



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

**ALYSON MARLOS DE OLIVEIRA MIRANDA**

**EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS  
PULPARES CULTIVADAS SOBRE FILMES POLIMÉRICOS**

**NATAL/RN**

**2017**

**ALYSON MARLOS DE OLIVEIRA MIRANDA**

**EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS  
PULPARES CULTIVADAS SOBRE FILMES POLIMÉRICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.

Natal/RN

2017

Catologação na Fonte. UFRN / Departamento de Odontologia  
Biblioteca Setorial de Odontologia “Profº Alberto Moreira Campos”.

Miranda, Alyson Marlos de Oliveira.

Efeito da laserterapia sobre a proliferação de células pulpare  
cultivadas sobre filmes poliméricos / Alyson Marlos de Oliveira  
Miranda. – Natal, RN, 2017.

24 f.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.

Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal  
do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde, Natal, 2017.

1. Materiais Biocompatíveis - Monografia. 2. Regeneração -  
Monografia. 3. Lasers - Monografia. I. Barboza, Carlos Augusto  
Galvão. II. Título.

RN/UF/BSO

BLACK D151

**EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS  
PULPARES CULTIVADAS SOBRE FILMES POLIMÉRICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Aprovado em: 19 / 06 / 2017

---

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.  
Departamento de Morfologia/UFRN

---

Prof. Dr. Antônio de Lisboa Lopes Costa.  
Departamento de Odontologia/UFRN

---

Prof. Dr. Euler Maciel Dantas.  
Departamento de Odontologia/UFRN

## DEDICATÓRIA

A Deus, por seu infinito amor.

A meus pais, meu porto seguro.

À minha vó Alice, meu colo de Deus.

À Rayane, que não é só um ombro amigo, mas todo um coração.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus,

Por guiar minha vida, minha família, minhas atitudes diárias. Tudo o que eu fizer terá orações que me levará até Ele.

A meus pais,

Pela presença e total dedicação. Em vocês encontro todos os porquês e motivos.

A Rayane,

Pelo companheirismo de sempre. Por tornar o amor um segundo nome, que a vida me deu de presente.

A meu orientador Carlos Augusto,

Pelo acolhimento e confiança, desde o primeiro momento.

Aos professores Costinha, Edna, Ângela e Lélia,

Pelo apoio ao projeto e por me ajudarem a descobrir verdades, com ética e paixão.

Aos integrantes do grupo de pesquisa Biologia Crânio Facial,

Pela disponibilidade e desejo de ajudar sempre.

Aos amigos que a Odontologia me deu,

Por compartilharmos momentos, muito além das expectativas sobre cada um de nós e da capacidade de nossas mãos.

## RESUMO

A engenharia de tecidos é uma ferramenta promissora utilizada para obter reparo funcional de diversos órgãos, com a utilização de arcabouços biocompatíveis associados a fatores celulares e teciduais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o estímulo da laser de baixa intensidade ( $1 \text{ J/cm}^2$ ) sobre a adesão e proliferação de células pulpares em filme de ácido polilático (PLA). Foram avaliados três grupos: Grupo 1 (controle) – células cultivadas sobre a superfície plástica de placas de cultivo celular; Grupo 2 – células cultivadas sobre filmes de PLA; Grupo 3 – células cultivadas sobre filmes de PLA e irradiadas com laser de diodo (InGaAlP) com comprimento de onda de 660nm e potência de 30mw, dose de  $1,0 \text{ J/cm}^2$  e irradiação emitida de forma contínua. O experimento foi conduzido em triplicata com os intervalos de tempo 24 e 72h. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas pelo método de exclusão azul de tripan (24 e 72 h) e fotomicrografia na interface biomaterial-plástico. Os resultados mostraram proliferação celular em todos os grupos, sendo significativamente maior no grupo 3 em relação aos grupos 1 ( $p < 0.001$ ) e 2 ( $p < 0.05$ ) no intervalo de 72 horas. Esses dados sugerem que o estímulo do laser, nos parâmetros utilizados, aumenta a proliferação celular, tendo assim uso potencial para aplicações futuras na Odontologia regenerativa.

**Palavras-chave:** Lasers. Materiais Biocompatíveis. Proliferação Celular.

## ABSTRAT

Tissue engineering is a promising tool used to obtain functional repair of several organs, with the use of biocompatible scaffolds associated with cellular and tissue factors. The aim of the present study was to evaluate the effect of low laser laser irradiation ( $1 \text{ J/cm}^2$ ) on adhesion and proliferation of pulp cells cultured on poly lactic acid (PLA) films. Three groups were evaluated: Group 1 (control) - cells cultured on the plastic surface of cell culture plates; Group 2 - cells cultured on PLA films; Group 3 - cells cultured on PLA films and irradiated with diode laser (InGaAIP) with wavelength of 660nm and power of 30mW, dose of  $1 \text{ J/cm}^2$  and irradiation emitted continuously. The experiment was conducted in triplicate at intervals of 24 and 72 h. Cell viability and proliferation were evaluated by the tripan blue exclusion method (24 and 72 h) and photomicrography at the biomaterial-plastic interface. The results showed cellular proliferation in all groups, being significantly higher in Group 3 in relation to groups 1 ( $p < 0.001$ ) and 2 ( $p < 0.05$ ) at 72 h. These data suggest that the stimulation of the laser, in the parameters used, increases the cellular proliferation, thus having potential use for future applications in regenerative dentistry.

**Keywords:** Lasers. Biocompatible materials. Cell proliferation.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>12</b>
2.1	OBTENÇÃO CELULAR.....	12
2.2	FABRICAÇÃO DO FILME PLA .....	12
2.3	CULTIVO CELULAR .....	13
2.4	CULTIVO CELULAR EM FILME DE PLA.....	13
2.5	IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE .....	14
2.6	ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	14
2.7	TESTE DE CONTATO DIRETO.....	15
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	15
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>20</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>211</b>
	<b>ANEXO</b> .....	<b>23</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regeneração dos tecidos craniofaciais continua a ser um desafio clínico na Odontologia, constituindo um amplo campo de pesquisa na Engenharia de tecidos. A perda dos tecidos craniofaciais é ocasionada por uma série de fatores, dentre eles: traumas, neoplasias e doença periodontal.<sup>1</sup> A terapia celular vem sendo amplamente estudada com o objetivo de melhorar o tempo e a qualidade da cicatrização de diversos tecidos orais. A associação dessas células com arcabouços biocompatíveis proporciona um ambiente estrutural favorável ao crescimento celular, que pode ser potencializado com associação a componentes biomoduladores, dentre eles o laser de baixa intensidade (LBI).<sup>2</sup>

O LBI tem sido utilizado em diversas situações clínicas, principalmente em processos cicatriciais. Em virtude de baixas densidades de energia e comprimento de onda utilizados, o LBI é capaz de penetrar facilmente nos tecidos resultando em síntese de fatores de crescimento, aumento da atividade e proliferação celular, produção de colágeno e angiogênese. A capacidade que o LBI apresenta de estimular a proliferação dos mais diferentes tipos celulares tem sido relatada como seu mais importante efeito fisiológico.<sup>2</sup>

Dependendo das propriedades físicas e químicas dos biomateriais utilizados para confecção de arcabouços celulares, esses podem gerar respostas positivas ou negativas no processo de adesão, proliferação, migração, diferenciação e viabilidade celular.<sup>3</sup> O ácido poliláctico (PLA) é um biomaterial que pertence aos hidroxiácidos e tem o ácido láctico ( $\alpha$ -ácido 2-hidroxi-propanóico) como matéria prima. Este biomaterial é amplamente aceito para aplicações biomédicas devido a suas propriedades positivas no que se refere à biodegradabilidade, biocompatibilidade e sua fácil disponibilidade, em virtude do baixo custo.<sup>4</sup> Nesse contexto, o ácido poliláctico vem sendo utilizado como arcabouço para diversos tipos celulares.<sup>5,6</sup>

O efeito bioestimulatório do LBI tem sido investigado sobre diversas linhagens celulares como: células-tronco mesenquimais (MSC), células-tronco de ligamento periodontal humano, células-tronco da polpa de dentes humanos e também sobre linhagens de pré-osteoblastos MC3T3-E1, oferecendo bons resultados.<sup>7,8,9,10</sup> Porém, até o presente momento, nenhum estudo avaliou o efeito estimulatório do LBI sobre células pulpares cultivadas em arcabouços de ácido poliláctico (PLA). O objetivo do

presente estudo foi avaliar o bioestímulo do laser de baixa intensidade na dose de 1 J/cm<sup>2</sup> com comprimento de onda de 660nm e potência de 30mw, sobre a adesão e proliferação de células pulpareas cultivadas sobre filme de PLA.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 OBTENÇÃO CELULAR

As células foram obtidas após autorização do comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Parecer CAAE: 34913314.4.0000.5537). Foram utilizados três dentes decíduos em estágio final de esfoliação e extração indicada, obtidos de crianças entre 06 a 12 anos, com bom estado de saúde sistêmica e bucal, apresentando diagnóstico radiográfico de rizólise dos terços apical e médio da raiz.

O processo de obtenção das células pulpares ocorreu após a exodontia, no qual cada dente foi imediatamente mantido em tubo tipo Falcon contendo 5 mL de meio alfa-MEM em condição hipotérmica (4°C). Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os dentes foram submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, com uma solução contendo meio alfa-MEM enriquecido com 10.000 U.I./mL de Penicilina, 10.000 µg/mL de Estreptomicina, 100 mg/mL de Gentamicina e 250 µg/mL de Anfotericina B, objetivando eliminar possível contaminação.

O tecido pulpar foi cuidadosamente retirado por curetagem e, em seguida, o extrato foi submetido à digestão enzimática com 3 mg/mL de colagenase I (Gibco,USA) e 4mg/mL de dispase (Gibco, USA), por 1 hora a 37°C. As culturas foram mantidas em meio alfa-MEM suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SFB) a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 70 – 90% de confluência, com troca de meio a cada três dias.

### 2.2 FABRICAÇÃO DO FILME DE PLA

Os filmes foram fabricados no Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Morfologia da UFRN, através de uma adaptação da técnica descrita por Lian et al.<sup>11</sup>, no qual 5 gramas de PLA foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio em um agitador magnético durante 30 minutos. Em seguida, o material foi deixado numa câmara de ventilação, durante duas horas, para evaporação do clorofórmio residual e, posteriormente, deixado em overnight na estufa. Os filmes obtidos foram recortados em fragmentos circulares com 1 cm de diâmetro.

## 2.3 CULTIVO CELULAR

As células pulpares foram cultivadas em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Cultilab) suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB; Gibco, USA) com 1% de antibiótico, em garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>. Foram mantidas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80 a 90% de confluência, com troca de meio a cada três dias.

O experimento foi conduzido em triplicata com três grupos experimentais (Figura 1), em dois intervalos de tempo após irradiação.

- Grupo 1 - Células pulpares cultivadas sobre a superfície da placa.
- Grupo 2 - Células pulpares cultivadas sobre biofilme de ácido poliláctico.
- Grupo 3 - Células pulpares cultivadas sobre biofilme de ácido poliláctico e submetidas à laserterapia de baixa intensidade.

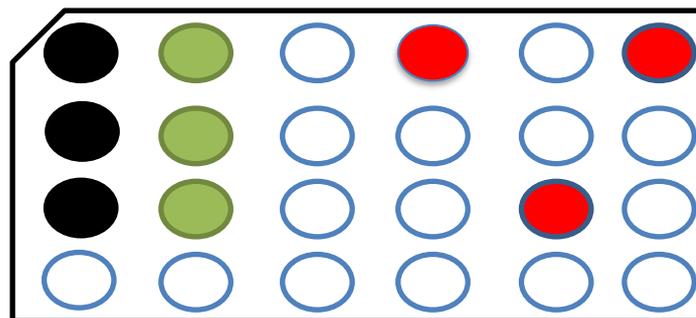


Figura 1: Desenho experimental da distribuição dos grupos na placa de cultura de 24 poços. Preto: Grupo 1; Verde: Grupo 2; Vermelho: Grupo 3. Os espécimes do Grupo 3 foram cultivados deixando-se o intervalo de um poço em vazio para evitar dispersão não intencional da irradiação.

## 2.4 CULTIVO CELULAR EM FILME DE PLA

As fibras de PLA foram esterilizadas de acordo com o protocolo adaptado de Mansourizadeh et al.<sup>12</sup> sobre raio ultravioleta (UV) por 3 horas, em seguida imersas em etanol 70% durante 30 minutos e lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 15 minutos cada e finalmente cultivadas *overnight* em meio completo ( $\alpha$ MEM, 10% SFB, 1% Antibióticos) com objetivo de aumentar a hidrofiliabilidade do biomaterial. As células foram então cultivadas sobre cada arcabouço de PLA em uma densidade padronizada de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

## 2.5 IRRADIAÇÃO COM LASER DE BAIXA INTENSIDADE

A irradiação com laser de baixa intensidade foi realizada logo após o plaqueamento das células nos seus respectivos poços. O aparelho utilizado para as irradiações foi um Laser diodo de InGaAlP (Kondortech – Bio Wave LLLT Dual, Brasil), com os parâmetros listados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Parâmetros utilizados do Laser de Baixa Intensidade.**

Potência	30mW
Comprimento de onda	660nm
Dose	1,0J/cm <sup>2</sup>
Diâmetro da ponta	0,01cm <sup>2</sup>
Modo de ação	Contínuo
Tempo	40s

FONTE: Grupo de Pesquisa Biologia Crânio Facial da UFRN.

## 2.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foi utilizado o método de exclusão por azul de tripan, após os intervalos de tempo 24 e 72h, seguindo o seguinte protocolo: lavagem com PBS, adição de 500 µl de tripsina (5 minutos), adição de 500µl meio α-MEM para inativar a tripsina, passagem da amostra para cada tubo cônico de 15ml correspondente. Em seguida, foi coletado, separadamente, 10µl da amostra e misturados com 10µl de azul de tripan. Logo após, levado a câmara de Neubauer. Em seguida, para obtenção da estimativa do número de células foi realizado o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Número total de células contadas X fator de diluição}}{4} \times 10^4$$

## 2.7 TESTE DE CONTATO DIRETO

Foram obtidas fotomicrografias da interface filme de PLA/placa de cultura (Figura 2) em cada grupo experimental, nos dois intervalos de tempo estudados (24 e 72 horas), utilizando-se Microscópio Invertido (Eclipse Ti-U – Nikon) do Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL/ DBQ/ UFRN).

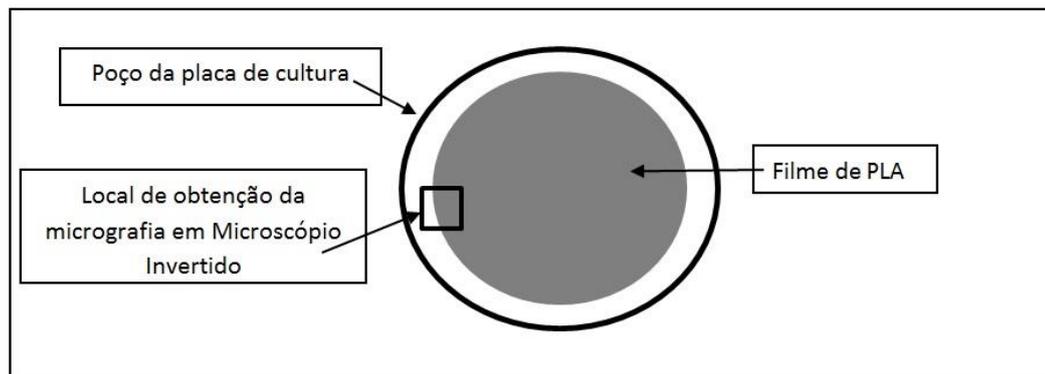


Figura 2 – Modelo da fotomicrografia da interface filme de PLA/placa de cultura.

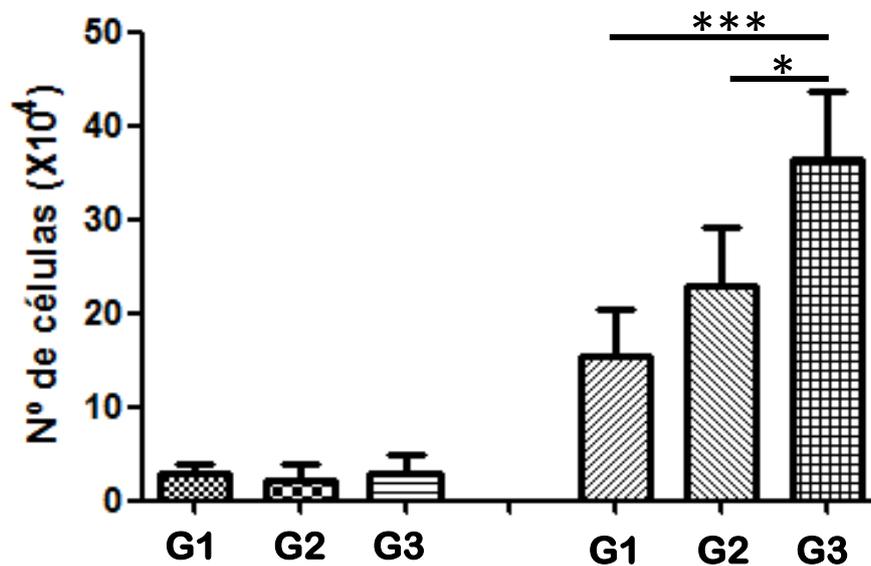
Em seguida, as fotos obtidas foram comparadas entre os diferentes períodos de observação para avaliação qualitativa da proliferação celular na placa de cultura e/ou sobre o filme de PLA.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A diferença entre os grupos para cada um dos tempos estudados (24 e 72 horas) foi analisada pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando um intervalo de confiança de 95%.

### 3 RESULTADOS

A proliferação das células pulpares analisada pelo método de coloração azul de tripan é ilustrada na Figura 3. Todos os grupos apresentaram um incremento no número de células com o decorrer do experimento, sendo que o Grupo 3 (células cultivadas sobre arcabouço de PLA e submetidas à laserterapia) exibiu um número de células significativamente maior do que o Grupo 1 ( $p < 0.001$ ) e o Grupo 2 ( $p < 0.05$ ) no intervalo de 72 h.



**Figura 3** – Número médio ( $\pm$  desvio-padrão) de células pulpares dos três grupos nos intervalos de 24 e 72 horas pelo teste do azul de tripan. Asteriscos representam diferença estatisticamente significativa: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; teste de Mann-Whitney.

Ao longo das 72 horas de experimento, podemos ver uma crescente proliferação celular na interface do biomaterial com a placa de cultura, onde as células apresentaram uma morfologia adequada ao seu tipo celular. O Grupo 3 mostrou visivelmente um maior crescimento celular em comparação com os Grupos 1 e 2 (Figura 4).

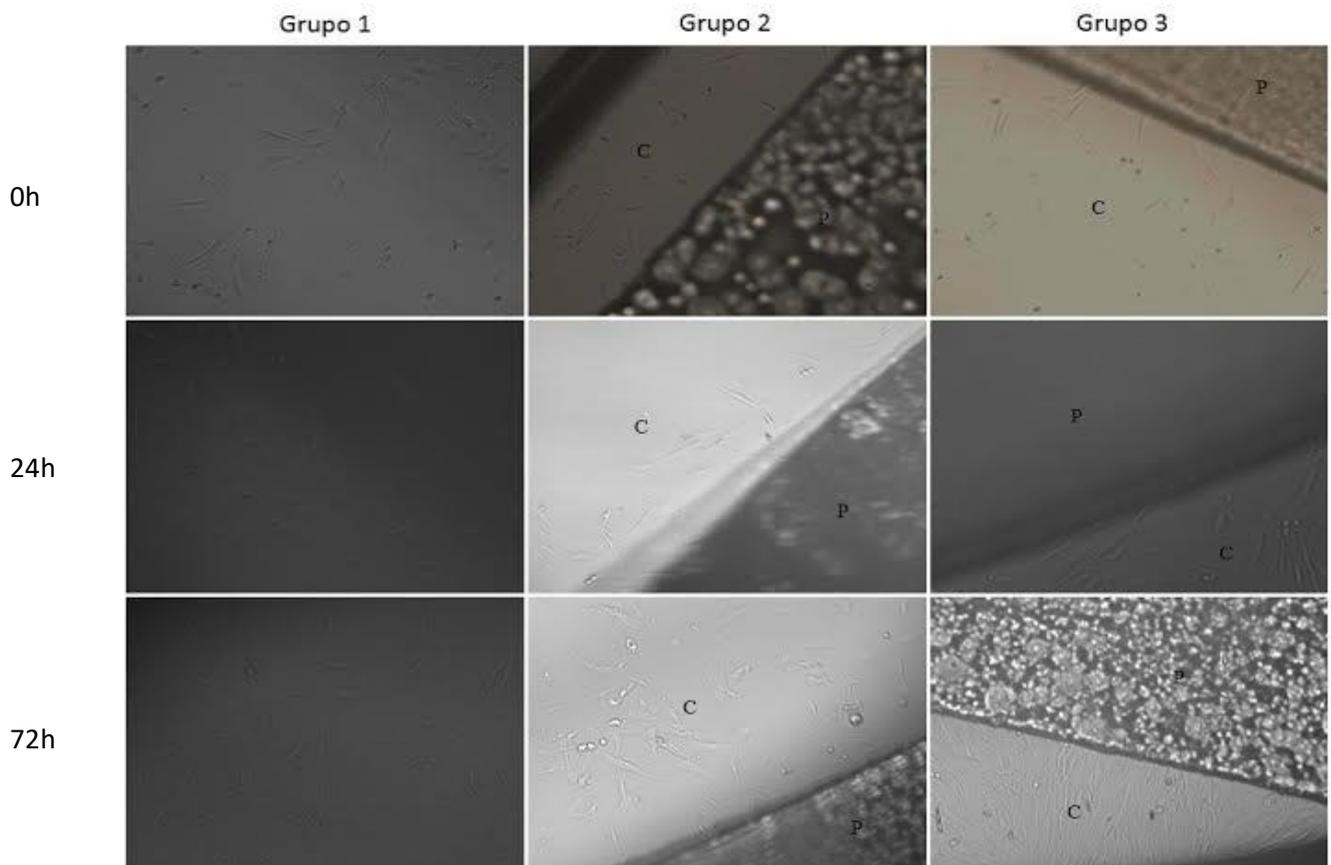


Figura 4 - Fotomicrografias da interface filme de PLA (P) / placa de cultura (C) em diferentes intervalos de tempo. A crescente proliferação celular na placa de cultura e na interface com o filme de PLA durante o período da análise indica que, provavelmente, também há um significativo número de células em sua superfície, além de mostrar que o PLA não está impedindo a proliferação celular. Aumento: 10x.

## 4 DISCUSSÃO

A utilização de células pulpares traz uma perspectiva de aliar qualidade aos materiais de substituição tecidual, concedendo acréscimo de componente celular ao material, conferindo-lhe maior capacidade regenerativa. Todavia, a obtenção de uma quantidade considerável de um tipo celular específico é um fator importante na regeneração tecidual. Por conseguinte, terapias que proporcionem um aumento na taxa proliferativa das células em cultura é de grande interesse para a engenharia de tecidos.<sup>13</sup>

No contexto da odontologia regenerativa, selecionar um arcabouço apropriado à adesão celular torna-se um componente essencial. O arcabouço de ácido poliláctico pode ser confeccionado para mimetizar a matriz extracelular, possibilitando suporte mecânico para a implantação celular<sup>14</sup>. Wang X et al.<sup>15</sup> investigaram a proliferação celular de células da polpa de dentes decíduos cultivadas sobre arcabouços de ácido poliláctico, no qual obtiveram resultados significativos de aumento do número de células quando comparados ao grupo controle. Esse fato foi confirmado no presente estudo, ao verificar uma taxa considerável de proliferação celular após 72h, sugerindo que o filme estrutural de PLA possui boa biocompatibilidade com as células pulpares, servindo como possível arcabouço para usos in vivo.

No presente estudo o LBI mostrou-se uma ferramenta potencial para estimular o crescimento de células pulpares. A literatura mostra que a fotobiomodulação é uma alternativa útil para o estímulo da proliferação de diferentes tipos celulares<sup>16</sup>.

Tuby, Maltz e Dian<sup>17</sup>, usando doses de 1,0 e 3,0 J/cm<sup>2</sup> em células-tronco mesenquimais e cardíacas, mostraram que o LBI promoveu um aumento significativo dos dois tipos celulares após a aplicação do laser, quando comparados ao grupo controle. Hou et al.<sup>18</sup> utilizando doses de 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0 J/cm<sup>2</sup> em células-tronco mesenquimais da medula óssea a LBI, mostrou aumento na população celular significativamente maior no grupo submetido à irradiação, quando comparado ao grupo controle, sendo a dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup> a mais efetiva. Os resultados do presente estudo reforçam a eficácia do LBI, com utilização da dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup>, em aumentar a proliferação celular in vitro, sugerindo que a terapia com Laser apresenta um efeito bioestimulatório dependente da dose a ser utilizada. Outrossim, essa taxa proliferativa respalda-se na possível conversão de energia fotônica em energia química, na forma

de adenosina trifosfato (ATP), o que melhora as funções celulares, contribuindo para o aumento da população de células e mantendo suas características de integridade <sup>2</sup>.

Em relação à laserterapia em células de origem dentária, Moura-Netto et al. <sup>19</sup> submeteram células-tronco de dentes decíduos à irradiação com LBI em doses de 3,0 e 5,0 J/cm<sup>2</sup>, sendo as células submetidas a diferentes estágios nutricionais. Constataram uma taxa de crescimento celular significativamente maior nos grupos submetidos ao laser, quando comparados ao controle. Soares et al. <sup>13</sup> observaram o efeito bioestimulador do LBI em células-tronco do ligamento periodontal. A dose é um componente importante na influência dos resultados de proliferação celular <sup>20</sup>. No presente estudo foi utilizada a dose de 1,0 J/cm<sup>2</sup>, a qual promoveu uma significativa bioestimulação, comparando-se ao grupo controle, sugerindo que essa dose não danificou os fotorreceptores, o que ocasionou um aumento do efeito biomodulador. Além disso, a análise quantitativa das células em diferentes intervalos de tempo (24 e 72h) apontam, através de testes estatísticos, um comportamento crescente de adesão e proliferação celular nos grupos estudados (PLA e laser /PLA). Esses resultados são concordantes com os achados de Moura-Netto, Zaccara e Soares <sup>19,20,13</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo apresentam relevância clínica posto que a utilização do LBI representa uma bioestimulação eficaz na terapia associada a células-tronco, conferindo uma base para avanços da utilização dessas células em processos regenerativos. Aliando-se a isso, o arcabouço de ácido poliláctico confere uma microestrutura biocompatível ao desenvolvimento celular. Em suma, o presente estudo revelou que o bioestímulo do laser com dose de  $1,0 \text{ J/cm}^2$ , associado à base de biofilme polimérico, promoveu aumento da proliferação celular.

## REFERÊNCIAS

1. Saltz, A., Kandalam, U. Mesenchymal stem cells and alginate microcarriers for craniofacial bone tissue engineering: a review. *J Biomed Mater Res A*. 2016 Res:104:1276–1284.
2. Nagata MJ, Santinoni CS, Pola NM, de Campos N, Messori MR, Bomfim SR, et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: a new therapeutic approach to enhance bone healing. *J Photochem Photobiol B*, Apr 2013 v. 5, n. 121: 6-14.
3. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *Journal of polymer science Part B, Polymer physics*. 2011;49(12):832-864.
4. Goswami, J.; Bhatnagar, N.; Mohanty, S. & Ghosh, A. K. Processing and characterization of poly(lactic acid) based bioactive composites for biomedical scaffold application. *Express Polymer Letters*. 2013 7(9): 767–777.
5. da Luz CM, Boyles MS, Falagan-Lotsch P, Pereira MR, Tutumi HR, de Oliveira Santos E, et al Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated J *Nanobiotechnology*. 2017 ,15(1):11.
6. Ling LE, Feng L, Liu HC, Wang DS, Shi ZP, Wang JC, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015 May;103(5):1732-45.
7. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G.. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 2012 v. 27, n. 2, 423-430.
8. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Honda I, et al. Periodontal Regeneration Using Periodontal Ligament Stem Cell-Transferred Amnion. *Tissue Engineering*: 2014 v. 20, n. 3, 693- 704.
9. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH, Shi S, et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. *J Dent* ,2009 ,Res,v. 88, n. 4, 249-254.
10. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *J Dent* 2014 42:761–768.
11. LIAN, Y. S.; ZHAO, W. & CHEN, G. Q. Study on the biocompatibility of novel terpolyesterpoly (3-hydroxybutyrate-co3-hydroxyvalerate-co-hydroxyhexanoate). *J Biomed Mater Res A* . 2008 87:441–9.
- 12 Mansourizadeh, F.; Asadi, A.; Oryan, S.; Nematollahzadeh, A.; Dodel, M. & Asghari-Vostakolaei, M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering. *Molecular Biology Research Communications*. 2013 2(1-2):1-10.

13. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci.* 2015;30(3):1171-4
14. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Ramakrishna S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials.* 2012;33(3):846-55.
15. Wang X, Li G, Liu Y, Yu W, Sun Q. Biocompatibility of biological material polylactic acid with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Biomed* , 2017, 6(5):519-524.
16. Wu YH, Wang J, Gong DX, Gu HY, Hu SS, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Lasers Med Sci.* 2012 Mar;27(2):509-19
17. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007 Apr;39(4):373-8
18. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med.* 2008 Dec;40(10):726-33
19. Moura-Netto C, Ferreira LS, Maranduba CM, Mello-Moura ACV, Marques MM. Low-intensity laser phototherapy enhances the proliferation of dental pulp stem cells under nutritional deficiency. *Braz Oral Res.* 2016 May 31;30(1).
20. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ÁC, Barboza CA. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Dec,* 2015 30(9):2259-64

## ANEXO

As normas adotadas nessa monografia seguiram as instruções aos autores para submissão de artigo no Journal of Applied Oral Science.

### NORMALIZAÇÃO TÉCNICA

O manuscrito deve ser digitado da seguinte forma: 1,5 de espaçamento em fonte arial de 11 pts, com margens de 3 cm de cada lado, em uma página a4, somando até 15 páginas, incluindo as ilustrações (gráficos, fotografias, tabelas, etc). Os autores devem manter uma cópia do manuscrito para possíveis pedidos.

### CITAÇÃO DOS AUTORES

A citação dos autores no texto pode ser realizada de duas maneiras:

1) Apenas numérico: "e interfere com o sistema bacteriano e sistema de tecido<sup>3,4,7-10</sup>". As referências devem ser citadas em uma ordem numérica ascendente dentro do parágrafo.

2) ou alfanumérico

Um autor - Silva<sup>23</sup> (1986)

Dois autores - Silva e Carvalho<sup>25</sup> (1987)

Três autores - Ferreira, Silva e Martins<sup>27</sup> (1987)

Mais de três autores - Silva, et al.<sup>28</sup> (1988)

Caracteres de pontuação, como períodos e vírgulas, devem ser colocados após a citação numérica dos autores. Ex: Ferreira<sup>38</sup>.

### REFERÊNCIAS

As referências devem seguir os "Requisitos uniformes para manuscritos submetidos a Revistas Biomédicas - Vancouver".

Todas as referências devem ser citadas no texto. Eles devem ser ordenados alfabeticamente pelo sobrenome do autor e numerados em ordem crescente de acordo. A ordem de citação no texto deve seguir esses números. As abreviaturas dos títulos das revistas internacionais citadas devem seguir o Index Medicus / MEDLINE. Comunicações pessoais e dados não publicados sem data de publicação não devem ser incluídos na lista de referência.

Resumos, monografias, dissertações e teses não serão aceitos como referências.

Os nomes de todos os autores devem ser citados até 6 autores; No caso de haver mais autores, os 6 primeiros autores devem ser citados, seguidos pela expressão ", et al.", Que deve ser seguida por "período" e não deve ser escrita em itálico. Ex: Uhl, et al.

No máximo, 30 referências podem ser citadas, exceto para comentários convidados pelo Editor-em-chefe.

Artigos publicados em revistas

Wenzel A, Fejerskov O. Validade do diagnóstico de lesões de cáries questionáveis em superfícies oclusais de terceiros molares extraídos. *Caries Res.* 1992; 26: 188-93.

Trabalhos com mais de 6 autores

Os primeiros 6 autores são citados, seguidos pela expressão ", et al."

Parkin DM, Clayton D, Black RJ, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Infância - leucemia na Europa após Chernobyl: 5 anos de seguimento. *Br J Cancer.* 1996; 73: 1006-12.