



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

NADIJANNIA NÚBIA DE CARVALHO LEITE

**O EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA**

CAMPINA GRANDE-PB

2016

NADIJANNIA NÚBIA DE CARVALHO LEITE

**O EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento a exigência para obtenção do Grau de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes

**CAMPINA GRANDE-PB
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

L533e Leite, Nadijannia Núbia de Carvalho.

O efeito da laserterapia de baixa intensidade na proliferação de células-tronco isoladas da papila apical humana [manuscrito] / Nadijannia Núbia de Carvalho Leite. - 2016.

32 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Departamento de Odontologia".

1. Células-tronco. 2. Laserterapia. 3. Proliferação celular. 4. Papila apical. I. Título.

21. ed. CDD 617.6

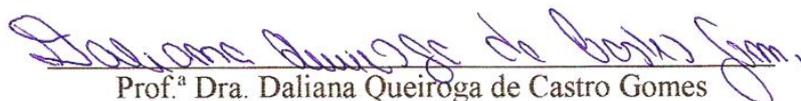
NADIJANNIA NÚBIA DE CARVALHO LEITE

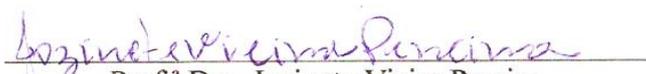
O EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE NA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DA PAPILA APICAL HUMANA

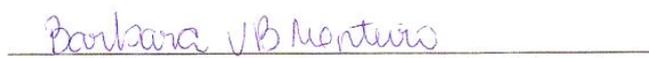
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Estadual da Paraíba, em
cumprimento a exigência para obtenção do
Grau de Bacharel em Odontologia.

Aprovado em: 25/10/2016

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof.^a Dra. Jozinete Vieira Pereira,
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof.^a Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

*Ao meu Senhor e salvador, Jesus, dono da minha vida.
Aos meus pais, Neri Carvalho Leite e José Severiano Leite,
Por todo amor e cuidado; pelos ensinamentos, exemplos e
por todo companheirismo.
A eles que são a minha maior riqueza, **DEDICO**.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele, sou grata pelo refúgio, fortaleza e por seu imensurável amor que excede todo entendimento.

À minha amada família, meus pais José e Neri por todo apoio, por sempre acharem soluções para os obstáculos que encontrei não só nessa fase acadêmica, mas por toda uma vida, por todo o amor que me foi ofertado. Ao meu irmão Jandi (*in memoriam*), obrigada por sua presença real, sei que do céu me olhas e se orgulhas de mim. Ao meu irmão Matheus por toda sua inocência e amor, mesmo tão pequeno me impulsiona a dar o meu melhor. A todos os meus familiares pela torcida.

Ao meu espelho profissional, professora Daliana Queiroga de Castro Gomes, por seu cuidado e atenção na elaboração deste trabalho; quero agradecer por me receber de braços abertos no SBOnco e LINCCO, tenho guardado comigo ensinamentos que vão além da profissão, seus projetos são formadores de seres humanos melhores, obrigada.

Às professoras, Jozinete Pereira e Bárbara Monteiro, pela disponibilidade, contribuição e por suas valiosas considerações para a melhora desde trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Odontologia da UEPB, pela presteza e ensinamentos.

À Hianne Moraes, pela parceria no PROCAD, obrigada pela maravilhosa convivência, pela confiança e pelo exemplo que me deste de amor pela pesquisa, tudo isso foi essencial para que tudo desse certo em nossa missão em Goiânia-GO.

À minha irmã de alma, minha Ray, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tudo tem se tornado mais leve. Obrigada pelo carinho, pela paciência, por todas as horas que me dedicastes, e por sua capacidade singular de me trazer paz e arrancar meus mais sinceros sorrisos mesmo nos momentos mais difíceis, te amo.

À Amanda Aragão pelo exemplo de pessoa que sempre foi para mim, obrigada pelos conselhos e carões, pelo colo e amparo, por muitas vezes me emprestar sua família para que eu pudesse me sentir mais campinense; sinto que Deus reflete seu cuidado para comigo através de pessoas como você.

À Mayane Oliveira, pessoa colocada por Deus na minha vida, através de um acaso tão cheio de propósitos, serei eternamente grata por todo companheirismo, palavras e carinho durante esses mais de 5 anos, te levarei para sempre comigo e sei que nossa amizade não findará com o desfecho deste ciclo.

Aos amigos de perto e de longe; em especial Joseane, Bianka e Keille que me ajudaram a suportar dificuldades, comemoraram vitórias e ouviram meus desabafos, choros e risos. À Liege, por me socorrer em todas as dúvidas, me auxiliando com sua experiência acadêmica.

Aos amigos que a graduação me presenteou Andreza Barbosa, Laryssa Viana, Iroildo Filho, em especial, minha dupla de clínica e de vida, Marcela Pessoa, pelos mimos e cuidados, por dividir comigo meus medos e superações; fostes um presente de Deus na minha vida. A todos, minha eterna gratidão por toda alegria, incentivo e amizade, sem vocês estes anos não teriam sido os mesmos.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da laserterapia de baixa intensidade (LBI) no aumento do metabolismo das células-tronco isoladas da papila apical humana, *stem cells apical papilla* (SCAPs), por meio de imunofluorescência, bem como verificar se a LBI intensifica a proliferação das mesmas por meio da imunexpressão do Ki-67. Todos os procedimentos antecedentes à estocagem das células seguiram os princípios éticos regidos pelo Código de Helsinque e foram submetidos ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás aprovado sob o número (CAAE): 44993015800005083. Os experimentos foram realizados com células isoladas de quatro pacientes distintos, previamente caracterizadas e cultivadas. As células foram irradiadas com um aparelho de Laser semiconductor (InGaAlP), com potência de 100mW, comprimento de onda de 660nm, de ação contínua. Para o ensaio de Imunofluorescência, utilizou-se o Mitotraker Red (Molecular Probes®, MP-07512, Invitrogen©) na concentração de 100mM. A técnica consistiu na aplicação de um fluorocromo de coloração vermelha que permeabilizava a célula e se fixava na superfície de mitocôndrias ativas; foi comparada a diferença de fluorescências entre os grupos controle não tratado (CNT), grupo irradiado com ensaio de imunofluorescência sem intervalo de incubação (6JT0) e o grupo irradiado com ensaio de imunofluorescência com intervalo de 24h de incubação (6J24h) e feita a avaliação, observando que quanto maior o metabolismo mitocondrial, maior a fixação do fluorocromo a sua superfície. Com o objetivo de analisar o mecanismo de ação da LBI sob as SCAPs, foi realizada técnica de imunocitoquímica. Foi utilizado o marcador Ki-67; a fim de verificar se havia diferença na regulação da expressão desta proteína nas células irradiadas e não irradiadas. O ensaio foi repetido em outras linhagens isoladas da amostra. Para a análise de imunocitoquímica, eram separados dois grupos de células de cada paciente, sendo um grupo controle não tratado (CNT) e um grupo irradiado com laser vermelho (6J). Os percentuais de imunoreatividade foram registrados em planilha e posteriormente submetidos a análise estatística, através de uma análise descritiva com obtenção da mediana e desvio padrão de todos os grupos estudados. Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa na imunoreatividade ao Ki-67, entre os grupos de células irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e foi adotada significância de 5%. As células irradiadas, com laser vermelho de baixa intensidade parecem apresentar positividade quanto ao aumento da proliferação, porém não houve significância estatística quando comparadas aos grupos controle. Assim, conclui-se que a LBI foi capaz de aumentar o metabolismo mitocondrial das células-tronco isoladas da papila apical, associado a um aumento das medianas do marcador Ki-67; o que pode indicar que a LBI estimula a proliferação das SCAPs.

Palavras-Chave: Células-tronco. Terapia a laser. Proliferação celular.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of LLLT metabolism increase of stem cells apical papilla (SCAPs) by immunofluorescence and verify if enhances proliferation of SCAPs through the Ki-67 immunoexpression. All records procedures for storage of the cells followed the ethical principles governed by the Helsinki Code and submitted to the ethics committee in research at UFG under the certificate presentation for ethical consideration (CAAE): 44993015800005083. The experiments were performed with isolated cell four different patients, previously characterized and cultivated. The cells were irradiated with a semiconductor laser device (InGaAlP) with 100mw power, wavelength 660nm of continuous action. Control and treated groups were removed from the stove simultaneously. For the immunofluorescence assay, were used the Mitotraker Red (Molecular Probes®, HB-07512, © Invitrogen) at 100mM concentration. This technique consisted in applying a red colored fluorochrome which permeates the cell and fixes on the surface of active mitochondria; fluorescence difference was compared between untreated control (UC), the group irradiated with immunofluorescence assay without incubation interval (6JT0) and the group irradiated with immunofluorescence assay with an interval of 24 hours of incubation (6J24h), and evaluation made by observing that the higher the mitochondrial metabolism, greater the fixation of fluorochrome to its surface. In order to analyze the action mechanism of LLLT under SCAPs, immunocytochemistry technique was performed. It was used a Ki-67 marker to verify if there were differences in regulation of expression of this protein in irradiated and unirradiated cells. Test was repeated on isolated strains from four different patients. For immunocytochemical analysis, were separated two groups of cells from each patient, an UC group and an irradiated group with red laser (6J). Percentage of immunoreactivity was recorded in a spreadsheet and then subjected to statistical analysis; through a descriptive analysis to obtain median and standard deviation of all studied groups. To check whether there was a statistical difference in immunoreactivity to Ki-67 between the irradiated and unirradiated cell groups using *Mann-Whitney* test and was adopted significance of 5%. The cells irradiated with low intensity red laser, appear to be positive on the increased proliferation; however, there was no statistical significance when compared to control groups. In conclusion, that LLLT was able to increase mitochondrial metabolism of isolated stem cells of papilla, associated with a median increase of Ki-67 marker; which may indicate that LBI stimulates the proliferation of SCAPs.

Keywords: Stem cells. Laser therapy. Cell proliferation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Ácido Trifosfato de Adenosina
cAMP	Adenosina 3', 5' - Monofosfato Cíclico
CNM	Controle Não Marcado
CNT	Controle Não Tratado
Cytc	Citocromo C Oxidase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DPSC	<i>Dental Pulp Stem Cell</i>
FO-UFG	Faculdade de Odontologia-Universidade Federal de Goiás
LBI	Laserterapia de Baixa Intensidade
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffed Saline</i>
PBS-BSA	<i>Phosphate Buffed Saline – Bovine Serum Albumin</i>
PDLSC	<i>Periodontal Ligament Stem Cell</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SCAP	<i>Stem Cell Apical Papilla</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	<i>Stem cell from Human Exfoliated Deciduous Teeth</i>
UFG	Universidade Federal de Goiás

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Parâmetros do Laser de Diodo.	20
Quadro 2	Distribuição dos grupos, para Imunofluorescência, de acordo com o tipo de intervenção.	22
Quadro 3	Especificação do marcador Ki-67.	24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Poço único posicionado sobre a placa molde para irradiação das células 21
previamente ao ensaio de imunofluorescência.
- Figura 2 Irradiação das células aderidas na lamínula 24h antes da reação de 23
imunocitoquímica.
- Figura 3 Atividade mitocondrial antes da irradiação, imediatamente após a 26
irradiação e 24 após irradiação com LBI
- Figura 4 Imunoexpressão do Ki-67 nos grupos 6J e CNT. 27
- Figura 5 Distribuição dos percentuais de imunoreatividade ao Ki-67 27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	Células-tronco Isoladas da Papila Apical Humana (SCAPs)	15
3.2	Laserterapia de Baixa Intensidade e Proliferação de Células Mesenquimais	16
4	METODOLOGIA	19
4.1	Considerações Éticas	19
4.2	Cultura de Células	19
4.2.1	Manutenção das Células-tronco Isoladas da Papila Apical Humana	19
4.3	Irradiação das Células	19
4.4	Imunofluorescência	20
4.5	Imunocitoquímica	22
4.6	Análise dos Dados	25
5	RESULTADOS	26
5.1	LBI e Atividade mitocondrial das SCAPs	26
5.2	LBI na proliferação de SCAPs	26
6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÕES	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Laser (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) consiste em um feixe de luz eletromagnética uniforme, cujas propriedades têm propiciado várias aplicações nas áreas de saúde (KUSHIBIKI; OKAWA; ISHIHARA, 2015). Estudos demonstram que a laserterapia de baixa intensidade (LBI) tem sido responsável por estímulos celulares e efeitos biomoduladores *in vivo* e *in vitro*. Sua capacidade de estimular a proliferação e o crescimento celular, e de aumentar o metabolismo de vários tipos de células é considerada o efeito fisiológico mais importante (PEREIRA; LONGO; AZEVEDO, 2012, SOARES et al, 2015).

A LBI tem sido aplicada na aceleração de processos de regeneração tecidual, devido, em parte, à redução na duração da inflamação, pois as baixas densidades de energia e os comprimentos de onda utilizados no laser de baixa intensidade são capazes de penetrar facilmente nos tecidos, induzindo significativos efeitos biomoduladores e resultando em uma reparação mais rápida (COSTA et al, 2013, GINANI et al, 2015, KUSHIBIKI; OKAWA; ISHIHARA, 2015).

Uma outra alternativa que vem evoluindo na aplicabilidade à regeneração dos tecidos é a terapia celular, principalmente utilizando células-tronco mesenquimais, *mesenchymal stem cells* (MSCs), que são células imaturas de origem mesodérmica, não especializadas, as quais apresentam potencial de desenvolvimento por meio da diferenciação em variadas linhagens de células, incluindo osteoblastos, adipócitos e condrócitos (CHANG et al, 2015).

Essas células são as precursoras na formação da maioria dos tecidos conjuntivos do organismo, tornando-se então as células de eleição a serem utilizadas em estratégias de regeneração desses tecidos. Logo, seu uso na terapia de regeneração celular tem atraído a atenção mundial durante os últimos anos como fontes para a engenharia tecidual (EGUSA et al, 2012, IBARRETXE et al, 2012). O potencial para a regeneração de tecido a partir de células-tronco implantadas está ainda a ser testado em ensaios clínicos para avaliar a sua eficácia e segurança (XIAO; NASU, 2014).

Embora alguns autores relatem que os parâmetros usados na LBI ainda são limitados e, às vezes, conflitantes, o que pode influenciar na obtenção dos efeitos biológicos desejados (GINANI et al, 2015); estudos relacionando a LBI e MSCs têm mostrado que a LBI pode alterar o metabolismo celular e aumentar a produção de ácido trifosfato de adenosina (ATP). Assim, a LBI parece ser uma abordagem válida para o pré-condicionamento de MSCs *in vitro* antes de seu transplante (MVULA; ABRAHAMSE, 2015, KUSHIBIKI; OKAWA; ISHIHARA, 2015).

O corpo humano possui várias fontes de células-tronco que permanecerão ativas durante a vida; sendo responsáveis pela renovação dos agrupamentos de células diferenciadas em um organismo adulto (IBARRETXE et al, 2012). Portanto, conhecer e entender o processo de desenvolvimento específico dos tecidos é de fundamental importância para restauração dos mesmos e de órgãos danificados (XIAO; NASU, 2014).”

Muitos tecidos humanos adultos, tais como medula óssea, tecido adiposo, derme, cordão umbilical e polpa dentária contêm populações de células-tronco mesenquimais (XIAO; NASU, 2014). Após a descoberta de células-tronco adultas a partir da polpa dentária, *dental pulp stem cells* (DPSCs), vários tipos de células-tronco dentárias têm sido isolados sucessivamente de germes de dentes, de dentes decíduos esfoliados, *stem cells from human exfoliated deciduous teeth* (SHEDs), do ligamento periodontal, *periodontal ligament stem cells* (PDLSCs) e, mais recentemente, células-tronco que residem na papila apical de dentes em desenvolvimento, *stem cells from apical papilla* (SCAPs) (BAKOPOULOU et al, 2011, ABUARQOUB; AWIDI; ABUHARFEIL, 2015).

A porção apical da raiz em desenvolvimento atua como o centro de desenvolvimento da raiz e do periodonto (CHEN et al, 2013). Acredita-se que as SCAPs são uma fonte principal de células indiferenciadas, as quais apresentam taxas de proliferação maiores do que as células das polpas dentárias (RUPAREL et al, 2013), sendo capazes de diferenciar-se em células odontoblásticas com uma mineralização ativa e com evidências que suportam a hipótese que SCAPs parecem ser a fonte de odontoblastos primários responsáveis pela formação de dentina radicular e polpa dentária (WU et al, 2013, ABUARQOUB; AWIDI; ABUHARFEIL, 2015).

Estudos anteriores relatam que o efeito da LBI apresenta resultados positivos no que diz respeito ao aumento das taxas de proliferação de células mesenquimais da medula óssea, tecido cardíaco, do tecido adiposo, e células do ligamento periodontal (ZACCARA et al, 2015). Contudo, não há trabalhos que comprovem o aumento da proliferação a partir da LBI nas SCAPs. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da LBI na proliferação das SCAPs, por meio da imunofluorescência e do Ki67.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da laserterapia de baixa intensidade, na proliferação e no aumento metabólico, das células-tronco isoladas da papila apical humana.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar se a laserterapia de baixa intensidade ocasiona aumento metabólico nas células-tronco isoladas da papila apical humana, avaliado por meio da imunofluorescência;
- Observar se a irradiação das células-tronco isoladas da papila apical humana resulta em aumento da proliferação, analisada por meio da imunexpressão do Ki-67.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Células-tronco Isoladas da Papila Apical Humana (SCAPs)

As MSCs são consideradas, mundialmente, uma ótima fonte de células progenitoras para a engenharia tecidual e de regeneração, devido sua capacidade de autorrenovação e diferenciação (BAKOPOULOU et al, 2011). Mesmo na vida adulta, o corpo humano ainda possui várias fontes de células-tronco que permanecerão ativas renovando os agrupamentos de células diferenciadas no organismo adulto (IBARRETXE et al, 2012).

A medula óssea, o tecido adiposo, a derme, o cordão umbilical e a polpa dentária são exemplos de tecidos humanos adultos que apresentam populações de células-tronco mesenquimais (XIAO; NASU, 2014). Vários tipos de células-tronco dentárias, após a descoberta de células-tronco adultas a partir da polpa dentária, foram isolados de outros tecidos dentários como de germes de dentes; de dentes decíduos esfoliados SHED; de ligamento periodontal PDLSC e, mais recentemente, células-tronco que residem na papila apical de dentes em desenvolvimento SCAPs (BAKOPOULOU et al, 2011, ABUARQOUB; AWIDI; ABUHARFEIL, 2015).

A papila apical consiste em um tecido que é distinto do tecido pulpar, localizado no vértice de raízes de dentes permanentes em desenvolvimento, que é, potencialmente, uma fonte de MSCs para a formação dessas raízes, além disso, elas podem também originar células odontoblásticas, osteoblastos e adipócitos quando cultivadas sob condições adequadas (SAITO et al, 2015). Por apresentarem uma maior taxa proliferação quando comparada as células da polpa dentária, acredita-se que as SCAPs sejam uma fonte principal de MSCs (RUPAREL et al, 2013).

Chen et al, em 2013, afirmaram que as SCAPs podem ser uma excelente opção para a engenharia de tecido periodontal. Para isso, eles compararam, *in vitro*, os potenciais de diferenciação em células periodontais de células-tronco de SCAPs e PDLSCs. As culturas de células foram adquiridas a partir de terceiros molares impactados normais e apresentando raízes com formação incompleta. As células foram cultivadas durante o período de 60 dias, e, em seguida, foram analisadas quanto ao potencial de mineralização; a taxa de proliferação celular; capacidade de formação de colônias e a presença de marcadores específicos de ligamento periodontal. Este estudo revelou que as SCAPs apresentaram um índice significativamente maior de proliferação celular e capacidade de formação de colônias quando comparadas as PDLSCs. Ambos os tipos de células exibiram potencial de mineralização após a cultura de

indução e de longo prazo. Podendo-se concluir que as SCAPs expressam propriedades periodontais *in vitro*, além de uma maior taxa de proliferação e mineralização que as PDLSCs.

Bakopoulou et al, em 2011, compararam *in vitro* o potencial osteo/odontogênico de diferenciação de MSCs derivadas da polpa dentária (DPSC) ou da papila apical (SCAP) de dentes permanentes em desenvolvimento. Para isso, culturas de DPSCs e SCAPs foram estabelecidas a partir de terceiros molares impactados na fase de desenvolvimento radicular de doadores jovens saudáveis. As culturas foram analisadas quanto a presença de marcadores de células-tronco, incluindo STRO-1, CD146, CD34 e CD45, utilizando citometria de fluxo. Como resultado, as SCAPs mostraram um potencial significativamente maior da taxa de proliferação e mineralização quando comparado às DPSCs, o que pode ser de importância para a sua utilização na engenharia tecidual dentária e em tratamentos clínicos à base de células tronco, segundo os autores.

Prateptongkum; Klingelhöffer e Morszeck, em 2015, comparando duas linhagens independentes de SCAPs de um mesmo doador com uma terceira linhagem de células de outro doador, a partir da investigação da expressão de um marcador de células-tronco e da eficiência de unidades formadoras de colônias; demonstraram que as características, como taxa de proliferação e potencial de diferenciação das culturas de SCAPs, independem da fonte de células, ou seja, do tecido dentário doador das SCAPS utilizadas.

3.2 Laserterapia de Baixa Intensidade e Proliferação de Células Mesenquimais

A palavra “Laser” é em um acrônimo do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que consiste em um feixe de luz eletromagnética com características específicas uniformes, sendo monocromático, coerente e direcional, que é gerado através de um aparelho que vem permitindo numerosas aplicações nas áreas de saúde (MVULA e BRAHAMSE, 2015, KUSHIBIKI; OKAWA; ISHIHARA, 2015).

Umas das características da luz laser é a monocromaticidade e, na LBI, o comprimento de onda varia de 630-905nm. Essa energia é convertida em energia metabólica pelos cromóforos intracelulares e, utilizada na produção de ATP pela cadeia respiratória mitocondrial, além de aumentar atividade do DNA e a síntese de RNA. Os comprimentos de onda característicos da LBI e a utilização de densidades de energia mais baixas facilitam a penetração da irradiação e resultam em efeitos biomoduladores em células e tecidos (GINANI et al, 2015, MVULA e ABRAHAMSE, 2015).

A LBI em tecido humano, como tratamento médico, vem sendo utilizada a fim de promover mudanças metabólicas satisfatórias (KUSHIBIKI; OKAWA; ISHIHARA, 2015). Para reparar o tecido de maneira mais rápida, o tratamento com laser estimula a atividade celular, conduz a liberação de fatores de crescimento por macrófagos, induz a proliferação de queratinócitos, promove o aumento da população e degranulação de mastócitos e estimula a angiogênese, o que pode resultar em uma aceleração no processo de cicatrização de feridas a partir da redução na duração da inflamação aguda (COSTA et al, 2013).

Essa prática tem sido amplamente realizada em diversas situações clínicas com o intuito de acelerar os processos de regeneração e cura tecidual, em decorrência do efeito proliferativo (GINANI et al, 2015) em uma variedade de tipos de células, o que tem sido indicado como o efeito fisiológico mais relevante (SOARES et al, 2015).

Para que essas respostas sejam satisfatórias, é necessário um planejamento prévio que considere o comprimento de onda, a potência e a quantidades de aplicações que serão realizadas; como também, a densidade de energia ou fluência (J/cm^2), a qual representa a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido e a densidade de potência ou intensidade (W/cm^2), que é saída de luz por unidade de área medida em Watts por centímetro quadrado (RIBEIRO; ZAZELL, 2004).

Além da prática clínica, a terapia celular vem crescendo gradativamente como outra alternativa para aplicabilidade do laser de baixa intensidade (CHANG et al, 2015). Vários trabalhos relatam um aumento significativo na taxa de proliferação de células como fibroblastos, osteoblastos, linfócitos, e células endoteliais, como também na proliferação de células-tronco mesenquimais da medula óssea, do tecido adiposo e dos tecidos dentários (SOARES et al, 2015, ABUARQOUB; AWIDI; ABUHARFEIL, 2015).

Pereira; Longo e Azevedo (2012) investigaram se a LBI poderia aumentar os potenciais de proliferação e diferenciação de DPSC isoladas a partir de polpas dentárias saudáveis e a partir de polpas inflamadas. Para isso, as DPSC foram isoladas de pacientes diferentes, a partir de dentes com polpas dentárias em condições normais e inflamadas e posteriormente irradiadas com um laser de (660 nm) em quatro densidades de energia diferentes (0,05, 0,30, 7 e 42 J/cm^2). Como resultado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de proliferação, tanto para DPSC de polpas dentários normais como para as polpas dentárias inflamadas.

Soares et al, em 2015, avaliaram o efeito do laser de baixa intensidade (660 nm, 30 mW) sobre a taxa de proliferação de PDLSC, obtidas a partir de dois terceiros molares saudáveis extraídos por indicação cirúrgica. As células foram irradiadas com um laser de diodo InGaAlP

em 0 e 48 h utilizando duas densidades de energia diferentes (0,5 e 1,0 J/cm²), exceto no grupo controle. A proliferação celular foi avaliada pelo método de exclusão de azul de tripano e pela medição da atividade mitocondrial utilizando o ensaio de citotoxicidade baseado em MTT em intervalos de 0, 24, 48 e 72 h após a primeira aplicação do laser. Os autores concluíram que a LBI, particularmente, a dose de 1,0 J/cm², a qual induziu uma proliferação significativamente maior quando comparada a densidade de 0,5 J/cm² e controle, contribuíram positivamente no estímulo sobre a proliferação de PDLSC.

Zaccara et al, em 2015, com o objetivo de identificar a menor densidade de energia capaz de promover a proliferação de DPSCs, mantendo sua viabilidade celular, isolaram DPSCs humanas advindas de terceiros molares saudáveis extraídos devido a uma indicação cirúrgica e/ou ortodôntica. As células foram irradiadas com um laser de diodo InGaAlP em 0 e 48 h utilizando duas densidades de energia diferentes (0,5 e 1,0 J/cm²), exceto no grupo controle. A proliferação celular e da viabilidade e atividade mitocondrial foram avaliados em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira aplicação do laser. Esse estudo concluiu que a LBI particularmente uma dose de 1,0 J/cm², contribuiu para o crescimento de DPSC e, com a manutenção da sua viabilidade. Indicando assim, que essa terapia parece ser uma importante ferramenta para a engenharia tecidual e medicina regenerativa envolvendo células tronco.

Ginani et al, em 2015, por meio de uma revisão sistemática da literatura, avaliaram os efeitos da LBI na proliferação *in vitro* de células-tronco mesenquimais. Para isso, realizaram uma busca eletrônica no banco de dados PubMed / Medline dos artigos publicados nos últimos doze anos. As análises dos trabalhos mostraram uma relevante quantidade de estudos utilizando a LBI em células estaminais (*stem*) derivadas da medula óssea, polpa dentária, ligamento periodontal, e tecido adiposo. Neste trabalho, os autores avaliaram vários protocolos, que foram usados para irradiar as células, com variações no comprimento de onda, densidade de potência, tempo de radiação e o estado de polarização da luz. A maior parte dos estudos demonstrou um aumento na taxa de proliferação das células irradiadas; podendo concluir que a LBI influencia positivamente a proliferação *in vitro* de células tronco, sendo necessária a realização de novas experiências com outros tipos de células e uniformizar a metodologia desses estudos.

Estudos como esses anteriormente citados, os quais relacionam a LBI e MSCs, na medicina regenerativa, têm sido realizados a fim de, com a promoção do aumento do número de células, o tempo de preparação das mesmas seja encurtado significativamente e, por conseguinte, diminui-se também o risco de contaminação dessas culturas (WU et al, 2012). Isso pode ser observado, pois, a LBI pode alterar o metabolismo das células tronco e aumentar a produção de ATP (MVULA; ABRAHAMSE, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações Éticas

Os experimentos foram realizados com células doadas e previamente caracterizadas do biorrepositório de células-tronco do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos da Universidade Federal de Goiás (UFG). Todos os procedimentos antecedentes à estocagem das células, seguiram os princípios éticos regidos pelo Código de Helsinque e foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, aprovado sob o número do certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE): 44993015.8.0000.5083.

4.2 Cultura de Células

4.2.1 Manutenção das Células-tronco Isoladas da Papila Apical Humana

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada a 5% de CO₂ até as células atingirem o estado de confluência. Para cada garrafa, foi utilizado 10 mL de meio de cultura padrão composto por: *Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture* F-12 (DMEM/F12, Sigma-Aldrich®- SLBH2344V), soro fetal bovino (SFB) a 10%, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Este meio foi mantido na garrafa por um período máximo de três dias, para não colocar em risco a viabilidade celular.

Para todos experimentos realizados neste estudo, foram utilizadas células isoladas de quatro pacientes distintos.

4.3 Irradiação das Células

As células foram depositadas em placas de seis poços (EasyPath®, EP-5125241) ou 12 poços (Falcon®, células doadas e previamente caracterizadas do biorrepositório de células-tronco do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica e Sistemas de Liberação de Fármacos da UFG.

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm² e mantidas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada a 5% de CO₂

As células foram depositadas em placas de seis poços (EasyPath[®], EP-5125241) ou 12 poços (Falcon[®] 35-3504), na densidade de células específica para cada ensaio, mantendo-se sempre um poço vazio entre dois poços contendo células, de modo a evitar a dispersão de luz não intencional entre os poços durante aplicação do laser. As células foram irradiadas com um aparelho de Laser semiconductor (InGaAlP), laser DUO MMOPTICS[®] (São Carlos, SP, Brasil.), com as especificações apresentadas no Quadro 1. Os grupos controle e tratados foram retirados da estufa simultaneamente. A irradiação ocorreu dentro da cabine de fluxo desprovida de iluminação.

Quadro 1. Parâmetros do Laser de Diodo.

Composição	InGaAlP
Potência	100 mW
Comprimento de onda	660 nm
Modo de ação	Contínuo
Diâmetro da ponta	0,03 cm ²
Energia	6 J
Tempo	60s
Modo de aplicação	Sonda de irradiação perpendicular à placa, a 0,5 cm das células

4.4 Imunofluorescência

Para o ensaio de Imunofluorescência, utilizou-se o Mitotraker Red (Molecular Probes[®], MP-07512, Invitrogen[®]) na concentração de 100mM. A técnica consiste na aplicação de um fluorocromo de coloração vermelha que permeabiliza a célula e através de um radical clorometilo se fixa na superfície de mitocôndrias ativas. Quanto maior o metabolismo mitocondrial, maior a fixação do fluorocromo a sua superfície.

Foram utilizadas placas de cultura clonal ou poço único de 35mm (Thermo Scientific[®]-130180), sendo a densidade de células de 5×10^5 por poço. Os grupos controle e de intervenção foram divididos como exposto no Quadro 3; os grupos controle não tratado (CNT), grupo irradiado com ensaio de imunofluorescência sem intervalo de incubação (6JT0) e o grupo irradiado com ensaio de imunofluorescência com intervalo de 24h de incubação (6J24h) e foi

realizada a avaliação, observando que quanto maior o metabolismo mitocondrial da célula, maior a fixação do fluorocromo a sua superfície.

Para irradiação, cada poço foi colocado sobre um molde que delimitava cada 1cm^2 da área do poço (Figura 1). O laser vermelho (Quadro 1) foi aplicado no ponto central de cada quadrado, desta forma, toda a superfície do poço foi irradiada uma única vez.

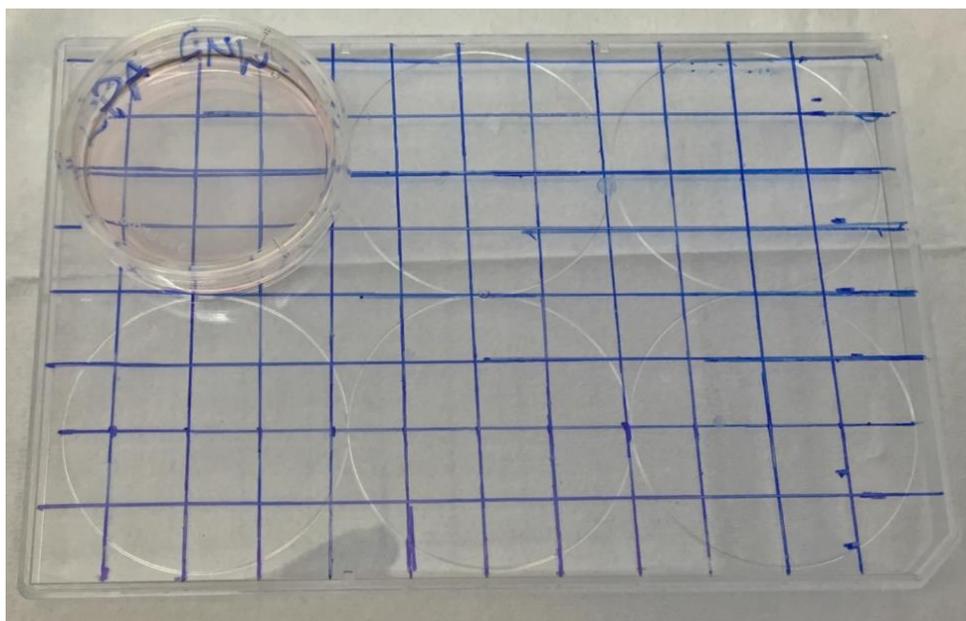


Figura 1. Poço único posicionado sobre a placa molde para irradiação das células previamente ao ensaio de imunofluorescência.

Após exposição ao laser, as células foram incubadas por mais 24h. No caso do grupo T0, não houve incubação. Posteriormente, iniciou-se o ensaio seguindo o protocolo abaixo citado:

- 1) Remover o meio de cultura dos poços;
- 2) Lavar um vez com DMEM sem SFB, com o intuito de que as proteínas do SFB não interajam com o fluorocromo provocando precipitação e consequente coloração de fundo;
- 3) Colocar o Mitotraker(100mM) e incubar por 30 min;
- 4) Remover o corante e lavar uma vez com PBS aquecido;
- 5) Preparar uma solução de 150 μ l de PBS aquecido e adicionar 850 μ l de Paraformaldeido a 4% para cada poço. Incubar os poços com a solução por 15min;
- 6) Retirar a solução;
- 7) Lavar com PBS mantendo os poços sob agitação por 5min. Repetir esta etapa três vezes;
- 8) Realizar leitura em microscópio de fluorescência.

As imagens obtidas através da microscopia de fluorescência foram adquiridas e editadas com o auxílio do software LAS AF 4.1 (Leica®), com objetivo de detectar diferenças na fluorescência mitocondrial entre os grupos irradiados e não irradiados. Esta análise foi realizada apenas de forma qualitativa. Foi comparada a diferença de fluorescências entre os grupos CNT, 6JT0 e 6J24h.

Quadro 2. Distribuição dos grupos, para Imunofluorescência, de acordo com o tipo de intervenção.

GRUPO	INTERVENÇÃO
Controle não marcado (CNM)	Sem irradiação e sem marcação do Mitotraker
Controle não tratado (CNT)	Sem irradiação e com marcação do Mitotraker
Irradiado tempo 0 (6J T0)	Irradiação e ensaio de Imunofluorescência sem intervalo de incubação.
Irradiado 24h (6J 24h)	Irradiação e ensaio de Imunofluorescência com intervalo de 24h de incubação.

4.4 Imunocitoquímica

Com o objetivo de analisar o mecanismo de ação da LBI sob as SCAPs, foi realizada técnica de imunocitoquímica, seguindo protocolo do Laboratório de Patologia e Imunohistoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO-UFG). Foi utilizado o marcador Ki-67 (Quadro 3); com o objetivo de verificar se há diferença na regulação da expressão desta proteína nas células irradiadas e não irradiadas.

Para realização da técnica, foram utilizadas lamínulas circulares (13mm, Glasscyto®) condicionadas em ácido clorídrico, para que houvesse ultra limpeza, e, posteriormente, esterilizadas em autoclave. As lamínulas foram posicionadas em placas de 12 poços (Falcon®, 35-3504), imersas em 200µl de SFB e incubadas por 40 minutos. Este processo resulta na decantação de proteínas presentes no soro que agem diretamente na adesão celular, desta forma, as células se concentraram em maior volume na lamínula e não no poço.

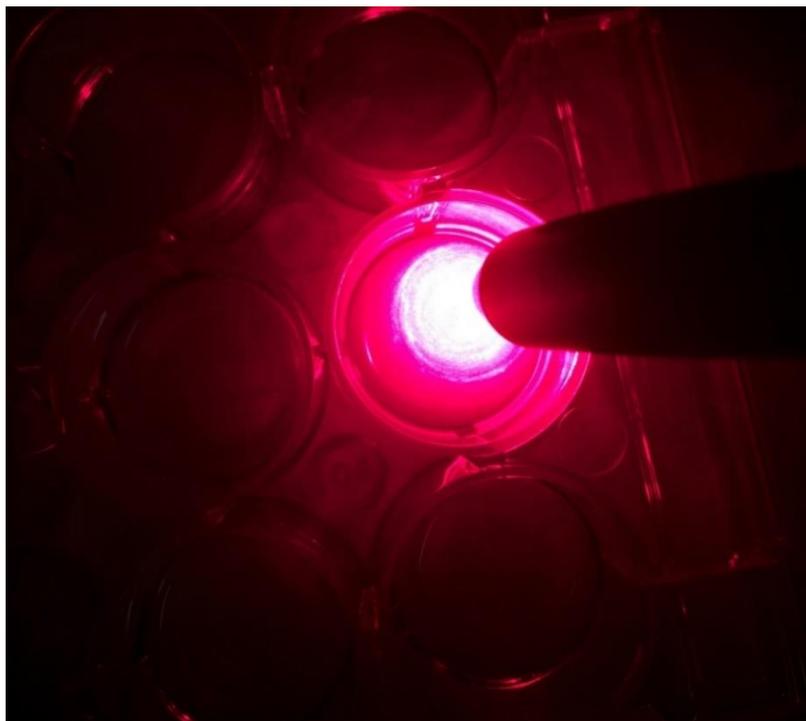


Figura 2. Irradiação das células aderidas na lamínula 24h antes da reação de imunocitoquímica.

Após incubação, retirou-se o SFB remanescente e depositou-se uma suspensão celular concentrada na densidade de 1×10^5 células/ poço. As placas foram armazenadas em estufa e incubadas por mais 24h, para completa adesão. Posteriormente, as células foram irradiadas (Figura 2) apenas na energia de 6J conforme especificações já descritas (Quadro 1) e incubadas novamente por mais 24h.

Todo o procedimento da imunocitoquímica foi realizado na própria placa com a ajuda de pipetas de pasteur, seguindo-se o seguinte protocolo:

- 1) Retirar todo o meio dos poços;
- 2) Pipetar sobre a lamínula, 200 μ l de acetona P.A refrigerada;
- 3) Envolver a placa em papel alumínio e congelar;
- 4) Após descongelamento, lavar os poços com TBS para remoção do excesso de acetona;
- 5) Pipetar H₂O₂ sobre a lamínula, incubando por 20 min;
- 6) Lavar duas vezes com TBS;
- 7) Pipetar PBS-BSA e incubar por 20 min;
- 8) Lavar duas vezes com TBS;
- 9) Pipetar o anticorpo primário, de acordo com a diluição específica (Quadro 3), e incubar por 2 horas;

- 10) Lavar cinco vezes com TBS;
- 11) Colocar uma gota anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB) sobre a lamínula e incubar por 30 min;
- 12) Lavar cinco vezes com TBS;
- 13) Colocar uma gota da solução estreptavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB) sobre a lamínula e incubar 30 min;
- 14) Colocar a solução reveladora (DAB) sobre a lamínula por 5min;
- 15) Lavar 5 vezes com TBS;
- 16) Gotejar hematoxilina e incubar por 15min;
- 17) Lavar em água ultrapura até completa remoção;
- 18) Imergir em cadeia ascendente de álcool, incubando 1 min em cada concentração (70%; 95%; 100%)
- 19) Passar rapidamente em xilol e montar em lâminas.

Quadro 3. Especificação do marcador anti Ki-67.

Anticorpo	Fabricante (Clone)	Diluição	Sistema	DAB
Ki-67	Anticorpo monoclonal de camundongo, anti-Ki-67 humano, MIB1, Dako (NCL-Ki-67-MIB1)	1:100	LSAB	5min

Após a montagem das lâminas, foi realizada a leitura em microscópio óptico. As células imunorreativas apresentam coloração acastanhada: para o ki-67 em núcleo. Utilizou-se o software AxioVision[®] 4.7.1 para fotografar três campos de cada lâmina. A quantificação foi realizada com o auxílio da ferramenta *cell counter do software Image J[®]*, sendo programado o tipo 1, para células negativas e o tipo 2, para células positivas. Por fim, para cada marcador, obtinha-se um somatório de células positivas e negativa nos três campos e calculou-se o percentual de imunoreatividade, por meio da equação.

$$\% \text{ de Imunoreatividade} = \frac{\text{número de células positivas}}{\text{número total de células}}$$

O ensaio foi repetido em linhagens isoladas de quatro pacientes distintos. Para a análise imunocitoquímica, foram separados dois grupos de células de cada paciente, um grupo CNT e

um grupo irradiado com laser vermelho (6J). Os percentuais de imunoreatividade registrados em planilha e posteriormente submetidos a análise estatística.

4.7 Análise dos Dados

A análise estatística foi empregada para os dados obtidos no ensaio da imunocitoquímica. Inicialmente foi realizada a análise descritiva com obtenção de mediana e desvio padrão de todos os grupos estudados. A normalidade de distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de *Kolmogov-Sminorv*. Apesar de a distribuição ter sido dada como normal, só foi possível a análise por meio de testes não paramétricos. Desta forma, para verificar se houve diferença estatística na imunoreatividade ao Ki-67 entre os grupos de células irradiados e não irradiados, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* e foi adotada significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 LBI e Atividade mitocondrial das SCAPs

Neste estudo, foi observado, a partir da concentração de fluorocromo nas células, um evidente aumento da atividade mitocondrial, desde o momento imediato da irradiação, sendo este aumento metabólico ainda maior após 24h de exposição ao laser, conforme pode ser observado nas imagens abaixo (Figura 3).

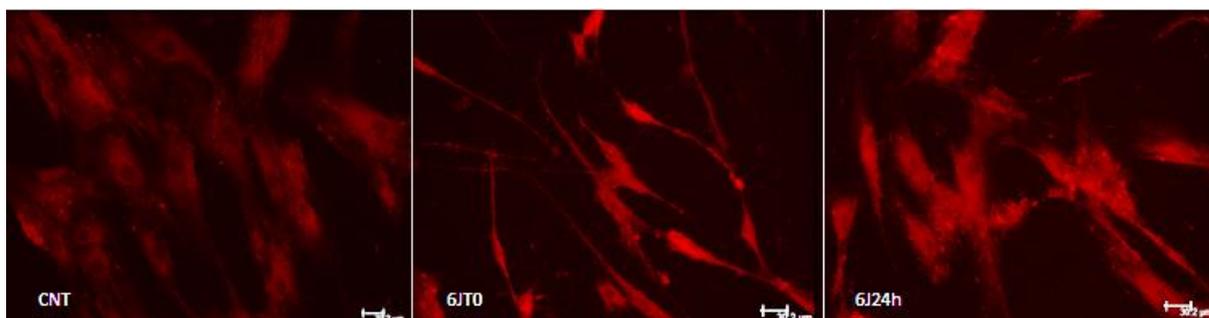


Figura 3. Atividade mitocondrial antes da irradiação, imediatamente após a irradiação e 24 após irradiação com LBI.

5.2 LBI na proliferação de SCAPs

As células irradiadas com laser vermelho de baixa intensidade apresentaram maior imunopositividade, o que pode ser observado na Figura 4, na qual as células imunorreativas apresentam coloração acastanhada para o Ki-67 em núcleo, estando o grupo A (irradiado) com uma quantidade maior de células coradas. Na Figura 5 podemos observar que os resultados das medianas dos percentuais de imunexpressão também foram superiores para este marcador nos grupos irradiados. Porém, ao analisar o valor de p (probabilidade de significância), constatou-se que não houve significância estatística quando comparadas aos grupos controle ($p=0,083$).

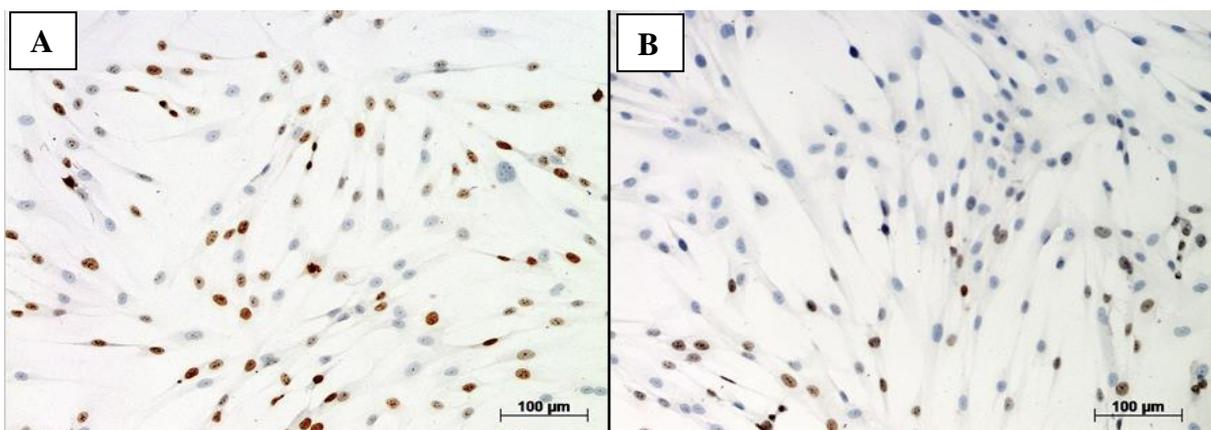


Figura 4. A, imunexpressão do Ki-67 no grupo 6J; B, imunexpressão do Ki-67 no grupo CNT.

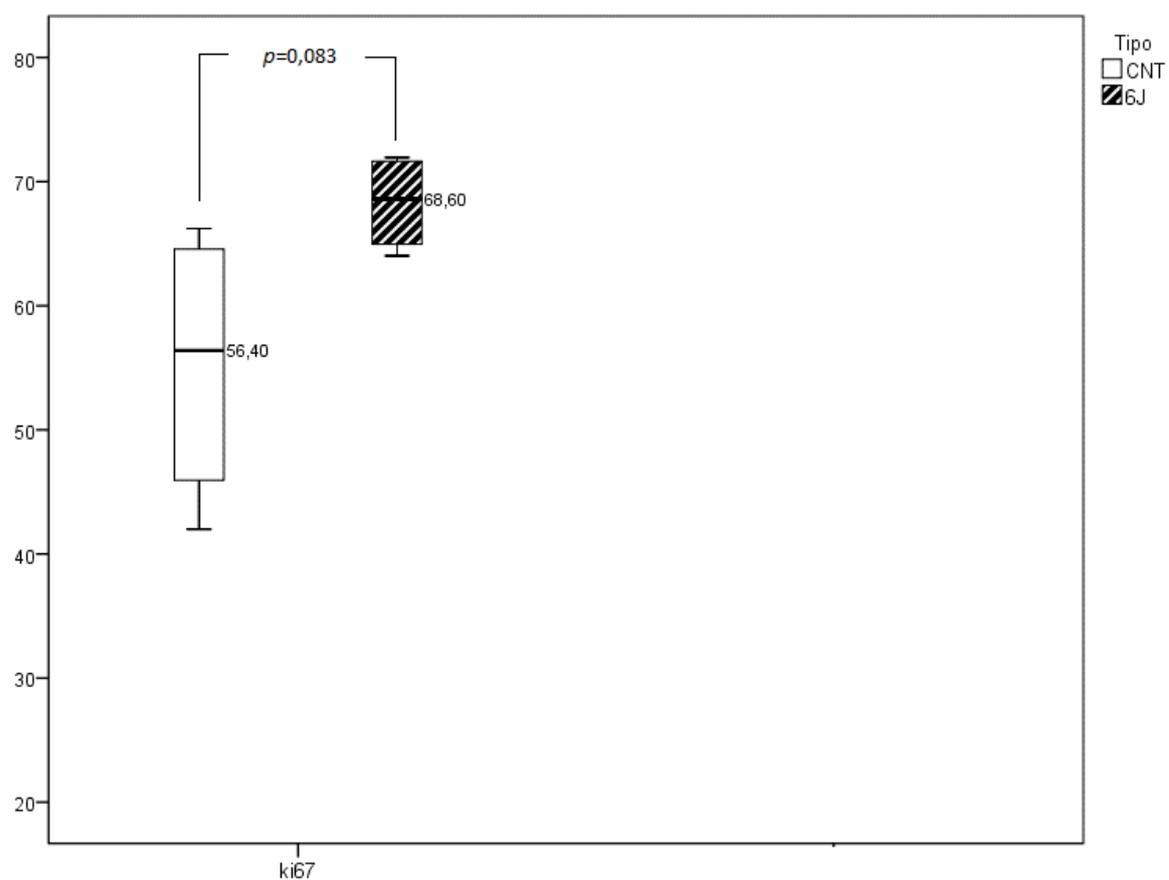


Figura 5. Distribuição dos percentuais de imunoreatividade ao Ki-67.

6 DISCUSSÃO

O aumento da produção de ATP é resultado direto do aumento metabólico mitocondrial. Esta molécula desempenha um importante papel no transporte de íons como o Ca^{2+} , além de regular os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), ambos exercem papel de mensageiros secundários em diversas funções vitais da célula, inclusive, na expressão gênica. A proliferação celular é um dos possíveis efeitos resultantes destas cascatas de reações intracelulares desencadeadas pela LBI (PASSARELLA, 1989, KARU e KOLYACOV, 2005). De maneira geral, o mecanismo de ação do laser de baixa intensidade na proliferação celular dá-se pelo acúmulo energético provocado pela luz no interior da célula (YU et al, 1997). A enzima Citocromo C Oxidase (CytC), encontrada nas mitocôndrias, representa a primeira via de absorção intracelular da luz vermelha. Este processo resulta no aumento do metabolismo mitocondrial por efeito da alteração no transporte transmembrana dos elétrons (KARU e KOLYACOV, 2005).

Karu e Kolyacov (2005) apontaram a mitocôndria como sendo a via primária da fotobiomodulação promovida pela LBI, isso foi reafirmado nos resultados expostos neste trabalho, no qual o aumento da intensidade de fluorescência foi perceptível desde o momento imediato após a aplicação do laser, isto é, a irradiação de SCAPs demonstrou influenciar positivamente a atividade metabólica mitocondrial.

Os resultados encontrados no presente estudo, a partir dos marcadores de proliferação que apresentaram um aumento da atividade mitocondrial e das medianas de imunopositividade, parecem sugerir a possibilidade de uma alteração do metabolismo celular a partir da absorção da luz vermelha, contudo, quando comparadas as SCAPs não irradiadas, essas alterações foram insuficientes para ocasionar diferenças na proliferação celular. Esses achados confirmam os resultados observados em células-tronco da polpa dental (PEREIRA; LONGO; AZEVEDO, 2012).

Por outro lado, Eduardo et al, em 2008, evidenciaram efeitos positivos da irradiação com laser de baixa intensidade na proliferação de células-tronco da polpa dental, fato que também foi observado em células isoladas do ligamento periodontal (SOARES et al, 2015, ZACCARA et al, 2015). Além disso, outras células-tronco mesenquimais isoladas de outros tecidos, como medula óssea e tecido adiposo, as quais também demonstraram aumento na taxa de proliferação com a utilização da LBI em células indiferenciadas (HOU et al, 2008, DE VILLIERS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2011, LIPOVSKY et al, 2013, GINANI et al, 2015).

Os achados, decorrentes desta pesquisa, demonstram que os grupos de SCAPs irradiadas com laser de baixa intensidade apresentaram uma tendência a um aumento nas medianas dos percentuais de imunopositividade ao marcador Ki-67, quando comparadas às não irradiadas ($p=0,08$). Recentemente, foi elucidado que a Ki-67, proteína utilizada na imunomarcação de células proliferativas, está intimamente relacionada à compartimentalização de estruturas nucleares durante a divisão celular (CUYLEN et al, 2016).

A associação do aumento das medianas de imunopositividade ao Ki-67 à maior intensidade metabólica mitocondrial pode sugerir que a irradiação com luz vermelha pode estimular a proliferação das SCAPs. Pereira; Longo e Azevedo (2012) também observaram aumento das medianas de proliferação em células tronco da polpa dentária irradiadas, no entanto, os autores também não obtiveram significância estatística quando comparadas aos grupos controle, semelhante ao encontrado neste estudo. Estes resultados podem ser justificados, pois em ambos os casos, foram utilizadas linhagens isoladas de pacientes distintos, o que pode resultar em maior variação da resposta metabólica das células frente à irradiação *in vitro*.

Vale salientar que esses achados discordam do estudo realizado por Prateptongkum; Klingelhöffer e Morscheck (2015) que, comparando duas linhagens independentes de células SCAPs de um mesmo doador com uma terceira linhagem de células de outro doador, a partir da investigação da expressão de um marcador de células tronco e da eficiência de unidades formadoras de colônias, demonstraram que as características, como taxa de proliferação e potencial de diferenciação das culturas de SCAPs independem da fonte de células, ou seja, do tecido dentário doador das SCAPS utilizadas.

7 CONCLUSÃO

A LBI foi capaz de aumentar o metabolismo mitocondrial das células-tronco isoladas da papila associado a um aumento das medianas do marcador Ki-67; o que pode indicar que a LBI estimula a proliferação das SCAPs.

REFERÊNCIAS

- ABUARQOUB, D.; AWIDI, A.; ABUHARFEIL, N. Comparison of Osteo/Odontogenic Differentiation of Human Adult Dental Pulp Stem Cells and Stem Cells from Apical Papilla in The Presence of Platelet Lysateneration. **Arch Oral Biol.**, v.60, n.10, p.1545-1553. Oct., 2015.
- BAKOPOULOU, A. et al. Comparative Analysis of In Vitro Osteo/Odontogenic Differentiation Potential of Human Dental Pulp Stem Cells (DpSCs) and Stem Cells From the Apical Papilla (Scap). **Arch Oral Biol.**, v.56, n.7, p.709-721. Jul., 2011.
- CHANG, H. H. et al. Role of Alk5/Smad2/3 and Mek1/Erk Signaling in Transforming Growth Factor Beta 1–Modulated Growth, Collagen Turnover, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla Of Human Tooth. **J Endod.**, v.41, n.8, p.1272-1280. Aug., 2015.
- CHEN, K. et al. Comparative Analysis of in Vitro Periodontal Characteristics of Stem Cells From Apical Papilla (Scap) and Periodontal Ligament Stem Cells (PdlSCs). **Arch Oral Biol.** v.58, n.8, p.997-1006. Aug., 2013.
- CUYLEN, S. et al. Ki-67 Acts as a Biological Surfactant to Disperse Mitotic Chromosomes. **Nature**, n.535, p.308–312. 2016.
- COSTA, R.O. et al. Os Benefícios do Laser de Baixa intensidade na Oncologia. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.11, n.37, jul/set., 2013.
- DE VILLIERS, J. A.; HOURELD N. N.; ABRAHAMSE, H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. **Stem Cell Rev**, n.7, p.869-882. 2011.
- EDUARDO, F. P. et al. Stem Cell Proliferation Under Low- Intensity Laser Irradiation: a Preliminary Study. **Lasers Surg Med**, n.40, p.433-438. 2008.
- EGUSA, H. et al. Stem Cells in Dentistry – Part I: Stem Cell Sources. **J Prosthodont Res.** v.56, n.3, p.151-165. Jul., 2012.
- HOU, J. F. et al. In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation for Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Growth Factors Secretion and Myogenic Differentiation. **Lasers. Surg. Med.** n.40, p.726–733. 2008.
- GINANI, F. et al. Effect of Low-Level Laser Therapy on Mesenchymal Stem Cell Proliferation: A Systematic Review. **Lasers Med Sci.** v.30, n.8, p.2189-2194. Nov., 2015.
- IBARRETXE, G. et al. Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues: New Hope for Dental and Neural Regeneration. **Stem Cells Int.** v.2012, p.1-12. Oct., 2012.
- KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomed Laser Surg.**, v.23, n.4, p.355–361. 2005.

KUSHIBIKI, T., OKAWA, T. H. S., ISHIHARA, M. Low Reactive Level Laser Therapy for Mesenchymal Stromal Cells Therapies. **Stem Cells International**. v. 2015, p.1-12. 2015.

LIPOVSKY, A. et al. Low-level Visible Light (LLVL) Irradiation Promotes Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. **Lasers Med Sci**, n.28, p.1113-1117. 2013.

MVULA, B., ABRAHAMSE, H. Differentiation Potential of Adipose-Derived Stem Cells when Cocultured with Smooth Muscle Cells, and the Role of Low-Intensity Laser Irradiation. **Photomed Laser Surg**. Nov., 2015.

PASSARELLA, S. He-Ne Laser Irradiation of Isolated Mitochondria. **J Photochem Photobiol**, v.3, n.4, p.642-643. 1989.

PEREIRA, L. O., LONGO, J.P.F., AZEVEDO, R. B. Laser Irradiation did not Increase the Proliferation or the Differentiation of Stem Cells from Normal and Inflamed Dental Pulp. **Arch Oral Biol**. v.57, n.8, p.1079-1085. Aug., 2012.

PRATEEPTONGKUM, E., KLINGELHÖFFER, C., MORSCZECK, C. The Influence of the Donor on Dental Apical Papilla Stem Cell Properties. **Tissue and Cell**. v.47, p.382–388. 2015.

RIBEIRO MS, ZEDEL DM. Laser em Baixa Intensidade. **A Odontologia e o laser**, ed Quintessence. p.217. 2004.

RUPAREL, N. B. et al. Characterization of a Stem Cell of Apical Papilla Cell Line: Effect of Passage on Cellular Phenotype. **J Endod**. v.39, n.3, p.357-363. Mar., 2013.

SOARES, D. M. et al. Effects of Laser Therapy on the Proliferation of Human Periodontal Ligament Stem Cells. **Lasers Med Sci**. v.30, n.3, p.1171-1174. Apr, 2015.

WU, J. et al. Conditioned Medium from Periapical Follicle Cells Induces the Odontogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla in Vitro. **J Endod**. v.39, n.8, p.1015-1022. Aug. 2013.

XIAO, L., NASU, M. From Regenerative Dentistry to Regenerative Medicine: Progress, Challenges, and Potential Applications of Oral Stem Cells. **Stem Cells Cloning**. v.7, p.89–99. 2014.

YU, W. et al. Photomodulation of Oxidative Metabolism and Electron Chain Enzymes in Rat Liver Mitochondria. **Photochem Photobiol**, v.66, n.6, p.866-871. 1997.

ZACCARA, I. M. et al. Effect of Low Level Laser Irradiation on Proliferation and Viability of Human Dental Pulp Stem Cell. **Lasers Med Sci**. v.30, n.9, p.2259-2264. Dec., 2015.