do ligamento periodontal quando expostas a estímulos extrínsecos, como infecção bacteriana, estímulos mecânicos e físicos, é necessário investigar se a FBM pode alterar as proteínas envolvidas no processo de apoptose nessas células. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar se a FBM poderia alterar os níveis relativos de mRNA de caspase-6 e Bcl-2 em células do ligamento periodontal, modulando assim o processo de apoptose.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolo nº 039/2014).

2.1 ANIMAIS

Camundongos machos C57BL/6, pesando 24-28g cada, foram alojados 5 por gaiolas com acesso gratuito à dieta de laboratório e água potável.

Os animais foram mantidos em ciclo claro / escuro de 12:12 h (luzes acesas das 6:00 às 18:00) em ambiente com temperatura controlada ($25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais foram distribuídos em três grupos ($n = 6$): (a) controle, (b) 3 Jcm^{-2} e (c) 30 Jcm^{-2} .

2.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

O laser infravermelho de baixa potência (AlGaAs; HTM Indústria de Equipamentos Eletrônicos Ltda, Brasil) foi utilizado para os procedimentos experimentais. Os parâmetros físicos do laser, bem como a forma de tratamento, estão descritos na tabela 1. A irradiação do laser foi aplicada por 4 dias consecutivos, pontualmente e perpendicular a mandíbula, na região do dente incisivo central. Duas densidades de energia foram testadas, 3 Jcm^{-2} e 30 Jcm^{-2} (densidades utilizadas para tratamento do processo inflamatório), dentro da janela terapêutica de tratamento para laser de baixa potência e seguindo as indicações do fabricante.

Tabela 1: Parâmetros físicos do laser.

Comprimento de onda (nm)	830
Laser de diodo	AsGaAl
Potência (mW)	10
Área por ponto (cm^2)	0.05
Densidade de Potência (Wcm^{-2})	0.2
Energia por ponto (mJ)	150 e 1500

Densidade de energia (Jcm ⁻²)	3 e 30
Tempo por ponto (s)	15 e 150
Número de pontos	1
Técnica de aplicação	Pontual por contato com a pele
Número de sessões de tratamento	Quatro

Fonte: elaborada pelo autor.

Para as aplicações do laser de baixa potência, os animais foram imobilizados utilizando um tubo tipo Falcon adaptado, onde o fundo do tubo foi removido permitindo que a parte anterior da face (incluindo a região da mandíbula) ficasse exposta para fora do tubo. Isso permitiu a completa imobilização dos animais sem a necessidade de anestesia e a aplicação do tratamento nos tempos citados na tabela 1.

Vinte e quatro horas após a última irradiação, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico, utilizando cloridrato de quetamina e xilazina. Após, suas mandíbulas foram dissecadas, a pele removida e então as mandíbulas foram lavadas em solução de PBS para retirada do excesso de sangue.

2.3 EXTRAÇÃO DE RNA

As mandíbulas foram imersas em nitrogênio líquido, maceradas, o RNA total foi extraído usando TRIzol® (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e centrifugado (12.000 rpm, 4°C, 10 min). Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, adicionado clorofórmio, e as misturas foram centrifugadas (12.000 rpm, 4 ° C, 15 min). As fases aquosas foram transferidas para outros tubos e foi adicionado isopropanol. Após incubação em temperatura ambiente por 15 min, as misturas foram centrifugadas (12.000 rpm, 4°C, 10 min), os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi lavado com solução etanol-DEPC (etanol 80%, 0,1%) e centrifugado. Os sobrenadantes foram removidos e o RNA total foi reconstituído em solução de água-DEPC (0,1%). A concentração e a pureza do RNA foram determinadas por espectrofotômetro, calculando-se a razão de densidade óptica na razão de comprimento de onda de 260/280 nm. Em seguida, 2 µg de RNA total foram transcritos em DNA complementar (cDNA) usando o kit de transcrição reversa de cDNA (Applied Biosystems, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

2.4 ENSAIO RT-qPCR

Para os ensaios RT-qPCR, foram usados primers para caspase-6 e Bcl-2 (tabela 2). Todos os primers foram desenhados utilizando o programa Primer BLAST (UNTERGASSER et al.,2012). Os ensaios RT-qPCR foram realizados no instrumento Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 40 ciclos; em cada ciclo, desnaturação inicial a 95°C por 10 min, desnaturação a 95°C por 15s e pareamento e extensão de primer a 60°C por 1 min. Para análises dos níveis de RNA por RT-qPCR, o método Delta-Delta $\Delta\Delta C_t$ foi usado (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). O primer β -actina foi usado como gene de controle interno.

Tabela 2: Primers usados para RT-qPCR.

Primers	Sequência	
	Foward (5' --> 3')	Reverse (3' --> 5')
β -actina	CATCCGTAAAGACCTCTATGC	GGAGCCAGAGCAGTAATCTC
Caspase-6	GACGTGGTGGAAAGGGCTAAA	AGTGTACAAAAAGGGGAGGC
Bcl-2	TGGGTCTAGGAAAGGGGAA	CGGGCTATTCACAATTCTGCC

Fonte: elaborada pelo autor.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram expressos como média \pm desvio padrão e comparados pelo teste de variância One-Way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey (significância $p < 0,05$). O software GraphPad InStat (versão 7 para Windows 8, GraphPad Software, EUA) foi usado para as análises estatísticas.

3 RESULTADOS

3.1 NÍVEIS RELATIVOS DE mRNA PARA GENES DE CASPASE-6 E BCL-2

Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas quando comparados com o grupo controle ($p>0,05$), ambas as densidades de energia, especialmente a densidade de 30 Jcm^{-2} , demonstraram tendência a diminuir (*downregulate*) o nível relativo de mRNA da caspase-6 (figura 1a).

Por outro lado, a figura 1b demonstra um aumento (*upregulate*) significativo do nível relativo do mRNA de Bcl-2 na densidade de energia de 30 Jcm^{-2} quando comparado com o grupo controle ($p<0,05$), enquanto nenhuma diferença estatística foi observada na densidade de energia de 3 Jcm^{-2} ($p>0,05$).

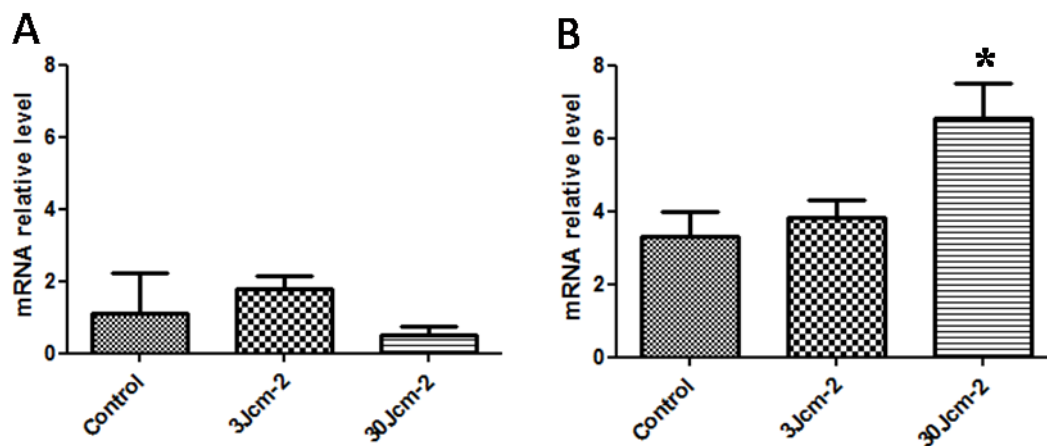


Figura 1. Níveis relativos de mRNA dos genes caspase-6 (A) e Bcl-2 (B) nas mandíbulas de camundongos após fotobioestimulação nas densidades de energia de 3 Jcm^{-2} e 30 Jcm^{-2} .

4 DISCUSSÃO

O uso de terapias menos invasivas para minimizar a dor e o desconforto durante e após as intervenções odontológicas é cada vez mais comum. Acredita-se que o FBM seja uma excelente abordagem para esse fim, uma vez que apresenta efeitos benéficos nos tecidos biológicos, como ativação da microcirculação, neovascularização, efeitos antiinflamatórios e analgésicos, além de estimular a proliferação celular e regeneração tecidual (CAVALCANTI et al., 2011; RAHMAN et al., 2013).

A interação das radiações não ionizantes com os tecidos biológicos pode ocorrer por fenômenos de reflexão, absorção, transmissão e espalhamento. Além disso, as características celulares e os parâmetros físicos da radiação determinam quais fenômenos são predominantes (FREITAS; HAMBLIM, 2016). Uma vez absorvida pelas células, a radiação pode modular as reações bioquímicas e estimular a atividade mitocondrial (KARU, 2008; HAMBLIN, 2018). Além disso, algumas dessas reações poderiam acelerar a síntese de DNA, RNA e proteínas reguladoras do ciclo celular, aumentando os níveis de EROs e promovendo a proliferação celular (FONSECA et al., 2012). Assumindo que as EROs estão envolvidas com os efeitos bifásicos da FBM (FREITAS; HAMBLIM, 2016), densidades de energia mais altas podem levar à morte das células. Foi descrito que a FBM desencadeia mudanças nos mecanismos de reparo do DNA, causa danos subletais ao DNA e altera a expressão gênica relacionada à apoptose (FONSECA et al., 2012; FONSECA et al., 2013; SERGIO et al., 2016; da SILVA et al., 2019).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo fibroso denso que sustenta e fixa o dente ao seu alvéolo alveolar, sendo o colágeno seu principal componente, que está embutido em uma matriz gelatinosa (SEO et al., 2004; GULABIVALA; NG, 2014). As células principais são os fibroblastos, ocasionais células de defesa e, desde a descoberta em 2004, células-tronco do ligamento periodontal. Essas células foram encontradas em pequeno número no ligamento periodontal e exibiram capacidades de autorrenovação e diferenciação multipotente, típicas das células-tronco (SEO et al., 2004). Devido à ampla aplicação das terapias de FBM na odontologia e à presença de células pluripotentes nesse tecido, torna-se relevante avaliar as respostas celulares

e moleculares relacionadas aos parâmetros do laser. Portanto, o presente trabalho investigou se a FBM poderia alterar genes envolvidos em processos pró- e anti-apoptóticos.

A apoptose é um processo complexo dependente de energia, caracterizado por modificações morfológicas e bioquímicas específicas, incluindo a ativação de caspases, que desempenham um papel central (NAGATA, 2018). As caspases são expressas na forma de pró-enzimas, inativadas na maioria das células e, uma vez ativadas, podem ativar outras pró-caspases, permitindo o início de uma cascata de proteases. A caspase-6 é considerada uma proteína pró-apoptótica e, quando ativada, é responsável pela clivagem das proteínas da matriz nuclear juntamente com a caspase-3 e -7 (ELMORE, 2007; YUAN; AKEY, 2013; NAGATA, 2018). No presente estudo, o nível relativo do mRNA da caspase-6 não foi alterado após a aplicação de ambas as densidades de energia (3 Jcm^{-2} e 30 Jcm^{-2}) quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$), mas foi observado uma discreta diminuição na densidade de energia de 30 Jcm^{-2} (Figura 1a). Adicionalmente, em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa utilizando técnicas imunocitoquímicas para detecção de apoptose, foi observado uma redução da marcação de células positivas para caspase-6 na mesma densidade de energia ($p < 0,05$) (CERQUEIRA, 2016). Tais resultados indicam que FBM na densidade de energia de 30 Jcm^{-2} pode modular tanto o nível relativo do mRNA da caspase-6 quanto a proteína em células do ligamento periodontal.

Mais ainda, os resultados deste estudo combinados com os achados preliminares de Cerqueira (2016) sugerem que FBM aumenta tanto o nível relativo do mRNA de Bcl-2 (Figura 1b), quanto a expressão da proteína Bcl-2 em células do ligamento periodontal em densidade de energia mais alta (30 Jcm^{-2}). As proteínas da família Bcl-2 regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial e são pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas. Algumas das proteínas anti-apoptóticas incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w e BAG, enquanto as proteínas pró-apoptóticas incluem Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Bkl (SCHINZEL, KAUFMANN; BORNER, 2004). Essas proteínas desempenham um papel fundamental na determinação se a célula irá iniciar ou interromper o processo apoptótico. Além disso, Wu e colaboradores (2009) relataram que o laser de baixa potência em altas densidades de energia pode

modificar a permeabilidade da membrana mitocondrial e mediar a translocação de Bax induzida pela produção de EROs.

O principal mecanismo de ação da família Bcl-2 é a regulação da liberação do citocromo c da mitocôndria, por meio da alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (CORY; ADAMS, 2002). Mais, a Bcl-2 contribui para a inibição da produção de EROs e acidificação intracelular, estabilizando o potencial de membrana da mitocôndria (KUSHIBIKI, 2013). Portanto, a FBM na densidade de energia de 30 Jcm⁻² poderia regular o processo apoptótico nas células do ligamento periodontal através do aumento da expressão gênica e proteica de Bcl-2.

Dentre as características morfológicas observadas numa célula apoptótica estão descritos diminuição celular, núcleo picnótico como consequência da fragmentação do DNA (devido à ação das caspases ativadas) e perda de cromatina (SARASTE; PULKKI, 2000; ELMORE, 2007). Em outro estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, foi observado que a fragmentação do DNA em células periodontais e da polpa dental diminuem na densidade de energia 30Jcm⁻² (ANDRADE, 2017; FARIA et al, 2020). Por outro lado, a fragmentação de DNA e o fenótipo nuclear de característico de células apoptóticas foram observadas em células de tendões após laser de baixa potência com baixa densidade de energia (de PAOLI et al., 2015). Mais ainda, foi descrito que a apoptose ocorre exclusivamente em células inflamatórias, enquanto outras células próximas não respondem da mesma forma (dos ANJOS et al., 2017). Tomados em conjunto, todos esses achados indicam que diferentes tipos de células têm mecanismos de morte e sobrevivência em diferentes limiares e o entendimento sobre os parâmetros da FBM e as respostas celulares é verdadeiramente relevante para aplicações clínicas, prognóstico de doenças e possíveis efeitos colaterais.

5 CONCLUSÃO

A fotobiomodulação definitivamente trouxe a odontologia para uma nova era. Novas aplicações baseadas no efeito da luz nos tecidos bucais e dentais tornaram-se o tema de um grande e crescente número de pesquisas realizadas nesse campo. Neste estudo foi observado que a fotobiomodulação por laser infravermelho de baixa potência altera os níveis relativos de mRNA da Bcl-2 em densidade de energia maiores, mas não é capaz de alterar o nível relativo de mRNA de Caspase-6.

REFERÊNCIAS

AL-SHIBANI, N. Low-intensity laser for harvesting palatal graft for the treatment of gingival recession: A systematic review. **Journal Of Investigative And Clinical Dentistry**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. e12368, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jicd.12368>

ANDRADE, I. N. Análise da apoptose em células da polpa dental após utilização de laser de baixa potência. Juiz de Fora, 2017. 40 f. TCC (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017

ANJOS, L. M. J. et al. Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 32, n. 5, p. 975-983, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2196-8>

CAVALCANTI, T. M. et al. Knowledge of the physical properties and interaction of laser with biological tissue in dentistry. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 5, p. 955-960, out. 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962011000500014>.

CERQUEIRA, L. R. Ação do laser terapêutico de baixa intensidade em fibroblastos do ligamento periodontal. Juiz de Fora, 2016. 46 f. TCC (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016

CHEN, Y. et al. Efficacy of low-level laser therapy in pain management after root canal treatment or retreatment: a systematic review. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 34, n. 7, p. 1305-1316, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-019-02793-6>

CORY, S.; ADAMS, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 2, n. 9, p. 647-656, set. 2002. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc883>

CRONSHAW, M. et al. Systematic Review of Orthodontic Treatment Management with Photobiomodulation Therapy. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 862-868, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4702>

DA SILVA, P. A. V. et al. Photobiomodulation can alter mRNA levels cell death-related. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 34, n. 7, p. 1373-1380, fev. 2019. [Http://dx.doi.org/10.1007/s10103-019-02732-5](http://dx.doi.org/10.1007/s10103-019-02732-5)

DE PEDRO, M. de et al. Efficacy of Low-Level Laser Therapy for the Therapeutic Management of Neuropathic Orofacial Pain: A Systematic Review. **Journal Of Oral & Facial Pain And Headache**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 13-30, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.11607/ofph.2310>

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic**

Pathology, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007. <http://dx.doi.org/10.1080/01926230701320337>

FARIA, L. V. et al. Laser de baixa potência pode prevenir a morte celular em tecidos dentários. In: 37º Congresso Internacional de Odontologia, 37, 2019, São Paulo. Anais eletrônicos... São Paulo: Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas, 2019. p. 130-130. Disponível em: <<http://www.apcd.org.br/assets/pdf/publicacao-dos-trabalhos.pdf>>.

FARIA L. V. et al. Photobiomodulation can prevent apoptosis in cells from mouse periodontal ligament. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 35, n. 8, p. 1841–1848, out 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-020-03044-9>

FEKRAZAD, R.; ARANY, P. Photobiomodulation Therapy in Clinical Dentistry. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p.737-738, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4756>

FONSECA, A. S. et al. DNA repair gene expression in biological tissues exposed to low-intensity infrared laser. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 28, n. 4, p. 1077-1084, 2 set. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10103-012-1191-3>

FONSECA, A. S. et al. Effect of laser therapy on DNA damage. **Lasers In Surgery And Medicine**, Nova York, v. 42, n. 6, p. 481-488, 20 jul. 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/lsm.20921>

FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal Of Selected Topics In Quantum Electronics**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 348-364, maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1109/jstqe.2016.2561201>

GAO, X.; XING, da. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. **Journal Of Biomedical Science**, Basel, v. 16, n. 1, p. 4, jan. 2009. <http://dx.doi.org/10.1186/1423-0127-16-4>

GHOLAMI, Leila et al. Photobiomodulation in Periodontology and Implant Dentistry: Part 1. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 739-765, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4710>

GHOLAMI, Leila et al. Photobiomodulation in Periodontology and Implant Dentistry: Part 2. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 766-783, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4731>

GULABIVALA K, NG YL. Tooth Organogenesis, Morphology and Physiology. In **Endodontics**, 4th ed.: Mosby, Jan 2014, p. 2–32. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-3155-7.00001-1>

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochemistry And Photobiology**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 199-212, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/php.12864>

HE, M. et al. A systematic review and meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) on chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric and young patients. **European Journal Of Pediatrics**, Heidelberg, v. 177, n. 1, p. 7-17, nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-017-3043-4>

HOSSEINPOUR, S.; TUNÉR, J.; FEKRAZAD, R. Photobiomodulation in Oral Surgery: A Review. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 814-825, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4712>

IWAHARA, L. K. F.; DE PAOLI F.; DA FONSECA, A. S. Low-Power Red and Infrared Laser Effects on Cells Deficient in DNA Repair. **Journal Of Lasers In Medical Sciences**, Londres, n. 10, v. 3, p. 157-162, jul 2019. <http://dx.doi.org/10.15171/jlms.2019.25>

KARU T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochemistry And Photobiology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 1091-1099, sep-oct. 2008. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x>

KARU, T. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). **IEEE Journal Of Selected Topics In Quantum Electronics**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 143-148, mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1109/jstqe.2013.2273411>

KARU, T. I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, Nova York, v. 56, n. 5, p. 691–704, maio 1989.

KULKARNI, S.; MEER, M.; GEORGE, R. Efficacy of photobiomodulation on accelerating bone healing after tooth extraction: a systematic review. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 34, n. 4, p. 685-692, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-018-2641-3>

KUSHIBIKI, T. et al. Blue Laser Irradiation Generates Intracellular Reactive Oxygen Species in Various Types of Cells. **Photomedicine And Laser Surgery**, Larchmont, v. 31, n. 3, p. 95-104, mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2012.3361>

LIU, L.; ZHANG, Z.; XING, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. **Free Radical Biology And Medicine**, Nova York, v. 51, n. 1, p. 53-68, jul. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.042>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, Orlando, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MESTER, Andrew; MESTER, Adam. The History of Photobiomodulation: Endre Mester (1903–1984). **Photomedicine And Laser Surgery**, Larchmont, v. 35, n. 8, p. 393-394, ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2017.4332>

NAGATA, Shigekazu. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review Of Immunology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 489-517, abr. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>

NIEMZ M. H. **Laser-tissue interactions: Fundamentals and applications.** Nova York: Springer, 2007.

PAOLI, P. et al. DNA fragmentation and nuclear phenotype in tendons exposed to low-intensity infrared laser. **Optical Interactions With Tissue And Cells Xxvi**, [s.l.], v. 9321, mar. 2015. [Http://dx.doi.org/10.1117/12.2075726](http://dx.doi.org/10.1117/12.2075726)

PARKER, S. et al. Systematic Review of Delivery Parameters Used in Dental Photobiomodulation Therapy. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 784-797, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4694>

POYTON, R. O.; BALL, K. A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. **Discov Med.**, Timonium, v. 11, n. 57, p. 154-159, fev 2011.

REN, C.; MCGRATH, C.; JIN, L.; ZHANG, C.; YANG, Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. **J Periodontal Res.** v. 52, n.1, p. 8-20, fev 2017 doi: 10.1111/jre.12361

SANTINONI, C. S. et al. Influence of low-level laser therapy on the healing of human bone maxillofacial defects: A systematic review. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 169, p. 83-89, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.004>

SARASTE. A.; PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular Research**, Londres, v. 45, n. 3, p. 528-537, fev. 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00384-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00384-3)

SCHINZEL, A.; KAUFMANN, T.; BORNER, C. Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion, and changes in subcellular localization. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1644, n. 2-3, p. 95-105, mar. 2004. [Http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.09.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.09.006)

SEO, B. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **The Lancet**, Londres, v. 364, n. 9429, p. 149-155, jul. 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16627-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16627-0)

SERGIO, L. P. S. et al. Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 31, n. 3, p. 429-435, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1870-6>

SUTER, V. G. A.; SJÖLUND, S.; BORNSTEIN, M. M. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. **Lasers In Medical Science**, Londres, v. 32, n. 4, p. 953-963, mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-017-2184-z>

SVELTO, O.; HANNA, D. C. **Principles of Lasers.** Nova York: Springer, 2010.

TUNÉR, J.; HOSSEINPOUR, S.; FEKRAZAD, R. Photobiomodulation in Temporomandibular Disorders. **Photobiomodulation, Photomedicine, And Laser Surgery**, Larchmont, v. 37, n. 12, p. 826-836, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1089/photob.2019.4705>

UNTERGASSER, Andreas et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 40, n. 15, p. 115-115, jun. 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks596>

WU, S. et al. High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. **Journal Of Cellular Physiology**, Filadélfia, v. 218, n. 3, p. 603-611, mar. 2009. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21636>

YEH, S. W. et al. Low-Level Laser Therapy for Fibromyalgia: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pain Physician**, Paducah, v. 22, n. 3, p. 241-254, maio 2019.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. **Structure**, Londres, v. 21, n. 4, p. 501-515, abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2013.02.024>

ZADIK, Y. et al. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. **Supportive Care In Cancer**, Berlin, v. 27, n. 10, p. 3969-3983, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-019-04890-2>

ANEXO A

Os resultados do presente trabalho foram publicados sob a forma de artigo científico na revista *Lasers in Medical Science* (FI: 2.342), classificada como A2 na área de Odontologia da classificação Qualis 2013/2016 da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Os resultados apresentados nesse artigo científico também englobam outras análises provenientes de trabalhos de conclusão de curso apresentados em anos anteriores na Faculdade de Odontologia/UFJF (CERQUEIRA, 2016; ANDRADE, 2017).

FARIA L. V. et al. Photobiomodulation can prevent apoptosis in cells from mouse periodontal ligament. **Lasers In Medical Science.**, v. 35, n. 8; oct 2020. doi: 10.1007/s10103-020-03044-9.



Photobiomodulation can prevent apoptosis in cells from mouse periodontal ligament

Luan Viana Faria¹ · Ingrid Navarro Andrade¹ · Lúcia Mara Januário dos Anjos¹ · Marcos Vinícius Queiroz de Paula² · Adenilson de Souza da Fonseca^{3,4,5} · Flávia de Paoli¹

Received: 9 October 2019 / Accepted: 20 May 2020
© Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2020

Abstract

Photobiomodulation (PBM) has been used to modulate the inflammatory and immune responses, pain relief, and to promote wound healing. PBM is widely used in dental practice and its cellular effects should be investigated. The aim was to evaluate if PBM changes proteins cell death-related, such as caspase-6 and Bcl-2, in periodontal ligament cells. Eighteen mice were divided in three groups ($n = 6$), i.e., (I) control, (II) 3 J cm^{-2} , and (III) 30 J cm^{-2} . Low power infrared laser (830 nm) parameters were power at 10 mW, energy densities at 3 and 30 J cm^{-2} in continuous emission mode, exposure time of 15 and 150 s, respectively for 4 days in a row. Twenty-four hours after last irradiation, the animals were euthanized, and their jaws were fixed and decalcified. Caspase-6 and Bcl-2 were analyzed by real-time polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques, and DNA fragmentation was evaluated by TUNEL. Statistical differences were not significant to caspase-6 mRNA relative levels in tissues from jaws at both energy densities, but a significant increase of Bcl-2 mRNA relative levels was obtained at 30 J cm^{-2} group. Also, 30 J cm^{-2} group showed caspase-6 positive-labeled cells decreased and Bcl-2 positive-labeled cells significantly increased. TUNEL-labeled cells demonstrated DNA fragmentation decreased at 30 J cm^{-2} . PBM can alter Bcl-2 mRNA relative level and both caspase-6 and Bcl-2 protein, modulating cell survival, as well as to reduce DNA fragmentation. More studies must be performed in order to obtain conclusive results about photobiostimulation effects using infrared low-level laser in apoptosis process as to achieve the optimum dosage.

Keywords Apoptosis · Bcl-2 · Caspase-6 · DNA fragmentation · Periodontal ligament · Photobiomodulation

✉ Luan Viana Faria
luanvfaria13@hotmail.com

- ¹ Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036900, Brazil
- ² Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário, São Pedro, Juiz de Fora, Minas Gerais 36036900, Brazil
- ³ Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard Vinte e Oito de Setembro, 87, fundos, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551030, Brazil
- ⁴ Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Rio de Janeiro 20211040, Brazil
- ⁵ Centro de Ciências da Saúde, Centro Universitário Serra dos Órgãos, Avenida Alberto Torres, 111, Teresópolis, Rio de Janeiro 25964004, Brazil

Introduction

Nowadays, there is absence of reports in literature on photobiomodulation (PBM) therapy side effects for both red and infrared radiations. Such side effects' absence could be related to non-thermal effect and low production of reactive oxygen species (ROS). ROS are involved in intracellular signaling pathways initiated after photon absorption by mitochondria [1]. For instance, ROS can activate nuclear factor kappa B (NF- κ B), which induces expression of many genes, as those genes involved in anti-apoptotic and pro-survival, cell migration, and proliferation [1, 2]. However, if light energy delivered is too high, injuries paradoxically tend to be exacerbated by increased oxidative stress and overabundant activation of NF- κ B. Biphasic dose effects induced by PBM are thought to occur due to excessive generation of ROS, excessive production of NO, activation of some cytotoxic pathways, and excessive activation of NF- κ B, leading to inflammation and cell death [3]. Additionally, Wu and co-workers [4] reported that PBM could induce mitochondrial permeability pore transition

**ANEXO B – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 039/2014 – CEUA sobre “EFEITOS CELULARES E MOLECULARES DE LASERS TERAPÊUTICOS DE BAIXA INTENSIDADE NA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA E NA MANDÍBULA DE CAMUNDONGOS” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de FLÁVIA DE PAOLI com a colaboração de JACY GAMEIRO e LÚCIA MARA DOS ANJOS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 05/05/2015. Para o desenvolvimento da pesquisa serão utilizados 90 camundongos da linhagem C57Bl/6 (90 machos) de 6-8 semanas de idade, conforme solicitado e que serão utilizados no período de 13/05/2015 a 31/01/2017.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº. 039/2014 - CEUA about “EFEITOS CELULARES E MOLECULARES DE LASERS TERAPÊUTICOS DE BAIXA INTENSIDADE NA ARTICULAÇÃO TÍBIO-TÁRSICA E NA MANDÍBULA DE CAMUNDONGOS” under responsibility of de FLÁVIA DE PAOLI and collaboration of JACY GAMEIRO and LÚCIA MARA DOS ANJOS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 05/05/2014. For the development of this research 90 mice of C57Bl/6 lineage (90 males) of 6 to 8 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 13/05/2015 to 31/01/2017.

Juiz de Fora, 13 de maio de 2015.



Coordenadora
CEUA



Vice-coordenadora
CEUA

ANEXO C - Apresentação dos resultados do qPCR no 37º Congresso Internacional de Odontologia



LASER DE BAIXA POTÊNCIA PODE PREVENIR A MORTE CELULAR EM TECIDOS DENTÁRIOS

FARIA, L. V.¹; MEDEIROS, Y. L.¹; ANJOS, L. M. J.²; FONSECA, A. S.³ e PAOLI, F.⁴

1. Acadêmico do curso de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF.
 2. Doutora em Ciências Biológicas - Subárea Imunologia e Doenças Infecto Parasitárias pela UFJF.
 3. Doutor em Biologia – Subárea de Biociências Nucleares pela UERJ – Professor Adjunto da UERJ e UNIRIO.
 4. Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela UNICAMP - Professora Adjunta do Departamento de Morfologia da UFJF.
- luanvfaria13@hotmail.com



30 JAN
a
02 FEV
2019

INTRODUÇÃO

O laser de baixa potência (LBP) possui destaque na odontologia^{2,3}. Entretanto, a grande aplicabilidade do LBP pode levantar questões sobre o tempo de tratamento, tipos de lesões e possíveis efeitos colaterais¹.

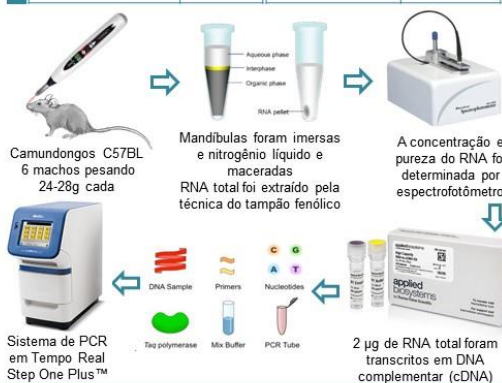
Apesar de atualmente não existir relatos sobre esses efeitos, diversos trabalhos tem atribuído que mesmo com baixas produções de espécies reativas de oxigênio, as células são capazes de desencadear sinalizações intracelulares e gerar até mesmo danos sub-letais no DNA¹.

OBJETIVO

Avaliar a expressão relativa de mRNA de genes envolvidos em vias de apoptose, como a Bcl-2 e Caspase-6, em mandíbulas de camundongos tratadas com laser.

MATERIAIS E MÉTODOS

PARÂMETROS	Emissão (λ)	830 nm	Área irradiada	0,05 cm ²
	Fluências	3 e 30 J/cm ²	Tempo de Irradiação	15 e 150 segundos
	Potência	10 mW		



REFERÊNCIAS

1. Dos Anjos, L. M. J., da Fonseca, A. de S., Gameiro, J., & de Paoli, F. (2017). Apoptosis induced by low-level laser in polymorphonuclear cells of acute joint inflammation: comparative analysis of two energy densities. *Lasers in Medical Science*, 32(5), 975–983.
2. Pandeshwar, P., Raza, M. D., Das, R., Shastay, S. P., Kaul, R., & Srinivasreddy, M. B. (2015). Photobiomodulation in oral medicine: a review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 7(2), 114–126.
3. Milligan, M., Arudchelvan, Y., & Gong, S.-G. (2017). Effects of two wattages of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Archives of Oral Biology*, 80, 62–68.

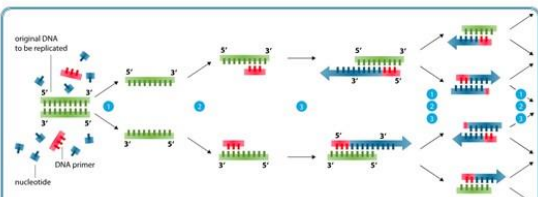


Fig. 1. Representação esquemática da reação em cadeia da polimerase ou PCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

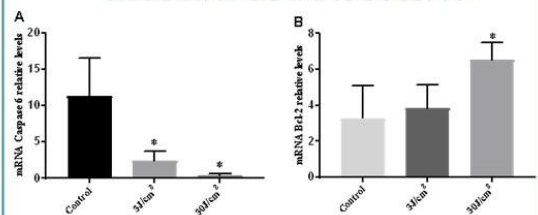


Figura 2. Níveis relativos de mRNA para os genes da caspase-6 (A) e Bcl-2 (B) na mandíbula do camundongo após a fotobioestimulação.

Apoptose é um complexo processo, dependente de energia e caracterizado por específicas modificações morfológicas e bioquímicas, incluindo a ativação de caspases. A caspase-6 é considerada uma proteína pró-apoptótica (efetora ou executora). Já a família de proteínas Bcl-2 regula a permeabilidade da membrana mitocondrial e pode ser pró-apoptótica ou anti-apoptótica, sendo a proteína Bcl-2 um exemplo de proteína anti-apoptótica.

CONCLUSÃO

O LBP foi capaz de prevenir a apoptose nas células da polpa dentária e do ligamento periodontal, devido à regulação negativa da caspase-6 e ao aumento do Bcl-2.

APOIO



*Todos os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade de Juiz de Fora (protocolo nº 039/2014).

ANEXO D – Publicação dos resultados do qPCR nos anais do 37º Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo (FARIA, et al., 2019)

Painel

Laser 

Laser de baixa potência pode prevenir a morte celular em tecidos dentários

Luan Vinícius Faria

Yuri de Lima Medeiros

Lúcia Maria Januário dos Anjos

Adelson de Souza do Fonseca

Flávio de Paoli

RESUMO

Usado isoladamente ou como coadjuvante de tratamentos, o laser de baixa potência (llpp) possui destaque na Odontologia, principalmente por apresentar-se como uma terapia com potencial efeito analgésico, anti-inflamatório e biomodulador das funções celulares. A grande aplicabilidade do llpp pode levantar questões sobre o tempo de tratamento, tipos de lesões e possíveis efeitos colaterais. Atualmente, não há relatos sobre esses efeitos e essa ausência muitas vezes é atribuída ao efeito atérmico e baixa produção de espécies reativas de oxigênio (ros). Por outro lado, diversos trabalhos tem atribuído que mesmo com baixas produções de ros, as células são capazes de desencadear sinalizações intracelulares e gerar até mesmo danos sub-letais no DNA. Com isso, fazem-se necessárias investigações dos efeitos moleculares do llpp. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis relativos de genes envolvidos em vias de apoptose, como a bcl-2 e caspase-6, em mandíbulas de camundongos tratadas com laser. O estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética em uso de animais da Universidade Federal de Juiz de Fora (039/2014). Dezoito camundongos (57lb/6) foram divididos em três grupos: controle (I), 3 j/cm² (II) e 30 j/cm² (III). Os parâmetros do laser foram: 830 nm, potência de 10 mw, 3 e 30 j/cm², área irradiada de 0,05 cm², em emissão de luz contínua, por quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última irradiação, os animais foram submetidos à eutanásia e suas mandíbulas foram dissecadas e lavadas em soro fisiológico. O material foi macerado após imersão em nítrogênio líquido, e o rna total foi extraído para realização de pcr em tempo real, a fim de determinar os níveis relativos de genes relacionados a apoptose. Os resultados demonstraram que os níveis relativos de bcl-2 foram aumentados, enquanto os níveis para caspase-6 foram diminuídos após o tratamento com llpp, especialmente para a maior dose (30 j/cm²). Conclui-se que o laser desencadeia uma resposta celular, o qual possui uma tendência a proteger a célula contra a apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dos Anjos, L. M. J., Da Fonseca, A. De S., Gameiro, J., Et De Paoli, F. (2017). Apoptosis Induced By Low-Level Laser In Polymorphonuclear Cells Of Acute Joint Inflammation: Comparative Analysis Of Two Energy Densities. Lasers In Medical Science, 32(5), 975-983. Pandeshwar, P., Rao, M. D., Das, R., Shastri, S. P., Kaul, R., Et Srinivasreddy, M. B. (2015). Photobiomodulation In Oral Medicine: A Review. Journal Of Investigative And Clinical Dentistry, 7(2), 114-126. Milligan, M., Anuchekhan, Y., Et Gong, S.-G. (2017). Effects Of Two Wattages Of Low-Level Laser Therapy On Orthodontic Tooth Movement: ArchIVES Of Oral Biology, 80, 62-68. Theodoridou, A., Bakopoulou, A., Kontonasi, E., Papachristou, E., Hadjichristou, C., Bounaki, M., ... Koidis, P. (2016). Odontogenic Differentiation And Biomineralization Potential Of Dental Pulp Stem Cells Inside Mg-Based Bioceramic Scaffolds Under Low-Level Laser Treatment. Lasers In Medical Science, 32(1), 201-210.