

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA –  
NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

MARIANA CASTELLO DE CARVALHO DELUCA

EFEITOS CITOTÓXICOS, DE MIGRAÇÃO E ANGIOGÊNESE DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA E FOTOBIMODULAÇÃO NAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA  
TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA –  
NÍVEL MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

MARIANA CASTELLO DE CARVALHO DELUCA

EFEITOS CITOTÓXICOS, DE MIGRAÇÃO E ANGIOGÊNESE DA TERAPIA  
FOTODINÂMICA E FOTOBIMODULAÇÃO NAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA  
TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica - Endodontia.

Linha de Pesquisa: Biologia Celular e Estrutural

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Porto Alegre

2020

*“Me movo como educador porque,  
primeiro, me movo como gente”.*

*Paulo Freire*

## AGRADECIMENTOS

Ser professor hoje em dia é ser protagonista do ensino, educar em tempos difíceis é manter acesa a chama da utopia para construção de uma sociedade melhor. Como dizia Paulo Freire, “*se a educação sozinha não transformar a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda*”. Estudar no Brasil é um privilégio e ciente das oportunidades que tive e tenho cabe a mim a sabedoria para ecoar esses aprendizados de forma humana. Para a concretização desta importante etapa da minha vida profissional e pessoal a presença e auxílio de algumas pessoas foram essenciais e por esse motivo gostaria de agradecer, em especial: à **Deus**, por ser meu ponto de paz e tranquilidade; à toda família (de Norte a Sul), principais influenciadores das minhas conquistas, principalmente minha mãe **Celeide** que me apoia incondicionalmente e confia de olhos fechados em mim, minha irmã **Nathália**, a maior companheira de vida e está sempre ao meu lado, meu pai **Sérgio** (*in memoriam*), que lá de cima, me ilumina e me conduz pelos melhores caminhos e minhas primas **Camila**, **Geovanna**, **Anna Paula**, **Bárbara** e **Taciane** que mesmo de longe sempre me encorajaram à seguir em frente, amo muito todos vocês; à minha orientadora **Patrícia Kopper**, pela sua amizade e exemplo de profissional a ser seguido, sua forma tranquila, alegre e dedicada de me orientar fez toda a diferença para o meu aprendizado; à minha amiga **Marina Aspesi**, confidente e dupla desta grande jornada, obrigada pela amizade e companheirismo que cultivamos desde a graduação, esse trabalho é fruto do nosso esforço!; à pós-doutoranda **Bibiana Matte** obrigada pelos momentos de grande conhecimento com muita paciência e empenho, saiba que você é um grande exemplo de profissional e pesquisadora para mim; à graduanda **Luiza Brand** pela disponibilidade e incansáveis ajudas durante toda a pesquisa; à equipe do **LAMOC** e **LabEndo**, ambientes mais frequentados durante esses dois últimos anos, obrigada a todos pelo acolhimento, troca de conhecimento e amizades, principalmente aos amigos **Gabriela Crespo**, **Natalia Vila**, **Luisa Dockhorn**, **Paola Bottezini**, **Maurício**

**Anastácio, Paulo Augusto, Patrícia Chaves, Gabriela Ferreira, Roberta Mendes** e tantos outros presentes nesse período especial, obrigada pelo convívio e amizade que levarei para vida; agradeço aos amigos de fé **Samara, Sillvana, Vitória, Guilherme, Bruno, Gabriel, Helena, Jéssica, Rafaela e Matheus** que me socorreram em momentos difíceis, me apoiaram e entenderam as ausências durante à pesquisa; a todos os orientados e integrantes do “**Team Kopper**”, obrigada pelo acolhimento e por poder compartilhar momentos únicos nessa equipe tão querida; aos professores **Roberta Kochenborger, Fabiana Grecca e Luciano Casagrande** que me auxiliaram diretamente no desenvolvimento da pesquisa com muita dedicação; à **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** pela estrutura e oportunidade de realizar essa pós-graduação com excelência; à **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul** junto à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas em Nível Superior (CAPES)** pela bolsa que me permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade; a todos os funcionários da universidade que me auxiliaram nesse processo, principalmente ao **Sr. Paulo** e todos os outros seguranças que me acompanharam nessa cansativa jornada noturna; à banca, escolhida com muito carinho, por aceitarem participar desse momento tão importante para mim: **José Antônio Poli de Figueiredo** que me acompanha nessa jornada acadêmica desde a graduação, um grande professor e amigo, **Manoela Martins** sempre querida, atenciosa e disposta a me auxiliar, **Thayana Souza**, grande incentivadora do meu ingresso no mestrado, obrigada por, mais uma vez, acrescentar positivamente na minha carreira na Odontologia e como suplente **Daiana Böttcher**, quem me conduziu aos primeiros passos da vida científica e por fim, agradeço a todos os envolvidos nesse processo que de algum modo fizeram a diferença para meu sucesso, obrigada de coração.

## RESUMO

DELUCA, Mariana Castello de Carvalho. **Efeitos citotóxicos, de migração e angiogênese da terapia fotodinâmica e fotobiomodulação nas células envolvidas na terapia de revascularização.** 2020. 59 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, área de concentração Clínica Odontológica/Endodontia – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) e da Fotobiomodulação (PBM) como terapias complementares ao protocolo de revascularização pulpar, em cultura celular primária de células da papila apical humana (APCs) e em células endoteliais (HUVECs). Dois primeiros pré-molares inferiores com um canal foram seccionados, simulando dentes com rizogênese incompleta, e um dos canais foi irrigado com 1mL de azul de metileno 0.005%. A seguir, os dois canais foram irrigados com 20mL de Hipoclorito de sódio (NaOCl) 1.5% e 20mL de EDTA. Antes de cada ensaio, as soluções químicas obtidas foram diluídas em meios de cultura na concentração de 0.5% (NaOCl + EDTA 0.5%; NaOCl + EDTA + MB 0.5%). O efeito da PDT e da PBM em cultura de células foi avaliado por meio dos seguintes grupos: CTG (meio de cultura); ISG (NaOCl + EDTA 0.5%); MBG (MB + NaOCl + EDTA 0.5%); PBMG (NaOCl + EDTA 0.5% + laser); PDTG (NaOCl + EDTA + MB 0.5% + laser). Foram realizados os ensaios de citotoxicidade em APCs, de índice de polaridade em APCs, migração celular em APCs e angiogênese em HUVECs. Os dados obtidos foram analisados pelo ANOVA, seguido do teste de Tuckey ( $P \leq 0.05$ ). A PDT e a PBM aumentaram a viabilidade celular em comparação com os grupos ISG e MBG, respectivamente. Todos os protocolos testados reduziram a migração celular em comparação com CTG. A PBMG mostrou maior distância de migração das HUVECs em comparação a ISG, evidenciando um potencial de angiogênese. Conclui-se que a PBM e a PDT têm potencial para serem empregadas como terapias coadjuvantes ao protocolo de revascularização pulpar em dentes com rizogênese incompleta.

**Palavras-chave:** revascularização, terapia fotodinâmica, fotobiomodulação, células da papila apical.

## **ABSTRACT**

DELUCA, Mariana Castello de Carvalho. **Cytotoxic, migration and angiogenesis effects of photodynamic therapy and photobiomodulation in cells involved at the revascularization therapy.** 2020. 59 p. Dissertation presented to the Postgraduate Program in Dentistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, area of concentration: Dental Clinic/Endodontics – Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

The aim of this study was to evaluate photodynamic therapy (PDT) and photobiomodulation therapy (PBM) as complementary therapies on a pulp revascularization protocol using primary culture of cells from apical papilla (APCs) and endothelial cells (HUVECs). In order to simulate tooth with open apex, two mandibular first premolars with a single canal were sectioned and one of the root canal was irrigated with 1mL of 0.005% methylene blue (MB). Next, the root canal was irrigated with 20mL of 1.5% sodium hypochlorite (NaOCl) and 20mL of 17% EDTA. The chemical solution obtained was diluted in cell culture media previous to each experiment (NaOCl + EDTA 0.5%; NaOCl + EDTA + MB 0.5%). The effect of PDT and PBM was evaluated accordingly to these groups: CTG (cell culture media); ISG (NaOCl + EDTA 0.5%); MBG (MB + NaOCl + EDTA 0.5%); PBMG (NaOCl + EDTA 0.5% + laser); PDTG (NaOCl + EDTA + MB 0.5% + laser). It was performed cytotoxic assay, polarity index and migration analysis in APCs and sprouting assay in HUVECs. All data was analyzed by ANOVA followed by Tuckey post-hoc test ( $P \leq 0.05$ ). PDT and PBM favored viability compared to ISG and MBG, respectively. All tested protocols reduced cell migration compared to the CTG. PBMG demonstrated increased migration distance of HUVECs when compared to ISG, what might be related to an angiogenesis potential. PBM and PDT have potential to be employed as complementary therapies on pulp revascularization protocol of necrotic tooth with open apex.

**Key words:** revascularization, photodynamic therapy, photobiomodulation, apical papilla cells.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO .....	6
1 APRESENTAÇÃO .....	9
2 INTRODUÇÃO.....	10
3 OBJETIVOS.....	14
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
Attachment 1 .....	41
Methodology Flowchart.....	41
Anexo A .....	54
Anexo B .....	59
Anexo C .....	62



## 1 APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como foco de estudo avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica e da terapia de fotobiomodulação em cultura primária de células obtidas da papila apical humana e em células endoteliais (HUVEC).

Esta dissertação de mestrado está estruturada da seguinte maneira:

- Introdução, enfatizando os pontos principais deste estudo;
- Objetivos geral e específicos do estudo;
- Artigo científico formatado de acordo com as normas da revista Journal of Endodontics, fator de impacto 2.886 (Qualis A1, CAPES), para ser enviado para apreciação do corpo editorial.
- Considerações finais.

## 2 INTRODUÇÃO

As células tronco da papila apical (SCAPs) são um tipo de célula-tronco mesenquimal indiferenciada caracterizadas pela capacidade de formação de dentina primária radicular que, de acordo com condições indutivas adequadas, são capazes de se diferenciar em tipos diferentes de células, agindo na regeneração dos tecidos (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2008).

Em relação às células-tronco da polpa dentária (DPSCs), as SCAPs apresentam um maior potencial de proliferação, diferenciação e regeneração (HUANG et al., 2008). Com esse potencial, são importantes nas situações em que procedimentos regenerativos são realizados, contribuindo para a formação e reestabelecimento dos tecidos lesados (HUANG et al., 2008). As SCAPs apresentam altos níveis de survivina e telomerase, que são moléculas importantes na mediação da proliferação celular (SONOYAMA et al., 2006), sendo indispensáveis para a complementação radicular em dentes com rizogênese incompleta (HUANG G. T. J. et al., 2008; SONOYAMA et al., 2008).

Processos traumáticos e cariosos, frequentemente encontrados em crianças e adolescentes que apresentam dentes ainda em formação, são as causas mais comuns para a necrose pulpar (ÇALISKAN et al., 2015). Em função da necrose, tem-se uma infecção, resultando na interrupção do processo de desenvolvimento do ápice radicular, impossibilitando seu fechamento (HUANG et al., 2008). Nestes casos o tratamento convencional indicado seria a endodontia, visando conter a contaminação gerada por microorganismos e selar o sistema de canais radiculares. Entretanto, em dentes com ápice aberto, a complexidade da anatomia radicular apical limita o preparo químico mecânico e a obturação. Além disso, o tratamento endodôntico convencional impossibilita a continuidade do processo de desenvolvimento do ápice radicular, impossibilitando seu fechamento (HUANG et al., 2008; SOUZA et al., 2013).

Com isso, diferentes métodos terapêuticos que visam o controle da infecção, o favorecimento da continuidade da formação radicular e o

reestabelecimento da vitalidade pulpar vêm sendo adotados como alternativas. Dentre estes, destacam-se a apicificação e a revascularização (WITHERSPOON et al., 2008). Na apicificação após o preparo químico mecânico, preenche-se o canal com pasta a base de hidróxido de cálcio, e acompanha-se o caso clínica e radiograficamente, realizando-se trocas da pasta até que ocorra a formação de uma barreira mineralizada, não ocorrendo a continuidade do desenvolvimento radicular (ANDREASEN et al., 2002). Nestes casos, devido às paredes dentinárias delgadas e ao pequeno comprimento radicular, há um risco aumentado de fratura dentária (CVECK et al., 1992; DING et al., 2009; CHEN et al., 2011).

A técnica de revascularização tem como objetivo promover a continuidade do desenvolvimento radicular em dentes jovens com rizogênese incompleta e necrose pulpar, sendo uma alternativa à apicificação (LOVELACE et al., 2011; WIGLER et al., 2013; GALLER et al., 2016). O sangramento, provocado através do protocolo de revascularização, recruta células-tronco dos tecidos perirradiculares para o interior do canal radicular, o coágulo formado aprisiona células estaminais da papila apical (SCAP's), servindo de *scaffold*, sustentando o desenvolvimento e diferenciação celular, resultando no reparo pulpar e complementação da raiz (SHAH et al., 2008; LOVELACE et al., 2011; HARGREAVES et al., 2013). O prosseguimento da formação radicular ocorre a expensas de células tronco da papila apical (SCAPs) que, estimuladas pela bainha epitelial de Hertwig, são capazes de proliferar e diferenciarem-se em odontoblastos (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2008). Nestes casos, além de ocorrer o fechamento apical, espera-se um aumento da espessura dentinária radicular, tornando o dente mais resistente a possíveis fraturas (NOSRAT et al., em 2011).

Para que a revascularização seja bem sucedida, o controle da infecção presente no sistema de canais radiculares é fundamental (LOVELACE et al., 2011). Neste sentido, terapias complementares de desinfecção do sistema de canais radiculares têm sido estudadas e empregadas, almejando um aumento dos índices de sucesso. A Terapia Fotodinâmica (PDT) vem se destacando

como auxiliar aos procedimentos antimicrobianos endodônticos, apresentando resultados positivos como auxiliar na resolução dos problemas endodônticos (SOUKOS et al., 2006; XU et al., 2009).

A PDT fundamenta-se na eliminação de microrganismos a partir da ação conjunta de um agente fotossensibilizador com uma fonte de luz, originando uma reação química que tem como resultado a produção de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singleto), as quais são tóxicas a bactérias, fungos e vírus (MAROTTI et al., 2008). Em relação ao uso das soluções antimicrobianas tradicionais, a PDT possui alguns benefícios. Silva Garcez et al. (2006) compararam a ação antimicrobiana do PDT com a do NaOCl 0,5% frente a cultura de *E. faecalis*. Os autores verificaram que ocorreu uma maior redução do patógeno quando a PDT foi empregada, sugerindo ser uma terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico. Além disso, um estudo realizado por Gomes-Filho et al. (2016) avaliou a ação da PDT em fibroblastos L-929 e comprovou que tal terapia foi biocompatível, favorecendo a viabilidade celular. Em dentes com rizogênese incompleta, onde há maior dificuldade no processo de desinfecção devido à anatomia e fragilidade radicular, a PDT pode ser uma alternativa, podendo favorecer o prognóstico, reduzindo a carga microbiana (SILVA et al., 2013). Seu papel como terapia complementar ao protocolo de revascularização ainda não está bem estabelecido pela literatura.

Além disso, a capacidade de proliferação e de diferenciação das SCAPs, aprisionadas no coágulo, está diretamente relacionada com a complementação radicular almejada quando protocolos de revascularização são realizados (SONOYAMA et al., 2006). A fotobiomodulação (PBM) tem sido sugerida como uma terapia complementar com o objetivo de favorecer a proliferação de células tronco (MOHAMMADI et al., 2009). A PBM demonstrou estimular a ativação da microcirculação, a produção de novos capilares, ter efeitos anti-inflamatórios e analgésicos e favorecer o crescimento e a regeneração celular (HENRIQUES et al., 2008). Há evidências de que quando utilizada, é capaz de diminuir significativamente a dor pós-operatória além de causar efeitos benéficos nos tecidos irradiados (LOPES et al., 2017). Estudos laboratoriais e em animais

demonstraram que a PBM favoreceu a capacidade regenerativa de células tronco da polpa, sendo capazes de formar um novo tecido (ZACCARA et al., 2018; MOREIRA et al., 2013), e da papila apical (ABE et al., 2016). A interação da luz do laser com as células, em dose adequada, mostrou-se capaz de promover funções celulares como a incitação de linfócitos, a ativação de mastócitos, o aumento da produção de ATP mitocondrial e a proliferação de vários tipos celulares (CAVALCANTI et al., 2011).

Conhecendo-se o potencial benéfico da PDT e da PBM, o emprego de tais terapias como coadjuvantes ao protocolo de revascularização de dentes permanentes jovens com ápice aberto e necrose pulpar pode resultar em melhores prognósticos, evitando a perda dentária precoce. Devido a pouca informação na literatura a respeito de seus efeitos na proliferação e viabilidade celular, na indução da neoformação vascular, faz-se necessário novas investigações a esse respeito.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica e da terapia de fotobiomodulação como complementares à terapia de revascularização pulpar, em cultura primária de células obtidas da papila apical humana e em células endoteliais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação com o ensaio de SRB em células da papila apical.

Avaliar a influenciada terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação na morfologia celular em células da papila apical, a partir do índice da polaridade celular.

Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação na migração de células da papila apical, por meio do ensaio de *time-lapse*.

Avaliar a influência da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação na angiogênese por meio do ensaio de tubulogênese em células endoteliais.

## 4 ARTIGO CIENTÍFICO

### Title

**Cytotoxic, migration and angiogenesis effects of photodynamic therapy and photobiomodulation on apical papilla and endothelial cells.**

Mariana Castello de Carvalho Deluca<sup>1</sup>, Roberta Kochenborger Scarparo<sup>1</sup>, Marina Aspesi<sup>1</sup>, Bibiana Franzen Matte<sup>1</sup>, Luiza Meurer Brand<sup>1</sup>, Luciano Casagrande<sup>1</sup>, Fabiana Soares Grecca<sup>1</sup>, Patrícia Maria Poli Kopper Móra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dentistry Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

### Correspondence to:

Patrícia Maria Poli Kopper, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: [patricia.kopper@ufrgs.br](mailto:patricia.kopper@ufrgs.br)

Phone: +55 (51) 3308 5191

### Contact information of authors:

Mariana Castello de Carvalho Deluca: [mariana.deluca@hotmail.com](mailto:mariana.deluca@hotmail.com)

Roberta Kochenborger Scarparo: [roberta.scarparo@ufrgs.br](mailto:roberta.scarparo@ufrgs.br)

Marina Aspesi: [marina.aspesi@hotmail.com](mailto:marina.aspesi@hotmail.com)

Bibiana Franzen Matte: [bfmatte@gmail.com](mailto:bfmatte@gmail.com)

Luiza Meurer Brand: [luizabrand@hotmail.com](mailto:luizabrand@hotmail.com)

Luciano Casagrande: [luciano.casagrande@ufrgs.br](mailto:luciano.casagrande@ufrgs.br)

Fabiana Soares Grecca: [fabiana.grecca@ufrgs.br](mailto:fabiana.grecca@ufrgs.br)

Patrícia Maria Poli Kopper: [patricia.kopper@ufrgs.br](mailto:patricia.kopper@ufrgs.br)

**Author contributions:**

**Mariana Castello de Carvalho Deluca:** Main researcher, analysis and interpretation of data, drafting of the article, and approval of final version.

**Roberta Kochenborger Scarparo:** Contribution to the experimental design, analysis and interpretation of data.

**Marina Aspesi:** Contribution to the experimental design, carrying out the experiment and to the data analysis.

**Bibiana Franzen Matte:** Contribution to the experimental design, carrying out the experiment, data analysis, review and approval of final version.

**Luiza Meurer Brand:** Contribution to carrying out the experiment and to the data analysis.

**Luciano Casagrande:** Contribution to the experimental design and funding acquisition.

**Fabiana Soares Grecca:** Contribution to the experimental design and funding acquisition.

**Patrícia Maria Poli Kopper:** Contribution to the conception, the experimental design, data analysis, design of the manuscript, review and approval of final version.



## Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to evaluate the effect of photodynamic therapy (PDT) and photobiomodulation therapy (PBM), as complementary procedures to the pulp revascularization therapy, on primary culture of cells from apical papilla (APCs) and endothelial cells (HUVECs). **Methods:** In order to simulate tooth with open apex, two mandibular first premolars had its single canal enlarged in the foraminal and with a Peeso drill (# 4). One of the root canal was irrigated with 1mL of 0.005% methylene blue (MB). Next, both root canals were irrigated with 20 mL of 1.5% sodium hypochlorite (NaOCl) and 20mL of 17% EDTA. The chemical solution obtained was diluted in cell culture media previous to each experiment (MB + NaOCl + EDTA 0.5%; NaOCl + EDTA 0.5%). The effect of PDT and PBM was evaluated accordingly to these groups: CTG (cell culture media); ISG (NaOCl + EDTA 0.5%); MBG (MB + NaOCl + EDTA 0.5%); PBMG (NaOCl + EDTA 0.5% + laser); PDTG (MB + NaOCl + EDTA 0.5% + laser). It was performed cytotoxic, polarity index and migration analysis in APCs and sprouting assay in HUVECs. All data was analyzed by ANOVA followed by Tuckey post-hoc test ( $P \leq 0.05$ ). **Results:** PDTG and PBMG increased cell viability compared to MBG and ISG, respectively. All tested protocols reduced cell migration compared to the CTG. PBMG demonstrated increased migration distance of HUVECs when compared to ISG, what might be related to an angiogenesis potential. **Conclusions:** PBM and PDT have potential to be employed as complementary procedures to the pulp revascularization therapy of necrotic tooth with open apex.

**Key Words:** revascularization, photodynamic therapy, photobiomodulation, apical papilla cells.

## Introduction

Traumatic process and caries are frequently present in teeth undergoing formation and these are the most common causes for pulp necrosis (1). As a consequence, there is an infection in the root canal system that results in root development and apical closure impairment (2). In cases like that, therapeutics aim to infection control, root development and pulp vitality establishment. With the revascularization technique, stem cells are recruited from surrounding tissue into the root canal and a blood clot function as a scaffold to stem cells from apical papilla (SCAPs) to proliferate and differentiate. As a result, pulp repair and root development are expected to occur (3, 4, 5). These processes are a consequence of SCAPs ability to proliferate and differentiate into odontoblasts after stimulation of Hertwig's epithelial root sheath. In this regard, besides apical closure, it is expected an increase in dentin thickness that will allow the tooth to be more resistant to fractures (2, 6, 7).

In order to achieve a successful revascularization, infection control of the root canal system is fundamental (4). Therefore, complementary disinfection therapies, like Photodynamic Therapy (PDT), has been studied and employed with the goal to increase success rates (8, 9, 10, 11, 12). Moreover, proliferation and differentiation capacity of SCAPs present in the clot is associated to root development (6). Photobiomodulation therapy (PBM) has been suggested as a complementary therapy to stimulate stem cell proliferation, microcirculation activation, capillaries formation, anti-inflammatory and analgesic effects. Altogether, these processes favor cell regeneration and new tissue formation (13, 14, 15, 16, 17). In addition, the blood clot performed inside the root canal must present a blood vessel formation, serving as a scaffold for SCAPS (5).

The cytotoxicity effect of the laser was already evaluated *in vitro* using a PDT protocol in human gingival fibroblasts and mouse fibroblasts L-929 (18, 19). The PBM protocol was evaluated in human fibroblasts, human exfoliated deciduous teeth and human pulp fibroblasts (17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27).

However, in APCs, no reports were found regarding the cytotoxic effect of these therapies.

Regarding the effect of these therapies on cell migration, Zaccara et al. 2020 (17) showed that PBM accelerates the migration of dental pulp stem cells (DPSCs). However, the influence of PDT and PBM in the migration of APCs remains to be investigated. In addition, the angiogenic potential of these therapies has not yet been assessed. Other protocols had their effect on angiogenesis evaluated from tests with endothelial cells (28, 29).

Since the effects of photodynamic therapy and photobiomodulation as complementary procedures to the pulp revascularization therapy are not yet completely established, the present study aims to evaluate its cytotoxic, migration and angiogenesis effects on primary culture of cells from apical papilla (APCs) and endothelial cells (HUVECs).

## Materials and methods

### *Ethics considerations*

The protocol of this study was approved by the Research Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil. (CAAE: 03575218.6.0000.5347)

### *Isolation and cell culture*

Four impacted third molars with open apex were the source of APCs in this study. It was obtained enough amounts of APCs that were cultivated and analyzed. Following tooth extraction, dental papilla was removed and the tissue was stored in a culture dish (35x10 mm; TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Swiss) containing Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin and streptomycin (P/S, Gibco). The tissues were sectioned into fragments of approximately 1 mm<sup>3</sup> and kept in an incubator at 37°C, 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub> until it was observed cell migration from the tissue to the dish. Culture medium was changed 24h after the tissue collection and every 48h to obtain explants of the cells. After 90% confluence, successive passages were performed for cellular expansion. The experiments were performed between the fourth (P4) and the eighth (P8) passage.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC CRL-1730) and stored at Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia of UFRGS. HUVECs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% FBS containing 1% penicillin and streptomycin in an incubator at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C and 100% humidity.

All experiments were conducted in three independent times. During this whole period, the cells were incubated in a 37°C humidified and 5% CO<sub>2</sub> environment.

### *Chemical solutions preparation*

To simulate a clinical situation of tooth with open apex, two single canal first premolars were sectioned transversal in the crown region in order to obtain roots with a standardized length of 13mm. The root canal was enlarged in the foraminal end with a Peeso drill (# 4), simulating the morphology of a tooth with open apex. The roots were sterilized and fixed in 50mL conical tubes (Kasvi®, São José dos Pinhais, PR) using a rubber dam (Madeitex Indústria e Comércio de Látex Ltda, São José dos Campos, SP) and a rubber O-ring (Ø 0.8 cm)(Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP).

One of the root canals was filled with 1mL of 0.005% methylene blue (MB) (Farmácia Reativo, Porto Alegre, RS) for two minutes according to the manufacturer protocol LASER DUO (MMOptics, São Carlos, SP, Brasil). Next, the root canals were irrigated according to the American Association of Endodontics (AAE) (30). It was used a 20 mL irrigation syringe with a hypodermic needle 25/04 to irrigate 20 mL of 1.5% sodium hypochlorite (NaOCl) for 5 minutes and, then, it was irrigated 20 mL of 17% EDTA for 5 minutes. When the procedure was finished, the root canals was discarded and the chemical solutions (NaOCl + EDTA; NaOCl + EDTA + MB) were identified and maintained refrigerated at 4°C.

Immediately before each assay, the chemical solutions obtained were diluted in cell culture media at a 0.5% concentration (NaOCl + EDTA 0.5%; NaOCl + EDTA + MB 0.5%).

### *Experimental design*

The effect of PDT and PBM in cell culture with the chemical solutions were evaluated according to the following groups (methodology flowchart - attachment 1):

- CTG (control): cell culture media;
- ISG (PBM control): NaOCl + EDTA 0.5%;
- MBG (PDT control): MB + NaOCl + EDTA 0.5%;

- PBMG: NaOCl + EDTA 0.5% + application of a diode laser with a continuous-wave indium-gallium-aluminum-phosphide – InGaIP (LASER DUO; MMOptics Ltd., São Carlos, SP, Brazil) in low intensity with the following parameters: wavelength of 660 nm ( $\pm 10$  nm), output Power of 100 mW (0.1 W), round spot area of 0.03 cm<sup>2</sup>, laser probe diameter of 0.20 cm, power density of 3.33 W/cm<sup>2</sup>, energy density 33.33 of J/cm<sup>2</sup>, 10 s of exposure time, and 1J of energy per point of application. Five laser applications were made at 6-h intervals (0 h, 6 h, 12 h, 18 h, and 24 h) (19), resulting in total energy of 5J per well. The output power of the equipment was tested using a power meter (Laser Check; MM Optics LTDA, Sao Paulo, Brazil) before and after irradiations.
- PDTG: MB +NaOCl + EDTA 0.5% + application of InGaAlP in low intensity, using an optical fiber, with the following parameters: wavelength of 660 nm ( $\pm 10$  nm), output Power of 100 mW (0.1 W), round spot area of 0.0028 cm<sup>2</sup>, laser probe diameter of 0.06 cm, power density of 3.33 W/cm<sup>2</sup>, energy density 33.33 of J/cm<sup>2</sup>, 180 s of exposure time, resulting in total energy of 5.4J per well.

In the PBMG and PDTG, cells were plated in a way to maintain empty wells between seeded wells, in order to minimize the unintentional dispersion of light between wells during laser application. The light was applied in the dark with a standard distance of 2mm between the light and the solution with an adapted laser holder.

#### *APCs Cytotoxicity assay*

Cytotoxicity was assessed in APCs by sulforhodamine B staining (SRB, Sigma-Aldrich). For SRB evaluation, cells were seeded in 96-well plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) at a cell density of  $5 \times 10^3$  cells per well. After a 24h-incubation, cells were exposed to specific protocols of each group (CTG, ISG, PBMG, MBG, PDTG) for 24 hours. It was added 50  $\mu$ L of a 50% trichloroacetic acid solution (Sigma-Aldrich) for 1h at 4°C. The wells content were removed and 50  $\mu$ L of SRB dye (0.4%) were added in each well for 30 minutes. The plate was

washed with 1% acetic acid solution (Sigma-Aldrich) and 100  $\mu$ L of Trizma Base (10mM) (Sigma-Aldrich) were added to solubilize the colorimetric product. The optical densities of the solutions were measured in a spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 560 nm wavelength (31).

The SRB absorbance readouts were normalized with the absorbance of the control group (CTG) and represented the activity of the viable cells.

#### *APCs Polarity index assay*

APCs were plated in 6-well plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) at a cell density of  $2,5 \times 10^4$  cells per well (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). After a 24h-incubation, cells were exposed to specific protocols of each group (CTG, ISG, PBMG, MBG, PDTG). The effect of the protocols on cell polarity was analyzed after 24 hours. Images were captured in a microscope (Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with a charge coupled device camera (Axiocammrn, Zeiss) using a 10X objective (Eclplan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss) and AxioVision Software (Zeiss). It was acquired 10 fields per well.

It was used the ImageJ software in order to measure the length of the main migration axis (L1), parallel to the direction of movement, and the length of the perpendicular axis that intersects the center of the nucleus of the cell (L2). It was randomly analyzed 200 cells per group. The polarity index (PI) was calculated as the ratio of L1 by L2 (32). From the polarity index, it was plotted histograms in order to evidence cell size distribution. Cells with low PI are more rounded (low migration rate) and cells with high PI indicate elongated cells (high migration rate).

#### *APCs Migration assay*

APCs were plated on collagen-coated dishes ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) at a density of  $2,5 \times 10^4$  cells per well and maintained at the incubator for 4 hours to promote cell attachment. Then, cells were exposed to specific protocols of each group (CTG, ISG, PBMG, MBG, PDTG) and then it was analyzed migration with a time-lapse assay. Images were captured in a microscope at 10 minutes intervals for 24

hours (Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with heat control (37°C) and a charge coupled device camera (Axiocammrn, Zeiss) using a 10X objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss) and Axio Vision Software (Zeiss). In the PBMG, the light was applied every 6 hours during the experiment.

Migrating cells were tracked using the software ImageJ updated with the plugin Manual Tracking. From these data, the migration velocity was calculated as total distance of migration ( $\mu\text{m}$ ) per hour. For the directionality analysis, it was evaluated the directionality index (DI) that correspond to values between 0 and 1. Cells that have DI closer to 0 represent cells with no-directional/circular movement, while DI closer to 1 represent cells with a linear trajectory. In order to represent the spatial trajectory, a polar plot graph was constructed based on each migratory cell, where the X and Y coordinates of each cell trajectory were normalized to start at a virtual ( $X = 0$  and  $Y = 0$ ) position.

#### *HUVECs Sprouting assay*

For sprouting assay, the protocol of Koh et al, 2008 (33) was adapted. HUVECs at a density of  $3 \times 10^4$  cells per well were plated in low adhesive 96-well plate containing 1.5% low melting agarose (Sigma-Aldrich) with regular culture media and under standard humidified conditions (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) for 48h to stimulate spheroid formation. For analysis of endothelial cell spreading, spheroids were transferred to a rat tail collagen-based three dimensional (3D) matrix (1.8 mg/ml) in a 24-well plate. After collagen polymerization (30 minutes), spheroids were exposed to specific protocols of each group (CTG, ISG, PBMG, MBG, PDTG). Spheroids were imaged at 0 and 96h using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with a charge coupled device camera (Axiocammrn, Zeiss) using a 4X objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss) and AxioVision Software (Zeiss). The area of spheroids was measured by ImageJ software. It was calculated the ratio of the spheroid area after 96h by the spheroid area at the initial time-point (0h).



### *Statistical analysis*

The normality of the data was analyzed by Kolmogorov-Smirnov. Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data were analyzed by ANOVA followed by Tuckey post-hoc test ( $P \leq 0.05$ ). Data were analyzed using Graph Pad Prism 5.0 version software (Graph Pad, La Jolla, CA).

## **Results**

### *APCs Cytotoxicity assay*

Figure 1 demonstrates the result of cytotoxicity assay. PDTG increased cell viability compared to CTG and MBG ( $P \leq 0.0001$ ). ISG had similar cell viability to CTG ( $P > 0.05$ ), showing no cytotoxicity effect. PBMG increased cell viability compared to ISG ( $P \leq 0.05$ ).

### *APCs Polarity index assay*

Figure 2 illustrates the results from the cell polarity index of the different groups. It was observed a higher amount of cells with elongated morphology in the CTG compared to all other groups. Mean while, it was noted a higher amount of rounded cells in the ISG. PDTG and PBMG showed a greater number of elongated cells compared to ISG and MBG, respectively, indicating cell morphology preservation when the therapy protocols were applied.

### *APCs Migration assay*

Velocity and directionality was negatively influenced by the different studied protocols since CTG had the highest migration velocity and directionality index compared to the other groups (Figure 3). Also, CTG cells demonstrated to migrate longer distances.

### *HUVECs Sprouting assay*

Figure 4 summarizes sprouting assay findings. Spheroid area ratio of CTG was significantly increased than in the ISG ( $P \leq 0.01$ ), but it was not different from

the other groups ( $P>0.05$ ). PBMG demonstrated increased cell migration in a 3D matrix in comparison to the ISG ( $P\leq 0.01$ ), indicating a potential angiogenesis stimulation.

## Discussion

The present study demonstrates, *in vitro*, that revascularization therapy modifies the behavior of the apical papilla and endothelial cells and that PBM and PDT minimize this damage. It was observed that PDT and PBM have the potential to be employed in the clinical setting since PDT favored APCs and endothelial cells viability and PBM stimulated angiogenesis. In the cytotoxicity and sprouting assay, PDT and PBM demonstrated better results than the irrigating solution alone that is the protocol recommended by the AAE (30). These findings reinforce the need to continue *in vivo* researches in order to evaluate the potential of these therapies as complementary to revascularization protocols.

In order to reproduce the clinical setting in this *in vitro* study, it was used solutions that irrigated root canals of extracted teeth according to AAE protocol (30). In this *in vitro* setting, EDTA interacted with dentin. It is well established in the literature that the contact of EDTA with dentin releases dentin-derived growth factors (TGF- $\beta$ , BMP2) and angiogenesis factors (PDGF, VEGF, FGF2) (34, 35, 36). These factors are important for cell survival, proliferation and differentiation (34, 35, 37, 38, 39) and can interfere in the results analyzed herein.

However, it is understood that cell culture *in vitro* methodologies lack fidelity when compared to *in vivo* situations. When isolated, cells in culture are more vulnerable and the plastic dish is much less complex when compared to the organization of tissue or an organism (40). The *in vivo* cytotoxic effect of drugs is, for example, reduced by phagocytic cells. Also, lymphatic and blood channels dilute and transport the drug (41). Therefore, it was performed a pilot study and the chemical solutions from the irrigating procedure obtained were diluted in a 0.5% concentration in cell culture media (42, 43).

Since cells in culture have a higher turn over than in *in vivo* organism, PBM protocol was adapted. In order to simulate the clinical setting of daily applications, the present *in vitro* model employed light applications at a 6-hour interval that resulted in 5 applications during 24 hours (16, 17, 23). As observed in previous studies, this interval was used since laser therapy has a dose-dependent effect in the biological responses and there seems to have a cumulative effect in each new dose application (16, 17, 23).

The PDT protocol demands the use of a photosensitizer agent (methylene blue) that will bind to the microorganism cell membrane. After light irradiation in a specific wavelength combined to the absorption peak of the photosensitizer agent, there is a formation of singlet oxygen (highly reactive) that will lead to the microorganism death by cell membrane destruction (44). Since PDTG has irrigating solution and methylene blue associated to the light exposure, it was analyzed the effect of methylene blue alone as a control.

Interestingly, it was observed that PDT favored APCs viability more significantly than PBM, when compared to its control, MBG and ISG, respectively. This fact may be related to the laser application, considering that in the PDTG a single application was performed, resulting in a total energy of 5.4J, and that in the PBMG the total energy of 5.0J was fragmented into five applications of 1J. Previous studies have shown that cell viability in human exfoliated deciduous teeth can be positively influenced by a greater dose of energy dispensed in a single moment (45).

The cytotoxic effect of irrigating solution associated or not to complementary therapies to revascularization protocol was evaluated with SRB staining since this assay has demonstrated better predictive power when compared to others (46). The findings from this assay evidenced the beneficial effect of PBM and PDT when employed as complementary therapies to revascularization protocol, since it demonstrated to reduce the cytotoxic effect of irrigating solution, maintaining cell viability and stimulating repair.

The polarity assay, associated to migration velocity and directionality, are indicators to evaluate cell migration. In cell polarity assay, PBMG and PDTG had

less quantity of rounded cells in comparison to ISG, what indicates cell viability preservation. In this regard, these therapies have potential to contribute to cell migration and, in revascularization cases, the recruitment of cells from the apical papilla is important to tissue regeneration (2).

In the migration velocity and directionality analysis, all evaluated groups impaired cell migration when compared to CTG. Since cell morphology was preserved in PBM and PDT treatments, it is possible that cell migration is influenced by other factors. Therefore, it is important to study different revascularization protocols in the future. Even though combination of other irrigating solutions has been evaluated (47, 48), the literature demonstrates that association of NaOCl and EDTA is still the best option available. NaOCl has the ability to dissolve organic matter and has antimicrobial activity, while EDTA stimulate dentin-derived growth factors and smear layer removal, which increases stem cell adhesion (47, 49, 50).

Since one of the steps during the revascularization protocol is to fill the root canal with a blood clot, it was analyzed the potential of PBM and PDT to stimulate angiogenesis with a sprouting assay using endothelial cells. Spheroids with endothelial cells have been used as an angiogenesis model in order to evaluate formation of capillaries-like structures *in vitro* (28). The results herein demonstrated that PBM induced a higher migratory distance in a 3D matrix in comparison to the ISG. This indicates that PBM stimulate angiogenesis and can favor the formation of a more stable blood clot in revascularization cases. This effect can stimulate tissue repair after clot formation in the root canal, because laser interaction with cells accelerate local microcirculation and reduce inflammatory markers. Altogether, PBM induces cell bioestimulation and the healing process (51).

As observed herein, it is concluded that PBM and PDT have potential to be used as complementary therapies to the pulp revascularization protocol in necrotic teeth with open apex. It is suggested that *in vivo* studies can complement to the findings observed in this study.

## References

1. Çalışkan MK, Kaval ME. Endodontic management of immature teeth with spontaneous apical closure and periapical lesions: case series and review of the literature. *Dent Traumatol.* 2015;31(4):324-327.
2. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34(6):645-651.
3. Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod.* 2008;34(8):919-925; Discussion 1157.
4. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011;37(2):133-138.
5. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2013;39(3 Suppl):S30-43.
6. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-171.
7. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod.* 2011;37(4):562-567.

8. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006;32(10):979-984.
9. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34(6):728-734.
- 10 . Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *JEndod.* 2008;34(2):138-142.
11. Pinheiro SL, Schenka AA, Neto AA, de Souza CP, Rodriguez HM, Ribeiro MC. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):521-526.
12. Plotino G, Grande NM, Mercade M. Photodynamic therapy in endodontics. *Int Endod J.* 2019;52(6):760-774.
13. Henriques ACG. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. *Odontologia Clínica Científica.* 7:197-200. 2008.
14. Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2009;59(1):35-46.
15. Moreira MS, Diniz IM, Rodrigues MF, de Carvalho RA, de Almeida Carrer FC, Neves II, et al. In vivo experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2017;166:180-186.

16. Zaccara IM, Mestieri LB, Moreira MS, Grecca FS, Martins MD, Kopper PMP. Photobiomodulation therapy improves multilineage differentiation of dental pulp stem cells in three-dimensional culture model. *J Biomed Opt.* 2018;23(9):1-9.
17. Zaccara IM, Mestieri LB, Pilar EFS, Moreira MS, Grecca FS, Martins MD, et al. Photobiomodulation therapy improves human dental pulp stem cell viability and migration in vitro associated to up regulation of histone acetylation. *Lasers Med Sci.* 2020.
18. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009;35(11):1567-1572.
19. Gomes-Filho JE et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.01.007>
20. Van Breugel HFI et al. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine.* 1992: 12528-537.
21. Pereira AN et al. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2002: 31:263–267.
22. Saygun I et al. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2008: 23:211–215.

23. Meneguzzo DT et al. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. *Proc. SPIE6846*, 684601 (2008).
24. Skopin MD et al. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. 2009.
25. Basso FG et al. In Vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts. *International Journal of Dentistry*. doi:10.1155/2012/719452. 2012.
26. Carvalho NC et al. Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser Photobiomodulation. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. 178 (2018) 348–354.
27. Almeida-Júnior LA et al. Effect of single and multiple doses of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). *Lasers in Medical Science*. (2019) 34:1917–1924.
28. Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, et al. Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. *Tissue Eng*. 2004;10(9-10):1536-1547.
29. Laschke MW et al. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*. 35 (2017) 782–791.
30. American Association of Endodontists. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Available at: [https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf)



31. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012;38(7):971-976.
32. Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One.* 2011;6(8):e22865.
33. Koh W, Stratman AN, Sacharidou A, Davis GE. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol.* 2008;443:83-101.
34. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblastin vitro. *Int J Dev Biol.* 1992;36(4):491-503.
35. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6
36. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructurallocalisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J.* 2000;32(8):489-94.
37. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent.* 2007;35(8):636-42.

38. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res.* 1990;5(7):717-23.
39. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.* 2006;13(7):611-20.
40. Freshney RI. Measurement of cytotoxic and viability, in: culture of animal cells: a manual of basic technique, 2nd ed. new york, wiley-liss; 1990:245–56.
41. Wall GL, Dowson J, Shipman C. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(2):230-241.
42. Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(4):473-481.
43. Liu S, Zhai H, Fu S, Cui C, Xu J, Jiang J, Pan P, Zhang B. Evaluation of the cytotoxic effects of sodium hypochlorite on human dental stem cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 2018.
44. Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2013;39(3):411-414.
45. Moura-Netto C et al. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res.* 2016; 31;30(1).

46. Van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*. 2015;8:47.
47. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod*. 2011;37(8):1109-1115.
48. Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endod J*. 2016;11(4):293-297.
49. Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*. 2014;40(1):51-55.
50. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod*. 2011;37(11):1536-1541.
51. Lins RD, Dantas EM, Lucena KC, Catão MH, Granville-Garcia AF, Carvalho Neto LG. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. *An Bras Dermatol* 2010;85(6):849-855.

## Figure legends

**Figure 1.** (A) APCs proliferation (% of control) of different groups. Horizontal bars that connect vertical bars represent statistical significance between groups (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ).

**Figure 2.** Cell polarity index (PI) in the different groups. (A) Dotted white lines indicate the length of the main migration axis (L1) and the length of the perpendicular axis that intersects the center of the nucleus of the cell (L2). (a) Cell from the CTG with low PI (rounded) and (b) cell from the PBMG with high PI (elongated) (B-C-D-E-F) Histograms of PI from cells evaluated in the respective groups: CTG, ISG, PBMG, MBG and PDTG.

**Figure 3.** (A) Cell migration velocity of different groups. Horizontal bars that connect vertical bars represent statistical significance between groups (\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ). (B) Cell directionality index of different groups. Horizontal bars that connect vertical bars represent statistical significance between groups (\*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ). (C-D-E-F-G) Polar plot graphs of cell migration directionality of different groups. Each line represents one migratory cell.

**Figure 4.** (A) Graphic representation of average ratio of spheroid area at 96h by spheroid area at time 0h. Horizontal bars that connect vertical bars represent statistical significance between groups (\*\* $P \leq 0.01$ ). (B) Illustrative images of spheroids formed in PBMG at time 0h (a) and in 96h (b). Illustration of area acquisition of spheroids at time 0h (c) and in 96h (d) in the ImageJ software.

Figure 1

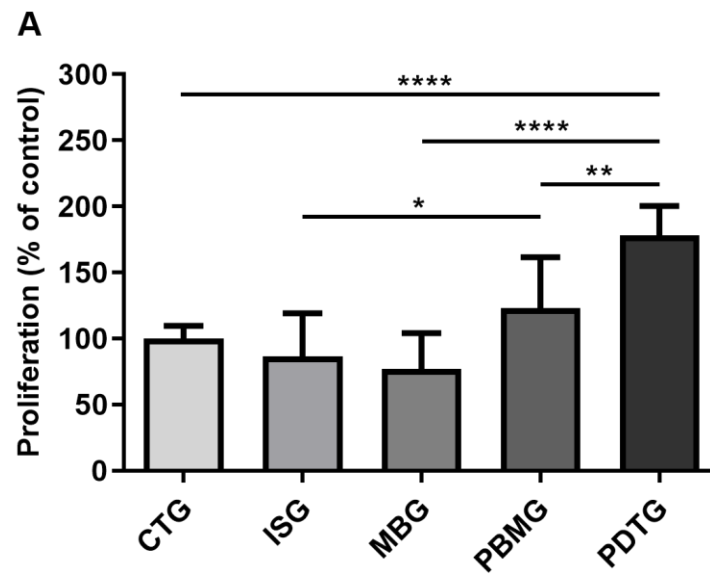


Figure 2

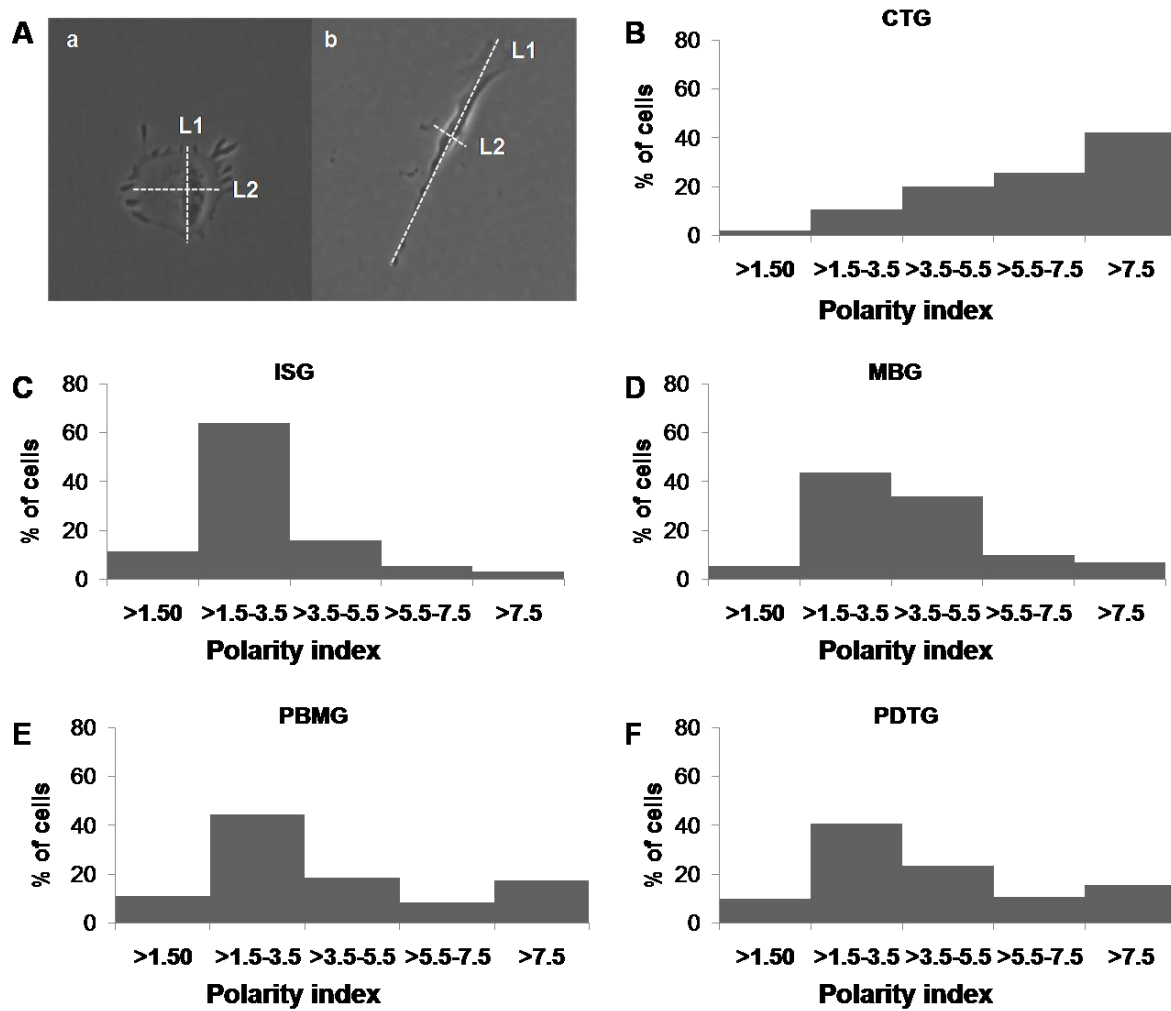


Figure 3

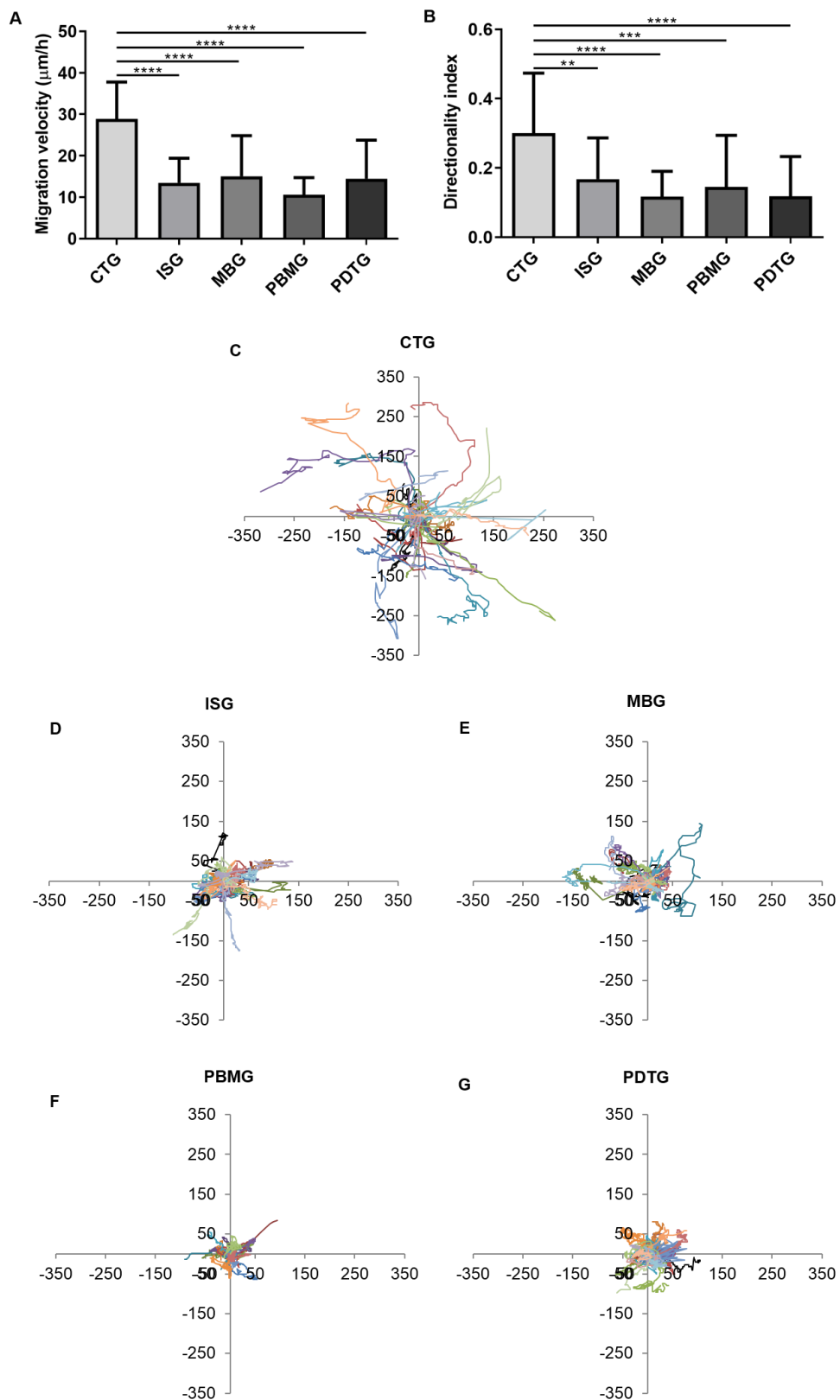
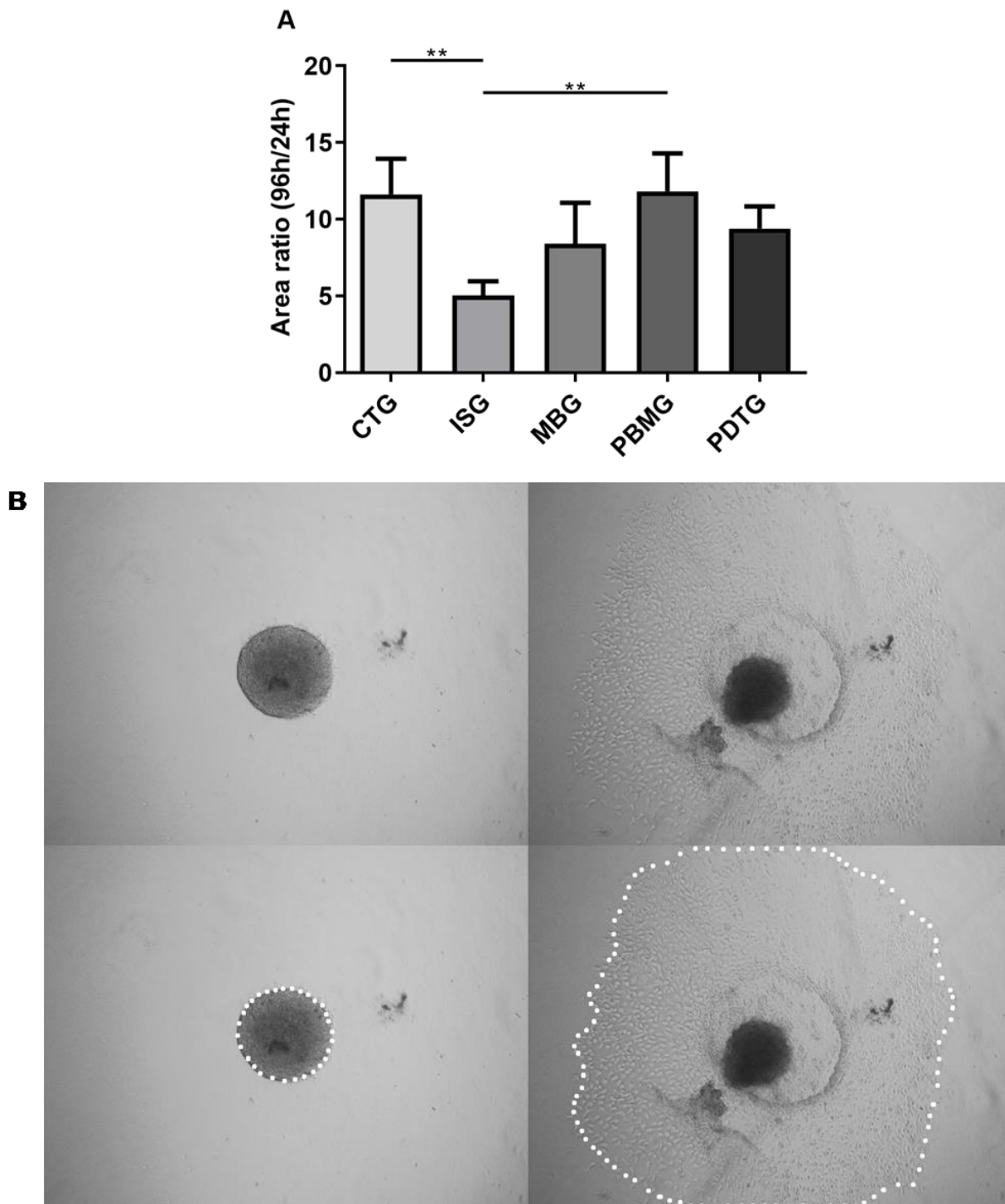


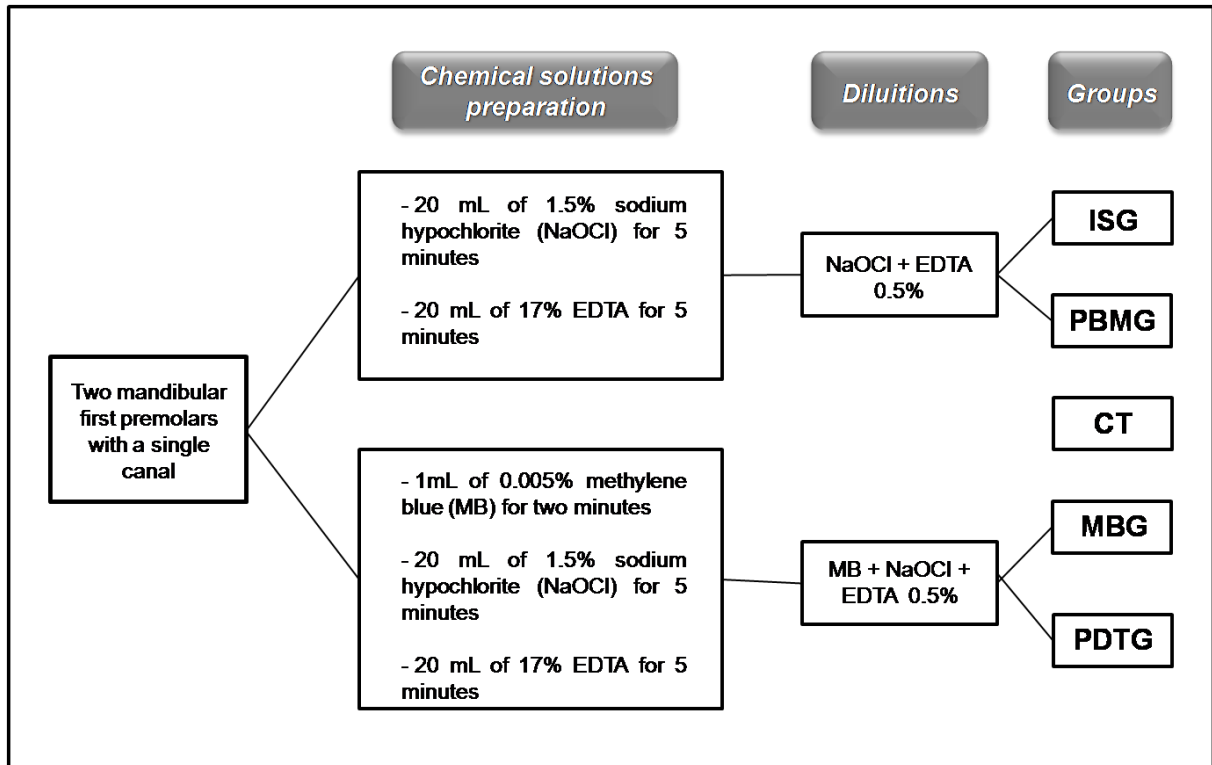
Figure 4





## Attachment 1

## Methodology Flowchart



**Acknowledgements**

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A revascularização vem sendo estudada, apresentando resultados favoráveis para o tratamento de dentes com rizogênese incompleta. Nestes casos, o controle da infecção presente no sistema de canais radiculares e a capacidade de proliferação e diferenciação das células da papila apical, aprisionadas no coágulo, são fundamentais para que complementação radicular possa ocorrer. Sendo assim, a presente investigação contribuiu com informações a respeito do efeito da PDT e da PBM em células da papila apical e em células epiteliais. Pelos resultados, ambas as terapias apresentam potencial para serem empregadas de forma complementar ao protocolo de revascularização pulpar, recomendado pela AAE (30). Estudos adicionais envolvendo metodologias *in vivo* são necessários para avaliar o efeito das terapias em condições clínicas que não podem ser fielmente reproduzidas em estudos *in vitro*.

## 6 REFERÊNCIAS

ABE G L et al. Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em scaffold de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*. **Tese (Mestrado em Odontologia)**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

ALMEIDA-JÚNIOR L A; MARQUES N C T; PRADO MTO; OLIVEIRA TM; SAKAI VT. Effect of single and multiple doses of low-level laser therapy on viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). **Lasers in Medical Science**. (2019) 34:1917–1924.

ALMUSHAYT A; NARAYANAN K; ZAKI AE. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. **Gene Ther**. 2006;13(7):611-20.

ALKAHTANI, A.; ALKAHTANY, S. M.; ANIL, S. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. **J Contemp Dent Pract**, v. 15, n. 4, p. 473-81, Jul 2014. ISSN 1526-3711. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25576116> >.

ALRAIES, A. et al. Variation in human dental pulp stem cell ageing profiles reflect contrasting proliferative and regenerative capabilities. **BMC Cell Biol**, v. 18, n. 1, p. 12, 02 2017. ISSN 1471-2121. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28148303> >.

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Available at: [https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf)

ANDREASEN, J. O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E. C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dent Traumatol**, v. 18, n. 3, p. 134-7, Jun 2002. ISSN 1600-4469. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110105> >.

BASSO, F. G. et al. In Vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts. **International Journal of Dentistry**. doi:10.1155/2012/719452. 2012.

BÈGUE-KIRN C; SMITH AJ; RUCH JV; WOZNEY JM; PURCHIO A; HARTMANN D. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblastin vitro. *Int J Dev Biol*. 1992;36(4):491-503.

CAVALCANTI T. M. et al. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**; v. 86 n.5 p. 955-60. Campina Grande, Paraíba. 2011.

CARVALHO, N. C; GUEDES, S. A. G; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. et al. Analysis of Aloe vera cytotoxicity and genotoxicity associated with endodontic medication and laser Photobiomodulation. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, B: Biology. 178 (2018) 348–354.

CHEN, M. Y. et al. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. **IntEndod J**, v. 45, n. 3, p. 294-305, Mar 2012. ISSN 1365-2591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22077958> >.

CVECK M. et al. Prognosis of luxated nonvital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha a retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 45-55.

DING, R. Y. et al. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 745-9, May 2009. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410097> >.

FARHAD MOLLASHAHI, N.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. **Iran Endod J**, v. 11, n. 4, p. 293-297, 2016. ISSN 1735-7497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27790258> >.

FIMPLE, J. L. et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. **J Endod**, v. 34, n. 6, p. 728-34, Jun 2008. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498901> >.

FINKELMAN RD; MOHAN S; JENNINGS JC; TAYLOR AK; JEPSEN S; BAYLINK DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. **J Bone Miner Res**. 1990;5(7):717-23.

FRESHNEY R I. Measurement of cytotoxic and viability, In: culture of animal cells: a manual of basic technique, 2nd ed. new york, wiley-liss; 1990:245–56.

GALLER, K. M. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. **IntEndod J**, v. 49, n. 10, p. 926-36, Oct 2016. ISSN 1365-2591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715631> >.

GARCEZ, A. S. et al. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. **J Endod**, v. 34, n. 2, p. 138-42, Feb 2008. ISSN 0099-2399. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215668> >.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Evaluation of photodynamic therapy on fibroblast viability and cytokine production. **PhotodiagnosisPhotodynTher**, v. 13, p. 97-100, Mar 2016. ISSN 1873-1597. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26796031> >.

HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A.; TEIXEIRA, F. B. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. **J Endod**, v. 39, n. 3 Suppl, p. S30-43, Mar 2013. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439043> >.

HENRIQUES ACG. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. *OdontologiaClínicaCientífica*. 7:197-200. 2008.

HUANG, G. T. et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. **J Endod**, v. 34, n. 6, p. 645-51, Jun 2008. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498881> >.

KOH, W. et al. *In vitro* three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. **Methods Enzymol**, v. 443, p. 83-101, 2008. ISSN 1557-7988. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772012> >.

KOMINE, C.; TSUJIMOTO, Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 39, n. 3, p. 411-4, Mar 2013. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402518> >.

LAMERS, M. L. et al. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22865, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21826213> >.

LASCHKE M W; MENGER M D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**. 35 (2017) 782–791.

LINS, R. D. et al. Biostimulation effects of low-power laser in the repair process. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 6, p. 849-55, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1806-4841. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308309> >.

LIU S; ZHAI H; FU S; CUI C; XU J; JIANG J; PAN P; ZHANG B. Evaluation of the cytotoxic effects of sodium hypochlorite on human dental stem cells. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 2018.

LOPES L. P. B. et al. Efeito da terapia de fotobiomodulação sobre a dor pós-operatória do tratamento endodôntico: estudo clínico controlado e randomizado. **Tese (Mestrado em Odontologia)**. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2017.

LOVELACE, T. W. et al. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 133-8, Feb 2011. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238791> >.

MAROTTI, J. et al. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 1, p. 303-9, Jan 2013. ISSN 1435-604X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22790655> >.

MARTIN, D. E. et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. **J Endod**, v. 40, n. 1, p. 51-5, Jan 2014. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24331991> >.



MENEGUZZO, D. T.; EDUARDO, C. P.; RIBEIRO, M. S.; MARQUES, M. et al. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. *Proc. SPIE*6846, 684601 (2008).

MOHAMMADI, Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J*, v. 59, n. 1, p. 35-46, Feb 2009. ISSN 0020-6539. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19323310> >.

MOREIRA, M. S. et al. *In vivo* experimental model of orthotopic dental pulp regeneration under the influence of photobiomodulation therapy. *J PhotochemPhotobiol B*, v. 166, p. 180-186, Jan 2017. ISSN 1873-2682. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27927605> >.

MOURA-NETTO, C et al. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Pulp Biology*. Mar 16, 2016.

NOSRAT, A.; SEIFI, A.; ASGARY, S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod*, v. 37, n. 4, p. 562-7, Apr 2011. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419310> >.

PEREIRA, A. N. et al. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Cell Growth and Procollagen Synthesis of Cultured Fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2002: 31:263–267.

PINHEIRO, S. L. et al. Photodynamic therapy in endodontic treatment of deciduous teeth. **Lasers Med Sci**, v. 24, n. 4, p. 521-6, Jul 2009. ISSN 1435-604X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18427873> >.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M. Photodynamic therapy in endodontics. **IntEndod J**, v. 52, n. 6, p. 760-774, Jun 2019. ISSN 1365-2591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30548497> >.

ROBERTS-CLARK DJ; SMITH AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000;45(11):1013-6

SALLES, L. P. et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. **J Endod**, v. 38, n. 7, p. 971-6, Jul 2012. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22703663> >.

SAYGUN, I. et al. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2008: 23:211–215.

SHAH, N. et al. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. **J Endod**, v. 34, n. 8, p. 919-25; Discussion 1157, Aug 2008. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18634921> >.

SILVA C. M. et al. Efeito as associação da terapia fotodinâmica no tratamento endodôntico de dentes decíduos com polpa necrosada. **Tese (Doutorado em Endodontia)**. Faculdade de Odontologia. Universidade de Taubaté. São Paulo, 2013.

SILVA GARCEZ, A. et al. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 4, p. e93-8, Oct 2006. ISSN 1528-395X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16997103> >.

SKOPIN, M. D. ET al. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**. 2009.

SONOYAMA, W. et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. **PLoS One**, v. 1, p. e79, Dec 2006. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183711> >.

SONOYAMA, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **J Endod**, v. 34, n. 2, p. 166-71, Feb 2008. ISSN 0099-2399. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18215674> >.

SOUKOS, N. S. et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. **J Endod**, v. 32, n. 10, p. 979-84, Oct 2006. ISSN 0099-2399. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982278> >.

SOUZA TS, Deonízio MA, Batista A, Kowalczuck A, Sydney GB. Regeneração endodôntica: existe um protocolo? *Rev Odontol Bras Central* 2013;22(63). ISSN 1981-3708

TOMSON PL; GROVER LM; LUMLEY PJ; SLOAN AJ; SMITH AJ; COOPER PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*. 2007;35(8):636-42.

TREVINO, E. G. et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. **J Endod**, v. 37, n. 8, p. 1109-15, Aug 2011. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763903> >.

VAN BREUGEL, H. F. I.; BÄR. D. et al. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1992: 12528-537.

VAN TONDER A; JOUBERT AM, CROMARTY AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Res Notes**. 2015;8:47.

WALL, G. L.; DOWSON, J.; SHIPMAN, C. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 33, n. 2, p. 230-41, Feb 1972. ISSN 0030-4220. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4500598> >.

WENGER, A. et al. Modulation of *in vitro* angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. **Tissue Eng**, v. 10, n. 9-10, p. 1536-47, 2004 Sep-Oct 2004. ISSN 1076-3279. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588413> >.

WIGLER, R. et al. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. **J Endod**, v. 39, n. 3, p. 319-26, Mar 2013. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402501> >.

WITHERSPOON, D. E. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. **J Endod**, v. 34, n. 7 Suppl, p. S25-8, Jul 2008. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565368> >.

XU, Y. et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. **J Endod**, v. 35, n. 11, p. 1567-72, Nov 2009. ISSN 1878-3554. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840649> >.

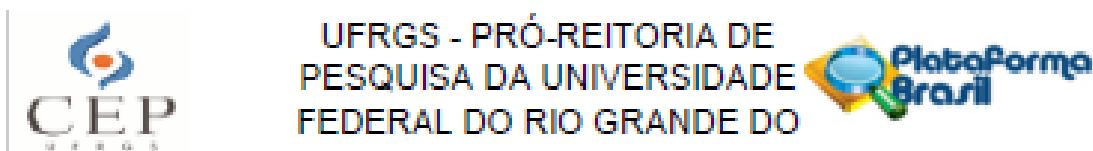
ZACCARA, I. M. et al. Photobiomodulation therapy improves multilineage differentiation of dental pulp stem cells in three-dimensional culture model. **J Biomed Opt**, v. 23, n. 9, p. 1-9, 09 2018. ISSN 1560-2281. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30203632> >.

ZACCARA, I. M. et al.. Photobiomodulation therapy improves human dental pulp stem cell viability and migration *in vitro* associated to upregulation of histone acetylation. **Lasers Med Sci**, Feb 2020. ISSN 1435-604X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32095920> >.

ZHAO S; SLOAN AJ; MURRAY PE; LUMLEY PJ; SMITH AJ. Ultra structural localization of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. **Histochem J**. 2000;32(8):489-94.

ÇALIŞKAN, M. K.; KAVAL, M. E. Endodontic management of immature teeth with spontaneous apical closure and periapical lesions: case series and review of the literature. **Dent Traumatol**, v. 31, n. 4, p. 324-7, Aug 2015. ISSN 1600-9657. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25731672> >.

## Anexo A



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do efeito da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação no protocolo de revascularização em cultura celular da papila apical

**Pesquisador:** Patrícia Maria Pöll Kopper Móra

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 03575218.6.0000.5347

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.115.074

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado de Mariana Castello de Carvalho Deluca, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, coordenado pela profa. Patrícia Maria Pöll Kopper Móra, do da Faculdade de Odontologia (FO) da UFRGS. O estudo objetiva avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica (PDT) e da terapia de fotobiomodulação (FBM) sobre culturas de células na presença de dentina com vistas ao seu uso como coadjuvante ao tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens. Para esse objetivo, serão utilizados dentes extraídos de pacientes. Está previsto o uso de 62 dentes (4 terceiros molares e 58 pré-molares inferiores).

Os dentes empregados no estudo serão doados por participantes da pesquisa atendidos no ambulatório de cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial da FO-UFRGS (ANEXO D), de ambos os sexos, independente de raça, com idade entre 18 e 25 anos, em bom estado de saúde sistêmica e bucal e que desejem participar da pesquisa doando o elemento dentário mediante assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e de um Termo de Doação de Dente. Os dentes serão empregados para a obtenção de células tronco da papila apical e em ensaios de citotoxicidade, proliferação, bioatividade, proteínas osteogênicas e tubulogênese, bem como para os ensaios de aderência dessas células à superfície dentinária.

O estudo será realizado no Laboratório de Endodontia, no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia e no Ambulatório de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial da FO-UFRGS, além

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Famosinha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer 3.115.074

do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS. O projeto tem a previsão de duração de 48 meses, iniciando em 21 de novembro de 2018 e está orçado em R\$45.163,00, constando como tendo financiamento próprio.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, *in vitro*, o efeito da terapia fotodinâmica e da terapia de fotobiomodulação sobre cultura de células na presença de dentina.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação em células tronco da papila apical (SCAPs) por meio dos ensaios de MTT e SRB.
- Avaliar a capacidade da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação de promover proliferação celular por meio do ensaio de cicatrização da ferida.
- Avaliar o efeito de bioatividade celular da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação por meio da enzima fosfatase alcalina e identificar depósitos minerais por meio da coloração de AlizarinRed.
- Avaliar a influência do efeito angiogênico da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação por meio do ensaio de tubulogênese, associado ao ensaio de SRB em células endoteliais (HUVEC).
- Avaliar as vias envolvidas no potencial osteogênico a partir de marcadores osteogênicos através do ensaio de PCR Real Time.
- Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica e da fotobiomodulação na aderência celular à superfície dentinária do canal radicular por meio da microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a influência da endotoxina LPS nos resultados dos ensaios.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos descritos pelos autores são "Quebra de sigilo que será minimizada pelo uso de códigos de identificação dos dentes doados. Os termos e formulários preenchidos para esta pesquisa serão mantidos sob responsabilidade do pesquisador principal por, pelo menos, 5 (cinco) anos".

Sobre os benefícios, os autores dizem que "Os participantes da pesquisa, que doarão os dentes, serão beneficiados indiretamente pelo fato do estudo gerar uma melhor compreensão por parte dos profissionais sobre o efeito da terapia fotodinâmica e da terapia de fotobiomodulação nos tratamentos de dentes com ápice aberto".

Pendência: Os benefícios encontram-se descritos apenas no formulário da Plataforma Brasil,

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Farcopilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UFRGS - PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 3.115.074

devendo ser também adicionados ao corpo do projeto original – ATENDIDO.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo encontra-se bem delimitado, com objetivo e metodologia claros.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Acompanham o projeto os seguintes documentos:

- Formulário básico da Plataforma Brasil
- Projeto original
- Folha de Rosto assinada pelo Vice-Pró-Reitor de Pesquisa
- Carta de anuência do responsável pelo Ambulatório de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial da FO-UFRGS (Pendência: nome do coordenador do setor não identificado) – ATENDIDO: Foi adicionado novo documento, agora com a identificação da responsável, Adriana Corsetti.
- Carta de anuência do Núcleo de Pesquisa Básica da FO-UFRGS assinada por Fernanda Visloli
- Carta de anuência do Laboratório de Endodontia da FO-UFRGS assinada por Régis Burmelsier Santos
- Carta de anuência do Diretor do Centro de Microscopia e Microanálise
- Termo de doação de dentes humanos
- TCLE

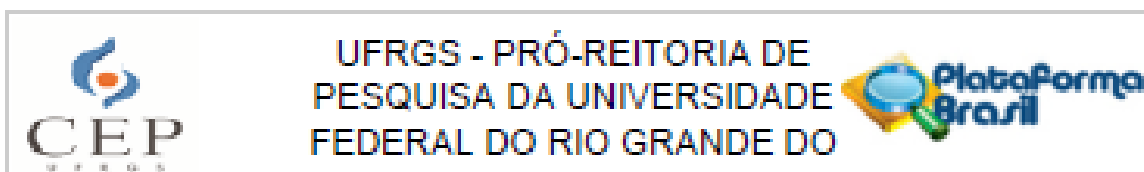
**Pendência:** O cronograma estipulado para a pesquisa tem a duração de 48 meses, todavia trata-se de um projeto de mestrado. Esclarecer – ATENDIDO: os autores esclarecem que "Devido a complexidade do estudo a aluna de mestrado defenderá apenas resultados parciais, ficando o pesquisador responsável pelo projeto encarregado de concluir o estudo após a defesa de mestrado."

**Pendência no TCLE:** O primeiro parágrafo descrevendo o estudo está em linguagem muito rebuscada, dificultando a compreensão do paciente. Substituir por linguagem mais simples; as informações sobre as responsáveis pelo estudo nesse parágrafo são dispensáveis. Sugestão adicional: Inverter o primeiro e segundo parágrafos, iniciando o TCLE com o convite a participar da pesquisa – ATENDIDO.

**Pendência no TCLE:** Após a passagem "A participação nesta pesquisa não lhe acarretará nenhum gasto previsível.", acrescentar "e você não receberá nenhuma remuneração por participar da mesma." – ATENDIDO.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Famosilha CEP: 90.040-080  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br





Continuação do Parecer: 3.115.074

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tendo sido atendidas todas as requisições, recomenda-se a aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1261990.pdf	10/01/2019 15:53:51		Aceito
Outros	Resposta_parecer_CEP.pdf	10/01/2019 15:53:02	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_Cirurgia.jpg	10/01/2019 15:49:50	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP.pdf	10/01/2019 15:42:53	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP.pdf	10/01/2019 15:42:35	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoCEP.pdf	26/11/2018 11:22:21	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_nucleo.jpg	23/11/2018 16:00:36	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_LABENDO.jpg	23/11/2018 15:56:20	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_CMM.pdf	23/11/2018 15:56:11	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Doacao.pdf	23/11/2018 15:55:40	Patrícia Maria Pol Kopper Móra	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Fariópolis CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3758 Fax: (51)3308-4085 E-mail: [efice@propeq.ufrgs.br](mailto:efice@propeq.ufrgs.br)



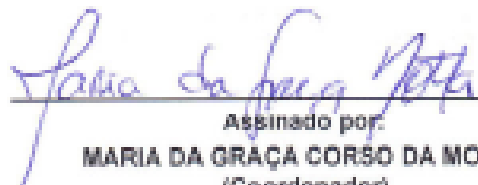
UFRGS - PRÓ-REITORIA DE  
PESQUISA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO GRANDE DO



Continuação do Parecer: 3.115.074

Não

PORTO ALEGRE, 17 de Janeiro de 2019

  
Assinado por:  
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA  
(Coordenador)

**Anexo B**

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Estudo:** “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROTOCOLO DE REVASCULARIZAÇÃO EM CULTURA CELULAR DA PAPILA APICAL”

**Participante da pesquisa:** \_\_\_\_\_

**Código:** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa, de maneira voluntária, por ter tido a indicação de extração do seu dente por motivo cirúrgico e/ou periodontal e/ou ortodôntico, que são independentes da realização deste estudo.

O objetivo deste estudo é avaliar a ação de um procedimento auxiliar (terapia fotodinâmica) na desinfecção dos canais radiculares e o efeito do uso de laser (terapia de fotobiomodulação) para estimular a cicatrização dos tecidos após o tratamento de canal.

A sua participação será apenas pela doação do seu dente já extraído. Este dente, por sua vez, será submetido a uma série de procedimentos em laboratório (por exemplo, corte da raiz, preparo do canal e análises por imagem), que não irão gerar riscos ou desconfortos a você. Não são esperados desconfortos adicionais por estar participando da pesquisa. Os desconfortos esperados poderão ser aqueles resultantes do procedimento de extração do dente e que podem ocorrer independentemente da participação no estudo.

Apesar dos resultados serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, a sua privacidade será preservada (seu nome não será revelado) quanto aos dados confidenciais que possam ser envolvidos na pesquisa. O risco de quebra de sigilo de seus dados será minimizado pelo uso de códigos de identificação dos dentes doados. Os termos e formulários preenchidos para esta pesquisa serão mantidos sob responsabilidade do

pesquisador principal por, pelo menos, 5 (cinco) anos. Seus beneficiados serão indiretos uma vez que o estudo irá gerar uma melhor compreensão por parte dos profissionais sobre um procedimento auxiliar (terapia fotodinâmica) na desinfecção dos canais radiculares e sobre o uso de laser (terapia de fotobiomodulação) para estimular a cicatrização dos tecidos após o tratamento de canal.

Caso você não queira participar do estudo, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente. Se você se recusar a participar ou quiser desistir, em qualquer fase da pesquisa, não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento ou acompanhamento após a cirurgia, o qual continuará normalmente.

A participação nesta pesquisa não lhe acarretará nenhum gasto previsível e você não receberá nenhuma remuneração por participar da mesma.

Você terá toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa a qualquer momento, podendo ou não concordar em participar. Toda e qualquer dúvida no decorrer do estudo poderá ser esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa através do telefone (51) 3308 5191. A pesquisadora Profa. Dra. Patrícia Maria Poli KopperMóra estará sempre à disposição para esclarecimentos. A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa UFRGS, endereçado a Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317, Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre/RS - CEP: 90040-060 - Fone: (51) 3308.3738. E-mail: [etica@propesq.ufrgs.br](mailto:etica@propesq.ufrgs.br)

*Eu \_\_\_\_\_,  
CPF \_\_\_\_\_, certifico que, tendo lido as informações acima e estando suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pelos pesquisadores, estou plenamente de acordo com a doação do dente que foi extraído para a realização do experimento.*

*Declaro que também fui informado que se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com o CEP-UFRGS através do telefone (51) 3308 3738.*

*Deste termo de consentimento livre esclarecido estão sendo geradas duas vias, sendo uma direcionada ao participante da pesquisa e a outra para o pesquisador.*

*Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.*

---

*Nome do participante da pesquisa*

---

*Nome do pesquisador*

Caso o participante da pesquisa seja analfabeto, o convite, a leitura do TCLE, os esclarecimentos e a assinatura do participante da pesquisa deverão ser acompanhados por testemunha a ser identificada a seguir.

*Este formulário foi lido  
para \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ por  
\_\_\_\_\_ e  
nquanto eu estava presente.*

*Nome da testemunha: \_\_\_\_\_*

*Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_*

*Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_*

## Anexo C



Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia

**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_ residente à  
\_\_\_\_\_, aceito  
doar do meu dente \_\_\_\_\_ e concordo em doá-lo para a pesquisa intitulada  
“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E DA  
FOTOBIMODULAÇÃO NO PROTOCOLO DE REVASCULARIZAÇÃO EM  
CULTURA CELULAR DA PAPILA APICAL”.

Estou ciente de que o dente foi extraído por indicação terapêutica para a melhoria da minha saúde, como documentado no prontuário da FO - UFRGS. A pesquisa citada anteriormente deverá ter sido previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, sendo preservada a identidade do doador na divulgação dos resultados.

Porto Alegre, setembro de 2018

---

Assinatura do Responsável

---

Testemunha

---

Testemunha