



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

# **Otimização do protocolo de fotobiomodulação no movimento dentário ortodôntico para aumentar a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal.**

**Estudo *in vitro***

**Elias Amin Elyamani**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)**



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Gandra, 26 de maio de 2022**

**Elias Amin Elyamani**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Medicina Dentária (Ciclo Integrado)**

**Otimização do protocolo de fotobiomodulação no movimento dentário ortodôntico para aumentar a viabilidade dos fibroblastos do ligamento periodontal.**

**Estudo *in vitro***

**Trabalho realizado sob a Orientação de Mestre Aline Gonçalves e Co-orientação de Mestre Sofia Oliveira.**

## **Declaração de Integridade**

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.



## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Aline Gonçalves, por seus muito bons conselhos, sua simpatia e sua disponibilidade. Obrigado por me ter dado a oportunidade de realizar este projeto experimental.

À minha co-orientadora, Sofia Oliveira, por sua imensa ajuda no laboratório, sua ajuda para escrever este trabalho, sua paciência, sua gentileza, suas explicações e sua pedagogia.

Aos meus colegas de laboratório para ajuda na elaboração deste trabalho.

A todos os meus professores da CESPU para a transmissão do seus conhecimentos e seus esclarecimentos.

À Direção do Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte e ao diretor do curso de Medicina Dentária, Professor Joaquim Moreira, pelo apoio institucional.

Aos meus pais por me encorajarem e me darem a oportunidade de estudar em Portugal.

Aos meus irmãos pelo apoio.

A toda minha família, avós, tios, tias, primos da França e do Marrocos.

Para minha madrinha Bur.

A Goretti e a sua família.

A todos os meus amigos, a Lucas, Quentin, Claire e a todos os outros que me ajudaram de perto ou de longe.

A todo ao meu grupo clínico: Gwendoline, Roméissat, Nicolas D, Adam, Nicolas C, Apolline, Adil, Anissa, Jorge, Alvaro, Eduarda, Giulia, Telma e Eva.

Ao Zen House para os seus deliciosos sushis.

Ao meu incrível binomio Abdallah.

A este grande e fantástico grupo de amigos que conheci aqui: Zak, Matthieu, Giv, Mohammed, Sophian, Valentin.

## Resumo

**Introdução:** A fotobiomodulação (PBM) ou terapia com luz de baixo nível (LLLT) são terapias não invasivas que usam luz de baixa energia (600-1000 nm) para diminuir a dor, inflamação e estimular células como fibroblastos e osteoblastos, permitindo acelerar o movimento dentário durante o tratamento ortodôntico.

**Objetivos:** Este estudo *in vitro* visa avaliar diferentes parâmetros de LLLT e determinar os mais adequados para estimular os fibroblastos do ligamento periodontal.

**Material e métodos:** Uma linha celular primária de fibroblastos humanos do ligamento periodontal (hPLFs) foi cultivada. As células foram divididas em grupos controlo e experimentais (655 nm, 850 nm e 940 nm) e a densidade de potência (5 e 10 mW/cm<sup>2</sup>) aplicadas. Todos os grupos foram estimulados uma vez, 3 minutos. A viabilidade celular foi analisada através do ensaio com MTS após 1 h, 24 h e 72 h.

**Resultados:** Após 1 h, o grupo experimental 940 nm 5 mW/cm<sup>2</sup> apresentou os melhores resultados, enquanto as condições 810 nm e 940 nm promoveram atividade aumentada após 24 h. Após 72 h, verificou-se uma atividade celular aumentada no 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup> em comparação ao grupo controlo. Os grupos 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup>, 810 nm 5 mW/cm<sup>2</sup> e 940 nm 10 mW/cm<sup>2</sup> apresentaram melhores resultados.

**Conclusões:** A estimulação dos hPLFs permitiu aumentar a atividade metabólica de quase todos os grupos para uma duração de 24 h, mas não induziu um efeito celular prolongado, exceto para o grupo 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup>.

**Palavras-chave:** fotobiomodulação; LLLT; fibroblastos; ligamento periodontal; movimento dentário ortodôntico; OTM.

## Abstract

**Introduction:** Photobiomodulation (PBM) or low-level light therapy (LLLT) are non-invasive therapies that use low-energy light (600-1000 nm) to decrease pain, inflammation and stimulate cells such as fibroblasts and osteoblasts, allowing accelerated tooth movement during orthodontic treatment.

**Objectives:** This *in vitro* study aims to evaluate different LLLT parameters and determine the most suitable ones to stimulate periodontal ligament fibroblasts.

**Material and methods:** A primary human periodontal ligament fibroblast cell line (hPLFs) was cultured. The cells were divided into control and experimental groups (655 nm, 850 nm and 940 nm) and power density (5 and 10 mW/cm<sup>2</sup>) applied. All groups were stimulated once, 3 minutes. Cell viability was analysed by MTS assay after 1 h, 24 h and 72 h.

**Results:** After 1 h, the 940 nm 5 mW/cm<sup>2</sup> experimental group showed the best results, while the 810 nm and 940 nm conditions promoted increased activity after 24 h. After 72 h, increased cellular activity was seen in the 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup> compared to the control group. The 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup>, 810 nm 5 mW/cm<sup>2</sup> and 940 nm 10 mW/cm<sup>2</sup> groups showed better results.

**Conclusions:** Stimulation of hPLFs allowed increased metabolic activity of almost all groups for a duration of 24 h, but did not induce a prolonged cellular effect, except for the 655 nm 10 mW/cm<sup>2</sup> group.

**Keywords:** photobiomodulation; LLLT; fibroblasts; periodontal ligament; orthodontic tooth movement; OTM



## Índice Geral

<b>1-</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2-</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>2</b>
<b>3-</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>2</b>
	2.1- CULTURA CELULAR.....	2
	2.1.1- <i>Protocolo Laboratorial</i> .....	2
	2.2- PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO.....	8
	2.3- VIABILIDADE CELULAR.....	9
	2.3.1- <i>Protocolo Laboratorial</i> .....	10
<b>4-</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>12</b>
<b>5-</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>6-</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>17</b>
<b>7-</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>18</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1-</b> Imagem microscópica (10x) da cultura celular de fibroblastos. ....	3
<b>Figura 2-</b> Falcon depois centrifugação. ....	4
<b>Figura 3-</b> Esquema de uma câmara do hemocítmetro com células nos 4 quadrantes. ....	5
<b>Figura 4-</b> Esquema das placas de 12 poços preenchidas com a solução celular para cada timepoint (1 h, 24 h e 72 h). ....	7
<b>Figura 5-</b> Sistema de estimulação. ....	8
<b>Figura 6-</b> Esquema do procedimento de estimulação. ....	8
<b>Figura 7-</b> Esquema de 96 poços com MTS após 4 h de incubação. ....	10
<b>Figura 8-</b> Exemplo de resultados obtidos no leitor de microplacas com software informático. 11	
<b>Figura 9-</b> Resultados para o primeiro timepoint-1 h. ....	12



## Índice de tabelas

<b>Tabela 1-</b> Medidas de absorbância para o primeiro timepoint-1 h.....	13
<b>Tabela 2-</b> Medidas de absorbância para o segundo timepoint-24 h.....	13
<b>Tabela 3-</b> Medidas de absorbância para o terceiro timepoint-72 h.....	14



## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

ATP- adenosine triphosphate

CCO- cytochrome C oxidase

CO<sub>2</sub>- carbon dioxide

DMEM- dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA- desoxyribonucleic acid

EDTA- ethylenediaminetetraacetic acid

hPLF- human periodontal ligament fibroblast

LED- light-emitting diode

LLLT- low-level light therapy

MTS- solução tampão: fosfato-salino

NADH- nicotinamide adenine dinucleotide

NADPH- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NaHCO<sub>3</sub>- sodium bicarbonate

NO- nitric oxide

PBM- photobiomodulation

PBS- sulfate buffered saline

PDL- periodontal ligament

RNA- ribonucleic acid

## 1- Introdução

O tratamento ortodôntico é essencial para a reabilitação estética e funcional do sistema estomatognático.<sup>1</sup> Embora tenha havido uma evolução significativa em vários campos da Ortodontia nas últimas décadas, o tempo prolongado de tratamento tem sido uma preocupação constante para os profissionais e pacientes dado este tipo de tratamento.<sup>2</sup>

Ao longo dos anos tem havido uma busca contínua por métodos para acelerar a movimentação dentária e reduzir o tempo de tratamento. De facto, a redução no tempo de tratamento é vantajosa, pois tratamentos mais longos podem resultar em maior probabilidade de reabsorção óssea alveolar, reabsorção radicular, alterações gengivais e maior probabilidade de cáries.<sup>2 3</sup>

A fotobiomodulação (PBM) ou terapia com luz de baixo nível (LLLT) são modalidades terapêuticas não invasivas que têm sido exploradas para acelerar o movimento dentário através da estimulação direta das células.<sup>4</sup> Estas terapias usam luz de baixa energia com comprimentos de onda compreendidos entre 600-1000 nm que correspondem ao espectro visível vermelho até ao quase infravermelho.<sup>5</sup> O mecanismo de funcionamento envolve absorção dos fótons pelo citocromo-coxidase (CCO) que se encontra nas mitocôndrias das células, levando à estimulação da produção de adenosina trifosfato (ATP), diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), e aumento da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Estes efeitos induzem a proliferação e diferenciação de diferentes linhagens celulares como osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos e células do ligamento periodontal (PDL), que estão implicadas na remodelação óssea, síntese de colágeno e revascularização.<sup>5</sup>

Atualmente, apesar do reconhecimento da eficácia do LLLT na aceleração do movimento dentário, os protocolos de estimulação e parâmetros do laser ou *light-emitting diodes* (LEDs) ainda são mal compreendidos. Estudos futuros são necessários para encontrar o mais adequado para obter resultados benéficos em relação à influência

na remodelação óssea e no movimento dentário para implementar essa terapia na rotina ortodôntica diária.<sup>6</sup>

## **2- Objetivo**

O objetivo deste estudo *in vitro* foi estimular hPLFs com LEDs e comparar o efeito de diferentes comprimentos de onda (655nm, 810nm e 940nm) e densidades de potência (5 ou 10mW/cm<sup>2</sup>) na viabilidade celular.

## **3- Material e métodos**

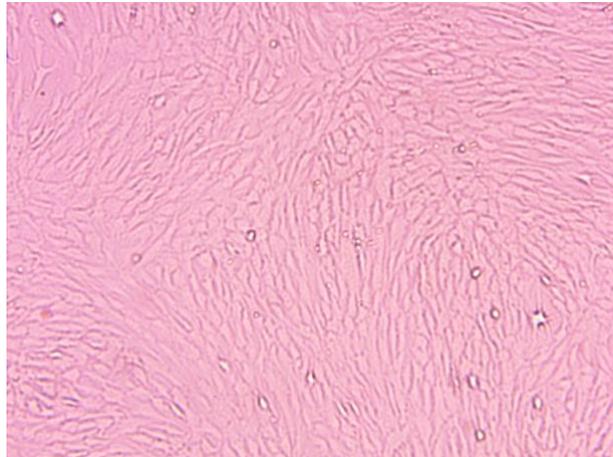
### **2.1- Cultura Celular**

A linha celular primária de hPLFs foi adquirida na empresa Innoprot® (Spain). As células foram colocadas em cultura em dois frascos com meio de cultura composto por DMEM:F12 com glutamina estável e 1,2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (PanBiotech®, Germany) suplementado com 1 % de penicilina/streptomicina e 10 % de soro bovino fetal (FBS). As células foram mantidas numa incubadora a 37°C, 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e 100 % de humidade. O meio foi trocado duas vezes por semana.

#### **2.1.1- Protocolo Laboratorial**

Essa etapa é essencial para ver se temos células suficientes para realizar o nosso estudo.

- a) Retirar as células da incubadora que foram cultivadas durante 72 h.
- b) Observar a confluência das células ao microscópio (Figura 1). Confluência é a percentagem da área do frasco de cultura coberto pelas células aderentes. Quando a confluência atinge 80-90 %, as células devem ser tripsinizadas.



*Figura 1 - Imagem microscópica (10x) da cultura celular de fibroblastos.*

- c) Descongelar 0,5 % tripsina-EDTA (Biowest, France) e aquecer solução tampão (PBS) e meio de cultura a 37°C.
- d) Remover o meio de cultura do frasco.
- e) Lavar as células com 10 mL de PBS duas vezes para remover totalmente os restos de meio de cultura antes de se colocar a solução de tripsina/EDTA, uma vez que o FBS do meio de cultura inibe a ação da tripsina/EDTA.
- f) Colocar a solução de tripsina/EDTA (2 mL) nos frascos de cultura e incubar durante 5 min na incubadora a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e 100 % de humidade para destacar as células da superfície onde foram cultivadas.
- g) Adicionar meio de cultura (4x o volume da tripsina/EDTA) para neutralizar a ação da tripsina/EDTA. Aqui 2 mL de tripsina/EDTA → 8 mL de meio de cultura.
- h) Aspirar o meio dos dois frascos e colocar num tubo falcon de 50 mL.

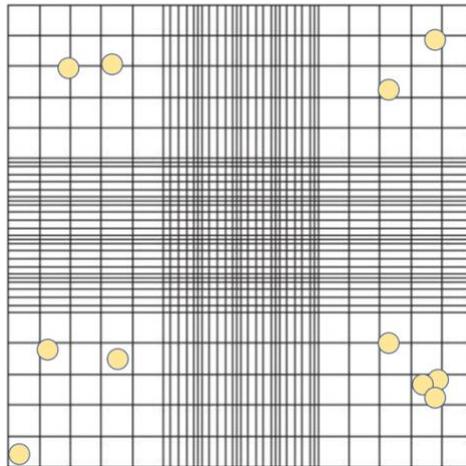
- i) Centrifugar o falcon com a suspensão celular a 300 G durante 5 min.
- j) Retirar o falcon da centrifugadora (Figura 2).



*Figura 2 - Falcon depois centrifugação.*

- k) Aspirar o sobrenadante que é constituído essencialmente por meio de cultura e células mortas e ressuspender o pellet composto por células depositadas no fundo do tubo com 5 mL de meio de cultura.
- l) Colocar 20  $\mu$ L de solução de 0,4 % azul tripano num *ependorf*.
- m) Colocar 20  $\mu$ L da suspensão celular anteriormente ressuspensa no *ependorf* com azul tripano e homogeneizar de forma as células estarem bem dispersas no volume.
- n) Contabilizar as células ao microscópio invertido com a lente de magnitude x10. O azul tripano cora as células mortas de azul, uma vez que ele consegue penetrar a membrana celular. Nas células vivas, como têm a membrana celular intacta, o azul tripano não consegue penetrar e, por isso, as células vivas não ficam coradas com azul.

- o) Pipetar 10  $\mu\text{L}$  da suspensão celular com o azul tripano e colocar no hemocítmetro (câmara de Neubauer).
- p) Contagem de células: contar os 4 quadrantes de cada câmara (Figura 3).



*Figura 3 - Esquema de uma câmara do hemocítmetro com células nos 4 quadrantes.*

Resultados da contagem:

- 1ª câmara:  $556 \text{ células} \times 2 = 1112$  (Multiplica-se por 2 devido ao fator de diluição).
- 2ª câmara:  $316 \text{ células} \times 2 = 632$ .
- Média das duas câmaras: 872 células.
- Para obter a concentração celular, multiplica-se por 10.000 (volume de solução que está em cada quadrado) e divide-se por 4 quadrados:

$$872 \times 10000 / 4 = 2,18 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

- Para o ensaio precisamos de 21 placas (sete placas com os seis grupos experimentais e um de controlo para cada timepoint com 3 réplicas de cada). Cada poço deverá conter 1 mL de suspensão celular.

Assim temos:

21 placas  $\times$  3 réplicas  $\times$  1 mL = 63 poços o que equivale a 63 mL com uma concentração de 20 000 células/mL em cada poço. Para evitar erros de pipetagem, o volume final foi ajustado para 70 mL.

$$70 \text{ mL} \times 20\,000 \text{ células/mL} = 1,4 \times 10^6 \text{ células/mL} \quad \checkmark \quad (\text{quantidade suficiente})$$

$C_i$ : concentração de células que foi anteriormente calculada através do hemocitómetro

$C_f$ : concentração de células que cada poço terá

$V_i$ : volume que devemos retirar da solução inicial

$V_f$ : volume total necessário para preencher todos os poços do estudo com a concentração final

$$C_i = 2,18 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$V_i = ?$$

$$C_f = 2 \times 10^4 \text{ células/mL}$$

$$V_f = 70 \text{ mL}$$

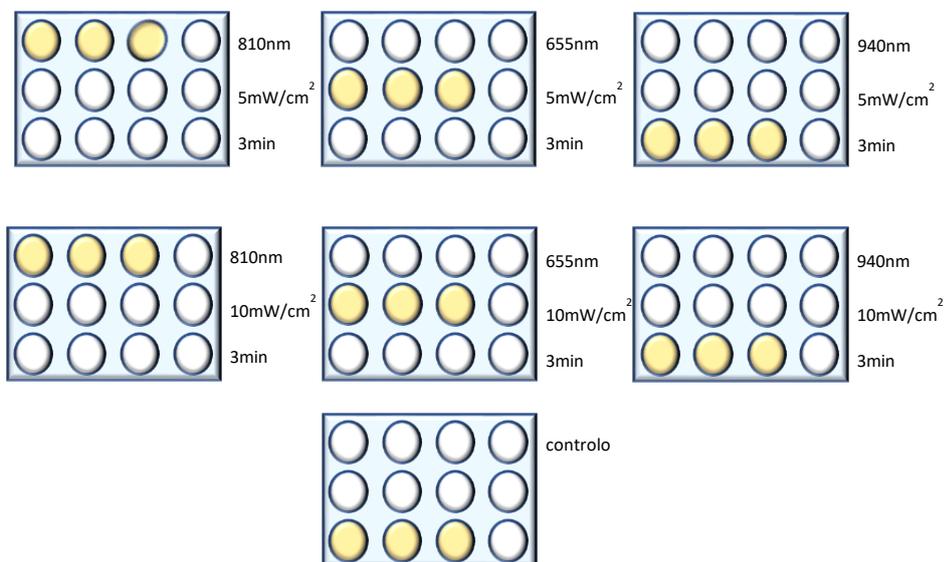
A equação da diluição permite obter  $V_i$ :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$2.18 \times 10^6 \times V_i = 2 \times 10^4 \times 70$$

$$V_i = 1,6 \text{ mL}$$

- q) Colocar num frasco T75 1,6 mL da suspensão celular.
- r) Adicionar 68,4 mL de meio de cultura para perfazer o volume final de 70 mL.
- s) Realizar *up and down* da suspensão celular para homogeneizar a solução.
- t) Colocar 1 mL da suspensão celular com concentração  $2 \times 10^4$  células/mL em 3 poços em cada placa para evitar a interferência da luz entre condições (Figura 4):



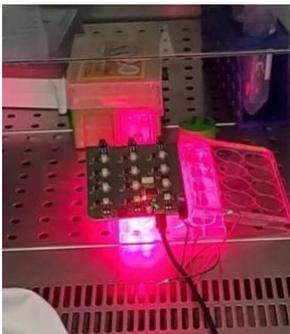
**Figura 4** - Esquema das placas de 12 poços preenchidas com a solução celular para cada timepoint (1 h, 24 h e 72 h).

- u) Incubar as placas com as células cultivadas na incubadora a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> e a 100 % de humidade durante 72 h antes da estimulação para permitir que as células adiram completamente aos poços.
- v) Colocar as células que não foram utilizadas neste estudo em cultura.

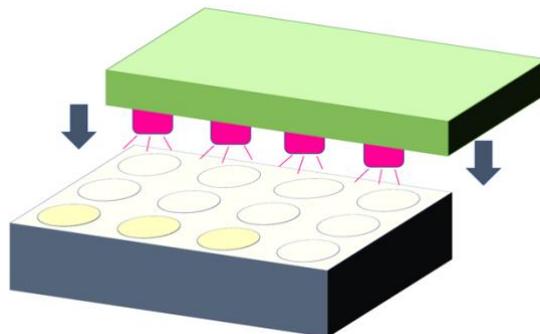
## 2.2- Protocolo de irradiação

As células foram estimuladas (Figuras 5 e 6) apenas uma vez com LEDs de comprimentos de onda 655 nm, 810 nm e 940 nm e com duas densidades de potência 5 mW/cm<sup>2</sup> e 10mW/cm<sup>2</sup> durante 3 minutos em modo contínuo.

O grupo controlo não foi estimulado. No entanto, o sistema de estimulação esteve colocado na placa de poços normalmente, como aconteceu com os grupos irradiados, mas estava desligado durante 3 min.



**Figura 5** - Sistema de estimulação.



**Figura 6** - Esquema do procedimento de estimulação.

### 2.3- Viabilidade celular

O 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, comumente conhecido por MTS, é um método colorimétrico utilizado para avaliar a atividade metabólica e, conseqüentemente, a viabilidade celular.<sup>7</sup> O MTS é um composto de tetrazólio que é reduzido por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) presentes nas células metabolicamente ativas. Esta redução resulta na produção de um composto denominado formazan com cor acastanhada, que é solúvel no meio de cultura. A quantidade de formazan produzida pode ser analisada colorimetricamente através da absorbância a 490 nm e é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas em cultura.<sup>8</sup>

A viabilidade celular dos hPLFs foi analisada pelo ensaio MTS (BioVision®, USA) após 1 h, 24 h e 72 h da estimulação. O reagente MTS foi adicionado a cada poço (100 µL) onde as células estavam cultivadas com meio de cultura. A um poço sem células foi adicionado apenas meio de cultura e, de seguida, o reagente MTS para servir de branco do ensaio. Desta forma, é assegurado que a absorbância detetada é proveniente da atividade metabólica das células e não de algum composto presente no meio de cultura. As células e o branco foram incubados durante 4 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> e 100 % humidade.

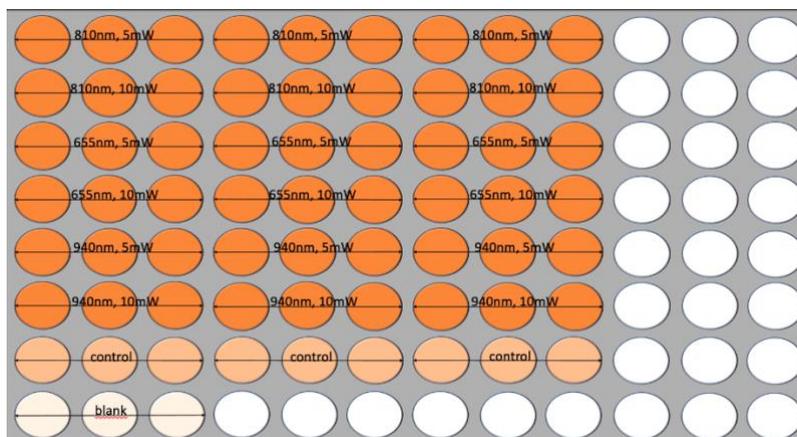
Após a incubação, o volume de cada poço (200 µL) foi pipetado em triplicado para uma placa de 96 poços que foi, posteriormente, colocada num leitor de microplacas (BioTek, USA) onde a absorbância foi medida a 490 nm. Para os cálculos, a absorbância do branco foi subtraída à absorbância de cada condição experimental.

### 2.3.1- Protocolo Laboratorial

- a) Desligar a luz da câmara de fluxo laminar, porque o MTS é fotossensível.

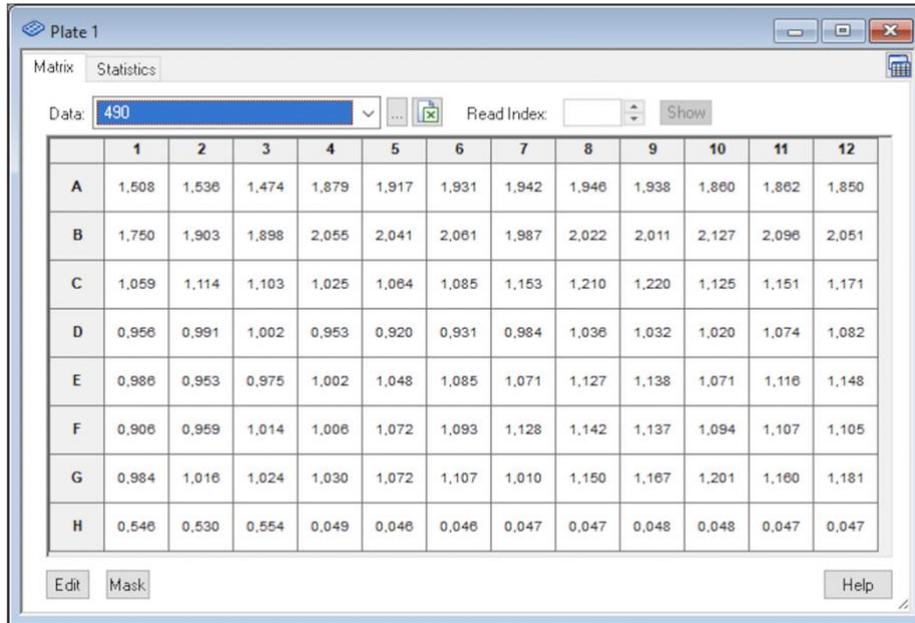
Segundo o protocolo do fabricante do kit, é recomendado usar 10  $\mu$ L de MTS para uma proporção de 100  $\mu$ L de meio de cultura. Como cada poço contém 1 mL de meio de cultura:

- b) Adicionar 100  $\mu$ L de MTS a cada poço.
- c) Cobrir a placa de poços com uma folha de alumínio e incubar durante 4 h a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> e 100 % humidade.
- d) Após 4 h de incubação, retirar as placas da incubadora com a luz desligada.
- e) Transferir para uma placa de 96 poços o volume dos poços e medir a absorbância no leitor de microplacas, previamente identificada (Figura 7).



*Figura 7 - Esquema de 96 poços com MTS após 4 h de incubação.*

- Transferir em triplicado o volume de cada poço (200  $\mu$ L).
- Realizar *up and down* para homogeneizar e pipetar o volume.
- Ler a placa no leitor de microplacas a uma absorbância de 490 nm (Figura 8).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,508	1,536	1,474	1,879	1,917	1,931	1,942	1,946	1,938	1,860	1,862	1,850
B	1,750	1,903	1,898	2,055	2,041	2,061	1,987	2,022	2,011	2,127	2,096	2,051
C	1,059	1,114	1,103	1,025	1,064	1,085	1,153	1,210	1,220	1,125	1,151	1,171
D	0,956	0,991	1,002	0,953	0,920	0,931	0,984	1,036	1,032	1,020	1,074	1,082
E	0,986	0,953	0,975	1,002	1,048	1,085	1,071	1,127	1,138	1,071	1,116	1,148
F	0,906	0,959	1,014	1,006	1,072	1,093	1,128	1,142	1,137	1,094	1,107	1,105
G	0,984	1,016	1,024	1,030	1,072	1,107	1,010	1,150	1,167	1,201	1,160	1,181
H	0,546	0,530	0,554	0,049	0,046	0,046	0,047	0,047	0,048	0,048	0,047	0,047

*Figura 8 - Exemplo de resultados obtidos no leitor de microplacas com software informático.*

## 4- Resultados

Os resultados do primeiro timepoint (Figura 9 e Tabela 1) mostraram uma atividade metabólica ligeiramente aumentada para os grupos experimentais 940 nm em comparação com os outros grupos experimentais 655 nm e 810 nm, uma vez que estes apresentaram uma atividade metabólica ligeiramente inferior à do controlo. O grupo 940 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup> apresentou uma atividade metabólica semelhante ao grupo de controlo, enquanto o grupo 940 nm a 5 mW/cm<sup>2</sup> induziu uma atividade metabólica superior à do controlo. No entanto, considerando todos os grupos experimentais e de controlo, não parece haver diferenças significativas entre condições.

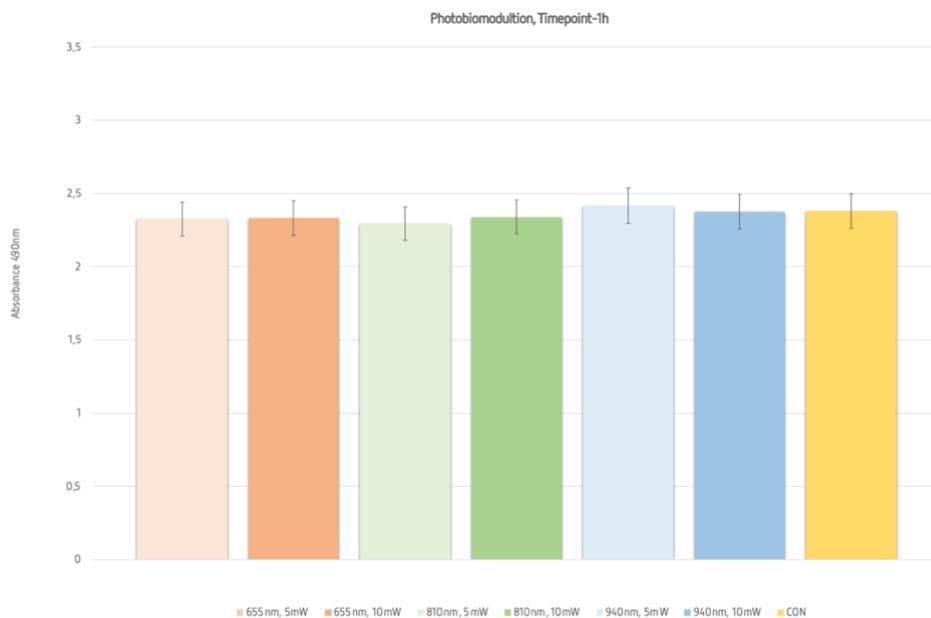
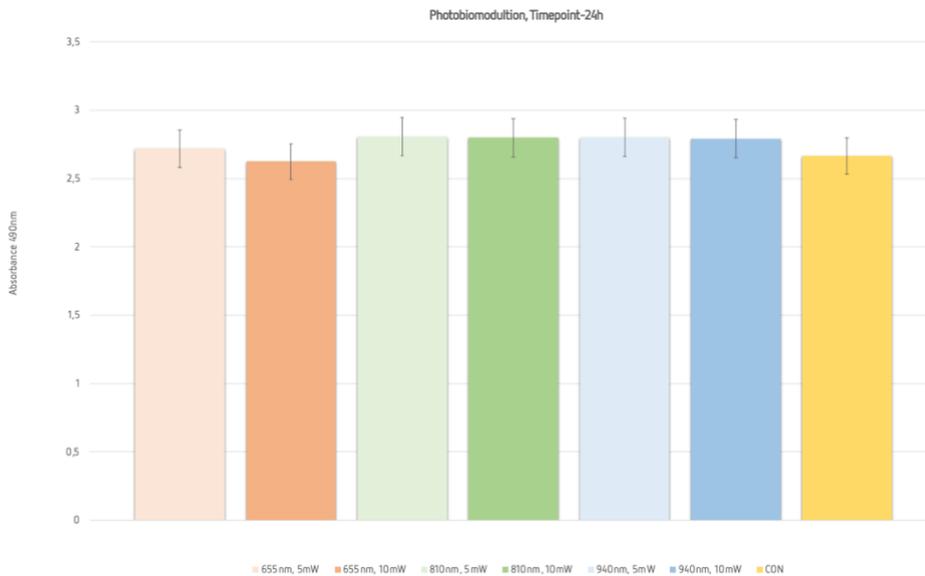


Figura 9 - Resultados para o primeiro timepoint-1 h.

	Timepoint-1h									Average
APP, PBM, 810, 5mW	2,222	2,234	2,227	2,226	2,229	2,241	2,376	2,445	2,434	2,292666667
APP, PBM, 810, 10mW	2,276	2,31	2,336	2,422	2,441	2,395	2,271	2,297	2,292	2,337777778
APP, PBM, 655, 5mW	2,41	2,56	2,599	2,179	2,229	2,286	2,256	2,217	2,186	2,324666667
APP, PBM, 655, 10mW	2,289	2,407	2,446	2,231	2,24	2,303	2,277	2,382	2,408	2,331444444
APP, PBM, 940, 5mW	2,282	2,365	2,394	2,456	2,473	2,511	2,397	2,396	2,464	2,415333333
APP, PBM, 940, 10mW	2,369	2,39	2,398	2,281	2,284	2,29	2,448	2,469	2,445	2,374888889
App, PBM, CON	2,262	2,326	2,344	2,392	2,371	2,378	2,404	2,433	2,516	2,380666667

*Tabela 1 - Medidas de absorbância para o primeiro timepoint-1 h.*

Após 24 h (Figura 11 e Tabela 2), a atividade metabólica dos hPLFs aumentou quando estimulados com os comprimentos de onda 810 nm e 940 nm para ambas as densidades de potência em comparação com o de 655 nm e grupo de controlo. No entanto, apesar de mais elevada, a atividade metabólica das células estimuladas com 810 nm ou 940 nm foi semelhante entre estas condições. Por outro lado, condição 655 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup> foi a que demonstrou uma atividade metabólica mais baixa.



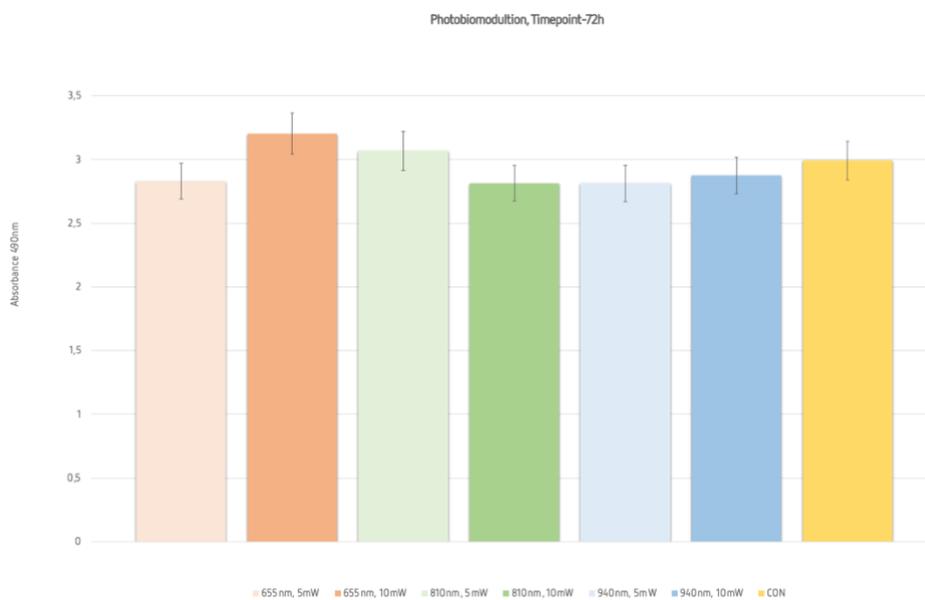
*Figura 10 - Resultados para o segundo timepoint-24 h.*

Timepoint-24h										Average
APP, PBM, 810, 5mW	2,638333333	2,802333333	2,844333333	2,866333333	2,864333333	2,823333333	2,800333333	2,799333333	2,816333333	2,806111111
APP, PBM, 810, 10mW	2,665333333	2,745333333	2,801333333	2,778333333	2,777333333	2,835333333	2,840333333	2,861333333	2,888333333	2,799222222
APP, PBM, 655, 5mW	2,864333333	2,744333333	2,724333333	2,664333333	2,651333333	2,677333333	2,707333333	2,694333333	2,726333333	2,717111111
APP, PBM, 655, 10mW	2,819333333	2,743333333	2,732333333	2,812333333	2,721333333	1,728333333	2,683333333	2,699333333	2,679333333	2,624333333
APP, PBM, 940, 5mW	2,885333333	2,889333333	2,873333333	2,692333333	2,725333333	2,723333333	2,818333333	2,778333333	2,817333333	2,800333333
APP, PBM, 940, 10mW	2,842333333	2,885333333	2,888333333	2,843333333	2,814333333	2,817333333	2,664333333	2,662333333	2,706333333	2,791555556
App, PBM, CON	2,643333333	2,646333333	2,694333333	2,678333333	2,544333333	2,654333333	2,763333333	2,675333333	2,694333333	2,666

*Tabela 2 - Medidas de absorbância para o segundo timepoint-24 h*

A atividade metabólica dos hLPFs às 72 h (Figura 13 e Tabela 3) foi superior à do controlo apenas para o grupo experimental 655 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup>. A condição 810 nm a 5 mW/cm<sup>2</sup> também apresentou uma atividade metabólica crescente, mas semelhante ao do grupo de controlo. Os restantes grupos experimentais revelaram atividades metabólicas ligeiramente inferiores ao grupo de controlo.

De uma maneira geral, a atividade metabólica de todos os grupos experimentais e controlo aumentou ao longo do tempo.



*Figura 11 - Resultados para o terceiro timepoint-72 h.*

	Timepoint-72h								Average	
APP, PBM, 810, 5mW	3,151	2,972	2,891	2,943	3,104	3,149	3,247		3,065285714	
APP, PBM, 810, 10mW	2,788	2,947	2,919	2,697	2,7	2,674	2,827	2,864	2,893	2,812111111
APP, PBM, 655, 5mW	3,002	3,036	3,031	2,806	2,788	2,77	2,695	2,667	2,667	2,829111111
APP, PBM, 655, 10mW	2,732	2,922	2,91	3,671			3,448	3,371	3,366	3,202857143
APP, PBM, 940, 5mW	2,499	2,628	2,635	3,195	3,243	3,186	2,659	2,649	2,611	2,811666667
APP, PBM, 940, 10mW	2,842	2,846	2,869	2,963	2,999	3	2,783	2,8	2,769	2,874555556
App, PBM, CON	2,892	2,867	2,824	2,973	3,102	3,104	3,032	3,066	3,067	2,991888889

*Tabela 3 - Medidas de absorbância para o terceiro timepoint-72 h.*

Considerando estes resultados experimentais, podemos concluir que as condições 655 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup>, 810 nm a 5 mW/cm<sup>2</sup> e 940 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup> obtiveram

os melhores resultados em termos de atividade metabólica e, conseqüentemente, de viabilidade celular.

## 5- Discussão

A fotobiomodulação ou LLLT é utilizada atualmente no campo da medicina dentária e medicina, particularmente, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e bioestimulatórios. Esta terapia tem sido utilizada para estimular dois tipos celulares essenciais à remodelação óssea e ao movimento dentário: os hPLFs e osteoblastos.

O nosso estudo focou-se no efeito da PBM na viabilidade dos hPLFs. Estas células são responsáveis por induzir uma cascata de reações inflamatórias que promovem a ativação de osteoclastos e, conseqüentemente, a remodelação óssea. Esta estimulação dos hPLFs permitiria, assim, a redução do tratamento ortodôntico. No entanto, existe um vasto número de parâmetros a serem estudados e definidos tais como o comprimento de onda, densidade de potência, energia, tempo de estimulação, número de estimulações, entre outros, para permitir a aplicação otimizada desta técnica. Pela análise da literatura, PBM é essencialmente aplicada com comprimentos de onda compreendidos entre 600 nm e 1000 nm.

Com base numa análise da literatura, para a estimulação celular foram utilizados LEDs de três comprimentos de onda diferentes (655 nm, 810 nm, 955 nm) e duas densidades de potência ( $5 \text{ mW/cm}^2$  e  $10 \text{ mW/cm}^2$ ) durante 3 min para compreender o efeito destes parâmetros na viabilidade dos hPLFs. Após 1 h de estimulação, o aumento da atividade metabólica foi semelhante para todos os grupos experimentais em comparação com o de controlo, mas ligeiramente superior para o grupo 940 nm a  $5 \text{ mW/cm}^2$ . Depois de 24 h de estimulação, a atividade metabólica aumentou ligeiramente e de forma similar para os grupos experimentais com LEDs 810nm e 940 nm,

independente da densidade de potência utilizada. Às 72 h, apenas os efeitos das condições 655 nm a  $10\text{mW}/\text{cm}^2$  e 840 nm a  $5\text{ mW}/\text{cm}^2$  permaneceram com maior atividade metabólica em relação ao grupo de controlo, sugerindo que estes parâmetros de estimulação podem exercer um efeito na atividade metabólica mais prolongado que os restantes grupos. Uma menor atividade metabólica foi registada para outras condições o que poderá indicar que a estimulação com estes parâmetros em específico pode ser insuficiente para exercer efeitos celulares semelhantes. Desta forma, mais tempo de estimulação e/ou repetição das sessões de estimulação ao longo do tempo podem ser necessárias.

Barbara Sterczala *et al.*<sup>9</sup> relatou que a atividade metabólica dos fibroblastos quando estimulados com comprimentos de onda 635 nm e 980 nm aumentou às 24 h. Às 48 h, apenas o grupo experimental de 635 nm demonstrou uma maior atividade metabólica do que o grupo de controlo. No entanto, às 72 h, a atividade celular dos dois grupos experimentais diminuiu em relação ao grupo de controlo, o que está de acordo com os nossos resultados, confirmando uma perda de efeitos biológicos ao longo do tempo.

Um estudo de Mohammmd Ayoub Rigi Ladiz *et al.*<sup>10</sup> comparou a viabilidade dos hPLFs com dois comprimentos de onda 810 nm e 940 nm e com três densidades de energia. Às 24 h, como observado no nosso estudo, a atividade celular do grupo de 810 nm ( $0,5\text{ J}/\text{cm}^2$ ) aumentou em comparação com o controlo. No entanto, a atividade metabólica das células estimuladas com o grupo de 810 nm pareceu significativamente superior à do grupo de 940 nm também a  $0,5\text{ J}/\text{cm}^2$ .

Eun-Jeong Choi *et al.*<sup>11</sup> comparou o efeito de um díodo de 810 nm com três densidades de energia diferentes e verificou um aumento da atividade metabólica até 48 h, quando comparado com o grupo de controlo. Após 72 h, este aumento igualou o grupo de controlo, não se observando nenhuma diferença significativa.

Também é necessário comparar os resultados do nosso estudo com outros estudos que submeteram os hPLFs a vários estímulos ao longo do tempo. No estudo Jyun-Yi Wu *et al.*<sup>12</sup> foi verificado um aumento significativo na atividade dos hPLFs para

um comprimento de onda de 660 nm. A atividade metabólica destas células após 1, 2 e 5 dias de estimulação diária com laser permaneceu mais elevada do que no grupo de controlo.

As diferenças encontradas entre os estudos com comprimentos de onda semelhantes e com células semelhantes podem ser demonstradas por H H van Breugel *et al.*<sup>13</sup> Neste estudo, os efeitos da irradiação por laser são dependentes do tempo de exposição e da densidade de potência utilizados e, por isso, tanto a estimulação como a inibição dos efeitos celulares podem ocorrer com o mesmo laser nas mesmas células.

## 6- Conclusões

A irradiação para quase todos os parâmetros permitiu aumentar a atividade metabólica dos hPLFs após 24 h. No entanto, uma única estimulação com LEDs não induziu um efeito celular prolongado no tempo, exceto para o grupo 655 nm a 10 mW/cm<sup>2</sup>.

Estudos futuros devem ser conduzidos para testar outros parâmetros de irradiação com especial foco na aplicação de múltiplas sessões de estimulação ao longo do tempo ou no aumento do tempo de exposição. Outras análises poderiam também ser realizadas para permitir a quantificação de outros fatores específicos envolvidos no movimento dentário e remodelação óssea (por exemplo, expressão de fosfatase alcalina e dos marcadores RANKL e OPG). Além disso, a extrapolação dos parâmetros de irradiação em estudos *in vitro* para fins clínicos pode ser desafiante e, por isso, estudos *in vivo* deveriam também ser elaborados.

## 7- Referências bibliográficas

1. de Almeida VL, de Andrade Gois VL, Andrade RNM, Cesar CPHAR, de Albuquerque-Junior RLC, de Mello Rode S, et al. Efficiency of low-level laser therapy within induced dental movement: A systematic review and meta-analysis. *J Photochem Photobiol B*. mai 2016;158:258-66.
2. Sousa MVS, Pinzan A, Consolaro A, Henriques JFC, de Freitas MR. Systematic literature review: influence of low-level laser on orthodontic movement and pain control in humans. *Photomed Laser Surg*. nov 2014;32(11):592-9.
3. Ge MK, He WL, Chen J, Wen C, Yin X, Hu ZA, et al. Efficacy of low-level laser therapy for accelerating tooth movement during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci*. juill 2015;30(5):1609-18.
4. Domínguez Camacho A, Montoya Guzmán D, Velásquez Cujar SA. Effective Wavelength Range in Photobiomodulation for Tooth Movement Acceleration in Orthodontics: A Systematic Review. *Photobiomodulation Photomed Laser Surg*. oct 2020;38(10):581-90.
5. AlShahrani I, Togoo RA, Hosmani J, Alhaizaey A. Photobiomodulation in acceleration of orthodontic tooth movement: A systematic review and meta analysis. *Complement Ther Med*. déc 2019;47:102220.
6. Chiari S. Photobiomodulation and Lasers. *Front Oral Biol*. 2016;18:118-23.
7. Dunigan DD, Waters SB, Owen TC. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity. *BioTechniques*. oct 1995;19(4):640-9.
8. Dunigan DD. Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity [Internet]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/14425880>.
9. Sterczała B, Grzech-Leśniak K, Michel O, Trzeciakowski W, Dominiak M, Jurczyszyn K. Assessment of Human Gingival Fibroblast Proliferation after Laser Stimulation In Vitro Using Different Laser Types and Wavelengths (1064, 980, 635, 450, and 405 nm)-Preliminary Report. *J Pers Med*. 4 févr 2021;11(2):98.
10. Ladiz MAR, Mirzaei A, Hendi SS, Najafi-Vosough R, Hooshyarfard A, Gholami L. Effect of photobiomodulation with 810 and 940 nm diode lasers on human gingival fibroblasts. *Dent Med Probl*. déc 2020;57(4):369-76.
11. Choi EJ, Yim JY, Koo KT, Seol YJ, Lee YM, Ku Y, et al. Biological effects of a semiconductor diode laser on human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci*. juin 2010;40(3):105-10.

12. Wu JY, Chen CH, Yeh LY, Yeh ML, Ting CC, Wang YH. Low-power laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via cyclic adenosine monophosphate. *Int J Oral Sci.* juin 2013;5(2):85-91.
13. van Breugel HH, Bär PR. 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 Surg Med.* 1992;12(5):528-37.