

MYLENE MARTINS MONTEIRO

Avaliação da fotobiomodulação no reparo em modelo *in vitro* de mucosite oral

BRASÍLIA, 2023

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MYLENE MARTINS MONTEIRO

Avaliação da fotobiomodulação no reparo em modelo *in vitro* de mucosite oral

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliete Neves da Silva Guerra

BRASÍLIA, 2023

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, deixo meu agradecimento à Deus, por tudo o que Ele colocou em meu caminho e por me permitir alcançar essa tão sonhada vitória, com uma jornada de muito esforço, foco e fé.

Aos meus pais, Suzana e Eduardo, por estarem sempre ao meu lado e por me ensinarem tanto. Meu agradecimento por estarem sempre presentes na minha vida e me apoiarem em todos os meus sonhos. Por me permitirem me dedicar aos estudos e por compreenderem todas as ausências durante esse período. Sem o apoio de vocês eu não conseguiria conquistar tudo o que conquistei.

Ao meu irmão, Danilo, por todo apoio e companheirismo, por não medir esforços em me ajudar em todos os momentos que precisei. Ele que sempre me acompanhou em todos os momentos da vida, obrigada por compartilhar mais essa conquista comigo.

Ao Rafael, meu companheiro de vida. Foi muito especial ter você comigo durante essa jornada. Obrigada por acreditar em mim e incentivar os meus sonhos, por me apoiar nos momentos de aflição e comemorar cada mínima conquista. Mas principalmente, obrigada por ser tão companheiro e estar ao meu lado sempre que precisei realizar experimentos em finais de semana, feriados e madrugada.

À minha família, minhas avós, Anna e Maria, minha madrinha Cláudia e tio Paulo, por sempre estarem comigo, me ajudando e me incentivando. Obrigada por entenderem todos os momentos que não pude estar com vocês e por celebrarem cada conquista comigo. E aos meus avôs, Eduardo e Laerte, que não estão mais entre nós, mas sempre acreditaram em mim e me incentivaram a realizar os meus sonhos.

À minha orientadora, Profa Eliete Neves Silva Guerra, que me acolheu e me ensinou o papel da mulher cientista. Obrigada por estar sempre presente e me incentivar a fazer sempre o meu melhor. Você é uma inspiração para todas nós. Obrigada por me possibilitar realizar esse sonho.

Agradeço minhas amigas Juliana e Vitória, por dividirem todos os momentos dessa jornada comigo. Por todo apoio nos momentos de angústia e por toda alegria compartilhada. A amizade de vocês significa muito para mim. Vocês fizeram os momentos no laboratório serem especiais.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Histopatologia Bucal pelo convívio, pelas ricas discussões, pela amizade e por todo apoio ao longo da minha jornada. Em especial Lídia, Victor, Larissa, Bruna, Isabella e Quele.

Agradeço também ao FarMol por todo suporte técnico, por me possibilitar fazer a RT-qPCR e conhecer pessoas sempre tão solícitas.

Aos físicos do HUB, em especial Ricardo, Samuel, Leonardo e Felipe, por sempre tornarem possível minha visita à radioterapia e me auxiliarem no planejamento e na irradiação das minhas placas de células.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por dar suporte e auxiliar na minha formação, ao CAPES, pela bolsa de mestrado concedida, que me possibilitou dedicação exclusiva à pesquisa.

RESUMO

A mucosite oral (MO) é a reação adversa mais comum da terapia radioinduzida na região de cabeça e pescoço. A Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e a Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) recomendam a terapia de fotobiomodulação tanto de forma preventiva, quanto no tratamento de todos os pacientes submetidos a radioterapia em região de cabeça e pescoço, associada ou não à quimioterapia. A fotobiomodulação provou reduzir a inflamação e a dor e, aumentar o reparo tecidual. Apesar de recomendado, os efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação ainda são pouco descritos. Diante disso, para melhor compreender a atuação do laser na MO, o presente trabalho foi proposto para avaliar o efeito da fotobiomodulação com os diferentes parâmetros do laser de baixa potência na migração, proliferação e expressão gênica. Para tanto, utilizou-se um modelo *in vitro* de mucosite oral, tratado com três estímulos: radiação ionizante, lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e extrato de *Porphyromonas gingivalis* (Pg). O trabalho foi dividido em 2 estudos, apresentados na forma de manuscritos. O primeiro teve como objetivo definir, por meio do ensaio de citotoxicidade (MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), a potência do laser que melhor atuou na viabilidade celular de fibroblastos, no modelo *in vitro* de mucosite oral. A fotobiomodulação foi realizada em quatro sessões de 6 horas de intervalo, com 660 nm de comprimento de onda. Após 24h da última sessão de fotobiomodulação, os grupos tratados com 30 mW mantiveram a viabilidade celular, quando selecionadas as densidades de energia de 2, 4 e 5 J/cm². Nos grupos tratados com 40 mW, a viabilidade celular foi reduzida nas densidades de energia de 2, 3 e 5 J/cm², com diferença estatisticamente significante para 5 J/cm² ($p<0.001$). Com base nesses resultados, o segundo trabalho utilizou a potência de 30mW, alterando as densidades de energia, para avaliar o tempo de fechamento de ferida, morfologia celular e expressão de α-SMA por imunofluorescência, e expressão gênica por meio de RT q-PCR. As análises foram realizadas 24h após a aplicação dos estímulos. Os fibroblastos tratados com as densidades de energia de 3 e 4 J/cm², e os queratinócitos tratados com 5 J/cm², mostraram melhores respostas na migração e proliferação celular ($p<0.05$). A maior expressão de α-SMA em fibroblastos foi observada com 3 J/cm². Os grupos de 3 e 5 J/cm² apresentaram um aumento estatisticamente

significante na expressão de *AKT* e *MTOR*, e o de 5 J/cm² na expressão de *PTEN* nos queratinócitos ($p<0.01$). Nos fibroblastos, a expressão de *PTEN* aumentou com 4 J/cm² ($p<0.0001$). Na análise das citocinas inflamatórias, os fibroblastos não apresentaram diferença significativa, enquanto nos queratinócitos, foi observado aumento na expressão de *TNF-α*, *IL-1β*, e *NF-κB* nos grupos 3 e 5 J/cm² ($p<0.001$). Concluindo, o estudo mostrou que a fotobiomodulação, utilizando 660 nm de comprimento de onda e 30 mW de potência, foi efetiva para estimular a migração e a proliferação celular, acelerando o reparo tecidual em modelo *in vitro* de mucosite oral radioinduzida. Como observado, diferentes densidades de energia apresentam diferentes respostas, assim, entender o efeito de cada parâmetro do laser é fundamental para melhores estratégias de tratamento. A fotobiomodulação é considerada uma terapia promissora pela capacidade de modular vias envolvidas no reparo, como a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR.

Palavras-chave: Mucosite oral; Modelo *in vitro*; Citocinas pró-inflamatórias; Laser de baixa potência; Fotobiomodulação.

ABSTRACT

Oral mucositis (OM) considered the main adverse effect of radio-induced treatment in head and neck cancer. The Multinational Association for Supportive care in Cancer/International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO) guidelines recommend photobiomodulation therapy in the mucositis prevention and treatment of patients undergoing head and neck radiotherapy, associated or not with chemotherapy. Photobiomodulation therapy (PBMT) has proven to increase wound healing and reduce inflammation and pain. However, despite recommended, the effects of photobiomodulation therapy in cellular level is still being described. All things considered, to better understand the effects of low-level laser in prevention and treatment of oral mucositis, the aim of this study was to analyze the effects of different parameters of PBMT on migration, proliferation and gene expression using an in vitro oral mucositis model treated with three stimuli: ionizing radiation, lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* and total extract of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* (Pg). This work was divided in 2 studies, presented in manuscript format. The first one aimed to analyzed cell viability effects by cytotoxicity assay (MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), of different laser power in a cultured cell line of human gingival fibroblasts, after oral mucositis model stimuli. Photobiomodulation therapy was delivered in four sessions with 6h interval. It was shown that regarding wavelength of 660 nm, after 24 h from the last laser irradiation session, the groups outputted in 30 mW of power maintained the cell viability while operating with 2, 4, and 5 J/cm². The groups treated with a higher power (40 mW), cell viability was reduced using 2, 3, and 5 J/cm² doses, with statistical significance for 5 J/cm² ($p < 0.001$). Delivering 2, 4, and 5 J/cm² of density of energy with 30 mW and more time of exposure presented better results on cell viability compared to the same density of energy with output power of 40 mW. The second study analyzed the power of 30mW with different energy densities in wound closure by scratch assay, morphology and α -SMA expression by immunofluorescence and, gene expression by RT-qPCR. Assays were performed 24h after oral mucositis stimuli. Fibroblasts treated with densities of energy of 3 and 4 J/cm², and keratinocytes with 5 J/cm² showed better response in proliferation and migration ($p < 0.05$). The greater expression of α -SMA was observed when 3 J/cm² were selected. Densities of 3 and 5 J/cm² have presented a

significant increase in the expression of *AKT* e *MTOR*, and 5 J/cm² of *PTEN* in keratinocytes ($p<0.01$). In fibroblasts, the expression tended to enhance when com 4 J/cm² was applied ($p<0.0001$). For the inflammatory cytokines, fibroblasts did not present differences in inflammatory cytokine expression, while in keratinocytes, groups 3 and 5 J/cm² showed significantly higher expression of *TNF-α*, *IL1β*, and *NFkB* ($p<0.001$). In conclusion, the present study showed that delivering 660 nm, 30 mW were effective stimulating cell migration, proliferation and accelerating wound healing. It is considered a promising therapy since PBMT can modulate pathways involving in wound repair. However, different energy densities presented distinct responses, understanding the effect of each laser parameter is fundamental to improve treatment strategies.

Key words: Oral mucositis; *In vitro* model; Proinflammatory cytokines; Low level laser; Photobiomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da dissertação:

- **Figura 1:** Ilustração da fisiopatologia da mucosite. O processo é dividido em cinco fases sobrepostas: iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e reparo. Imagem feita com BioRender online.
- **Figura 2:** Ilustração das fases do reparo tecidual, retirado de Trinh et al., 2022

Figuras do manuscrito 1:

- **Figure 1:** Cell viability after application of different photobiomodulation doses powered at 30 and 40 mW compared to a model of ionizing radiation and bacterial-induced stress. LPS lipopolysaccharide of Escherichia coli; Pg protein extract of Porphyromonas gingivalis; IR ionizing radiation. Analytical statistics: One-way ANOVA for parametric data followed by Dunnett's post-test (* $p < 0.05$; *** < 0.001)
- **Figure 2:** Comparison of same energies density powered at 30 and 40 mW. Analytical statistics: One-way ANOVA for parametric data followed by Tukey's post-test (** < 0.001)

Figuras do manuscrito 2:

- **Figure 1:** Wound closure in vitro model after PBMT with output power of 30 mW and different energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes. The graphs show the wound area expressed in percentage and compared with the follow up time (0, 12, 24, 36, 48, and 60h).
- **Figure 2:** Wound closure in vitro model after PBMT with output power of 30 mW and different energy densities. (A) Human gingival fibroblasts in 12, 24, and 36h follow up. (B) Microscopic images of fibroblasts obtained from the scratch assay. (C) Immortalized human keratinocytes in 12, 24, and 36h follow up. (D) Microscopic images of keratinocytes obtained from the scratch assay. The graphs show the wound area expressed in percentage and compared with PBMT groups (2 J/cm²; 3 J/cm² 4 J/cm², and 5 J/cm²) and control group (0 J/cm²), in hours 12, 24, and 36.
- **Figure 3:** Comparison of wound closure in vitro model after PBMT with output power of 30 mW and different energy densities in fibroblasts (blue) and keratinocytes

(green) in 12, 24, and 36h follow up. The graphs show the wound area expressed in percentage and compared with PBMT groups (2 J/cm²; 3 J/cm²; 4 J/cm², and 5 J/cm²) and control group (0 J/cm²), in hours 12, 24, and 36.

- **Figure 4:** Fibroblasts Immunofluorescence. (A) Effects of PBMT on expression of α-SMA and (B) Nucleus area after PBMT with output power of 30 mW laser energy density of 3 J/cm² and 5 J/cm². Cells were stained with mouse anti-Vimentin (1/200, Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-Smooth Muscle Actin (1/200, α-SMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and the nuclei with diamidino-phenyl-indole (1/1000 DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Abbreviations: α-SMA: Alpha-smooth muscle actin.
- **Figure 5:** Pro-inflammatory cytokines relative expression profile with output power of 30 mW and different laser energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes Abbreviations: *IL-1β*: interleukin-1β; *IL-6*: interleukin-6; *NFκB*: Factor nuclear kappa B; *TNF-α*: tumor necrosis factor α.
- **Figure 6:** Comparison of fibroblasts (blue) and keratinocytes (green) in (A) *PI3K/AKT/mTOR* pathway genes and (B) inflammatory cytokines relative expression profile with output power of 30 mW laser energy density of 0, 2, 3, 4, and 5 J/cm². Abbreviations: *PIK3CA*: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; *AKT*: protein kinase-B; *mTOR*: mammalian target of the rapamycin; *PTEN*: phosphatase and tensin homolog; *IL-1β*: Interleukin-1beta; *IL-6*: Interleukin 6; *NF-κB*: nuclear factor kappa B; *TNF-α*: Tumor necrosis factor alpha.
- **Figure 7:** Gene relative expression profile with output power of 30 mW and different laser energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes Abbreviations: *PIK3CA*: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; *AKT*: protein kinase-B; *mTOR*: mammalian target of the rapamycin; *PTEN*: phosphatase and tensin homolog.

LISTA DE TABELAS

Tabelas do manuscrito 1:

- **Table 1:** Laser parameters used for photobiomodulation therapy.

Tabelas do manuscrito 2:

- **Table 1:** Laser parameters used for photobiomodulation therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-SMA = Actina alfa de músculo liso

AKT = Proteína kinase B

AP1 = Proteína ativadora 1

ATP = Adenosina trifosfato

Cco = Citocromo c oxidase

cDNA = DNA complementar

DAPI = *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO = Dimethyl sulfoxide

DNA = Ácido desoxirribonucleico

FG = Fibroblastos gengivais primários

Gy = Gray

h = horas

HaCaT = Queratinócitos humanos imortalizados

H₂O = Água

IL = Interleucina

IL-1β = Interleucina-1beta

IL-6 = Interleucina 6

IQR = Intervalo interquartil

J/cm² = Joule por centímetro ao quadrado

Laser = Luz amplificada por emissão de radiação estimulada (*light amplification by stimulated emission radiation*)

LPS = Lipopolissacarídeo

MAPK = Proteína-quinase ativada por mitógenos

MASCC/ISOO = Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer/
Sociedade Internacional de Oncologia Oral

MMP = Metaloproteinases

MO = Mucosite oral

mTOR = Alvo da rapamicina em mamíferos

MTT: (3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

NF-κB = Factor nuclear kappa B

NO = Óxido nítrico

NO₂ = Dióxido de nitrogênio

O₂ = Oxigênio

PBMT = Terapia de Fotobiomodulação

PBS = Solução salina tamponada com fosfato

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

PI3K = Fosfoinositídeo 3-quinase

PIK3CA = phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

PTEN = Homólogo da fosfatase tensina

RI = Radiação ionizante

RNA = Ácido ribonucleico

ROS = Espécies reativas de oxigênio

RT-qPCR = Reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa

SD = Standard deviation

TGF-β = Fator de crescimento transformante Beta

TNF-α = Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	A MUCOSITE ORAL	17
2.2	O REPARO TECIDUAL	20
2.3	TERAPIAS ASSOCIADAS À MUCOSITE ORAL	22
2.4	EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO	24
3.	PROBLEMAS E HIPÓTESES.....	26
4.	ARTIGO	27
4.1	MANUSCRITO 1	27
	<i>Effects of different photobiomodulation therapy doses on cell viability after bacterial and ionizing radiation-induced stress: a pilot in vitro study.....</i>	27
4.2	MANUSCRITO 2.....	41
	<i>Effects of different photobiomodulation therapy doses on wound repair.....</i>	41
	<i>after ionizing radiation and bacterial-induced stress: in vitro study.....</i>	41
5.	CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	68
6.	CONCLUSÕES	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	ANEXOS.....	83
	ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA, CAAE N° 52278221.6.0000.0030	83
	APÊNDICES.....	97
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	97

1. INTRODUÇÃO

A mucosite oral (MO) é uma complicação que acomete cerca de 95% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia e quimioterapia (Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019; Pulito et al. 2020). Ela surge em forma de lesões na mucosa não queratinizada da cavidade oral e orofaringe, com características eritematosas que podem progredir para a formação de úlceras e de pseudomembranas (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015). Apresentam ainda sintomatologia dolorosa, podendo levar à interrupção da dieta por via oral, além do aumento na necessidade de acompanhamento médico (Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019; Elad et al. 2022).

Diversas terapias se mostraram ineficazes devido ao pouco conhecimento acerca da patobiologia da MO (Hong et al., 2019; Peterson, Srivastava and Lalla, 2015). Sabe-se que terapias antineoplásicas tem seus efeitos citotóxicos guiados por diferentes mecanismos que envolvem o comprometimento da replicação do DNA e do ciclo celular, danos ao DNA e morte da célula. No entanto, os eventos celulares específicos ainda são pouco caracterizados (Dasari and Tchounwou, 2014).

Evidências sugerem ainda uma interação entre o microbioma da região gastrointestinal e a MO, sendo a suscetibilidade ao desenvolvimento da mucosite oral modulada por micro-organismos comensais residentes da mucosa (Pedroso et al., 2015). Com isso, uma disbiose, resultante do tratamento antineoplásico, possui o potencial de modificar as respostas celulares associadas à severidade das lesões de MO, por promover um maior prejuízo ao tecido (Hong et al., 2019).

Tendo em vista o grau de acometimento desse paciente, faz-se necessário identificar estratégias de tratamento e prevenção da MO, de forma seletiva e eficaz. Para um melhor conhecimento do processo de evolução e reparo da doença, novas estratégias de estudo devem ser propostas. O entendimento da mucosite e seus estágios devem ser explorados em diferentes áreas de pesquisa, partindo da pesquisa básica, com estudo a nível molecular e celular dos efeitos das terapias propostas como alternativas ao tratamento da MO.

O estudo *in vitro* tem o potencial de contribuir na investigação individualizada dos mecanismos envolvidos no reparo tecidual, como forma de acelerar o processo.

Além disso, é possível identificar diferentes alvos terapêuticos envolvidos no reparo, e selecionar a terapia com o potencial esperado (Brown and Gupta, 2020; Lalla et al. 2019; Tra et al., 2013; Lambros et al., 2015).

Atualmente, algumas terapias estão sendo testadas e aplicadas no tratamento da MO. A fotobiomodulação, com o uso do laser de baixa potência, tem despertado muito interesse da comunidade científica, principalmente pelos seus efeitos analgésico, anti-inflamatório e no processo de reparo tecidual. Com isso, a sugestão de se desenvolver estudos que busquem explicar o impacto celular da aplicação do laser, entendendo as modulações das vias de sinalização, é evidentemente aceita e difundida.

O laser de baixa potência pode ser ajustado em diferentes parâmetros, como comprimento de onda, densidade de energia e potência (de Castro et al., 2005), e a alteração deles desencadeia diferentes respostas celulares. Por isso, é importante identificar e selecionar parâmetros com maior compatibilidade com as células-alvo da terapia, para que se obtenha o melhor desempenho da fotobiomodulação (Marques et al. 2016, AlGhamdi et al. 2021).

Na literatura, não existe consenso e padronização em relação aos protocolos de uso do laser de baixa potência, considerando os parâmetros de emissão de energia dos diferentes aparelhos. Nesse contexto, comparar diferentes parâmetros e protocolos, individualizando as respostas e reconhecendo moléculas-alvo, pode ser uma forma de padronizar e replicar os tratamentos realizados com o laser de baixa potência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A MUCOSITE ORAL

A mucosite oral (MO), inicialmente identificada como uma estomatite, é a reação adversa mais comum da terapia radio-induzida na região de cabeça e pescoço (Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019; Pulito et al. 2020). Observa-se essa complicaçāo em 95% dos pacientes com câncer oral ou de orofaringe, passando por tratamento antineoplásico com radioterapia, quimioterapia, ou a associação de ambos (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015). A MO é caracterizada por lesões que, em sua fase inicial, apresentam características eritematosas, progredindo para úlceras na região da mucosa oral e da orofaringe, com a formação de pseudomembranas (Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019; Elad et al. 2022).

O acúmulo da dose de radiação é o principal responsável pelo desenvolvimento clínico da MO, que, associada aos quimioterápicos, pode potencializar a progressão da lesão. Os pacientes que apresentam MO em estágios mais avançados, não costumam tolerar dieta por via oral e necessitam de assistência médica durante o tratamento do câncer. Além disso, estágios avançados da mucosite oral também são responsáveis por reduzir a adesão dos pacientes às terapias antineoplásicas ideais, levando a interrupção do tratamento oncológico e aumentando o risco de infecções oportunistas. (Elad et al. 2022; Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019).

Além da dor, as complicações da MO podem causar disfagia, alteração de paladar, perda de peso e infecções secundárias. Essas complicações, além de comprometerem o tratamento, ainda reduzem de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes (Elad et al. 2022; Sonis, 2011; Daugelaite et al. 2019).

A radioterapia é dosada em sessões diárias, dessa forma, o tempo total do tratamento será guiado pela quantidade da dose final que deverá ser entregue. Na cavidade oral, é possível notar, a partir da conclusão da primeira semana de tratamento, os primeiros sinais e sintomas da MO. A mucosa se apresenta eritematosa e o paciente relata sensação de queimação. Já ao final da segunda semana, observa-se a formação de úlceras e o aumento do desconforto oral. Nessa fase, costuma ser necessário aumentar as doses de analgésicos. A partir da terceira semana, com a dose de radiação acumulada, as úlceras se espalham pela cavidade oral, se tornando

mais confluentes. É possível identificar essas lesões na região da mucosa jugal, lábios, ventre e lateral da língua, palato mole e assoalho oral (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Elad et al. 2022).

As lesões normalmente persistem por 2 a 4 semanas após o final do tratamento com radioterapia. Comumente, em casos de maior gravidade, acontecem atrasos no tratamento antineoplásico, com redução nas doses de quimioterápicos ou pausas na radioterapia (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Pulito et al. 2020; Elad et al. 2022)

A MO tem sua progressão dividida em 5 fases, sendo elas a iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e reparo (**Figura 1**).

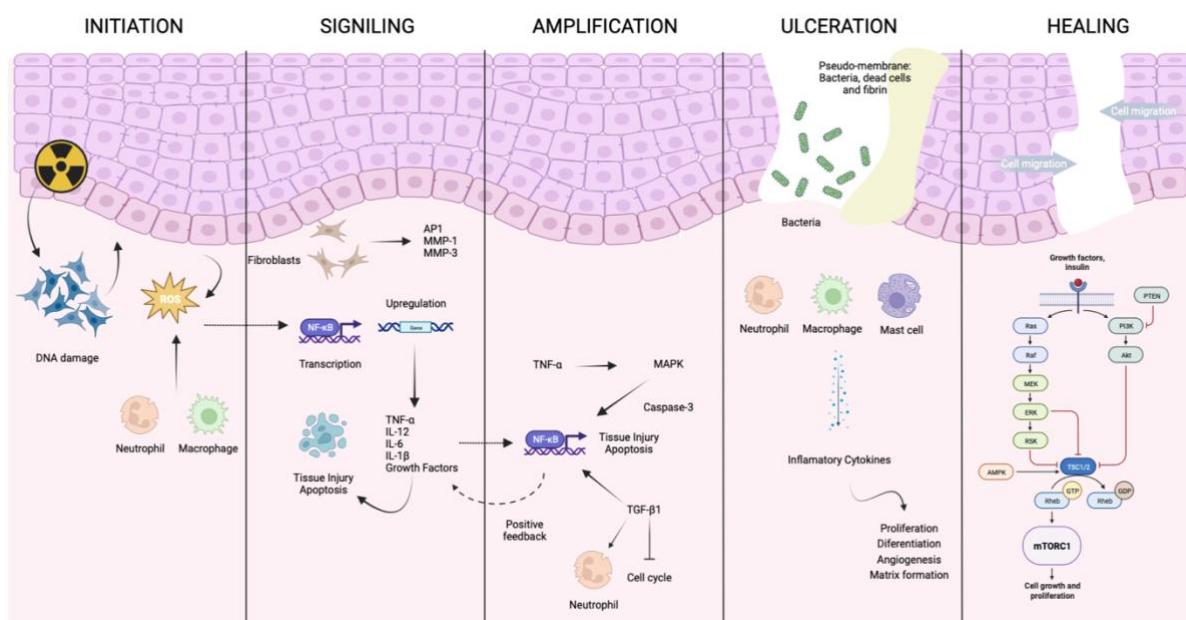


Figura 1. Ilustração da fisiopatologia da mucosite. O processo é dividido em cinco fases sobrepostas: iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e reparo. Imagem feita com BioRender online.

Na fase de iniciação, os tratamentos antineoplásicos de quimioterapia e/ou radioterapia induzem uma lesão tecidual. Essa lesão do tecido promove lesão no ácido desoxirribonucleico (DNA), levando à morte da camada basal de células epiteliais e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A quebra das moléculas de DNA ativa a via de apoptose regulada pelo p53 e estimula o aumento da caspase 3. As células mortas liberam padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são moléculas reconhecidas pela imunidade inata (Sonis, 2004).

Na fase da sinalização, as ROS vão ativar a transcrição do fator nuclear kappa B (NF-κB), responsável pela expressão de mais de 200 genes. Esses estão associados à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-12, IL-6, IL-1β), fatores de crescimento endotelial e ciclooxygenases, gerando uma lesão na fibrina do tecido conjuntivo, o que resulta em alterações ao tecido e apoptose da camada basal do epitélio. O tratamento antineoplásico também altera os fibroblastos, que por sua vez, levam à expressão da proteína ativadora 1 (AP1) e secreção de metaloproteinases (MMP-1 e MMP-3) que degradam a matriz de colágeno e desagregam a membrana basal epitelial (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Pulito et al. 2020; Brown and Gupta, 2020; Lalla et al. 2019).

Na fase de amplificação, ocorre um aumento do sinal por meio de um ciclo de feedback positivo. Citocinas ativam mais NF-κB, e NF-κB ativam mais citocinas, com consequente agressão tecidual e morte celular. O fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) liberado, inicia a ativação de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), sustentando a atividade de NF-κB. A MAPK ativa a caspase 3 e induz morte celular. O TNF-α aumenta o sinal pró-apoptótico e modula a atividade de MMP-1 e MMP-3. Os queratinócitos alterados liberam TGF- β1, responsável por inibir o ciclo celular, recrutar leucócitos e manter a atividade de NF-κB. (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Pulito et al. 2020)

A fase da ulceração é caracterizada por um infiltrado de macrófago, neutrófilos e mastócitos, além da colonização de bactérias gram-positivas e gram-negativas. A ruptura da mucosa permite a invasão e colonização de microorganismos, levando à infiltração de células envolvidas no processo inflamatório. Isso promove a liberação de citocinas inflamatórias e mediadores de apoptose, aumentando a lesão tecidual (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Pulito et al. 2020; Brown and Gupta, 2020; Lalla et al. 2019).

O processo de reparo é ativado com a sinalização pelas proteínas da matriz extracelular, que promove a migração das células das margens da lesão. Além disso, a matriz extracelular promove a proliferação e diferenciação do epitélio. Normalmente a reepiteliação se completa dentro das 4 semanas que sucedem a conclusão da radioterapia (Sonis, 2011; Villa and Sonis, 2015; Pulito et al. 2020; Brown and Gupta, 2020; Lalla et al. 2019).

2.2 O REPARO TECIDUAL

O processo envolvido no reparo tecidual é uma resposta celular e molecular do organismo, a uma lesão que promove quebra na barreira da epiderme, levando as células próximas a ativarem vias de reparo, recrutando outras células com o objetivo de devolver a integridade do tecido (Cialdai et al., 2022; Piipponen et al., 2020).

O reparo tecidual ocorre em quatro fases: homeostase, inflamação, proliferação e remodelação (**Figura 2**). O objetivo da primeira fase é cessar a perda de sangue, resultando em vasoconstrição local e formação de coágulos, auxiliando na migração celular. As células secretam ainda citocinas e fatores de crescimento, e recrutam outras células para agregar a área da lesão.

Iniciando a fase inflamatória, macrófagos presentes no local secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α e interleucina 6 (IL6) e as moléculas atraem fibroblastos e células do sistema imune. Essa fase pode durar até 7 dias, proporcionando uma grande migração e proliferação celular. A fase de proliferação é caracterizada pela mitose e migração celular, resultando na formação de um tecido conjuntivo fibroso. Ocorre pela produção de colágeno, angiogênese, formação de tecido de granulação e reepitelização, podendo durar de 2 a 4 semanas, sendo essencial a função dos miofibroblastos nesse processo (Mokoena et al., 2018).

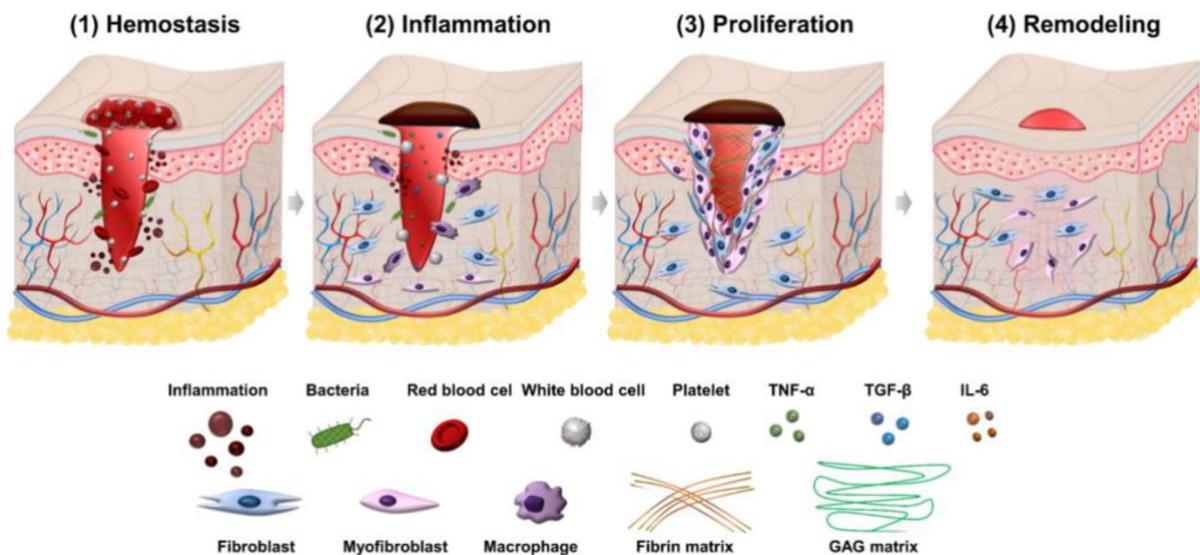


Figura 2. Ilustração das fases do reparo tecidual, retirado de Trinh et al., 2022

No reparo por segunda intenção, a formação de tecido de granulação é de extrema importância, assim como a contração da ferida. O processo de contração de ferida se caracteriza pela diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (Keshri et al., 2016). As células resultantes são de fenótipo híbrido, com características de fibroblastos e de células do músculo liso. Sua função no reparo é estabelecida pela produção de matriz extracelular e pelo aumento na contração do tecido e formação de fibrose (Keshri et al., 2016; Mokoena et al., 2020). A expressão de actina alfa de músculo liso (α -SMA) no citoplasma das células, sugere a presença de miofibroblastos e pode ser avaliada por imunofluorescência (Mokoena et al., 2020).

Durante o processo de reparo, uma rede de vias de sinalização é ativada em resposta à lesão tecidual, com o objetivo de regular as funções celulares. A via PI3K-PTEN-AKT-mTOR tem sido alvo de diferentes estudos e terapias, tendo em vista sua atuação em processos envolvidos no reparo, como metabolismo das células, proliferação e migração celular, sobrevivência, transcrição e síntese de proteínas (Simoncini et al., 2000; Castilho et al., 2013 Pellicoli et al., 2014; Squarize et al., 2010).

A ativação dessa via é caracterizada por um aumento na expressão de serina/treonina quinase B (AKT), também conhecida como proteína quinase B ou PKB. A AKT faz parte da via e, quando ativada, controla diversas funções celulares,

principalmente as que envolvem crescimento e metabolismo celular (Alessi et al., 1996; Castilho et al., 2013). Pankow et al., encontraram uma super expressão de AKT, durante o reparo tecidual, em células que estavam próximas às margens da ferida, sugerindo uma maior ativação de migração e proliferação na região. Além disso, a via PI3K-PTEN-AKT-mTOR interage com outras vias que participam da fase inflamatória do reparo, como a via NF-κB, ativada por meio de AKT (Pankow et al., 2006). A modulação dessas vias influencia diretamente a resposta celular no controle da homeostasia e reparo do tecido (Castilho et al., 2013; Squarize et al., 2010).

Outra proteína quinase serina/treonina relacionada à PI3K é o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), responsável por controlar o crescimento, proliferação e migração celular. (Zhou, Luo and Huang, 2010). O mTOR controla a síntese de proteínas que, posteriormente, influenciarão na diferenciação e sobrevivência das células. Quando ativados, AKT e mTOR atuam de maneira significativa na angiogênese e síntese de colágeno (Jere et al., 2019).

A regulação de AKT ocorre principalmente por antagonistas da sinalização de PI3K, sendo o gene supressor tumoral homólogo da fosfatase tensina (*PTEN*), o mais conhecido e estudado (Cantley and Neel, 1999). Portanto, a inibição de *PTEN* ocasionará em um aumento na expressão de PI3K e subsequente sinalização da via. Com isso, nota-se um aumento na expressão de AKT e mTOR, podendo levar a alterações fenotípicas características da carcinogênese (Vidotto et al., 2020).

2.3 TERAPIAS ASSOCIADAS À MUCOSITE ORAL

Diversas terapias são testadas e estudadas com o objetivo de prevenir e tratar a MO, focadas no reparo tecidual (Brown and Gupta, 2020), entretanto, segundo a literatura, ainda não foi realizado um estudo que abordasse um método completamente efetivo para prevenção ou tratamento dessa complicaçāo. Os agentes terapêuticos testados e recomendados são capazes de modular as manifestações clínicas, postergar, ou impedir a evolução para um estágio mais grave da MO (Daugelaite et al. 2019; Pulito et al. 2020).

As intervenções testadas ainda não têm seu mecanismo de ação bem elucidado, o que leva à seleção de protocolos clínicos por escolhas tendenciosas, e ainda com muita variação entre centros de pesquisa e tratamento. Essa falta de alta certeza de evidência científica gera um grande desafio na decisão do protocolo de tratamento e na comparação entre os estudos (Pulito et al. 2020).

Clinicamente, são utilizados enxaguantes com substâncias salinas ou benzamina, anestésico tópico e agentes sistêmicos, como morfina, para o controle da MO (Brown et al., 2020). Ainda, utiliza-se antifúngicos, protetores de mucosa, anti-histamínicos, antissépticos, analgésicos e o laser de baixa potência. Entretanto, não existe uma padronização na seleção das terapias (Brown and Gupta, 2020; Daugelaite et al., 2019)

Como a MO ocorre em estágios nos quais as vias vão sendo amplificadas, sugere-se que as terapias tenham como alvo alguma das vias envolvidas na patogênese da doença. Com isso, terapias antioxidantes, que resultam na inibição de ROS liberadas na fase em que ocorre lesão tecidual, são um potencial alvo terapêutico para o tratamento da MO. Outra terapia considerada interessante, seria focada na inibição da transcrição de NF- κ B e TGF- β 1, TNF- α e IL-1 β , inibindo a inflamação (Pulito et al. 2020).

A Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e a Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) fazem recomendações para o manejo da MO, baseadas em evidências científicas (Lalla et al. 2019). Uma das recomendações está associada à saúde oral desses pacientes. Intervenções educacionais foram recomendadas para ajudar os pacientes a manter uma saúde oral adequada, principalmente durante o tratamento antineoplásico. Assim, recomendou-se o uso de técnicas de escovação, utilização do fio dental e tipos de escova dentária adequadas. Além disso, foi recomendado o uso do laser de baixa potência, tanto de forma preventiva, quanto no tratamento de todos os pacientes que realizam radioterapia em região de cabeça e pescoço, associada ou não à quimioterapia. A recomendação de se realizar a fotobiomodulação com o auxílio do laser de baixa potência se deu, principalmente, pelo seu efeito anti-inflamatório e atuação no processo de reparo (Brown and Gupta, 2020; Lalla et al. 2019).

2.4 EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO

A fotobiomodulação é uma modalidade terapêutica em que um laser de baixa potência é utilizado, tendo como principal característica a presença de um único comprimento de onda, que não gera calor na sua aplicação, prevalecendo a conversão da energia absorvida por meio de um fotorreceptor ou cromóforo (Li et al., 2020; Karu, 1999). O cromóforo absorve a energia fornecida pelo aparelho de laser e transfere para outra molécula, promovendo reações fotoquímicas ou fotofísicas no tecido. Esse processo possibilita um maior estímulo na membrana mitocondrial e desencadeando alterações específicas, ou até uma regulação em todo o metabolismo celular, por meio do aumento da produção de ATP, RNA e síntese de proteínas (Karu, 1999; de Castro et al., 2005).

Diversos estudos têm sido realizados com a fotobiomodulação. O objetivo é demonstrar seus efeitos na inflamação, proliferação celular e aceleração do reparo tecidual, no aumento da síntese de DNA e RNA, na angiogênese e na produção de colágeno, serotonina e cortisol (Villa and Sonis, 2015; Courtois et al. 2021; de Castro et al., 2005). O interesse nesse tópico se deu pelo fato de a fotobiomodulação ser um tratamento não invasivo, que promete modular os processos biológicos por meio da absorção de fôtons pelas células. Dessa forma, destaca-se o efeito fotoquímico que estimula o processo de reparo pela proliferação, diferenciação e migração, enquanto reduz a inflamação e promove analgesia (Courtois et al. 2021; Li et al., 2020; Zhao, Xing and Chen, 2011; Huang et al., 2011).

O laser de baixa potência pode ser ajustado em diferentes parâmetros, como comprimento de onda, potência, densidade de energia, tempo de aplicação e área do spot, vinculando a resposta da terapia aos parâmetros estabelecidos (de Castro et al., 2005). Para o sucesso da terapia, devemos considerar a penetração da luz no tecido e o comprimento de onda específico que será absorvido pelos cromóforos. A compatibilidade é essencial para que a fotobiomodulação aconteça. A absorção pela cadeia respiratória celular ocorre dentro de todo o espectro de luz visível e infravermelho próximo, tendo seu efeito maximizado entre os comprimentos de onda de 650 a 1200 nm. Essa absorção é considerada o principal mecanismo celular do laser de baixa potência (Karu, 1999). A citocromo c oxidase (Cco) é reportada como

a principal molécula fotorreceptora das células humanas para os comprimentos de onda dentro do espectro vermelho e infravermelho (Karu and Kolyakov, 2005).

Além do comprimento de onda, podemos citar a densidade de energia (J/cm^2) como um dos principais parâmetros do laser, variando nos estudos *in vitro*, entre 1 e 20 J/cm^2 (Garrido et al., 2019; Meneguzzo et al., 2008; Ferreira et al., 2019; Hong et al., 2021). Conforme já reportado, potências maiores possuem o potencial inibitório para a proliferação das células, enquanto potências mais baixas têm demonstrado um aumento das funções celulares (de Castro et al., 2005; Monteiro et al., 2022; Huang et al., 2011).

Na mitocôndria, a aplicação do laser promove um aumento do gradiente eletroquímico, síntese de ATP, RNA, proteínas e ROS. As ROS estão envolvidas na sinalização celular, atividade de oxirredução e na ativação de fatores de transcrição, sendo o NF- κ B, o mais importante. Essa ativação induz expressão de outros genes envolvidos na proliferação e sobrevivência da célula, de modo que os efeitos celulares podem variar, a depender do tecido de interesse e estado da célula no momento da aplicação da fotobiomodulação (Huang et al., 2011; Brea-Calvo et al., 2009).

3. PROBLEMAS E HIPÓTESES

Na literatura, é possível observar diferentes sugestões de tratamentos para a mucosite oral. Dentre as terapias, o laser de baixa potência tem gerado interesse na comunidade científica, principalmente pelo seu efeito analgésico, anti-inflamatório e atuação no reparo celular. Apesar de seu uso clínico ser recomendado pela MASCC/ISOO, não existem protocolos de aplicação padronizados, e ainda faltam estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares de ação do laser, relacionados aos diferentes parâmetros, resultando nos seguintes questionamentos:

Pergunta 1: Quais os efeitos de diferentes potências do laser na fotobiomodulação em modelo *in vitro* de mucosite oral com cultura primária de fibroblastos gengivais humanos?

Hipótese: A fotobiomodulação quando comparada ao grupo controle, mantém a viabilidade celular dos fibroblastos gengivais humanos, após aplicação do modelo de mucosite oral. Ainda, potências mais baixas associadas a um maior tempo de exposição provocam um efeito positivo na viabilidade celular.

Pergunta 2: Quais os efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação utilizando diferentes densidades de energia e uma mesma potência em modelo *in vitro* de mucosite oral com cultura primária de fibroblastos gengivais e linhagem de queratinócitos imortalizados humanos?

Hipótese: A fotobiomodulação atua estimulando as vias de reparo tecidual e reduzindo o tempo de fechamento das feridas. Ainda, a fotobiomodulação atua na modulação da expressão de mediadores inflamatórios, genes envolvidos no reparo tecidual e na morfologia celular em células de mucosa oral.

4. ARTIGO

4.1 MANUSCRITO 1

O artigo a seguir foi publicado na revista Lasers in Dental Science Oral Diseases, ISSN 2367-2587 (versão online), classificada como periódico C na Qualis Referência Capes.

Effects of different photobiomodulation therapy doses on cell viability after bacterial and ionizing radiation-induced stress: a pilot in vitro study

Mylene Martins Monteiro ^a

Juliana Amorim dos Santos ^{a *}

Victor Paiva Barbosa ^a

Camila de Barros Gallo ^b

Márcia Martins Marques ^c

Eliete Neves Silva Guerra ^a

Affiliations

^a Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasília, Asa Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^b Stomatology Department, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Post Graduation Program, Ibirapuera University (UNIB), São Paulo, SP, Brazil

* Corresponding author

ABSTRACT

Purpose Photobiomodulation therapy has proven to be effective in accelerating cell proliferation, migration, and transcription. The study aimed to analyze the cell viability effects of different parameters of PBMT in a cultured cell line of human gingival fibroblasts after bacterial and ionizing radiation-induced stress.

Methods Explant technique was used to produce a primary cell culture. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum until stressful condition induction with lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis* protein extract, and ionizing radiation. Laser irradiation was carried out in four sessions set with 660 nm wavelength, an output power of 30 mW and 40 mW and energy density of 2, 3, 4, and 5 J/cm².

Results After 24 h from the last laser irradiation session, the groups outputted in 30 mW of power maintained the cell viability while operating with 2, 4, and 5 J/cm². However, 3 J/cm² dose significantly decreased cell viability ($p < 0.05$). When the laser irradiation session was set in a higher power (40 mW), cell viability was reduced using 2, 3, and 5 J/cm² doses, with statistical significance for 5 J/cm² ($p < 0.001$). In addition, operating the same energy using lower power seems to be superior to a higher power, being statically significant for 5 J/cm² dose ($p < 0.001$). This pattern followed with all different groups, except by 3 J/cm².

Conclusions The present study showed that delivering 2, 4, and 5 J/cm² of density of energy with 30 mW and more time of exposure presented better results on cell viability compared to the same density of energy with output power of 40 mW. Further studies comparing density energy should be conducted.

Key Words: Cell culture · Low-level laser · Human fibroblast · Photobiomodulation therapy

INTRODUCTION

Photobiomodulation therapy (PBMT) is a treatment modality that has proven to be effective in accelerating wound healing, pain relief, reducing dentin sensitivity

and the severity of xerostomia, and herpes labialis frequency [1–3]. The application of PBMT in controlling adverse reactions of cancer therapies has shown promising results and reached significant attention. The Multinational Association for Supportive care in Cancer/International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO) guidelines recommend PBMT to patients undergoing head and neck radiotherapy, associated or not with chemotherapy, due to numerous data in which the incidence and severity of oral mucositis have been positively impacted by PBMT [1, 4, 5].

The therapy operates with photon emission from a low- level laser light that transfers low energy to tissues and does not generate heat [2]. The exposure of biological tissues to low-level laser light induces the modulation of cellular functions by activating several pathways involved in cell growth and survival, proliferation, migration, and transcription [2, 6]. At a cellular level, this therapy promotes local, regional, and systemic action, enhancing mitochondrial activity and increasing the production of adenosine triphosphate (ATP) and reactive oxygen species (ROS) [7, 8].

The mechanism of action of PBMT has been discussed and reported in multiple *in vitro* studies, showing that it can promote stimulation or inhibition, depending on light parameters [9]. A review has analyzed 32 *in vitro* studies and concluded that an energy density varying from 0.5 to 4.0 J/cm² and a light wavelength from 600 to 700 nm for PBMT could enhance proliferation of different cell types [10]. These findings are in conformity with previous *in vitro* studies and literature reviews that show positive biostimulation effects on fibroblasts, keratinocytes, and osteoblasts [11–14].

Moreover, the primary challenge is applying the optimal laser parameters to deliver an ideal amount of energy to enhance the metabolism and improve clinical outcomes [2, 8, 15]. To test the hypothesis that the same density of energy with lower power could lead to an improvement on cell viability, stimulated gingival fibroblasts were exposed to different densities of energy and two different output powers. Thus, this pilot study aimed to analyze the effects of different parameters of PBMT on cell viability, using human gingival fibroblast cells stimulated with bacterial and ionizing radiation-induced stress.

MATERIALS AND METHODS

Cell isolation and primary culture

The explant technique was used to obtain a cell line of human gingival fibroblasts. Before the fragment's collections, ethics registration and approval had been obtained from the Human Research Ethics Committee of the Health Sciences College of the University of Brasília (CAAE No 78,679,717.6.0000.0030), and all the donors signed the understanding and written consent. Then, the gingival fragments of young donors who underwent third molar extraction surgery were isolated and transported to the Laboratory of Oral Histopathology immersed in cold Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The fragments were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), explanted into small fragments, placed on 6-well plates, stabilized with a glass coverslip, covered by 2 mL of DMEM supplemented with 20% FBS and antibiotics, and maintained in a humidified incubator with ideal conditions (37 °C and 5% CO₂). The culture medium was replaced every 3 days and when 80–90% confluence was reached, cells were detached with trypsin (0.25%)/EDTA (1 mM) solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and replaced in 100-mm dishes with DMEM plus 10% FBS and antibiotics to expand the culture or stored at – 80 °C in a freezing solution containing FBS and 8% dimethyl sulfoxide (DMSO).

Bacterial and ionizing radiation-induced stress

For the stressful condition induction, cells were treated with three stimuli, as established in previous experiments of the Laboratory of Oral Histopathology of the University of Brasília (data not shown): lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* 0111:B4 purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), *Porphyromonas gingivalis* protein extract (Pg), and ionizing radiation (IR). The protein extract of Pg was prepared in the University of Campinas, São Paulo, Brazil, as described by Albiero et al. [16] and donated to the Laboratory of Oral Histopathology of the University of Brasília. In order to achieve stress induction, before beginning the experiments, the cells were treated with LPS (1 µg/ mL) and Pg (5 µg/mL), incubated for 1 h, and then irradiated with 8 Grays (Gy).

Photobiomodulation therapy parameters

The laser irradiation sessions were performed using a continuous-wave InGaAIP laser (Photon Lase III DMC, São Paulo, Brazil) in punctual and contact mode. The wave-length 660 nm laser was applied with output powers of 40 and 30 mW. The energy densities were 2, 3, 4, and 5 J/cm² for each power. The complete treatment was performed in four sessions with 6-h intervals from each session according to Meneguzzo et al. [17] and Moreira et al. [18]. The overall parameters are presented in Table 1.

Table 1 Laser parameters used for photobiomodulation therapy

Parameters	Values							
Wavelength	660 nm							
Active medium	InGaAIP							
Beam area	0.044 cm ²							
Power	30 mW				40 mW			
Power density	0.68 W/cm ²				0.90 W/cm ²			
Energy density	2 J/cm ²	3 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²	2 J/cm ²	3 J/cm ²	4 J/cm ²	5 J/cm ²
Irradiation time	2.8 s	4.3 s	5.7 s	7.2 s	2.2 s	3.3 s	4.4 s	5.5 s
Energy per point	0.084 J	0.129 J	0.171 J	0.216 J	0.088 J	0.132 J	0.176 J	0.22 J

Experimental groups

The laser irradiation protocol presented in Table 1 was carried out in nine groups, considering a negative control group/vehicle (stimulated model without PBMT) and four energy densities (2, 3, 4, and 5 J/cm²) irradiated using two power doses (30 mW and 40 mW).

Cell viability

Gingival fibroblasts were seeded into 96-well plates at a density of 5 × 10 and incubated for 24 h. Then, the stressful stimuli protocol was applied in nine biological replicates for each group. The first photobiomodulation session was conducted right after ionizing radiation, according to experimental groups, and repeated three more times, every 6 h. After 24 h from the last session, the cells viability was assessed by the tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay. For this, 10 µL of MTT solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added, and the cells were incubated and protected from light for 4 h. Then, the solution was removed, and 100 µL of acidified isopropanol (25 mL of isopropanol + 104 µL of HCl 100%) was added to each well. Cellular viability was

analyzed after absorbance measurement using the spectrophotometer Thermo Plate TP Reader at 570 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Statistical analysis

The Shapiro–Wilk test was applied to assess data normality. As data resulted in parametric distribution, the one-way ANOVA followed by Dunnett's and Turkey's post-tests were applied to compare groups. The level of statistical significance was 95% ($p < 0.05$). The tests were performed using GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, CA, EUA).

RESULTS

Combination of energy and power can differently modulate cell response

The PBMT effect was analyzed in cells stimulated with bacterial and ionizing radiation–induced stress. For cell viability analysis, all treated groups irradiated with different doses of low-level laser were compared to a control group (non-irradiated with low-level laser). After 24 h from the last laser irradiation session, the groups outputted in 30 mW of power presented cell viability when operated with 2, 4, and 5 J/cm²; however, 3 J/cm² dose significantly decreased mitochondrial activity ($p < 0.05$). In contrast, when the laser irradiation session was set up in a higher power (40 mW), the cell viability was reduced using 2, 3, and 5 J/cm² doses, with statistical significance for 5 J/cm² ($p < 0.001$). Hence, the results indicated that the combination of energy and power can differently modulate cell response (Fig. 1).

Inhibitory response could be dependent on laser parameters

The same density of energy can be delivered setting different parameters, while performing a PBMT protocol [9]. In this study, two power outputs (30 and 40 mW) were set, using different times of exposition to deliver and compare four energy densities (2, 3, 4, and 5 J/cm²). The results demonstrated that operating the same energy, using lower power, seems to be superior to a higher power, being statically significant for 5 J/cm² dose ($p < 0.001$). This pattern followed with all different groups, except by 3 J/cm². Thus, bacterial and ionizing radiation–induced cells exposed to four PBMT sessions of 2, 4, and 5 J/cm² were more capable to keep mitochondrial

activity, operating at 30 mW than 40 mW (Fig. 2). These results suggested that inhibitory response could be power-dependent.

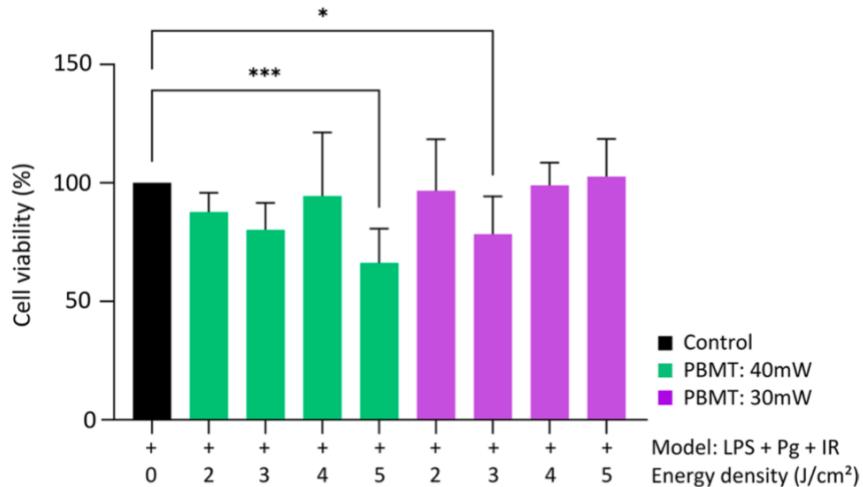


Fig. 1 Cell viability after application of different photobiomodulation doses powered at 30 and 40 mW compared to a model of ionizing radiation and bacterial-induced stress. LPS lipopolysaccharide of *Escherichia coli*; Pg protein extract of *Porphyromonas gingivalis*; IR ionizing radiation. Analytical statistics: One-way ANOVA for parametric data followed by Dunnett's post-test (* $p < 0.05$; *** < 0.001)

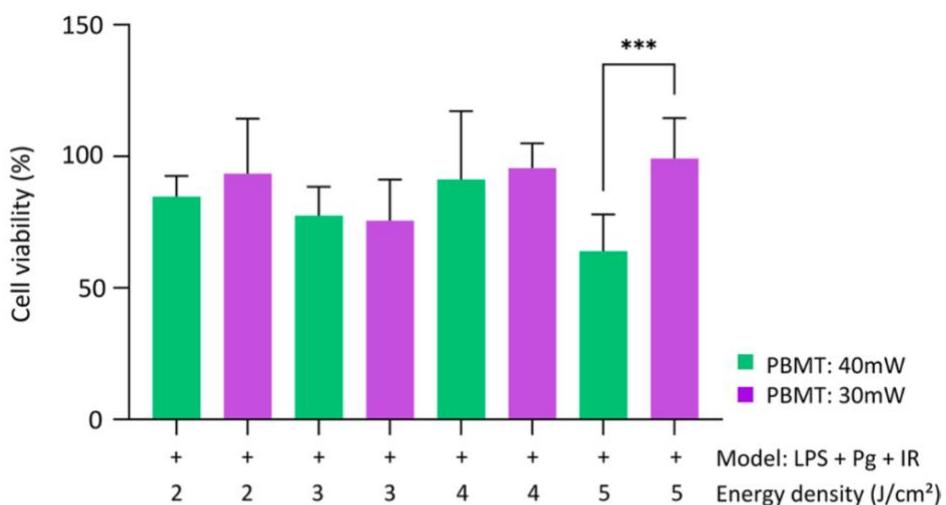


Fig. 2 Comparison of same energies density powered at 30 and 40 mW. Analytical statistics: One-way ANOVA for parametric data followed by Tukey's post-test (**<0.001)

DISCUSSION

The effects of PBMT depend on laser parameters, including wavelength, power, energy, spot area, and time of exposure. Also, these combined aspects could differently influence cell activity, such as proliferation [15, 19–21]. Thus, the effects of different parameters in wound healing are in current interest, since it can enhance cell growth depending on the set output.

This pilot study investigated the effect of low-power InGaAlP laser irradiation comparing the output power of 30 and 40 mW and the corresponding energy densities of 2, 3, 4, and 5 J/cm², while laser irradiation was performed in four sessions with an interval of 6 h between them. In accordance with published findings, lower power delivering the same density of energy was more capable to maintain cell viability than higher output power which suggests the influence of PBMT parameters in cell response [22–27].

Brueghel and Dop Bärr [9] suggested that power density and time of exposure seem to be more important than the total energy dose of PBMT on human fibroblasts. Azevedo et al. [20] found an inverse influence between power density and cell growth [9, 22, 28, 29]. Previous studies showed the same results, indicating that higher output power had inhibitory characteristics [6, 15, 24, 30].

Low doses of PBMT activate a proton gradient, releasing calcium from mitochondria into the cell's cytoplasm. This process stimulates a cascade of cellular functions and protein secretion enhancing cell proliferation. In contrast, higher doses can release an excessive amount of calcium promoting hyperactivity of calcium-adenosine triphosphatase, inhibiting cell metabolism [30–32]. Our results indicated that the same energy density, outputted in the power of 30 mW, showed higher viable cells than 40 mW, suggesting that the power can determine the stimulatory or inhibitory effect of the laser irradiation on cellular responses.

Hawkins and Abrahams [30] demonstrated that the cumulative effect from the accumulated doses determines the biomodulation effect, multiple exposures at higher doses cause additional stress and significantly reduced cell viability, and lower doses and fewer exposures maintained cell viability.

The response of the tissue exposed to PBMT protocols is the combination of time of exposure, total energy delivered, and cell response. The study design was

defined with a primary culture of gingival fibroblasts collected from patients. Even though the followed inclusion criteria considered healthy patients, the PBMT results may vary according to patients' response, cell type, tissue condition, and explant methods used for the culture [24]. Also, it is possible that, in this preliminary study, the total energy delivered in 3 J/cm^2 and 30 mW of output power associated with the time that the energy was delivered was unable to produce effect comparable with other parameters; this could be associated with different degrees of the effect produced by PBMT [6].

Considering that wound healing depends on cell proliferation, it is crucial to study and deeper understand the effect of power densities of PBMT *in vitro*, since this is the first step to understand the cascade process in a complex body [31]. There is not a well-defined standard of output power setting, although various studies have been performed to observe the effects of low-level laser in cellular response [2, 8, 10–12]. Comparing different protocols of application can contribute to determine the optimal combination of parameters according to different cell types and expected results. In addition, it is possible to obtain lower or higher doses to reach an energy density, controlling the output of power and the laser irradiation time which can facilitate the replication of protocols even when different equipment is available [6, 9].

There are some limitations in this study that should be addressed. First, this is a pilot study that only focused on cell viability. Considering the importance of laser parameters for different culture conditions, a single trial experiment assessing different PBMT outputs was conducted to allow future analysis since cell response depends on that. Second, the definition of output parameters was based on literature research, which contemplates different cell types and objectives. Thus, the future proposal is to continuously study cellular response after bacterial and ionizing radiation-induced stress, comparing output powers of 30 mW and lower with further experiments to analyze the effects of PBMT on cell morphology, proliferation, migration, gene and protein expression, and specific pathway signalization.

CONCLUSION

The present pilot study showed that PBMT effects can be influenced by the power outputted parameter. After analyzing PBMT set in 660 nm wavelength, output power of 30 and 40 mW, and energy densities of 2, 3, 4 and 5 J/cm², it was possible to conclude the PBMT effect. The results using a protocol of PBMT, set with 660 nm of wavelength in four sessions of laser application with 6-h interval suggest that delivering 2, 4, and 5 J/cm² of density of energy with output power of 30 mW, leading to more time of exposure, presented better results on cell viability compared to the same energy density with 40 mW. However, further studies comparing density energy should be conducted.

Author contribution

All the authors contributed to the study's conception and design. Material preparation, data collection, and analysis were performed by Mylene Martins Monteiro, Juliana Amorim dos Santos, and Victor Paiva Barbosa. The first draft of the manuscript was written by Mylene Martins Monteiro and Juliana Amorim dos Santos, and all the authors commented on previous versions of the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding

This study received financial support from DGP – UnB (Graduate Dean of the University of Brasilia) no. 0004/2021 in the name of J. Amorim dos Santos. The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication: M.M. Monteiro and J. Amorim dos Santos are supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Brazil. V. Paiva Barbosa and E.N.S. Guerra are supported by the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Ministry of Education, Brazil.

Declarations

Ethics approval This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Human Research Ethics Committee of the Health Sciences College of the University of Brasilia (CAAE No. 78679717.6.0000.0030).

Consent to participate

Informed consent was obtained from all individual participants that donated gingival fragments in the study.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE (2016) Could the biological robustness of low-level laser therapy (photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 54:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.01.005>
2. Pellicoli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM (2014) Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt* 19(2):028002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.2.028002>
3. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA (2015) Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci* 30(3):1171–1174. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1436-9>
4. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM et al (2014) MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* 120:1453–1461 5.
5. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, Gueiros LA, Majorana A, Nair RG, Ranna V, Tissing WJE, Vaddi A, Lubart R, Migliorati CA, Lalla RV, Cheng KKF, Elad S (2019) Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer* 27(10):3969–3983. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04890-2>
6. Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D’Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS (2016) Photobiomodulation of dental derived

- mesenchymal stem cells: a systematic review. *Photomed Laser Surg* 34(11):500–508. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4038>
7. Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M (2020) Photobiomodulation and oral mucositis: a systematic review. *Dent J (Basel)* 8(3):87. <https://doi.org/10.3390/dj8030087>
8. Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues MFSD, Moura-Netto C, Marques MM (2019) Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci* 34(4):659–666. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-z>
9. van Breugel HHFI, Dop Bärr PR (1992) Power density and exposure time of He–Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 12:528–537
10. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2021) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 1:237–249. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2>
11. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM (2007) Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 39:365–372
12. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184
13. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM (2006) Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 38:332–336
14. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP (2004) Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 34:260–265
15. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR (2015) Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg* 33:183–184
16. Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG (2017) Viability and osteogenic differentiation of human periodontal ligament progenitor cells are maintained after incubation with *Porphyromonas gingivalis*

- protein extract. *J Periodontol* 88(11):e188–e199. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170116>
17. Meneguzzo DT, Eduardo CP, Ribeiro MS, Marques MM (2008) Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibro- blasts. *Mechanisms for Low-Light Therapy III* 6846(68460A):1– 9. <https://doi.org/10.1117/12.761220>
18. Moreira MS, Sarra G, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores HV, Pedroni ACF, Lascala CA, Catalani LH (2021) Marques MM (2021) Physical and biological properties of a chitosan hydrogel scaffold associated to photobiomodulation therapy for dental pulp regeneration: an in vitro and in vivo study. *Biomed Res Int* 25(2021):6684667. <https://doi.org/10.1155/2021/6684667>
19. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D (2008) Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast- like cells. *Wien Klin Wochenschr* 120(3–4):112–117
20. Tuby H, Maltz L, Oron U (2007) Low-level laser irradiation pro- motes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med* 39:373–378
21. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ÁC, Barboza CA (2015) Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci* 30(9):2259–2264. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1803-9>
22. Azevedo LH, de Paula EF, Moreira MS, de Paula EC, Marques MM (2006) Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci* 21(2):86–89. <https://doi.org/10.1007/s10103-006-0379-9>
23. Barboza CAG, Ginani F, Moura SD et al (2014) Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein* 12(1):75–81
24. Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos- Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M (2008) Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 40(6):433–438. <https://doi.org/10.1002/lsm.20646>
25. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation- stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 36:8–12

26. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 31:263–267
27. Staffoli S, Romeo U, Amorim RNS, Migliau G, Palaia G, Resende L, Polimeni A (2017) The effects of low level laser irradiation on proliferation of human dental pulp: a narrative review. *Clin Ter* 168(5):e320–e326. <https://doi.org/10.7417/T.2017.2028>
28. Hawkins DH, Abrahamse H (2007) Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J Photo- chem Photobiol B* 88:147–155
29. Matic M, Lazetic B, Poljacki M et al (2003) Low level laser irradiation and its effect on repair processes in the skin. *Med Pregl* 56:137–141
30. Hawkins D, Abrahamse H (2006) Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 24:705–714
31. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I et al (1991) A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol* 11:87–91
32. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H et al (2000) Low- intensity laser therapy: a review. *J Invest Med* 48:312–326

4.2 MANUSCRITO 2

O artigo a seguir foi escrito de acordo com as normas da revista Lasers in Medical Science (online), classificada como periódico A2, na Qualis Referência CAPES, onde será posteriormente submetido para publicação.

Effects of different photobiomodulation therapy doses on wound repair after ionizing radiation and bacterial-induced stress: in vitro study

Mylene Martins Monteiro^a (ORCID: 0000-0002-4752-232X), Juliana Amorim dos Santos^{a*} (ORCID: 0000-0002-3042-3157), Victor Paiva Barbosa^a (ORCID: 0000-0003-0956-8981), Ana Gabriela Normando^c (0000-0002-0307-4991), Eliete Neves Silva Guerra^a (ORCID: 0000-0002-7622-1550).

Affiliations

^a University of Brasília, Brasília, Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, Brazil.

^b Stomatology Department, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^c Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Piracicaba Dental School, Oral Diagnosis Department, Semiology and Oral Pathology Areas, Piracicaba, SP, Brazil

* Corresponding author:

Dr. Mylene Martins Monteiro

Health Sciences Faculty, University of Brasília, Brasília, Brazil. Asa Norte, Brasília, DF, Brazil ZIP Code: 70910-900.

E-mail: mylenemonteiro7@gmail.com / Phone number: + 55 61 984774585

ABSTRACT

Purpose: Photobiomodulation therapy (PBMT) has proven to reduce inflammation and pain, and increase wound healing. Thus, the aim of this study was to analyze the effects of different parameters of PBMT on migration, proliferation, and gene expression after ionizing radiation and bacterial-induced stress in an *in vitro* model.

Methods: Immortalized Human Keratinocytes (HaCaT – ATCC) and a primary culture of Human Gingival Fibroblasts were used. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum until stressful condition induction with lipopolysaccharide of *Escherichia coli* (1 µg/mL), *Porphyromonas gingivalis* protein extract (5 µg/mL) and ionizing radiation (8 Gy). Low-laser irradiation (660 nm, 30 mW) was carried out in four sessions, with 6h interval, and energy density of 2, 3, 4, and 5 J/cm². Viability and scratch assays were performed 24h after the treatments to analyze cell proliferation, migration and cell morphology by immunofluorescence. Also, RT-qPCR was used to evaluate cytokines and wound healing genes expression.

Results: Pre-stimulated fibroblasts treated with densities of energy of 3 and 4 J/cm², and keratinocytes with 5 J/cm² showed better response in proliferation and migration after viability and scratch assays ($p<0.05$). The higher expression of α-SMA was observed in fibroblasts under 3 J/cm². Densities of 3 and 5 J/cm² have presented a significant increase in the expression of AKT e MTOR, and 5 J/cm² of PTEN in keratinocytes ($p<0.01$). In fibroblasts, the expression tended to enhance when 4 J/cm² was applied ($p<0.0001$). For the inflammatory cytokines, fibroblasts did not present differences in inflammatory cytokine expression, while in keratinocytes, groups 3 and 5 J/cm² showed significantly higher expression of TNF-α, IL1β, and NFκB ($p<0.001$).

Conclusions: The present study showed that delivering 660 nm, 30 mW were effective to stimulate cell migration, proliferation and to accelerate wound healing. PBMT can modulate cytokines and pathways involving in wound repair. Despite the different energy densities delivering distinct responses, understanding the *in vitro* effect of each laser parameter is fundamental to improve treatment strategies.

Keywords: Cell culture; Low-level laser; Human fibroblast; Immortalized human keratinocytes; Photobiomodulation therapy.

INTRODUCTION

The mucosal toxicity of cancer treatments has been studied over the years (Lalla et al., 2019). Oral mucositis (OM), considered the main adverse effect of oncological treatment, is characterized as a painful lesion that interfere in patients' basic physiological needs, such as eating and swallowing (Kusiak et al., 2020). Severe OM is one of the reasons why patients may not tolerate oral diet, leading to an increase in medical appointments and use of drugs, and frequently change treatment regimen (Elad et al., 2022; Sonis, 2011; Daugėlaitė et al. 2019). The pathogenesis of OM is described in stages, as a convenient method of describing a dynamic process involving oral microbiome, DNA injury, cell death and ulcerations. (Lalla et al., 2019; Sonis, 2011).

A recent work reveals that chemotherapy-induced oral mucositis is associated with bacterial dysbiosis and demonstrates the potential for dysbiotic shifts to aggravate antineoplastic-induced epithelial injury. OM severity was associated with 5-FU, increased salivary flow, and higher oral granulocyte counts. The oral bacteriome was disrupted during chemotherapy and while antibiotic and acid inhibitor intake contributed to these changes, bacteriome disruptions were also correlated with antineoplastics and independently and strongly associated with oral mucositis severity. The findings suggest that control of oral bacterial dysbiosis could represent a preventive approach to ameliorate OM. (Hong et al., 2019).

During the mucositis progression, the injured tissue promotes reactive oxygen species (ROS) release, activating different repair pathways. The nuclear factor- κ B (NF- κ B), activated by ROS, modulates the transcription of genes that represents the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor α ($TNF-\alpha$), interleukin-6 ($IL-6$), and interleukin-1 β ($IL-1\beta$) (Pulito et al. 2020; Courtois et al., 2021). Therefore, the administration of effective treatments should consider the pathways involved in mucositis pathobiology.

Photobiomodulation therapy (PBMT) has proven to reduce inflammation, pain and increase wound healing (Courtois et al., 2021). It is an eminent treatment modality recommended by The Multinational Association for Supportive care in Cancer/International Society for Oral Oncology (MASCC/ISOO) guidelines in the OM prevention and treatment of patients undergoing head and neck radiotherapy, associated or not with chemotherapy (Elad et al., 2022). The recommendation is due

to the positive impact to treat patients that developed OM during cancer treatments (Sonis et al., 2016; Pellicoli et al., 2014). Although PBMT is advancing for clinical settings, standard protocols are still missing, and its cellular and molecular mechanism of action is not completely elucidated.

Until now, the mechanism of action relies on the effect of the light that penetrates the tissue and is absorbed by hemoglobin, myoglobin, and mitochondrial cytochrome c oxidase, to positively influence cellular metabolism (Courtois et al., 2021; Cronshaw et al., 2020). It is known that depending on light parameters, it can stimulate or inhibit cellular functions (Monteiro et al., 2022). However, despite recommended, the effects of photobiomodulation therapy in cellular level is still being described. Understanding the effect of each laser parameter is fundamental to develop better protocols and improve treatment strategies. Hence, it is important to understand the *in vitro* effects of different laser parameters in cellular molecules, to elect a predictable therapy, regarding OM.

The findings of PBMT *in vitro* study are showing interesting and promising results (Ferreira et al., 2019; Monteiro et al., 2022). Establishing a protocol to deliver an ideal amount of energy, selecting optimal laser parameters has been the objective of different research groups. Taking this into consideration, the aim of this *in vitro* study was to analyze the effects of different parameters of PBMT on migration, proliferation, morphology, and cytokines and wound healing gene expression using human gingival fibroblasts and keratinocytes after ionizing radiation and bacterial-induced stress.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

For the experiments, immortalized human keratinocytes (HaCat), described in the American Type Culture Collection (ATCC) and Human Gingival Fibroblasts were used. The primary cells were obtained using the explant technique to establish a cell line of human gingival fibroblasts. Ethics registration and approval had been obtained from the Human Research Ethics Committee of the Health Sciences College of the University of Brasília (CAAE Nº 78679717.6.0000.0030), and all donors signed the understanding and written consent. The gingival fragments of young donors who underwent third molar extraction surgery were isolated and transported to the

Laboratory of Oral Histopathology, immersed in cold Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% penicillin/streptomycin//amphotericin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The fragments were washed twice with Phosphate-Buffered Saline (PBS), explanted into small fragments, placed on 6-well plates, stabilized with a glass coverslip, covered by 2 mL of DMEM supplemented with 20% FBS and antibiotics, and maintained in a humidified incubator with ideal conditions (37°C and 5% CO₂). The culture medium was replaced every 3 days and, when 80-90% confluence was reached, cells have been detached with trypsin (0.25%)/ EDTA (1 mM – 5%) solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and replaced in a 100 mm dishes with DMEM, plus 10% FBS, and antibiotics (penicillin and streptomycin) to expand the culture or stored at -80°C in a freezing solution containing FBS and 8% dimethyl sulfoxide (DMSO). For keratinocytes strain, cells were stored at -80°C and cultivated in plates of 100 mm using DMEM, 10% of FBS and 1% of penicillin and streptomycin. Cells were incubated in 5% CO₂ at 37°C and the culture medium were replaced every 3 days. When cells reached a confluence of approximately 80%, they were trypsinized and distributed in new plates for the experiments or to be passed or restored to maintain the cell line.

Ionizing radiation and bacterial induced stress

For the stressful condition induction, three stimuli were applied, as established in previous experiments of the Laboratory of Oral Histopathology of the University of Brasília (data not shown): lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* 0111: B4 purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), *Porphyromonas gingivalis* protein extract (Pg), and ionizing radiation (IR). The protein extract of Pg was prepared in the University of Campinas, São Paulo, Brazil, as described by Albiero et al. (2017), and donated to the Laboratory of Oral Histopathology of the University of Brasília. To achieve stress induction, before beginning the experiments, the cells were stimulated with LPS (1 µg/mL) and Pg (5 µg/mL), incubated for 1 hour, and then ionizing irradiated with 8 Grays (Gy) using a 6 MV linear photons beam (Siemens Primus linear accelerator – Malvern, Pennsylvania, USA).

Photobiomodulation therapy parameters

The low-level laser irradiations were performed using a continuous-wave InGaAIP laser (Photon Lase III DMC, São Paulo, Brazil), in punctual and contact mode. The 660 nm wavelength laser was applied with output power of 30 mW. The energy densities were 2, 3, 4, and 5 J/cm². Laser parameters were selected as described in previous study (Monteiro et al., 2022). The complete treatment was performed in four sessions with intervals of 6 hours between sessions. The overall parameters are presented in **Table 1**.

Scratch Assay

Initially, dishes were coated with 2 mL of fibronectin subtract and incubated overnight at 4°C. The dishes were then washed and dried within the laminar flux. Cells from both cell lines were seeded (Fibroblasts 2x10⁵ and keratinocytes 5x10⁵ cells/well) into the prepared dishes and incubated for 24h. The monolayer was scraped with p200 pipet to create vertical and a horizontal scratch line. The cells were washed with PBS and subjected to the stressful condition stimuli. Then, the cells were treated with PBMT or control (turned off equipment), according to the following experimental groups: (1) 0 J/cm²; (2) 2 J/cm² of PBMT; (3) 3 J/cm² of PBMT; (4) 4 J/cm² of PBMT; (5) 5 J/cm² of PBMT. The experimental groups were equal in Fibroblasts and keratinocytes . Four photos were taken in each well, every 12h, until wound closure. The area was measured in each photo and followed a statistical analysis by relative area comparison.

Immunofluorescence

Human gingival fibroblasts were seeded (2x10⁵ cells/well) in 6-well dishes in glass coverslip (Fisherbrand, Microscope Cover Glass – Fisher Scientific), according to the following experimental groups: (1) 0 J/cm²; (2) 3 J/cm² of PBMT; (3) 5 J/cm² of PBMT. The stressful condition was applied followed by PBMT. After 24h of the stressful condition stimuli, Fibroblasts were rinsed with PBS, fixed with PBS 1X plus 4% PFA and 5% sucrose for 15 min in 4 °C, and permeabilized with 0.5% Triton in PBS for 10 min. After that, cells were incubated with PBS 1X plus BSA 1% plus Glycine 1% in 37°C for 20 min. The cells were then incubated overnight (4°C with humidity), with mouse anti-Vimentin (1/200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), mouse anti-Smooth

Muscle Actin (1/200, α -SMA, Developmental Studies Hybridoma Bank). Cells were rinsed with PBS and incubated with the following secondary antibody donkey anti-mouse Alexa Fluor® 594 (1/500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The nuclei were labeled with diamidino-phenyl-indole (1/1000 DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 15 minutes in room temperature and the coverslips were mounted onto microscope slides using Fluoromount-G® (SouthernBiotech, USA). Microphotographs were performed using the Axio Observer D1 microscopy (Zeiss, Germany) and processed using ZEN (Zeiss, Germany) and ImageJ softwares (LOCI, Madison, USA).

Gene Expression

The gene expression was evaluated by the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The cells were seeded (Fibroblasts 2×10^5 and keratinocytes 5×10^5 cells/well) into 6-well dishes and incubated for 24 hours, according to the following experimental groups: (1) 0 J/cm²; (2) 2 J/cm² of PBMT; (3) 3 J/cm² of PBMT; (4) 4 J/cm² of PBMT; (5) 5 J/cm² of PBMT. The stressful condition was applied, followed by PBMT. After 24h of the stressful condition stimuli, total RNA was extracted using TRizol® (Invitrogen), following manufacturer's instructions. RNA integrity and concentration was determined by NanoVue Plus (GE Healthcare Life Sciences, UK, EU). The samples were treated with DNase I (Invitrogen). The cDNA templates were obtained by reverse transcription, in 20 μ L reactions, containing MultiScribeTM Reverse Transcriptase, 10X RT Buffer, 25X dNTP mix, 10X RT Random Primers and RNase-Free Water using the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The gene expression of the pro-inflammatory cytokines (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* and *NFKB*) and the genes *PTEN*, *PIK3CA*, *AKT* and *MTOR* were obtained by RT-qPCR analysis with PowerUp® SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers. Specific primers were verified comparing the available sequences in the nonredundant NCBI database (National Center for Biotechnology Information) with Primer-BLAST software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The reactions were prepared in triplicates in 96-well dishes with 10 μ L of final volume, 0.2 μ L of each primer (forward and reverse), 5 μ L of Power Up SYBR Green Master Mix (2X) and 3.6 μ L of RNase-Free water. Analyses of all qPCR reactions were performed by StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems) and 1 μ L cDNA. Beta-actin (β -ACTIN)

was used as housekeeping gene and to normalize the reaction. The relative quantification was analyzed using comparative C_T method, and statistics were calculated after performed the equation $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{treatment}} - \Delta C_{T\text{calibrator/control}}$ (Schmittgen & Livak, 2008). Experiments were performed in technical triplicates for each sample.

Statistical Analysis

All experiments were performed with at least three technical replicates. Statistical tests were performed using GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Software, CA, EUA). The Shapiro-Wilk test was applied to assess data normality. As data resulted in parametric distribution, the one-way ANOVA followed by Dunnett's and Turkey's post-test were applied to compare groups. The results were shown in bar graphs represented with mean and standard deviation. The level of statistical significance was 95% ($p<0.05$).

RESULTS

PBMT accelerates cell migration and proliferation

Scratch assay was chosen to assess the migratory and proliferation viability of the cells upon PBMT. The measure at 0h were established as 100% and, in the following hours, the relative area was expressed in percentage, according to each initial reference area. Keratinocytes and gingival fibroblasts were positively influenced by the laser application, accelerating cell migration and/or proliferation. The areas of the treated groups, compared to control group, were found to have a tendency of lesion reduction in all follow up moments, until wound closure (**Fig 1**).

In fibroblasts, the group treated with 3 J/cm² of PBMT [Mean (SD) – 25.24 (9.488), $p<0.05$], and with 4 J/cm² of PBMT [Mean (SD) – 28.39 (13.52), $p<0.05$] presented significant reduction in the wound area after 24h, when compared to control (0 J/cm²) group [Mean (SD) – 45.34 (8.695), $p<0.05$] (**Fig 2A**). The 3 J/cm² group was the first to have complete wound closure in 36h (**Fig 2B**). Fibroblasts did not show

significant differences in migration and proliferation, at any point, when irradiated by either 2 J/cm² and 5 J/cm² ($p>0.05$) of energy density.

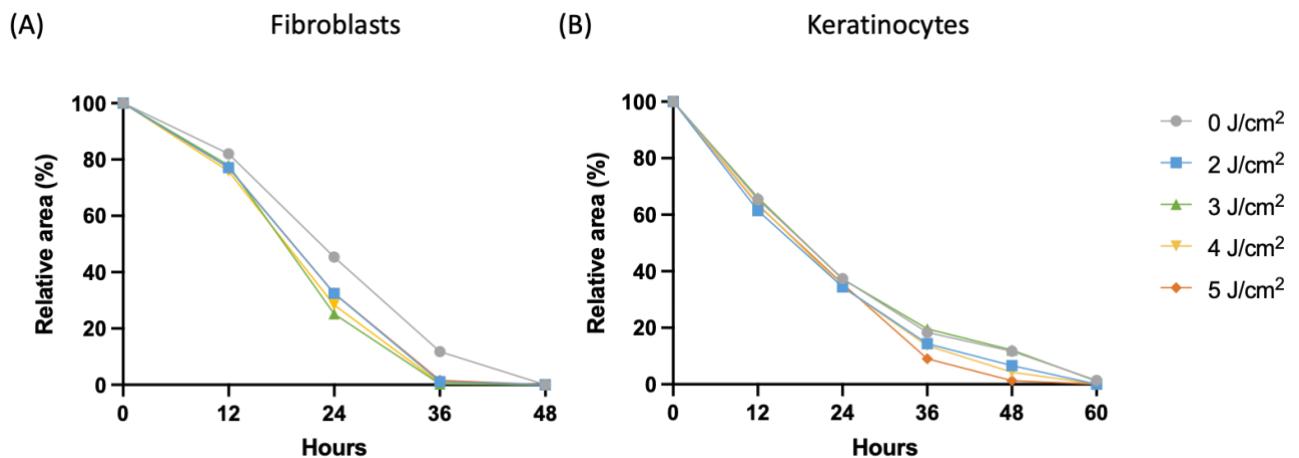


Fig 1. Wound closure *in vitro* model after PBMT with output power of 30 mW and different energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes. The graphs show the wound area expressed in percentage and compared with the follow up time (0, 12, 24, 36, 48, and 60h).

In keratinocytes, compared with control group [Mean (SD) – 18.41 (8.928), $p<0.05$], the group treated with 5 J/cm² of PBMT density of energy [Mean (SD) – 9.082 (5.069), $p<0.05$] showed significant acceleration of migration and proliferation after 36h (**Fig 2C,2D**). Compared with fibroblasts, keratinocytes also showed better response to PBMT in wound closure with significant differences in all experimental groups after 12h (0 J/cm² [fibroblasts: Mean (SD) – 82.00 (9.815), $p<0.0001$; keratinocytes: Mean (SD) – 65.48 (7.066), $p<0.0001$]; 2 J/cm² [fibroblasts: Mean (SD) – 77.12 (2.851), $p<0.0001$; keratinocytes: Mean (SD) – 61.44 (4.106), $p<0.0001$]; 3 J/cm² [fibroblasts: Mean (SD) – 77.96 (4.994), $p<0.001$; keratinocytes: Mean (SD) – 66.02 (8.145), $p<0.001$]; 4 J/cm² [fibroblasts: Mean (SD) – 75.85 (5.062), $p<0.001$; keratinocytes: Mean (SD) – 63.83 (3.716), $p<0.001$]; 5 J/cm² [fibroblasts: Mean (SD) – 77.20 (3.831), $p<0.0001$; keratinocytes: Mean (SD) – 63.47 (3.747), $p<0.0001$]). After 36h, fibroblasts presented a smaller relative area compared to keratinocytes in groups 2 J/cm² [fibroblasts: Median (IQR) – 0.000 (0.000 – 7.106), $p<0.05$; keratinocytes: Median (IQR) – 13.06 (6.158 – 26.69), $p<0.05$], 3 J/cm² [fibroblasts: Median (IQR) – 0.000 (0.000 – 2.080), $p<0.01$; keratinocytes: Median (IQR) – 13.12 (8.507 – 41.76), $p<0.01$] and 4 J/cm² [fibroblasts: Median (IQR) – 0.000 (0.000 – 3.436), $p<0.05$; keratinocytes: Median (IQR) – 11.13 (7.129 – 25.27), $p<0.05$]. (**Fig 3**).

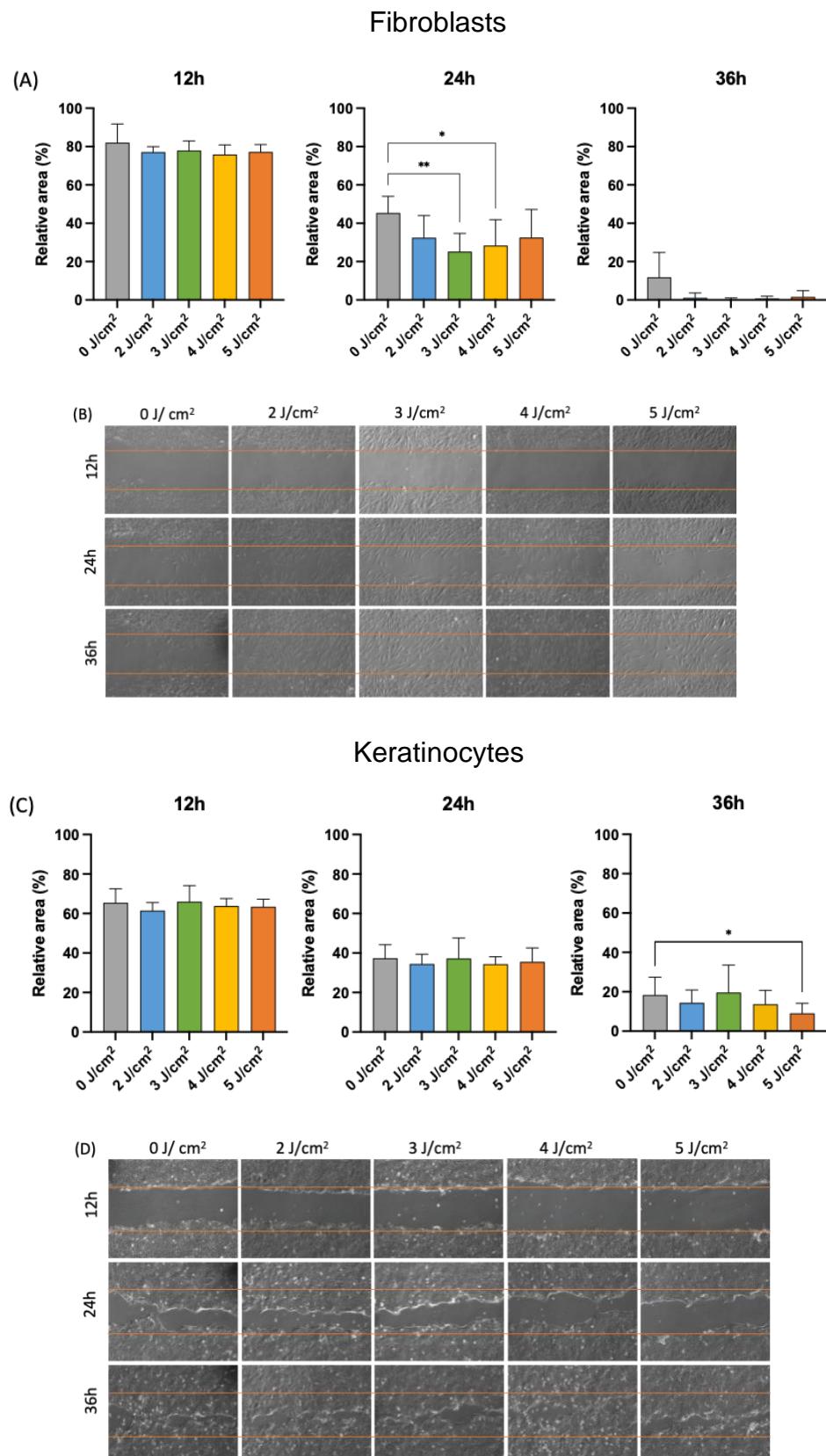
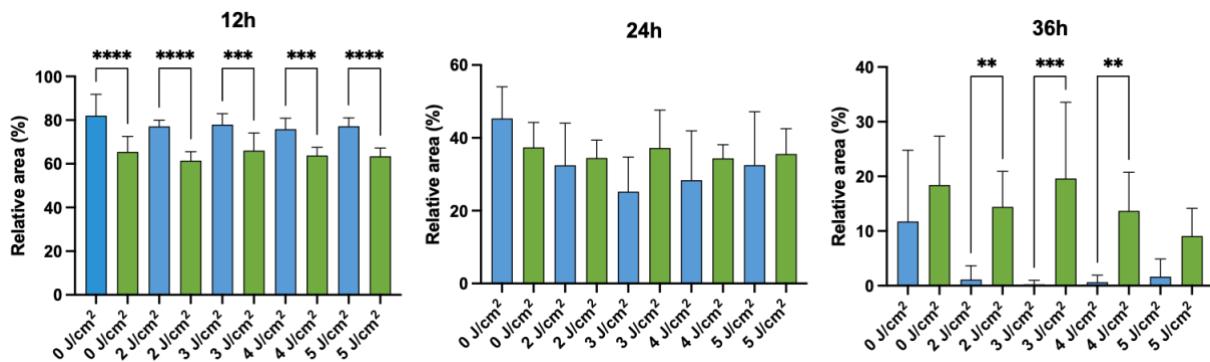


Fig 2. Wound closure in vitro model after PBMT with output power of 30 mW and different energy densities. (A) Human gingival fibroblasts in 12, 24, and 36h follow up. (B) Microscopic images of fibroblasts obtained from the scratch assay. (C) Immortalized human keratinocytes in 12, 24, and 36h follow up. (D) Microscopic images of keratinocytes obtained from the scratch assay. The graphs show the wound area expressed in percentage and compared with PBMT groups (2 J/cm²; 3 J/cm² 4 J/cm², and 5 J/cm²) and control group (0 J/cm²), in hours 12, 24, and 36.



Fibroblast differentiation marker: expression of α-SMA and Vimentin

The α-SMA stain displayed increased fluorescence in group 3 J/cm², in addition to a consistently distributed expression across the cytoplasm. Group 5 J/cm² revealed decreased fluorescence, compatible with the respective non-irradiated control group. Regarding vimentin analysis, it can be observed that all groups presented vimentin filaments, organized within the cytoplasm. Although all groups showed a positive fluorescence for vimentin, when presented in cell cytoplasm filaments, it can be stated that groups irradiated presented higher fluorescence staining (Fig 4).

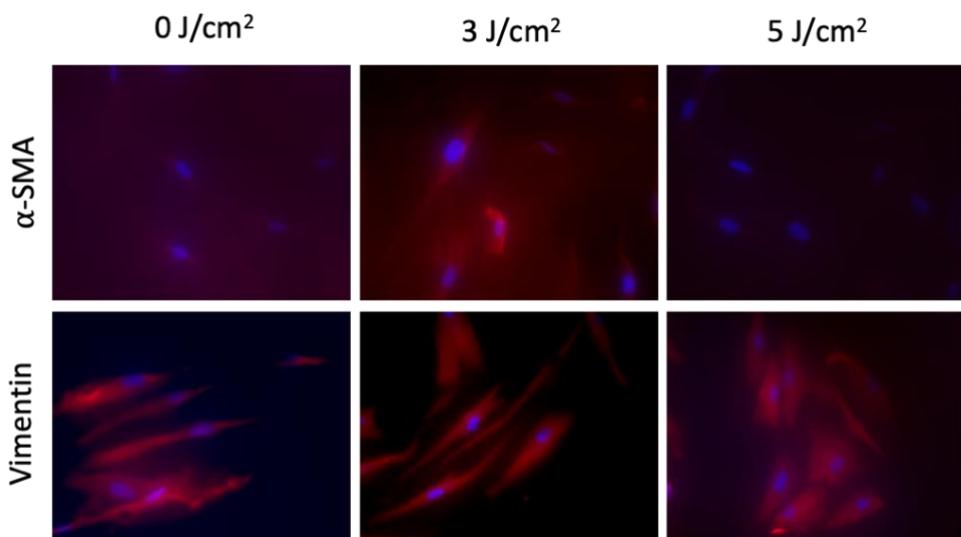


Fig 4. Fibroblasts Immunofluorescence. (A) Effects of PBMT on expression of α-SMA and (B) Nucleus area after PBMT with output power of 30 mW laser energy density of 3 J/cm² and 5 J/cm². Cells were stained with mouse anti-Vimentin (1/200, Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-Smooth Muscle Actin (1/200, α-SMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and the nuclei with diamidino-phenyl-indole (1/1000 DAPI, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Abbreviations: α-SMA: Alpha-smooth muscle actin.

PBMT influences the expression of pro-inflammatory genes

The results from RT-qPCR gene expression analysis indicated that PBMT was able to modulate genes related to pathways of interest in fibroblasts and keratinocytes. The effect of different radiation doses by low-level laser application was analyzed and presented in **Fig 5**.

In fibroblasts, when compared to control group, the differences did not reach statistical significance in expression of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* nor *NF-κB* (**Fig 5A**). While in keratinocytes, the relative expression of *IL-1β* (3 J/cm² [Mean (SD) – 4.621 (0.6547), p<0.001]; 5 J/cm² [Mean (SD) – 5.516 (0.1109), p<0.0001]), *NF-κB* (3 J/cm² [Mean (SD) – 5.467 (0.3442), p<0.001]; 5 J/cm² [Mean (SD) – 3.386 (0.7464), p<0.01]) and *TNF-α* (3 J/cm² [Mean (SD) – 5.478 (0.2133), p<0.0001]; 5 J/cm² [Mean (SD) – 4.707 (0.1541), p<0.0001]) remained higher in groups 3 and 5 J/cm², with statistical significance. It is noteworthy that 2 J/cm² and 4 J/cm² groups showed lower expression for all genes when compared to control group, lacking statistical significance (**Fig 5B**).

In inflammatory cytokines genes, group 2 J/cm², showed a tendency to enhance significantly the expression of *TNF-α* in fibroblasts [Mean (SD) – 1.694 (0.4603), p<0.01], compared to keratinocytes [Mean (SD) – 0.7656 (0.0596), p<0.01] (**Fig 6B**).

Groups 3 J/cm² and 5 J/cm² presented an increase in relative expression of *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*, and *NF-κB* in keratinocytes, compared to fibroblasts, with significant differences in group 5 J/cm² (*IL-1β* [keratinocytes: Mean (SD) – 5.516 (0.1109), p<0.0001; fibroblasts: Mean (SD) – 0.7700 (0.0211), p<0.001], *IL-6* [keratinocytes: Mean (SD) – 4.297 (0.9622), p<0.001; fibroblasts: Mean (SD) – 0.9782 (0.0148), p<0.01], *TNF-α* [keratinocytes: Mean (SD) – 4.707 (0.1541), p<0.001; fibroblasts: Mean (SD) – 1.418 (0.2383), p<0.001], and *NF-κB* [keratinocytes: Mean (SD) – 3.386 (0.7464), p<0.01; fibroblasts: Mean (SD) – 0.7219 (0.0026), p<0.01] (**Fig 6B**).

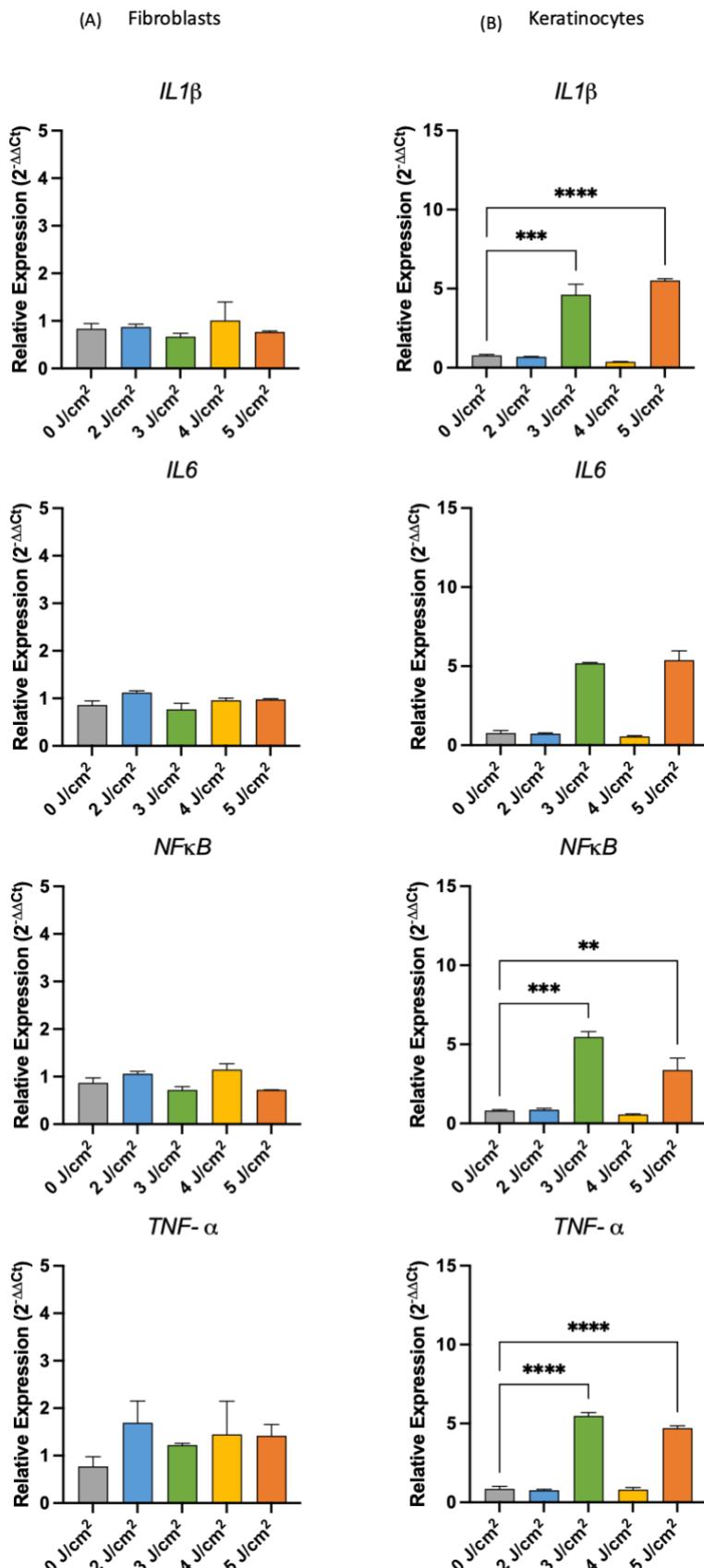


Fig 5. Pro-inflammatory cytokines relative expression profile with output power of 30 mW and different laser energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes Abbreviations: $\text{IL-1}\beta$: interleukin-1 β ; IL-6 : interleukin-6; $\text{NF}\kappa\text{B}$: Factor nuclear kappa B; $\text{TNF-}\alpha$: tumor necrosis factor α .

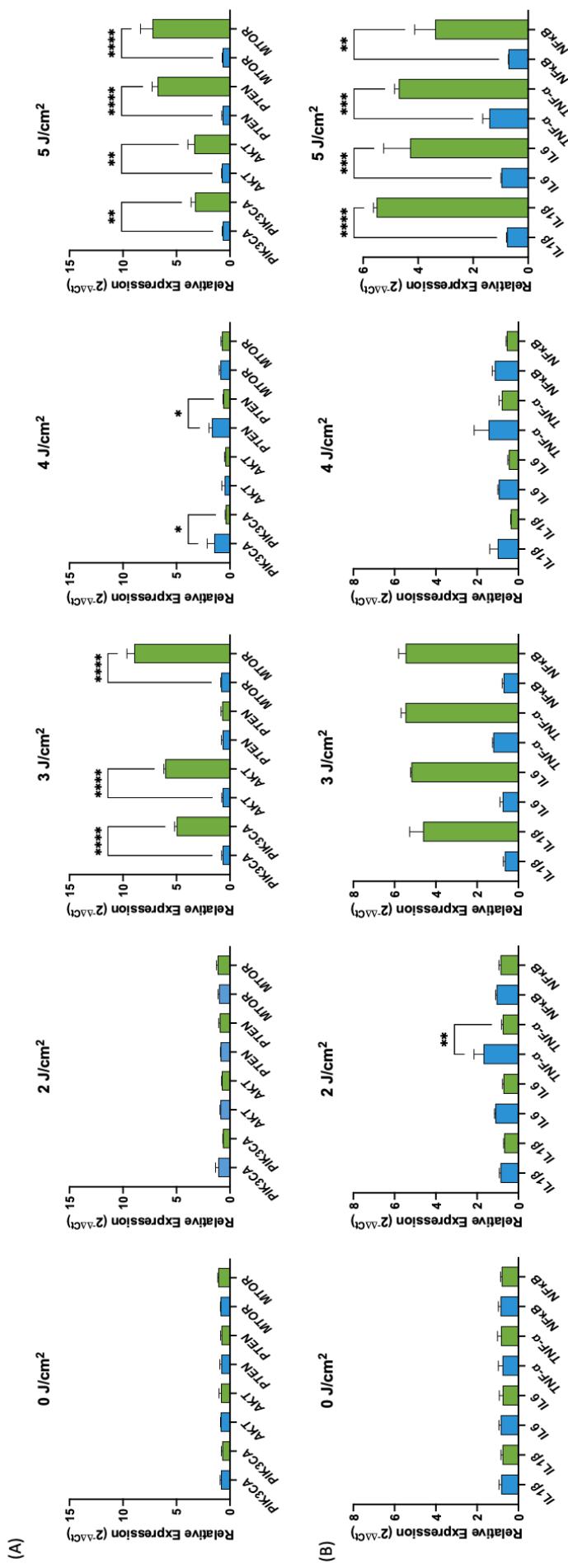


Fig 6. Comparison of fibroblasts (blue) and keratinocytes (green) in (A) PI3K/AKT/mTOR pathway genes and (B) inflammatory cytokines relative expression profile with output power of 30 mW laser energy density of 0, 2, 3, 4, and 5 J/cm^2 . Abbreviations: PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT1: protein kinase B; mTOR: mammalian target of the rapamycin; PTEN: phosphatase and tensin homolog; IL-1 β : Interleukin-1beta; IL-6: Interleukin 6; NF- κ B: Nuclear factor kappa B; TNF- α : Tumor necrosis factor alpha.

PBMT modulates the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway

To further explore the involvement of the signaling pathway in wound healing repair, gene expression was observed 24h after stressful condition stimuli and 6h after the last PBMT session. Fibroblasts and keratinocytes showed different gene expression when treated with different energy densities in PBMT. RT-qPCR results for the expression of genes involved in wound healing processes are presented in **Fig 7**.

RT-qPCR was performed to investigate the expression of genes related to the PI3K/AKT/mTOR pathway. As observed in **Fig 7**, relative expression was dependent on PBMT parameters. In fibroblasts, when groups were compared to control group, the group irradiated with 4 J/cm² presented a significative increase in relative expression of *PTEN* [Mean (SD) – 0.6921 (0.1087), p<0.05]. No statistically significant differences were observed in the comparisons of 2, 3 and 5 J/cm² (**Fig 7A**).

The expression of *PTEN*, *PIK3CA*, *AKT* and *MTOR* in keratinocytes were also altered by PBMT. Groups irradiated with energy densities of 3 J/cm² and 5 J/cm² showed a significative higher relative expression in *AKT* (3 J/cm² [Mean (SD) – 6.050 (0.1413), p<0.0001]; 5 J/cm² [Mean (SD) – 3.350 (0.5926), p<0.01]) and *MTOR* (3 J/cm² [Mean (SD) – 8.960 (0.6831), p<0.0001]; 5 J/cm² [Mean (SD) – 6.117 (0.5101), p<0.001]), compared to control group. The relative expression of *PTEN* tended to enhance in group 5 J/cm² [Mean (SD) – 6.780 (0.4946), p<0.0001]. Experimental groups 2 J/cm² and 4 J/cm² showed lower expression for all genes compared with 0 J/cm² group, although, there were no statistically significant differences among the groups (**Fig 7B**).

As observed in **Fig 6** genes that are related to the PI3K–AKT–mTOR pathway had their expression altered by PBMT differently in fibroblasts and keratinocytes. In 3 J/cm² group keratinocytes presented significative higher expression of *PIK3CA* [Mean (SD) – 4.993 (0.1943), p<0.0001], *AKT*: [Mean (SD) – 0.6050 (0.1413), p<0.0001] and *MTOR*: [Mean (SD) – 8.960 (0.6831), p<0.0001], compared to fibroblasts (*PIK3CA*: [Mean (SD) – 0.6980 (0.0958), p<0.0001]; *AKT*: [Mean (SD) – 0.6956 (0.0899), p<0.0001]; *MTOR*: [Mean (SD) – 0.8342 (0.0305), p<0.0001]) (**Fig 6A**).

Group 5 J/cm² in keratinocytes increase significatively compared to fibroblasts when *PIK3CA* gene was evaluated [keratinocytes: Mean (SD) – 3.277 (0.3606),

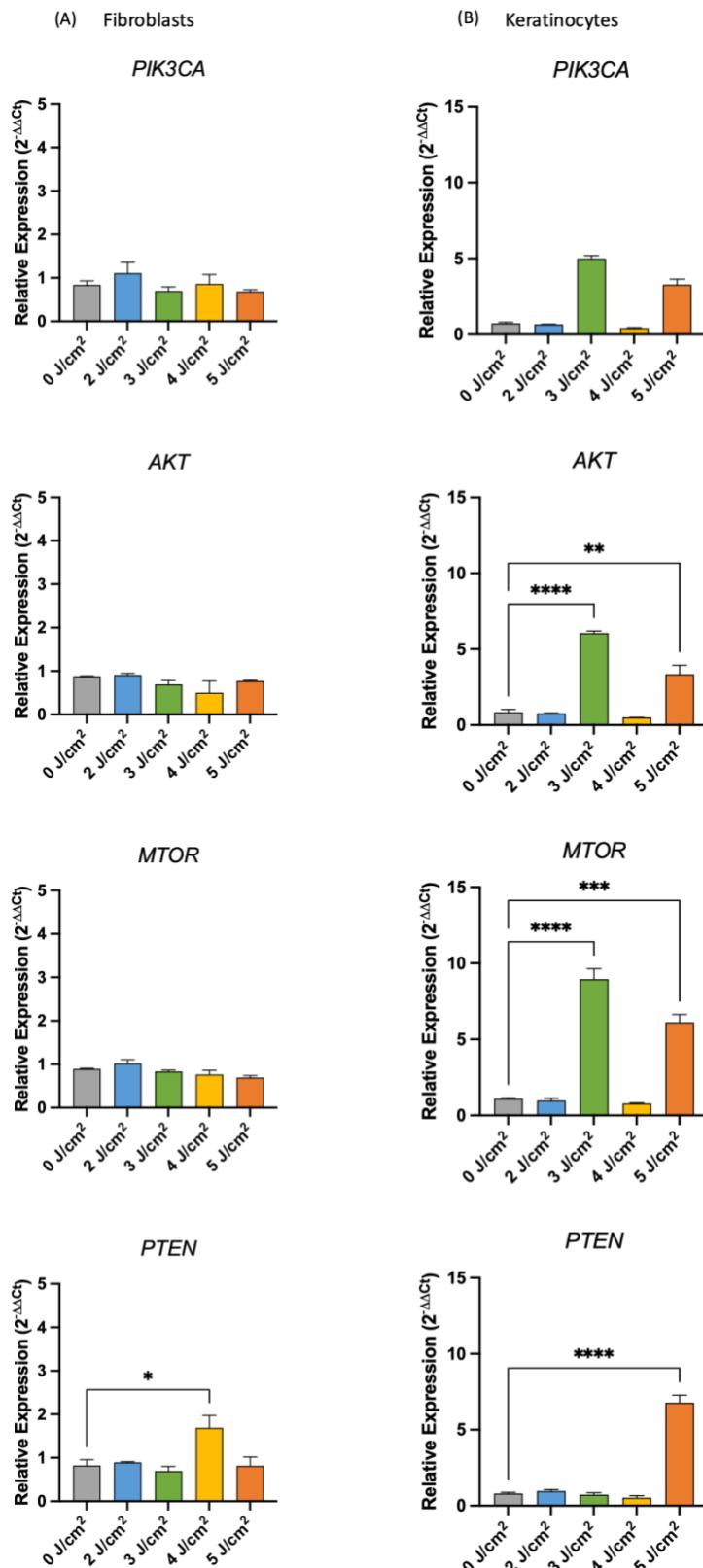


Fig 7. Gene relative expression profile with output power of 30 mW and different laser energy densities. (A) Human gingival fibroblasts (B) Immortalized human keratinocytes Abbreviations: PIK3CA: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; AKT: protein kinase-B; mTOR: mammalian target of the rapamycin; PTEN: phosphatase and tensin homolog.

$p<0.01$; fibroblasts: Mean (SD) – 0.6859 (0.0392), $p<0.01$], *AKT* [keratinocytes: Mean (SD) – 3.350 (0.5926), $p<0.01$; fibroblasts: Mean (SD) – 0.7721 (0.0155), $p<0.01$], *PTEN* [keratinocytes: Mean (SD) – 6.780 (0.4946), $p<0.0001$; fibroblasts: Mean (SD) – 0.6976 (0.0815), $p<0.0001$], and *MTOR* [keratinocytes: Mean (SD) – 7.261 (1.107), $p<0.0001$; fibroblasts: Mean (SD) – 0.6895 (0.0438), $p<0.0001$].(Fig 6A).

DISCUSSION

The present study exposes the *in vitro* effects of PBMT as a potential wound healing treatment. However, optimal laser parameters focused on cellular and molecular wound repair mechanisms are still unknown. The study aims to investigate the effects of different laser parameters to modulate inflammation and repair pathways. Since PBMT has shown great results due to its biostimulation ability (Sperandio et al., 2015; Courtois et al., 2021), delivering the right amount of energy could accelerate wound healing. In this context, it is important to study and compare the cellular and molecular effects of different laser parameters, as the primary study to a translational research.

Previous studies documented that PBMT enhances fibroblasts and keratinocytes proliferation and migration (Sperandio et al., 2015; Torres et al. 2018). It is known that wound repair depends on many cellular activities, such as keratinocytes involved in filling the gap area during wound repair, and fibroblasts, responsible for collagen production (Topaloglu, Özdemir and Çevik, 2021). Our study shows that PBMT with 30 mW enhanced cell proliferation and migration in fibroblasts and keratinocytes. The energy densities tested in this study can accelerate wound healing. However, the comparison of different energy densities has shown distinct responses in each cell. This situation can be explained by the modulation of different pathways involving in wound repair.

In fibroblasts, the 3 J/cm² group was the first one to have complete wound closure in 36h while in keratinocytes, 5 J/cm² group presented motility enhanced at the same follow up hour. Both groups showed a tendency to enhance relative expression of *TNF-α* increased by PBMT, whereas was not statistically significant. It was described that *TNF-α* role in repair is stimulate proliferation and release growth factors

which could explain the accelerate wound closure in both groups (Vilcek et al., 1986; Chen and Thibeault., 2010).

Compared to fibroblasts, keratinocytes showed migration and proliferation significantly increased in the first 12h for all groups tested. The differences were not significant in 24h while in 36h of follow up, the pattern changed. Fibroblasts presented in 36h a significative reduction in relative area in groups 2, 3 and 4 J/cm² compared to keratinocytes. Worldwide studies suggest that PBMT stimulates tissue repair and the results obtained in the scratch assays are consistent with the literature once wounds treated with PBMT tended to close earlier than control models (Fushimi et al., 2012; Solmaz, Ulgen and Gulsoy, 2017; Sperandio et al., 2015; Sutterby et al., 2022).

The PI3K/AKT/mTOR pathway is responsible for many physiological processes related to cell growth, proliferation, and apoptosis (Borges et al., 2020; Meng et al., 2020). To further explore the therapeutic window that may activate PI3K/AKT/mTOR pathway, four energy densities of the PBMT were selected and compared to control group (0 J/cm²). The protein PI3K, regulated by PTEN, activates the cascade with the phosphorylation of AKT, followed by the activation of mTOR, under normal physiological conditions (Jere, Hourel and Abrahame, 2019).

It was possible to observe a greater expression of *MTOR* in groups 3 and 5 J/cm² in keratinocytes. The expression suggests a mTOR activation in the cells, increasing cell proliferation and accelerating wound closure (Squarize et al., 2010). As analyzed in scratch assay, both groups presented a tendency to increase proliferation and migration rate. This can be explained by evaluating the role of *mTOR* in cell growth, proliferation, and survival, signaling growth factors and coordinating the cell energy to develop those functions (Khalil and Gout, 2011).

The successful wound repair happens when tissue restore the integrity by orchestrating the production of regulatory molecules and regulating the recruitment of cells involving in wound repair (Cialdai et al., 2022). The modulation of PI3K/AKT/mTOR pathway genes in fibroblasts 24h after stress induction presented no statistical difference compared to control group, except for group 4 J/cm². In this group, the expression of *PTEN*, regulator of PI3K/AKT/mTOR pathway, was significantly enhanced. Negative feedback loops within the pathway act to maintain homeostasis of PI3K and AKT, since the regulation of cellular metabolism is dependent upon them (Fruman et al., 2017).

Keratinocytes significantly increased the relative expression in group 5 J/cm² for all genes, and in group 3 J/cm² the higher expression were observed in *PIK3CA*, *AKT* and *MTOR*. It is important that chosen therapy parameters could modulate the genes between the extremes by receiving the right amount depending on healing phase. Subsequently to ionizing radiation, as the primary stress induction of *in vitro* model, *PI3K* is enhanced to promote kinase activation. This is considered an early step to response to DNA stand breaks (Zingg et al., 2004; Edwards et al., 2002).

The increase in inflammatory cytokines expression associated with cancer treatments was observed in oral mucositis by Bossi et al., even though, the role was not elucidated. The cytokines are often responsible for orchestrating the inflammation pathway in cellular response. TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NF- κ B are essential in the regenerative and protective process of the body, regulating metabolism and stimulating cell proliferation (Kany, Vollrath and Relja, 2019; Lopez-Castejon and Brough, 2011).

After stress induction, the repair pathway is activated to restore normal cell's function, increasing cell proliferation, and regulating cell survival (Fruman et al., 2017; Zingg et al., 2004). Damaged keratinocyte also express cytokines which play an important role in proliferation and immune responses, including IL-6, IL-1 β and TNF- α (Piipponen et al., 2020). The higher expression of inflammatory cytokines in keratinocytes in group treated with 3 and 5 J/cm² could be associated to an enhance in proliferation phase, as it was possible to observe in scratch assay. Although it was not significative, groups 2 and 4 J/cm² tended to decrease the expression of inflammatory cytokines, suggesting an inflammatory control.

Fibroblasts in inflammatory phase acts in wound repair, producing proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α , having its activity importance enhanced in proliferation phase (Cialdai et al., 2022). It also secrets matrix metalloproteinases (MMPs) and migrates into wounds (Cialdai et al., 2022; Mescher, 2017). Opposing keratinocytes expression, the analysis did not find a significant difference in relative expression of inflammatory cytokines in evaluated time, suggesting that for fibroblasts, densities of energy selected could not modulate the inflammation.

Keratinocytes in group 5 J/cm² showed relative gene expression of all inflammatory cytokines significantly higher compared to fibroblasts. During wound repair, keratinocytes play an important role recruiting and coordinating different cell types by cytokine secretion (Wojtowicz et al., 2014). This suggests that in healing

process, keratinocytes released inflammatory cytokines to contribute to increase cell proliferation and migration. In group 2 J/cm², fibroblasts expressed significantly higher TNF- α , compared to keratinocytes. The higher expression in fibroblasts could contribute to accelerate wound closure in this cell type, compared to keratinocytes, since TNF- α has a considerable role in proliferation (Vilcek et al., 1986; Chen and Thibeault., 2010).

Wound healing occurs in four different phases: hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation. In the proliferation phase, myofibroblasts play an important and crucial role in collagen formation. Fibroblasts starts to differentiate in myofibroblasts with the presence of cytokine TGF- β , and it is possible to identify the differentiation by the expression of α -Smooth muscle actin (α -SMA), a myofibroblast marker (Mokoena et al., 2018; Costa, 2021; Cialdai et al., 2022). Myofibroblasts are the leaders of the remodeling phase, regulating wound contraction and tissue remodeling. The contractile properties support wound contraction and increase production of MMPs and extracellular matrix (ECM) proteins, consolidating the properties when myofibroblasts incorporate α -SMA into the stress fibers (Bernardo & Fibbe, 2013; Cialdai et al., 2022). Since PBMT effects depends on parameters applied, it was possible to observe the different expressions of α -SMA in proposed groups. In accordance with our results, other authors have found an increase in the expression of α -SMA, when influenced by PBMT through the Smad pathway and its role mediating wound healing. However, different laser parameters and cell lines were used in the analysis (Mokoena et al., 2018; Amaroli et al., 2018; Arany et al., 2007; Ruh et al., 2018; Keskiner et al., 2016; Mokoena et al., 2020).

Selecting the optimal parameter is important to observe the expected result and understanding the cellular and molecular mechanism of action must be the main objective of researchers. Each energy density analyzed were able to contribute to wound repair at some point. The authors suggest that researchers must work with an energy density interval, fluctuating between sessions, focusing on repair phases to select the PBMT best operation.

CONCLUSION

PBMT at 660 nm, an output power of 30 mW and energy densities of 2, 3, 4, and 5 J/cm² were effective to stimulate cell migration, proliferation, and acceleration of

wound healing, and it is a promising therapy in *in vitro* models. Densities of energy of 3 and 4 J/cm², in fibroblasts, and 5 J/cm², in keratinocytes stimulated cell migration and proliferation. The greater expression of α-SMA was observed when 3 J/cm² were applied. In addition, densities of 4 J/cm² in fibroblasts and 5 J/cm² in keratinocytes increased the expression of *PTEN* while energy densities of 3 and 5 J/cm² showed higher gene expression of *AKT* and *MTOR* compared to control. Fibroblasts did not present differences in inflammatory cytokine expression. In keratinocytes, groups 3 and 5 J/cm² showed significantly higher expression of *TNF-α*, *IL-1β*, and *NF-κB*. Establishing an energy density interval and fluctuate in each session could gather the best PBMT response.

Funding and acknowledgments

This study received financial support by DGP – UnB (Graduate Dean of the University of Brasilia) nº 0004/2021 in the name of J. Amorim dos Santos. The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication: J. Amorim dos Santos and M.M. Monteiro are supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Brazil. V. Paiva Barbosa and E.N.S. Guerra are supported by the CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), Ministry of Education, Brazil.

REFERENCES

1. Lalla RV, Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2019 Aug; 1;2019(53):lgz011. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz011. PMID: 31425601.
2. Kusiak A, Jereczek-Fossa BA, Cichońska D, Alterio D. Oncological-Therapy Related Oral Mucositis as an Interdisciplinary Problem-Literature Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Apr 3;17(7):2464. doi: 10.3390/ijerph17072464. PMID: 32260309; PMCID: PMC7177874.
3. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin*.

- Cancer J Clin. 2022 Jan;72(1):57-77. doi: 10.3322/caac.21704. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34714553.
4. Sonis ST. Oral mucositis. Anticancer Drugs. 2011 Aug;22(7):607-12. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283462086. PMID: 21709615.
5. Daugėlaitė G, Užkuraitytė K, Jagelavičienė E, Filipauskas A. Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. Medicina (Kaunas). 2019 Jan 22;55(2):25. doi: 10.3390/medicina55020025. PMID: 30678228; PMCID: PMC6410239.
6. Hong BY, Sobue T, Choquette L, Dupuy AK, Thompson A, Burleson JA, Salner AL, Schauer PK, Joshi P, Fox E, Shin DG, Weinstock GM, Strausbaugh LD, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Diaz PI. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. Microbiome. 2019 Apr 25;7(1):66. doi: 10.1186/s40168-019-0679-5. PMID: 31018870; PMCID: PMC6482518.
7. Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, Strano S. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. J Exp Clin Cancer Res. 2020 Oct 7;39(1):210. doi: 10.1186/s13046-020-01715-7. PMID: 33028357; PMCID: PMC7542970.
8. Courtois E, Bouleftour W, Guy JB, Louati S, Bensadoun RJ, Rodriguez-Lafrasse C, Magné N. Mechanisms of PhotoBioModulation (PBM) focused on oral mucositis prevention and treatment: a scoping review. BMC Oral Health. 2021 Apr 29;21(1):220. doi: 10.1186/s12903-021-01574-4. PMID: 33926421; PMCID: PMC8086292.
9. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE (2016) Could the biological robustness of low-level laser therapy (photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 54:7-14. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.01.005>
10. Pellicoli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt*. 2014 Feb;19(2):028002. doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028002.
11. Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M (2020) Photobiomodulation and oral mucositis: a systematic review. *Dent J (Basel)* 8(3):87. <https://doi.org/10.3390/dj8030087>
12. Monteiro, M.M., Amorim dos Santos, J., Paiva Barbosa, V. et al. Effects of different photobiomodulation therapy doses on cell viability after bacterial and ionizing

- radiation-induced stress: a pilot in vitro study. *Laser Dent Sci* 6, 205–210 (2022). <https://doi.org/10.1007/s41547-022-00162-1>
13. Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodri- gues MFSD, Moura-Netto C, Marques MM (2019) Short-term evaluation of photobiomodulation therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci* 34(4):659–666. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-z>
14. Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG. Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With *Porphyromonas gingivalis* Protein Extract. *J Periodontol.* 2017 Nov;88(11):e188- e199. doi: 10.1902/jop.2017.170116. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28644106.
15. Sperandio FF, Simões A, Corrêa L, Aranha AC, Giudice FS, Hamblin MR, Sousa SC. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics.* 2015 Oct;8(10):795-803. doi: 10.1002/jbio.201400064. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25411997; PMCID: PMC4583360.
16. Torres P, Castro M, Reyes M, Torres VA (2018) Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Dis* 24(7):1150-1160. doi: 10.1111/odi.12816.
17. Topaloglu N, Özdemir M, Çevik ZBY. Comparative analysis of the light parameters of red and near-infrared diode lasers to induce photobiomodulation on fibroblasts and keratinocytes: An in vitro study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2021 May;37(3):253-262. doi: 10.1111/phpp.12645. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33332651.
18. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, Tsujimoto M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med.* 1986 Mar 1;163(3):632-43. doi: 10.1084/jem.163.3.632. PMID: 3512757; PMCID: PMC2188056.
19. Chen X, Thibeault SL. Role of tumor necrosis factor-alpha in wound repair in human vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope.* 2010 Sep;120(9):1819-25. doi: 10.1002/lary.21037. PMID: 20715091; PMCID: PMC2965638.
20. Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen.* 2012 Mar-Apr;20(2):226-35. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x. PMID: 22380691.

21. Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2017 May;32(4):903-910. doi: 10.1007/s10103-017-2191-0. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28321647.
22. Sutterby E, Chheang C, Thurgood P, Khoshmanesh K, Baratchi S, Pirogova E. Investigating the effects of low intensity visible light on human keratinocytes using a customized LED exposure system. *Sci Rep.* 2022 Nov 7;12(1):18907. doi: 10.1038/s41598-022-23751-3. PMID: 36344673; PMCID: PMC9640685.
23. Borges GA, Elias ST, Amorim B, de Lima CL, Coletta RD, Castilho RM, Squarize CH, Guerra ENS. Curcumin downregulates the PI3K-AKT-mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. *Phytother Res.* 2020 Dec;34(12):3311-3324. doi: 10.1002/ptr.6780. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32628350.
24. Meng C, Xia Q, Wu H, Huang H, Liu H, Li Y, Zhang F, Song W. Photobiomodulation with 630-nm LED radiation inhibits the proliferation of human synoviocyte MH7A cells possibly via TRPV4/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2020 Dec;35(9):1927-1936. doi: 10.1007/s10103-020-02977-5. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32162133.
25. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019 Dec;50:52-59. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.03.001. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30890300.
26. Squarize CH, Castilho RM, Bugge TH, Gutkind JS. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One.* 2010 May 13;5(5):e10643. doi: 10.1371/journal.pone.0010643. PMID: 20498714; PMCID: PMC2869363.
27. Khalil M, Gout I. Overexpression or downregulation of mTOR in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2012;821:87-103. doi: 10.1007/978-1-61779-430-8_7. PMID: 22125062.
28. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Oct 4;10:958381. doi: 10.3389/fbioe.2022.958381. PMID: 36267456; PMCID: PMC9578548.
29. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017 Aug 10;170(4):605-635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029. PMID: 28802037; PMCID: PMC5726441.

30. Zingg D, Riesterer O, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruschy M. Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5398-406. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3369. PMID: 15289348.
31. Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4671-7. PMID: 12183424.
32. Bossi P, Bergamini C, Miceli R, Cova A, Orlandi E, Resteghini C, Locati L, Alfieri S, Imbimbo M, Granata R, Mariani L, Iacovelli NA, Huber V, Cavallo A, Licita L, Rivoltini L. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016 Dec 1;96(5):959-966. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.08.047. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27745982.
33. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28;20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008. PMID: 31795299; PMCID: PMC6929211.
34. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189-95. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Epub 2011 Oct 22. PMID: 22019906; PMCID: PMC3714593.
35. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790. doi: 10.3390/ijms21228790. PMID: 33233704; PMCID: PMC7699912.
36. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf).* 2017 Jun 6;4(2):39-53. doi: 10.1002/reg2.77. PMID: 28616244; PMCID: PMC5469729.
37. Wojtowicz AM, Oliveira S, Carlson MW, Zawadzka A, Rousseau CF, Baksh D. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014 Mar-Apr;22(2):246-55. doi: 10.1111/wrr.12154. PMID: 24635175; PMCID: PMC4211362.
38. Mokoena D, Dhilip Kumar SS, Houreld NN, Abrahamse H. Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. *J Photochem Photobiol B.* 2018 Dec;189:138-144. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.011. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30343208.

39. Costa, Cláudio Rodrigues Rezende. Caracterização morfológica de tecidos e fibroblastos gengivais de pacientes com síndrome Esmalte Renal e síndrome de Raine. 2021. 153 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2021.)
40. Bernardo, M. E., and Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* 13 (4), 392–402. doi:10.1016/j.stem.2013.09.006
41. Amaroli A, Agas D, Laus F, Cuteri V, Hanna R, Sabbieti MG, Benedicenti S. The Effects of Photobiomodulation of 808 nm Diode Laser Therapy at Higher Fluence on the in Vitro Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Front Physiol.* 2018 Feb 23;9:123. doi: 10.3389/fphys.2018.00123. PMID: 29527174; PMCID: PMC5829029.
42. Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007 Nov-Dec;15(6):866-74. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00306.x. PMID: 18028135.
43. Ruh AC, Frigo L, Cavalcanti MFXB, Svidnicki P, Vicari VN, Lopes-Martins RAB, Leal Junior ECP, De Isla N, Diomedé F, Trubiani O, Favero GM. Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):165-171. doi: 10.1007/s10103-017-2384-6. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29181642.
44. Keskiner I, Lutfioğlu M, Aydogdu A, Saygun NI, Serdar MA. Effect of Photobiomodulation on Transforming Growth Factor- β 1, Platelet-Derived Growth Factor-BB, and Interleukin-8 Release in Palatal Wounds After Free Gingival Graft Harvesting: A Randomized Clinical Study. *Photomed Laser Surg.* 2016 Jun;34(6):263-71. doi: 10.1089/pho.2016.4094. Epub 2016 Apr 18. Erratum in: *Photomed Laser Surg.* 2018 Jan;36(1):58. PMID: 27088277; PMCID: PMC4892223.
45. Mokoena DR, Houreld NN, Dhilip Kumar SS, Abrahamse H. Photobiomodulation at 660 nm Stimulates Fibroblast Differentiation. *Lasers Surg Med.* 2020 Sep;52(7):671-681. doi: 10.1002/lsm.23204. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31820475.

Appendix 1. Primers' sequences and characteristics used for RT-qPCR.

Name	Sequence	Scale	Purification
PIK3CA_F	CCACGACCATCATCAGGTGAA	100 nm	STD
PIK3CA_R	CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT	100 nm	STD
mTOR_F	GCAGATTGCCAACTATCTTCGG	100 nm	STD
mTOR_R	CAGCGTAAAAGTGTCCCCTG	100 nm	STD
AKT1_F	TCCTCCTCAAGAACATGGCA	100 nm	STD
AKT1_R	GTGCGTTCGATGACAGTGGT	100 nm	STD
PTEN_F	TTTGAAGACCATAACCCACCAC	100 nm	STD
PTEN_R	ATTACACCAGTTCGTCCCTTC	100 nm	STD
β-ACTIN_F	TCACCCACACTGTGCCATCTACG	100 nm	STD
β-ACTIN_R	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG	100 nm	STD
IL-1β_F	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	100 nm	STD
IL-1β_R	GTCGGAGATTCTAGCTGGA	100 nm	STD
IL-6_F	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	100 nm	STD
IL-6_R	TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA	100 nm	STD
NF-kappa B_F	AACAGAGAGGATTCTGTTCCG	100 nm	STD
NF-kappa B_R	TTTGACCTGAGGGTAAGACTTCT	100 nm	STD
TNF-α_F	GGAGAAGGGTGACCGACTCA	100 nm	STD
TNF-α_R	CTGCCAGACTCGGCAA	100 nm	STD

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Os efeitos da fotobiomodulação dependem de parâmetros como potência, densidade de energia, comprimento de onda, área do spot e tempo de exposição. A definição desses parâmetros torna-se então imprescindível para o tratamento de lesões de mucosa oral (Anders et al. 2015; Zaccara et al. 2015).

Na mucosite oral, a fotobiomodulação é usada para acelerar todas as fases do reparo. Primeiramente, possui eficácia na eliminação de microorganismos e angiogênese, o que facilita a migração de células de defesa. Em seguida, as espécies reativas de oxigênio (ROS) ativam as plaquetas e atuam junto com o óxido nítrico (NO), sinalizando vias e levando ao recrutamento e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, o aumento de ATP e de NO induz a migração celular, proliferação, inibição da apoptose e angiogênese. Por fim, ocorre a formação de colágeno pelos miofibroblastos, promovendo, assim, uma aceleração no fechamento das lesões (Courtois et al. 2021).

Se considerarmos que para ocorrer o reparo tecidual é necessário que ocorra a migração e proliferação celular, devemos entender os efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação, para então entender o processo de cascata desencadeado por esse tratamento (Torres et al. 2018).

No presente estudo, foram investigadas e comparadas diferentes densidades de energias no processo de reparo de feridas. A densidade de energia é a quantidade de energia transferida por área, sendo assim, sua alteração influencia de forma significativa na quantidade de energia total enviada aos tecidos. Por isso, sua comparação e compreensão são de extrema importância no âmbito clínico.

A comparação entre as diferentes densidades de energia entregues no modelo *in vitro*, proporcionou respostas diferentes em fibroblastos gengivais e queratinócitos em todos os ensaios realizados.

Na literatura, existem quatro possíveis mecanismos de ação da fotobiomodulação. O primeiro mecanismo diz respeito à produção de ATP. Por conseguinte, a absorção de luz pela citocromo c oxidase (Cco) aumenta a transferência de elétrons na cadeia respiratória, aumentando a produção de ATP. Um

aumento na produção de ATP, por menor que seja, é capaz de aumentar a biodisponibilidade, aumentando as funções do metabolismo celular.

O segundo mecanismo aborda as duas atividades enzimáticas da Cco, sendo elas, a conversão de dióxido de nitrogênio (NO_2^-) em óxido nítrico (NO), e a redução de oxigênio (O_2) em água (H_2O). A fotobiomodulação, por sua vez, aumenta a produção de NO e dissocia da Cco, deixando maior quantidade de NO livre. O NO estimula então a vasodilatação e a transcrição de genes que estão envolvidos no reparo (Courtois et al. 2021; Karu and Kolyakov, 2005).

O terceiro mecanismo envolve as ROS. A fotobiomodulação tem uma ação antagonista na produção de ROS. Inicialmente, ela aumenta a oxidação, enquanto desregula a produção de ROS e a desintoxicação feita pelo próprio sistema. Em seguida, ocorre uma adaptação desse sistema, reduzindo o estresse oxidativo. Isso ocorre com maiores efeitos nas células em hipoxia, estresse, ou lesão, quando comparado a células normais. As ROS tem um papel importante na sinalização de vias, ciclo celular, síntese de proteínas e ativação de enzimas, porém, mesmo em pequena concentração, tem capacidade de gerar lesão celular, quebrar fitas de DNA e fragmentar proteínas. (Sonis, 2011; Karu and Kolyakov, 2005).

No quarto mecanismo de ação, parte da energia é convertida em calor, promovendo um efeito térmico, entretanto, são encontradas poucas evidências e discussões na literatura (Sonis, 2011; Courtois et al. 2021).

Atualmente, não existe um consenso em relação aos parâmetros do laser, utilizados no tratamento e prevenção da mucosite oral. Não obstante, a condução de estudos com foco em observar as diferenças da aplicação desses parâmetros têm sido de interesse na literatura (Marques et al. 2016, AlGhamdi et al. 2021). Nesse contexto, estudos *in vitro* são capazes de auxiliar na individualização das respostas e na identificação de moléculas alvo, de forma a buscar os melhores protocolos para a padronização e replicação, considerando os parâmetros de aplicação do laser e a resposta clínica esperada, inclusive, com diferentes equipamentos (Marques et al. 2016, AlGhamdi et al. 2021).

Nesse diapasão, faz-se necessária a comparação de diferentes protocolos, para que se possa determinar uma combinação dos parâmetros do laser de baixa

potência dentro de um intervalo de resposta, nos diferentes tipos celulares, visando obter uma melhor aplicação clínica.

Diante do exposto, as perspectivas futuras incluem a avaliação da expressão de proteínas, bem como a análise da resposta celular em modelos de co-cultura, incluindo fibroblastos e queratinócitos, tendo em vista os possíveis efeitos da interação celular. A hipótese é que essa interação contribuirá para um aumento na expressão de proteínas envolvidas no reparo tecidual, maior controle da inflamação e aceleração do reparo.

6. CONCLUSÕES

O estudo mostrou que a fotobiomodulação com o laser configurado em 660 nm de comprimento de onda, e densidades de energia de 2, 3, 4 e 5 J/cm², pode modular positivamente o reparo das feridas, atuando na migração, proliferação celular e expressão gênica de citocinas inflamatórias e das vias de sinalização do processo de reparo.

Os resultados obtidos pela utilização do comprimento de onda de 660 nm, em quatro sessões de aplicação de laser, com intervalo de 6 horas entre cada sessão, sugerem que a potência de 30 mW, com maior tempo de aplicação, apresenta melhores resultados na viabilidade celular de fibroblastos gengivais humanos, quando comparado a mesma densidade de energia e potência de 40 mW.

Quando selecionada a potência de 30 mW, as densidades de energia de 2, 3, 4 e 5 J/cm² se mostraram eficientes na migração e proliferação celular, acelerando o processo de fechamento das feridas. As densidades de energia de 3 e 4 J/cm², em fibroblastos, e de 5 J/cm², em queratinócitos, geraram resultados estatisticamente significativos quando comparados com os respectivos controles. A resposta dos queratinócitos, nas primeiras 12h de acompanhamento, é maior, quando comparada aos fibroblastos, entretanto, o fechamento total da ferida ocorreu primeiro nos fibroblastos.

Além disso, a expressão gênica também foi influenciada pela fotobiomodulação nas duas linhagens celulares. Nos queratinócitos, os grupos que utilizaram densidades de energia de 3 e 5 J/cm² apresentaram um aumento significativo na expressão de *AKT* e *MTOR*, sendo que o de 5 J/cm² também apresentou um aumento significativo na expressão de *PTEN*. Nos fibroblastos, a expressão de *PTEN* aumentou mediante a utilização da densidade de 4 J/cm². As citocinas inflamatórias não foram influenciadas significativamente nos fibroblastos, enquanto nos queratinócitos, foi observado aumento na expressão de *TNF-α*, *IL-1β*, e *NF-κB* nos grupos 3 e 5 J/cm². Nos fibroblastos, a maior expressão de α-SMA foi observada na utilização da densidade de 3 J/cm².

Por fim, o estudo identificou que a utilização do comprimento de onda de 660 nm, sob a potência de 30 mW, foi efetivo para estimular a migração e proliferação

celular, bem como acelerar o reparo tecidual nas linhagens testadas. A fotobiomodulação é considerada uma terapia promissora, principalmente pela capacidade de modular vias envolvidas no reparo do tecido. Entretanto, observou-se que diferentes densidades de energia apresentam diferentes respostas. Com isso, sugere-se a definição de um intervalo de densidade de energia, que pode variar entre as sessões, de acordo com as fases do reparo do tecido, para que se obtenha o melhor desempenho da fotobiomodulação. Assim, entender o efeito biológico de cada parâmetro do laser é fundamental para melhorar estratégias de tratamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albiero ML, Stipp RN, Saito MT, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG. Viability and Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Progenitor Cells Are Maintained After Incubation With *Porphyromonas gingivalis* Protein Extract. *J Periodontol.* 2017 Nov;88(11):e188- e199. doi: 10.1902/jop.2017.170116. Epub 2017 Jun 23. PMID: 28644106.
2. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 1996;15:6541–6551.
3. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA (2021) Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 1:237–249. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2>
4. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM (2001) Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 29:179–184
5. Amaroli A, Agas D, Laus F, Cuteri V, Hanna R, Sabbieti MG, Benedicenti S. The Effects of Photobiomodulation of 808 nm Diode Laser Therapy at Higher Fluence on the in Vitro Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. *Front Physiol.* 2018 Feb 23;9:123. doi: 10.3389/fphys.2018.00123. PMID: 29527174; PMCID: PMC5829029.
6. Anders JJ, Lanzafame RJ, Arany PR (2015) Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomed Laser Surg* 33:183–184
7. Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007 Nov-Dec;15(6):866-74. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00306.x. PMID: 18028135.
8. Azevedo LH, de Paula EF, Moreira MS, de Paula EC, Marques MM (2006) Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci* 21(2):86–89. <https://doi.org/10.1007/s10103-006-0379-9>
9. Barboza CAG, Ginani F, Moura SD et al (2014) Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein* 12(1):75–81

10. Bernardo, M. E., and Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* 13 (4), 392–402. doi:10.1016/j.stem.2013.09.006
11. Borges GA, Elias ST, Amorim B, de Lima CL, Coletta RD, Castilho RM, Squarize CH, Guerra ENS. Curcumin downregulates the PI3K-AKT-mTOR pathway and inhibits growth and progression in head and neck cancer cells. *Phytother Res.* 2020 Dec;34(12):3311-3324. doi: 10.1002/ptr.6780. Epub 2020 Jul 6. PMID: 32628350.
12. Bossi P, Bergamini C, Miceli R, Cova A, Orlandi E, Resteghini C, Locati L, Alfieri S, Imbimbo M, Granata R, Mariani L, Iacovelli NA, Huber V, Cavallo A, Licita L, Rivoltini L. Salivary Cytokine Levels and Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients Treated With Chemotherapy and Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016 Dec 1;96(5):959-966. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.08.047. Epub 2016 Sep 6. PMID: 27745982.
13. Brea-Calvo G, Siendones E, Sanchez-Alcazar JA, de Cabo R and Navas P 2009. Cell survival from chemotherapy depends on NF-kappaB transcriptional up-regulation of coenzyme Q biosynthesis. *PLoS One* 4(4): e5301.
14. Brown TJ, Gupta A. Management of Cancer Therapy-Associated Oral Mucositis. *JCO Oncol Pract.* 2020 Mar;16(3):103-109. doi: 10.1200/JOP.19.00652. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32048926.
15. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4240–4245
16. Castilho RM, Squarize CH, Gutkind JS. Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. *Oral Dis.* 2013 Sep;19(6):551-8. doi: 10.1111/odi.12070. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23379329; PMCID: PMC4764999.
17. Chen X, Thibeault SL. Role of tumor necrosis factor-alpha in wound repair in human vocal fold fibroblasts. *Laryngoscope.* 2010 Sep;120(9):1819-25. doi: 10.1002/lary.21037. PMID: 20715091; PMCID: PMC2965638.
18. Cialdai F, Risaliti C, Monici M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Oct 4;10:958381. doi: 10.3389/fbioe.2022.958381. PMID: 36267456; PMCID: PMC9578548.
19. Costa, Cláudio Rodrigues Rezende. Caracterização morfológica de tecidos e fibroblastos gengivais de pacientes com síndrome Esmalte Renal e síndrome de

- Raine. 2021. 153 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília, Brasília, 2021.)
20. Courtois E, Bouleftour W, Guy JB, Louati S, Bensadoun RJ, Rodriguez-Lafrasse C, Magné N. Mechanisms of PhotoBioModulation (PBM) focused on oral mucositis prevention and treatment: a scoping review. *BMC Oral Health.* 2021 Apr 29;21(1):220. doi: 10.1186/s12903-021-01574-4. PMID: 33926421; PMCID: PMC8086292.
21. Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M (2020) Photobiomodulation and oral mucositis: a systematic review. *Dent J (Basel)* 8(3):87. <https://doi.org/10.3390/dj8030087>
22. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
23. Daugėlaitė G, Užkuraitytė K, Jagelavičienė E, Filipauskas A. Prevention and Treatment of Chemotherapy and Radiotherapy Induced Oral Mucositis. *Medicina (Kaunas).* 2019 Jan 22;55(2):25. doi: 10.3390/medicina55020025. PMID: 30678228; PMCID: PMC6410239.
24. de Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005 Dec;23(6):586-9. doi: 10.1089/pho.2005.23.586. PMID: 16356152.
25. Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos- Bueno MR, Eduardo Cde P, Zatz M (2008) Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 40(6):433–438. <https://doi.org/10.1002/lsm.20646>
26. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM (2007) Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med* 39:365–372
27. Edwards E, Geng L, Tan J, Onishko H, Donnelly E, Hallahan DE. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in the response of vascular endothelium to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4671-7. PMID: 12183424.
28. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan;72(1):57-77. doi: 10.3322/caac.21704. Epub 2021 Oct 29. PMID: 34714553.
29. Ferreira LS, Diniz IMA, Maranduba CMS, Miyagi SPH, Rodrigues MFSD, Moura-Netto C, Marques MM (2019) Short-term evaluation of photobiomodulation

- therapy on the proliferation and undifferentiated status of dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci* 34(4):659–666. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2637-z>
30. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I et al (1991) A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol* 11:87–91
31. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell.* 2017 Aug 10;170(4):605-635. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029. PMID: 28802037; PMCID: PMC5726441.
32. Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM (2006) Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 38:332–336
33. Fushimi T, Inui S, Nakajima T, Ogasawara M, Hosokawa K, Itami S. Green light emitting diodes accelerate wound healing: characterization of the effect and its molecular basis in vitro and in vivo. *Wound Repair Regen.* 2012 Mar-Apr;20(2):226-35. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00771.x. PMID: 22380691.
34. Hawkins D, Abrahamse H (2006) Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 24:705–714
35. Hawkins DH, Abrahamse H (2007) Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J Photo- chem Photobiol B* 88:147–155
46. Hong BY, Sobue T, Choquette L, Dupuy AK, Thompson A, Burleson JA, Salner AL, Schauer PK, Joshi P, Fox E, Shin DG, Weinstock GM, Strausbaugh LD, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Diaz PI. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. *Microbiome.* 2019 Apr 25;7(1):66. doi: 10.1186/s40168-019-0679-5. PMID: 31018870; PMCID: PMC6482518.
36. Huang YY, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose Response.* 2011;9(4):602-18. doi: 10.2203/dose-response.11-009.Hamblin. Epub 2011 Sep 2. PMID: 22461763; PMCID: PMC3315174.
37. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3 β) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019 Dec;50:52-59. doi: 10.1016/j.cytofr.2019.03.001. Epub 2019 Mar 12. PMID: 30890300.

38. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28;20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008. PMID: 31795299; PMCID: PMC6929211.
39. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005 Aug;23(4):355-61. doi: 10.1089/pho.2005.23.355. PMID: 16144476.
40. Karu, T.I. (1999). Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 49, 1–17
41. Keshri GK, Gupta A, Yadav A, Sharma SK, Singh SB. Photobiomodulation with Pulsed and Continuous Wave Near-Infrared Laser (810 nm, Al-Ga-As) Augments Dermal Wound Healing in Immunosuppressed Rats. *PLoS One.* 2016 Nov 18;11(11):e0166705. doi: 10.1371/journal.pone.0166705. PMID: 27861614; PMCID: PMC5115773.
42. Keskiner I, Lutfioğlu M, Aydogdu A, Saygun NI, Serdar MA. Effect of Photobiomodulation on Transforming Growth Factor- β 1, Platelet-Derived Growth Factor-BB, and Interleukin-8 Release in Palatal Wounds After Free Gingival Graft Harvesting: A Randomized Clinical Study. *Photomed Laser Surg.* 2016 Jun;34(6):263-71. doi: 10.1089/pho.2016.4094. Epub 2016 Apr 18. Erratum in: *Photomed Laser Surg.* 2018 Jan;36(1):58. PMID: 27088277; PMCID: PMC4892223.
43. Khalil M, Gout I. Overexpression or downregulation of mTOR in mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2012;821:87-103. doi: 10.1007/978-1-61779-430-8_7. PMID: 22125062.
44. Kusiak A, Jereczek-Fossa BA, Cichońska D, Alterio D. Oncological-Therapy Related Oral Mucositis as an Interdisciplinary Problem-Literature Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Apr 3;17(7):2464. doi: 10.3390/ijerph17072464. PMID: 32260309; PMCID: PMC7177874.
45. Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM et al (2014) MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* 120:1453–1461 5.
46. Lalla RV, Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019 Aug 1;2019(53):lgz011. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz011. PMID: 31425601.

47. Lalla RV, Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019 Aug 1;2019(53):lgz011. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz011. PMID: 31425601.
48. Li X, Lang H, Li B, Zhang C, Sun N, Lin J, Zhang J. Change in Viability and Function of Pancreatic Islets after Coculture with Mesenchymal Stromal Cells: A Systemic Review and Meta-Analysis. *J Diabetes Res.* 2020 Mar 24;2020:5860417. doi: 10.1155/2020/5860417. PMID: 32309447; PMCID: PMC7132593.
49. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189-95. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001. Epub 2011 Oct 22. PMID: 22019906; PMCID: PMC3714593.
50. Marques MM, Diniz IM, de Cara SP, Pedroni AC, Abe GL, D'Almeida-Couto RS, Lima PL, Tedesco TK, Moreira MS (2016) Photobiomodulation of dental derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Photomed Laser Surg* 34(11):500–508. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4038>
51. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP (2004) Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med* 34:260–265
52. Matic M, Lazetic B, Poljacki M et al (2003) Low level laser irradiation and its effect on repair processes in the skin. *Med Pregl* 56:137–141
53. Meneguzzo DT, Eduardo CP, Ribeiro MS, Marques MM (2008) Influence of the fractionated irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibro- blasts. *Mechanisms for Low-Light Therapy III* 6846(68460A):1– 9. <https://doi.org/10.1117/12.761220>
54. Meng C, Xia Q, Wu H, Huang H, Liu H, Li Y, Zhang F, Song W. Photobiomodulation with 630-nm LED radiation inhibits the proliferation of human synoviocyte MH7A cells possibly via TRPV4/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Lasers Med Sci.* 2020 Dec;35(9):1927-1936. doi: 10.1007/s10103-020-02977-5. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32162133.
55. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf).* 2017 Jun 6;4(2):39-53. doi: 10.1002/reg2.77. PMID: 28616244; PMCID: PMC5469729.

56. Mokoena D, Dhilip Kumar SS, Houreld NN, Abrahamse H. Role of photobiomodulation on the activation of the Smad pathway via TGF- β in wound healing. *J Photochem Photobiol B*. 2018 Dec;189:138-144. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.10.011. Epub 2018 Oct 11. PMID: 30343208.
57. Mokoena DR, Houreld NN, Dhilip Kumar SS, Abrahamse H. Photobiomodulation at 660 nm Stimulates Fibroblast Differentiation. *Lasers Surg Med*. 2020 Sep;52(7):671-681. doi: 10.1002/lsm.23204. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31820475.
58. Monteiro, M.M., Amorim dos Santos, J., Paiva Barbosa, V. et al. Effects of different photobiomodulation therapy doses on cell viability after bacterial and ionizing radiation-induced stress: a pilot in vitro study. *Laser Dent Sci* 6, 205–210 (2022). <https://doi.org/10.1007/s41547-022-00162-1>
59. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD (2005) Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation- stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med* 36:8–12
60. Moreira MS, Sarra G, Carvalho GL, Gonçalves F, Caballero-Flores HV, Pedroni ACF, Lascala CA, Catalani LH (2021) Marques MM (2021) Physical and biological properties of a chitosan hydrogel scaffold associated to photobiomodulation therapy for dental pulp regeneration: an in vitro and in vivo study. *Biomed Res Int* 25(2021):6684667. <https://doi.org/10.1155/2021/6684667>
61. Pankow S, Bamberger C, Klippel A, Werner S. Regulation of epidermal homeostasis and repair by phosphoinositide 3-kinase. *J Cell Sci*. 2006;119:4033–4046)
62. Pedroso SH, Vieira AT, Bastos RW, Oliveira JS, Cartelle CT, Arantes RM, et al. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. *Microbiol*. 2015;161(10):1950-60.
63. Pellicoli AC, Martins MD, Dillenburg CS, Marques MM, Squarize CH, Castilho RM. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J Biomed Opt*. 2014 Feb;19(2):028002. doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028002.
64. Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM (2002) Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen syn- thesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 31:263–267
65. Peterson DE, Srivastava R, Lalla RV. Oral mucosal injury in oncology patients: perspectives on maturation of a field. *Oral Dis*. 2015;21(2):133-41.

66. Piipponen M, Li D, Landén NX. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 20;21(22):8790. doi: 10.3390/ijms21228790. PMID: 33233704; PMCID: PMC7699912.
67. Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, Strano S. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020 Oct 7;39(1):210. doi: 10.1186/s13046-020-01715-7. PMID: 33028357; PMCID: PMC7542970.
68. Ruh AC, Frigo L, Cavalcanti MFXB, Svidnicki P, Vicari VN, Lopes-Martins RAB, Leal Junior ECP, De Isla N, Diomede F, Trubiani O, Favero GM. Laser photobiomodulation in pressure ulcer healing of human diabetic patients: gene expression analysis of inflammatory biochemical markers. *Lasers Med Sci.* 2018 Jan;33(1):165-171. doi: 10.1007/s10103-017-2384-6. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29181642.
69. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H et al (2000) Low- intensity laser therapy: a review. *J Invest Med* 48:312–326
70. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000 Sep 28;407(6803):538-41. doi: 10.1038/35035131. PMID: 11029009; PMCID: PMC2670482).
71. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA (2015) Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci* 30(3):1171–1174. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1436-9>
72. Solmaz H, Ulgen Y, Gulsoy M. Photobiomodulation of wound healing via visible and infrared laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2017 May;32(4):903-910. doi: 10.1007/s10103-017-2191-0. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28321647.
73. Sonis ST, Hashemi S, Epstein JB, Nair RG, Raber-Durlacher JE (2016) Could the biological robustness of low-level laser therapy (photobiomodulation) impact its use in the management of mucositis in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 54:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.01.005>
74. Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs.* 2011 Aug;22(7):607-12. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283462086. PMID: 21709615.
75. Sperandio FF, Simões A, Corrêa L, Aranha AC, Giudice FS, Hamblin MR, Sousa SC. Low-level laser irradiation promotes the proliferation and maturation of keratinocytes during epithelial wound repair. *J Biophotonics.* 2015 Oct;8(10):795-803.

- doi: 10.1002/jbio.201400064. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25411997; PMCID: PMC4583360.
76. Squarize CH, Castilho RM, Bugge TH, Gutkind JS. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One*. 2010 May 13;5(5):e10643. doi: 10.1371/journal.pone.0010643. PMID: 20498714; PMCID: PMC2869363.
77. Staffoli S, Romeo U, Amorim RNS, Migliau G, Palaia G, Resende L, Polimeni A (2017) The effects of low level laser irradiation on proliferation of human dental pulp: a narrative review. *Clin Ter* 168(5):e320–e326. <https://doi.org/10.7417/T.2017.2028>
78. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D (2008) Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast- like cells. *Wien Klin Wochenschr* 120(3–4):112–117
79. Sutterby E, Chheang C, Thurgood P, Khoshmanesh K, Baratchi S, Pirogova E. Investigating the effects of low intensity visible light on human keratinocytes using a customized LED exposure system. *Sci Rep*. 2022 Nov 7;12(1):18907. doi: 10.1038/s41598-022-23751-3. PMID: 36344673; PMCID: PMC9640685.
80. Topaloglu N, Özdemir M, Çevik ZBY. Comparative analysis of the light parameters of red and near-infrared diode lasers to induce photobiomodulation on fibroblasts and keratinocytes: An in vitro study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2021 May;37(3):253-262. doi: 10.1111/phpp.12645. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33332651.
81. Torres P, Castro M, Reyes M, Torres VA (2018) Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Dis* 24(7):1150-1160. doi: 10.1111/odi.12816.
82. Tuby H, Maltz L, Oron U (2007) Low-level laser irradiation pro- motes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med* 39:373–378
83. van Breugel HHFI, Dop Bärr PR (1992) Power density and expo- sure time of He–Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo- biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 12:528–537
84. Vidotto T, Melo CM, Castelli E, Koti M, Dos Reis RB, Squire JA. Emerging role of PTEN loss in evasion of the immune response to tumours. *Br J Cancer*. 2020 Jun;122(12):1732-1743. doi: 10.1038/s41416-020-0834-6. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32327707; PMCID: PMC7283470

85. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, Tsujimoto M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med.* 1986 Mar 1;163(3):632-43. doi: 10.1084/jem.163.3.632. PMID: 3512757; PMCID: PMC2188056.
86. Villa A, Sonis ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol.* 2015 May;27(3):159-64. doi: 10.1097/CCO.0000000000000180. PMID: 25774860.
87. Wojtowicz AM, Oliveira S, Carlson MW, Zawadzka A, Rousseau CF, Baksh D. The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014 Mar-Apr;22(2):246-55. doi: 10.1111/wrr.12154. PMID: 24635175; PMCID: PMC4211362.
88. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ÁC, Barboza CA (2015) Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci* 30(9):2259–2264. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1803-9>
89. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Bensadoun RJ, Gueiros LA, Majorana A, Nair RG, Ranna V, Tissing WJE, Vaddi A, Lubart R, Migliorati CA, Lalla RV, Cheng KKF, Elad S (2019) Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer* 27(10):3969–3983. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-04890-2>
90. Zhao H, Xing D, Chen Q. New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. *Eur J Cancer.* 2011 Dec;47(18):2750-61. doi: 10.1016/j.ejca.2011.06.031. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21741231.
91. Zhou H, Luo Y, Huang S. Updates of mTOR inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 Sep;10(7):571-81. doi: 10.2174/187152010793498663. PMID: 20812900; PMCID: PMC2980558
92. Zingg D, Riesterer O, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruscha M. Differential activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt survival pathway by ionizing radiation in tumor and primary endothelial cells. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5398-406. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3369. PMID: 15289348.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA, CAAE Nº 52278221.6.0000.0030



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de Fibroblastos Gengivais Humanos

Pesquisador: MYLENE MARTINS MONTEIRO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52278221.6.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.212.117

Apresentação do Projeto:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

"Desenho:

Para o estudo, será utilizada cultura primária de fibroblastos gengivais humanos. Serão coletados fragmentos de gengiva íntegra de 20 participantes de 18 a 25 anos. Os fragmentos deverão ser íntegros, sem inflamação e serem removidos durante procedimento odontológico a serem realizados indicados por um profissional, não estando vinculado ao projeto. Os procedimentos podem ser extração de dentes terceiros molares, inclusos ou não, extração de pré-molares, indicado pela ortodontia, ou cirurgia para instalação de implantes dentários osseointegrados. Após a coleta do explante, eles serão transportados ao laboratório em isopor contendo gelo, onde será lavado com solução salina de fosfato tamponada, fragmentado em partes de aproximadamente 1mm. Os fragmentos serão dispostos em placas e mantidos em condições ideais, em incubadora úmida, com troca regular do meio de cultura. Ao atingirem a confluência ideal, as células serão desprendidas das placas com solução de tripsina acrescida de EDTA e centrifugadas. As células poderão ser armazenadas em congelador a -80°C, sem identificação do doador, ou serem distribuídas em novas placas para realização dos experimentos ou expansão da cultura. Todas as células serão tratadas com a associação de três estímulos - lipopolissacáideos (LPS – 10g/ml) de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), extrato proteico de Porphyromonas gingivalis (Pg – 5g/ml), e 8 Gray (Gy) de radiação ionizante (RI) para a obtenção de lesão celular radioinduzida. Como tratamento, as células serão divididas em 4 grupos. O primeiro grupo será o grupo controle. O segundo grupo será tratado com 2,5 M de curcumina (referência 08511), adquirida da empresa Sigma- Aldrich (San Luis, Missouri, EUA), em forma liofilizada e com grau de pureza padrão analítico. O terceiro grupo será tratado com fotobiomodulação, utilizando um laser de baixa potência. O quarto grupo será associada a culmina ao laser de baixa potência."

Resumo:

A curcumina e a fotobiomodulação (PBM) são terapias de interesse em estudos, pelas propriedades anti-inflamatórias e de reparação tecidual. Como a sinalização da via PI3K-AKT-mTOR promove proliferação celular, estimulando regeneração, remodelação e reepitelização, a modulação dela pela aplicação de curcumina e PBM podem ser alternativas promissoras para reparo de lesões radioinduzidas. Objetiva-se analisar efeitos da curcumina e da fotobiomodulação nos processos de regeneração e reparo, em modelos in vitro, de lesões radioinduzidas. Serão utilizados queratinócitos humanos imortalizados e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos. A lesão celular será induzida com três estímulos associados, lipopolissacárido de E.coli, extrato proteico de P.gingivalis e radiação ionizante. Como tratamento modulador, serão aplicados 2,5M de curcumina (definida em estudo anterior - referência 08511, Sigma Aldrich) e PBM (a definir pelo teste de viabilidade celular), de maneira isolada e/ou associada. Para analisar os efeitos, foram propostos os grupos experimentais: Queratinócito: [1] Veículo; [2] Curcumina (2,5M); [3] PBM (dose previamente definida); [3] Curcumina (2,5M) + PBM (dose previamente definida); Fibroblasto: [1] Veículo; [2] Curcumina (2,5M); [3] PBM (dose previamente definida); [3] Curcumina (2,5M) + PBM (dose previamente definida). Serão aplicados testes de viabilidade celular, cicatrização e migração celular, e avaliada expressão gênica de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL1, IL6, NFkB) e sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. Espera-se contribuir no desenvolvimento de protocolos de tratamento para lesões radioinduzidas pela modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, incentivando o aperfeiçoamento de fármacos associados com a terapia por PBM, como alternativa clínica viável para o SUS.

Introdução:

A curcumina, polifenol isolado da círcuma longa, vem sendo estudada como uma terapia

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

promissora, tendo em vista seus efeitos biológicos com propriedades antitumorais, antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Autores revisaram uma série de ensaios clínicos mostrando os efeitos da curcumina no tratamento de diferentes doenças inflamatórias humanas, com poucos efeitos adversos. No que diz respeito ao reparo tecidual, estudos in vitro e in vivo demonstram que a aplicação tópica de preparos à base desse polifenol contribui para a redução da resposta inflamatória e acelera o fechamento de feridas. Com isso, a identificação de vias sinalizadoras que respondem à ação da curcumina é um tema de constante interesse, com o objetivo de desenvolver terapias específicas. Estudos recentes sugerem a ação da curcumina como reguladora da expressão gênica e proteica da via PI3K-AKT-mTOR em células tumorais, quando usada em altas doses. Entretanto, a sinalização dessa via, modulada por doses mais baixas de curcumina, para a obtenção de reparo tecidual, ainda não é muito explorada pela literatura. De forma similar, a fotobiomodulação (PBM) é outra opção terapêutica em recorrente foco de análise, por influenciar de forma positiva o metabolismo celular. Essa terapia consiste na emissão de fóton de luz por meio da irradiação de laser de baixa potência, com resultados promissores em termos de analgesia, imunomodulação, reparo tecidual e regeneração de lesões teciduais. A terapia por PBM a nível celular, promove ação local, regional e sistêmica, de modo que sua resposta intracelular é percebida no aumento da ação da mitocôndria, resultando em uma maior produção de adenosina trifosfato (ATP) e espécies reativas de oxigênio. Em uma revisão crítica com mais de 50 estudos avaliando a PBM na viabilidade celular, proliferação, migração e produção de citocinas e fatores de crescimento em cultura de queratinócitos, observaram que a emissão de luz nos espectros vermelho e infravermelho apresentam melhor efeito estimulatório, sendo os mais favoráveis obtidos com a aplicação de intervalos de densidade de energia entre 0,1 a 5,0 J/cm². Embora os mecanismos de ação dessa terapia ainda não estejam totalmente elucidados, assim como a curcumina, a PBM pode apresentar efeito modulador da via PI3K-AKT-mTOR. O interesse na modulação da via PI3K-AKT-mTOR como alvo para o reparo tecidual pode ser explicado pois sua sinalização promove aumento da proliferação celular, estimulando também a regeneração, remodelação e reepitelização tecidual. Considerando a lesão na molécula de DNA causada por radiação ionizante, e o consequente aumento de fatores de transcrição e de citocinas inflamatórias decorrentes da agressão celular, a modulação da resposta por meio de terapias capazes de interagir com as fases de inflamação e reparação, pode ser promissora para o tratamento de lesões radioinduzidas, como por exemplo, a mucosite oral. Dessa forma, avaliar a interação entre os efeitos da PBM e da curcumina, de maneira isolada e associada, tanto com mediadores inflamatórios, quanto como sinalizadores da via PI3K-AKT-mTOR poderá auxiliar na

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

identificação de novas terapias e na explanação dos mecanismos de ação a elas atribuídos. Portanto, o presente projeto tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, para os processos de regeneração e reparo em modelo in vitro de lesão radioinduzida.

Hipótese:

Espera-se identificar os efeitos celulares e moleculares da fotobiomodulação e da curcumina para o tratamento de lesões induzidas por radiação ionizante. Considerando os efeitos conhecidos dessas terapias, é esperado que a associação das duas opções terapêuticas apresente resultado superior às aplicações isoladas.

"Metodologia Proposta:

Cultura celular: Serão utilizados queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) e cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (FG). Para a cultura primária, serão coletados fragmentos de gen- giva íntegra de 20 participantes de 18 a 25 anos. Os fragmentos deverão ser íntegros, sem inflamação e serão removidos durante procedimento odontológico a serem realizados indicados por um profissional, não estando vinculado ao projeto. Após a coleta do explante, eles serão transportados ao laboratório imerso e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico e antifúngico, em isopor contendo gelo, onde será lavado com solução salina de fosfato tamponada e fragmentado em partes de aproximadamente 1mm. Os fragmentos serão dispostos em placas e mantidos em condições ideais, em incubadora úmida, com troca regular do meio de cultura. Ao atingirem a confluência ideal, as células serão desprendidas das placas com solução de tripsina acrescida de EDTA e centrifugadas para o estabelecimento da cultura. Um vez estabelecida, as células poderão ser armazenadas em congelador a -80°C, sem identificação do doador, ou serem distribuídas em novas placas para realização dos experimentos ou expansão da cultura. Modelo de Lesão Radio-induzida: Inicialmente, todas as células serão tratadas com a associação de três estímulos - lipopolissacáridos (LPS – 10g/ml) de Escherichia coli 0111:B4 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), extrato proteico de Porphyromonas gingivalis (Pg – 5g/ml), e 8 Gray (Gy) de radiação ionizante (RI) para a obtenção de lesão celular radioinduzida. Esse modelo foi proposto em estudo anterior do Laboratório de Histopatologia Bucal da UnB e será replicada para novas análises. Curcumina: Como tratamento modulador da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, serão utilizados 2,5 M de curcumina (referência 08511), adquirida da empresa Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EUA), em forma liofilizada e com grau de pureza padrão analítico. Essa

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

concentração foi definida de acordo com a curva dose-resposta, previamente desenvolvida e publicada por Borges et al. 2020, optando-se pelo valor da tabela IC50, que corresponde à concentração imediatamente anterior ao início da citotoxicidade de cada fármaco. Fotobiomodulação – curva dose -resposta: Para definir a dose ideal da terapia por fotobiomodulação, quatro densidades de energia (2 J/cm², 3 J/cm², 4 J/cm² e 5 J/cm²) serão avaliadas por teste de viabilidade celular. Para isso, após o estímulo de lesão radio-induzida, as células serão irradiadas com laser de baixa potência, em comprimentos de onda nos espectros vermelho (660nm) e infravermelho (808nm), isolados e/ou associados. Após 24h, serão adicionados 10L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço. Decorridas 4 horas, o meio de cultura será aspirado e 100L de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104L de HCl 100%) serão adicionados em cada poço. As placas serão então agitadas em velocidade baixa e, em seguida, a absorbância será aferida em espectrofotômetro Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A dose que apresentar melhor resultado para a viabilidade celular será selecionada para a continuação dos experimentos.

Critério de Inclusão:

Pacientes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 25 anos; Fragmento de gengiva íntegra, sem inflamação, removida durante extração de dentes terceiros molares inclusos ou não com indicação de exodontia; Fragmento de gengiva sem inflamação removida durante extração de dentes pré-molares com indicação ortodôntica de exodontia; Fragmento de gengiva sem inflamação removida durante cirurgia para instalação de implantes dentários osseointegrados; Estar de acordo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Critério de Exclusão:

Gengiva com aspecto clínico de inflamação"

"Metodologia de Análise de Dados:

Teste de Viabilidade Celular: Após 24h da aplicação dos tratamentos, serão adicionados 10L de solução de MTT (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço. Após 4 horas, o meio de cultura será aspirado e 100L de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104L de HCl 100%) serão adicionados em cada poço. As placas serão então agitadas em velocidade baixa e, em seguida, a absorbância será aferida em espectrofotômetro

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

Thermo Plate TP Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).Imunofluorescência (morfologia celular): Após 24h da aplicação dos tratamentos, as células serão fixadas com 2mL de paraformaldeído 3%, lavadas e reagidas com solução de bloqueio. Para avaliar a distribuição de F actina, as lamínulas serão preparadas com coloração por faloídina; para analisar os filamentos intermediários, as células serão reagidas com anticorpos desenvolvidos para Citoqueratina 10 e 14 nos queratinócitos, e Vimentina nos fibroblastos, seguido dos anticorpos secundários. Os núcleos celulares serão corados (Hoechst 33342 - Thermo Fisher Scientific) e as lamínulas serão fixadas com Fluroshield. A análise será realizada em microscópio de imunofluorescência (Nikon Eclipse 80i), as imagens registradas através de uma câmera digital monocromática acoplada (QImaging ExiAqua) e a quantificação realizada com o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD).Teste de Cicatrização e Migração Celular (Scratch assay)As monocamadas celulares 100% confluentes serão arranhadas manualmente com uma ponta de pipeta (200 L), lavadas com PBS e tratadas de acordo com os grupo experimentais. Um microscópio invertido (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha) equipado com câmera digital (Zeiss ERc 5s, Göttingen, Alemanha) será usado para obter 12 imagens de grupo a cada 12h, a partir do tempo 0h até o fechamento completo da ferida. Expressão gênica (citocinas inflamatórias e PTEN, AKT, mTOR e PIK3CA)Após 24h da aplicação dos tratamentos, a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL1, IL6, NFkB) e de sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR será avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-qPCR). A extração do RNA total será feita de acordo com o método estabelecido pelo TRizol® (Invitrogen), seguida da síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), e amplificação por qPCR com o kit PowerUp® SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Análise estatística: As análises serão realizadas com o GraphPad Prism versão 9.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Para comparações múltiplas, serão utilizados os métodos one-way ou two-way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey. Para análise entre dois grupos, será realizado o teste de normalidade, sendo aplicado o Teste T para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. O critério de significância será o valor $p<0,05$.

Desfecho Primário:

A pesquisa básica visa ao primeiro passo para o desenvolvimento de protocolos de tratamento de lesões radioinduzidas por meio da modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR. A associação da terapia à laser com a curcumina, poderá incentivar protocolos duais, não apenas com foco na fase

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB



Continuação do Parecer: 5.212.117

profissional-dependente, mas também com a utilização domiciliar de fármacos de fácil acesso, sendo uma alternativa clínica viável para Sistema Único de Saúde (SUS). A criação de protocolos que podem ser utilizados na prevenção ou tratamento de lesões radioinduzidas poderá refletir em uma melhor qualidade de vida de pacientes oncológicos que devem ser submetidos a tratamentos de radioterapia ou quimioterapia. A promoção do reparo dessas lesões pode contribuir para uma melhor alimentação, comunicação e deglutição, assim como sua negligência pode levar a inviabilização da continuidade do tratamento proposto para o câncer. Além disso, a identificação dos alvos terapêuticos melhora a saúde do paciente, não apenas no âmbito da odontologia, mas também em outras áreas da saúde, uma vez que essas lesões podem levar à necessidade de hospitalizações para controle da infecção, manejo da dor e nutrição parenteral, aumentando os custos do tratamento.

Tamanho da Amostra no Brasil: 20.

Data do Primeiro Recrutamento: 10/02/2022"

"Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Sim

Justificativa:

O Projeto de Pesquisa será realizado com fragmentos gengivais obtidos em cirurgias orais tais como extrações dentárias e instalação de implantes e cedidos pelos pacientes ou pelos responsáveis. Durante a realização dos experimentos e após sua conclusão, as células serão armazenadas em congelador à -80°C, sem identificação do doador. A autorização do participante para o armazenamento das células encontra-se em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, o material armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos."

Objetivo da Pesquisa:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

"Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, nos processos de regeneração e reparo em modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de fibroblastos gengivais.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar os efeitos isolados e associados das terapias por fotobiomodulação e o uso da curcumina na modulação da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, com foco no reparo tecidual após estímulo radio-induzido; b) Avaliar a morfologia, a viabilidade, a produção de células tronco e o potencial de proliferação e migração celular dos tratamentos com fotobiomodulação e curcumina, isolados e associados, em células previamente estimuladas por radiação ionizante; c) Analisar a expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias, e de sinalizadores da via PI3K-PTEN-AKT-mTOR, após aplicar os tratamentos com fotobiomodulação e curcumina, isolados e associados, em células previamente estimuladas por radiação ionizante."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme o documento 'PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf' postado em 17/01/2022:

"Riscos:

Os fragmentos gengivais utilizados na pesquisa serão aqueles obtidos quando da extração de dentes por razões terapêuticas não estando, portanto, o procedimento cirúrgico vinculado ao projeto. Para os pacientes que aceitarem cederem amostras de gengiva para utilização no projeto, o risco poderia ser vincular a amostra a sua identidade. Nesse sentido, a confidencialidade do participante será garantida por meio da codificação das células com números.

Benefícios:

A pesquisa não oferece benefícios diretos e imediatos aos participantes, mas como benefícios futuros, espera-se que a pesquisa permita uma melhor compreensão da expressão gênica de citocinas proinflamatórias de tecidos gengivais tratados com produtos naturais tais como curcumina, resveratrol e EGCG, no intuito de estabelecer novas medidas terapêuticas para o uso baseado em evidências científicas, proporcionando melhora na qualidade de vida dos pacientes

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

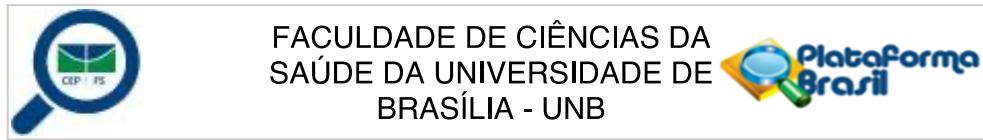
CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

oncológicos"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa de mestrado da PPG-ENF que será executado pela mestrandra Mylene Martins Monteiro sob a supervisão da Profa. Dra. Eliete Neves da Silva Guerra.

O cronograma indica que o primeiro contato com os participantes ocorrerá em 2022.

O orçamento, de financiamento próprio, no total de R\$6.452,00 indica gastos com informática, resarcimento de transporte e alimentação dos participantes e itens de consumo necessários à execução da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos acrescentados ao processo e analisados para emissão deste parecer:

1. Informações Básicas do Projeto: "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1809826.pdf" postado em 17/01/2022.
2. Projeto Detalhado ATUALIZADO: "8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf e 8Projeto_Jan_16_22_revisao.docx" postado em 17/01/2022.
3. Carta ao CEP-FS: "CARTA_DE_RESPONTAS_Jan_16_22.docx e CARTA_DE_RESPONTAS_Jan_16_22.pdf" postada em 17/01/2022.
4. Modelo de TCLE ATUALIZADO: "4TCLE_Jan_16_22.pdf e 4TCLE_Jan_16_22.docx" postado em 17/01/2022.

Recomendações:

Não se aplicam.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consustanciado No. 5.116.251 e 5.174.226:

1. Uniformizar os objetivos do projeto de pesquisa em todos documentos e no formulário online da Plataforma Brasil.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

RESPOSTA: Os objetivos foram uniformizados e descritos como: "O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos da curcumina e da fotobiomodulação, tanto como terapias isoladas, quanto associadas, nos processos de regeneração e reparo em modelo in vitro de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de fibroblastos gengivais." Foram modificados no formulário online (objetivo primário, página 4 "Detalhamento do estudo"), e nos arquivos anexados: 4TCLE_Nov_29_21 (Página 1, parágrafo 5) e no 8Projeto_Nov_29_21 (Página 4, objetivos gerais, parágrafo 1).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. No formulário online da Plataforma Brasil, na seção 'Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisado' consta que o projeto "Apresenta uma equipe de 5 pesquisadores, além da discente, composta por professores pesquisadores e alunos de pós- graduação e graduação.", mas somente 3 currículos foram apresentados. Solicita-se que sejam enviados os 3 currículos dos outros membros da equipe de pesquisa, e que seja explicado o papel de cada um dos membros da equipe de pesquisa.

RESPOSTA: Foi alterado o número de participantes do grupo de pesquisa. São 4 pesquisadores, além da discente, composta por alunos da graduação e pós graduação. Também foi anexado os 2 currículos dos membros que estavam faltando nos documentos "Lattes_Bruna_Bastos_Silveira_da_Silva" e "Lattes_Victor_Paiva_Barbosa". Todos os integrantes possuem produção científica própria e contribuem com o projeto auxiliando nas pesquisas e experimentos, quando necessário, sob supervisão da pesquisadora principal.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. No formulário online da Plataforma Brasil, na seção 'Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?' as pesquisadoras indicam interesse em armazenar o material biológico colhido por tempo indeterminado e informam que 'Dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, o material armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos.'.

Esta modalidade de armazenamento de material biológico, que inclui a utilização do material para projetos futuros e ainda não delineados caracteriza a constituição de um BIOBANCO conforme a PORTARIA No 2 . 2 0 1 , D E 1 4 D E S E T E M B R O D E 2 0 1 1 M S / C N S (https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2201_14_09_2011.html). Caso seja de interesse da equipe de pesquisa a constituição de um BIOBANCO, solicita-se que seja apresentada uma solicitação formal

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

conforme consta na portaria supracitada. Caso contrário, solicita-se que sejam feitas as adequações necessárias em todos documentos, incluindo Projeto Detalhado, TCLE e formulário online da PB, indicando nitidamente que o material coletado será utilizado exclusivamente para os objetivos delineados neste projeto de pesquisa, e que o material biológico coletado será destruído ao término do projeto de pesquisa, ou após 05 anos, o que ocorrer primeiro (CNS/MS 466/2012 XI.2.f).

RESPOSTA: A modalidade que estamos buscando é a de biorrepositório, onde a coleção de material biológico humano, será coletado e armazenado ao longo da execução desse projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pre-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.

Com isso, os documentos para adequação à Resolução CNS 441/2011, Portaria MS 2.201/11 e Norma Operacional CNS 001/2013, em relação ao armazenamento de material biológico foram anexados: "Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21" e "Declaracão". Tal informação também foi adicionada ao TCLE (Página 1, parágrafo 3 e Página 1, parágrafo 6). Foi também incluído ao projeto o item sobre armazenamento e uso futuro de material biológico armazenado (Página 6, item 6).

ANÁLISE: De fato, as pesquisadoras têm razão na solicitação, e a proposta é plenamente compatível com o estabelecimento de um biorrepositório. Em adição à documentação enviada, solicita-se que o TCLE seja adequado, e que conste no TCLE do participante que a amostra será armazenada respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa, e que a amostra biológica coletada ficará armazenada (Laboratório, faculdade, universidade), e sob a responsabilidade de qual pesquisador(a). Também deve constar que o/a participante da pesquisa pode a qualquer momento retirar o seu consentimento para o armazenamento da amostra biológica, e que será comunicado sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas ou da decisão de interrupção da pesquisa, como também sobre o fechamento ou transferência do biorrepositório. Qualquer alteração nos objetivos da pesquisa proposta, assim como na eventual utilização do material biológico em pesquisas futuras, o participante de pesquisa será contatado para reconsentimento, ou novo consentimento no caso de novo projeto de pesquisa, e que para toda modificação será apreciada pelo CEP antes de ser executada. Diante da necessidade de reconsentimento, ou novos consentimentos futuros, sugerimos fortemente que o contato telefônico e/ou e-mail dos participantes seja armazenado pelas pesquisadoras.

PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA.

RESPOSTA: O TCLE foi adequado constando as seguintes alterações sugeridas: A amostra será

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

armazenada, respeitando a confidencialidade, no laboratório de Histopatologia Bucal, na faculdade de Ciências da Saúde, na Universidade de Brasília, sobre a responsabilidade da pesquisadora Mylene Martins Monteiro.” (página 1, parágrafo 6) e “O(a) senhor(a) ainda será comunicado sobre perda, alteração ou destruição de suas amostras biológicas, da decisão de interromper a pesquisa ou do fechamento ou transferência do biorrepositório.” (página 2, parágrafo 7). Ainda foi adicionado um local para que seja possível armazenar o contato dos participantes (página 2).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Solicita-se que o TCLE seja apresentado em linguagem acessível e comprehensível ao público leigo. Não é necessário que os participantes conheçam em detalhe toda a metodologia do projeto de pesquisa, mas sim quais são os objetivos da pesquisa e como será feita a coleta de dados e como o material biológico colhido será armazenado e utilizado.

RESPOSTA: No TCLE as alterações referentes ao detalhamento da metodologia foi alterada, assim como a linguagem comprehensível ao público leigo. Essas alterações se encontram na página 1, parágrafo 1.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Todas as Pendências foram atendidas. Não foram observados óbices éticos.

Protocolo de pesquisa em conformidade com as Resolução CNS 466/2012, 510/2016 e complementares.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme a Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis devem apresentar relatórios parciais semestrais, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa; e um relatório final do projeto de pesquisa, após a conclusão da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_1809826.pdf	17/01/2022 20:20:56		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf	17/01/2022 20:19:38	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - UNB**



Continuação do Parecer: 5.212.117

Investigador	8Projeto_Jan_16_22_revisao.pdf	17/01/2022 20:19:38	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPONTAS_Jan_16_22.docx	17/01/2022 20:18:44	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPONTAS_Jan_16_22.pdf	17/01/2022 20:18:08	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4TCLE_Jan_16_22.pdf	17/01/2022 20:16:58	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4TCLE_Jan_16_22.docx	17/01/2022 20:16:50	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8Projeto_Jan_16_22_revisao.docx	17/01/2022 18:40:04	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21.pdf	01/12/2021 11:48:56	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Declaracao.pdf	01/12/2021 11:48:21	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao.docx	30/11/2021 16:23:41	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Justificativa_Armazenamento_Nov_29_21.docx	30/11/2021 16:13:23	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Victor_Paiva_Barbosa.pdf	30/11/2021 16:04:44	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Bruna_Bastos_Silveira_da_Silva.pdf	30/11/2021 16:03:34	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	2Termo_concordancia_Sept_22_21.docx	28/09/2021 20:27:25	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Declaração de concordância	2Termo_concordancia_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:15:58	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	1Carta_encaminhamento_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:15:02	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	1Carta_encaminhamento_Sept_22_21.docx	22/09/2021 12:13:49	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	3Termo_responsabilidade_Sept_22_21.docx	22/09/2021 12:13:21	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	3Termo_responsabilidade_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:13:03	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

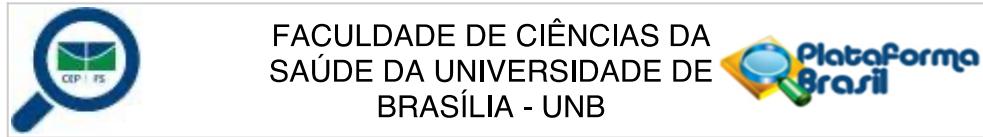
CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.212.117

Outros	Lattes_Mylene_Martins_Monteiro.pdf	22/09/2021 12:12:37	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Juliana_Amorim_dos_Santos.pdf	22/09/2021 12:12:18	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Outros	Lattes_Eliete_Neves_da_Silva_Guerra.pdf	22/09/2021 12:12:05	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Cronograma	6Cronograma_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:03:20	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Orçamento	5planilha_de_orcamento_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:03:00	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	7folhaDeRosto_Sept_22_21.pdf	22/09/2021 12:00:02	MYLENE MARTINS MONTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 26 de Janeiro de 2022

Assinado por:
Fabio Viegas Caixeta
(Coordenador(a))

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro	
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.910-900
UF: DF	Município: BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947	E-mail: cepfsunb@gmail.com

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade de Brasília
Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do projeto de pesquisa “**Modelo *in vitro* de lesão radioinduzida estabelecido com cultura primária de Fibroblastos Gengivais Humanos**”, sob a responsabilidade da pesquisadora Mylene Martins Monteiro. Para o estabelecimento de uma cultura primária, as células a serem cultivas são isoladas diretamente do tecido e processadas em condições ideias. Por serem derivadas de tecido e não modificadas, são mais semelhantes ao estado *in vivo* e exibem fisiologia normal, representando alternativas com alta relevância biológica para o desenvolvimento de modelos *in vitro*. Dessa forma, a cultura primária é extensivamente utilizada em estudos laboratoriais, sendo capazes de se expandir mantendo as características e funções originais, o que permite compreender os efeitos tanto de estímulos agressores, como de propostas terapêuticas, de maneira mais fidedigna. Como os fibroblastos são importantes células presentes na mucosa oral, o isolamento desse tipo celular por meio de fragmentos gengivais auxiliam no desenvolvimento de modelos que mimetizem lesões orais, como aquelas radioinduzidas. Assim, o presente estudo tem como objetivo desenvolver um modelo laboratorial com fibroblastos gengivais isolados diretamente da mucosa oral humana, para melhor compreender o processo inflamatório após uma agressão radioinduzida, e estudar a resposta celular e o processo de reparo após o tratamento do modelo com produtos naturais e fotobiomodulação. O modelo será desenvolvido a partir de fragmentos gengivais obtidos em cirurgias orais tais como extrações dentárias e instalação de implantes. Com esta pesquisa, espera-se verificar os efeitos celulares de fármacos naturais e da fotobiomodulação como terapias alternativas para reparo de lesões orais após estímulo radioinduzido.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

Ao assinar este termo, o senhor (a) estará concedendo uma amostra de gengiva em região com indicação de extração dentária ou instalação de implante para contribuir com esta pesquisa, consciente de que este(s) procedimento(s) tiveram indicação terapêutica, para melhoria da sua saúde, não estando, portanto, a cirurgia oral vinculada ao projeto em questão. Cabe ressaltar que o procedimento cirúrgico será realizado independente do aceite ou não em participar da pesquisa. Ao assinar esse termo, o senhor (a) autoriza a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material associado a esse projeto de pesquisa.

O senhor (a) não terá nenhum custo e não receberá nenhuma remuneração ao participar desta pesquisa. A sua participação ao conceder a gengiva não implica despesas, mas caso haja, será feita compensação material, exclusivamente de suas despesas e seus acompanhantes, tais como transporte e alimentação. Os riscos que este estudo oferece seriam os de vincular as células da gengiva a sua identidade. Porém, as amostras serão codificadas com números, garantindo, assim, a sua confidencialidade (seu nome não será revelado). Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação na pesquisa, você deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil. Em qualquer momento, o senhor(a) poderá ter acesso aos resultados e eles poderão ser publicados em eventos e revistas científicas sempre mantendo o sigilo da sua participação.

A pesquisa não oferece benefícios diretos e imediatos ao senhor(a), mas como benefícios futuros, espera-se que a pesquisa permita uma melhor compreensão dos eventos relacionados com os processos inflamatórios e de reparo da mucosa oral, bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas buscando a melhoria da saúde bucal.

Durante a realização dos experimentos e após sua conclusão, as células serão armazenadas e dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, poderão ser utilizadas em pesquisa futura. Por isso, há a necessidade de armazenamento dos tecidos coletados em biorrepositório, para não precisar de uma nova coleta em outros indivíduos. No caso de pesquisa futura, o senhor(a) será contatado para novo consentimento específico referente ao novo projeto de pesquisa e os novos projetos serão submetidos para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O(a) Senhor(a) pode se recusar ou desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a), retirando o consentimento de utilização e armazenamento de suas células e pedindo a destruição e descarte do material. Para isso, o senhor(a) deve formalizar a retirada do consentimento por manifestação escrita e assinada.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para a pesquisadora responsável, Mylene Martins Monteiro, pelo telefone 61 98477-4585, disponível inclusive para ligação a cobrar, ou por e-mail (mylenemonteiro7@gmail.com), ou com a professora orientadora, Eliete Neves da Silva Guerra, pelo telefone 61 99668-4988 ou por e-mail (elieteneves.unb@gmail.com).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelo telefone (61) 3107-1947 ou pelo e-mail cepf@unb.br ou [cepf@unb.br@gmail.com](mailto:cepf@unb.br), horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira. O CEP/FS se localiza na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor (a).

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

Brasília, ____ de _____ de _____.