

Otimização do protocolo de fotobiomodulação no movimento dentário ortodôntico para aumentar a viabilidade dos osteoblastos.

Estudo *in vitro*

Inês Alexandra Monteiro Alves Costa Mata

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

Gandra, 19 de Maio de 2022

Inês Alexandra Monteiro Alves Costa Mata

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 osteoblastos.

Estudo *in vitro*

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

Declaração de Integridade

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, e 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 referenciados ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Júlia Alexandra Fonteiro Alves Costa Patay

«Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe por provar o contrário.»

(Albert Einstein)

Protocolo de Otimização da Fotobiomodulação em Células Osteoblásticas

Alves Costa I.¹, Gonçalves A.², Monteiro F.³, Oliveira S.³, Pinho T.⁴

¹ Aluno do 5º ano do curso MIMD no IUICS

² Assistente Convidada do IUICS

³ Investigadoras no CMEMS-UMinho

⁴ Professora Auxiliar no IUICS

Introdução

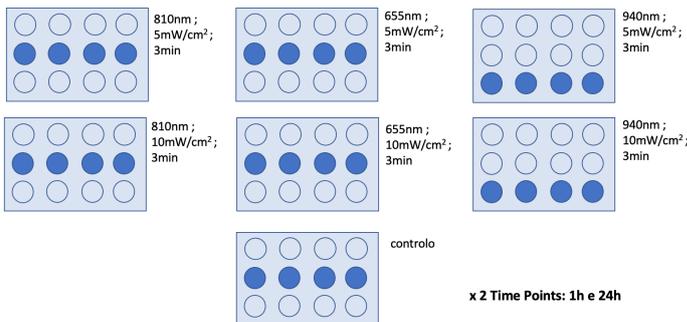
A fotobiomodulação (PBM) é um tratamento não-invasivo que utiliza irradiação de luz de baixa intensidade para estimular células e tecidos em todo o corpo. Em particular, vários estudos *in vitro* mostram que a PBM aumenta a viabilidade, proliferação e diferenciação de osteoblastos. Por este motivo, esta técnica tem sido utilizada em medicina dentária para promover aceleração do movimento ortodôntico.

Objetivos

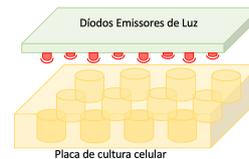
Propor um conjunto de parâmetros ótimos de PBM para estimular as células osteoblásticas e, assim, a formação óssea no periodonto.

Materiais e Métodos

Uma linha celular de osteoblastos fetais humanos (hFOB) foi cultivada em 14 placas, da seguinte forma:



Esquema da estimulação com PBM em todas as condições:



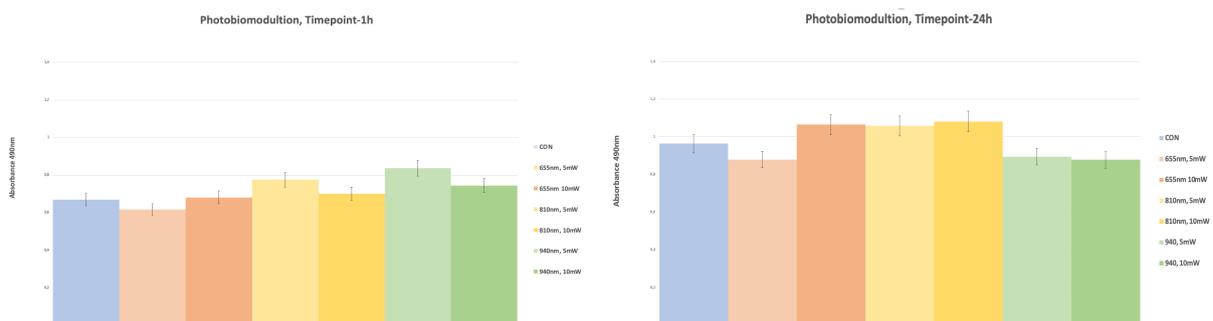
Incubação:
T= 37°C
CO₂ = 5%
Humidade= 100%

Realizaram-se os ensaios MTS para cada *time point*.

O ensaio MTS é um método colorimétrico utilizado para avaliar a atividade metabólica e consequentemente a viabilidade celular.

Discussão e Resultados

De acordo com os resultados dos ensaios MTS para os *time points* 1h e 24h, foram elaborados os seguintes gráficos de barras:



No primeiro *time point* (1h), todos os grupos com a exceção do grupo 655nm, 5mW/cm² obtiveram melhores resultados comparativamente ao grupo de controlo.

Os grupos com melhores resultados e consequente maior viabilidade celular são os grupos 810nm, 5mW/cm² e 940nm, 5mW/cm².

Verificamos que a viabilidade celular no 2º *time point* aumentou em todos os grupos comparativamente ao 1º *time point*.

No 2º *time point*, o grupo 655nm, 10mW/cm² e os grupos 810nm, 5 e 10mW/cm² apresentaram maior viabilidade celular.

Conclusão

É necessário realizar mais um *time point* após 72h, para observar a viabilidade celular, de forma a otimizar o protocolo da PBM nas células osteoblásticas, melhorando assim a sua aplicabilidade clínica.



Referências Bibliográficas

1. Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, et al. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF-β1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers in Medical Science*. 2013 Feb;28(2):343-50.
2. Huang TH, Lu YC, Kao CT. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. *Lasers in Medical Science*. 2012 May;27(3):621-7.
3. Javad MM, Hussen A, Adina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis *in vitro*. *Journal of Biomedical Optics*. 2013 Dec; 18(12):128001.
4. Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschoni M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the *in vitro* response of osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Optics*. 2014 Oct 3; 19(10):108002.
5. Bólboly Atay G, Ak Can A, Gölşay M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. *Lasers in Medical Science*. 2017 Apr 1;32(3):591-9.
6. Mergoni G, Vescovi P, Bellotti S, Uggeri J, Nammour S, Gatti R. Effects of 915 nm laser irradiation on human osteoblasts: a preliminary *in vitro* study. *Lasers in Medical Science*. 2018 Aug 1;33(6):1189-95.
7. Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Abe T, Medina CC, Nakajima K, et al. Examination of the effect of the combined use of red-Yag laser irradiation and mechanical force loading on bone metabolism using cultured human osteoblasts. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2020;11(2):138-43.
8. Chaweevanakorn C, Santiwong P, Surarit R, Sritanaudomchai H, Chintavakorn R. The effect of LED photobiomodulation on the proliferation and osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells: *in vitro*. *Journal of the World Federation of Orthodontists*. 2021 Jun 1;10(2):79-85.



EVENTOS
CIENTÍFICOS
IUCS

JORNADAS
CIENTÍFICAS
AEIUCS

XXX
JORNADAS CIENTÍFICAS
DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS

DIPLOMA

O Presidente das XXX Jornadas Científicas de Ciências Dentárias certifica que:

Alves Costa I., Gonçalves A., Monteiro F., Oliveira S., Pinho T.

apresentaram um trabalho científico sob a forma de E-poster intitulado, “Protocolo de Otimização da Fotobiomodulação em Células Osteoblásticas” no âmbito das XXX Jornadas subordinadas ao tema “Workflow digital nas distintas frentes de ação da Medicina Dentária”, que decorreram no dia 08 de abril de 2022, no Centro de Congressos da Alfândega do Porto.

PROF. DOUTOR JOAQUIM MOREIRA
PRESIDENTE DAS XXX JORNADAS CIENTÍFICAS DE CIÊNCIAS DENTÁRIAS



Agradecimentos

Por onde começar... 10 anos depois de terminar o Mestrado Integrado em Engenharia Civil, centenas de voos e milhares de km percorridos, aqui estou eu, a acabar o Mestrado Integrado em Medicina Dentária.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu marido, por todo o apoio, ajuda, paciência, amor e carinho com que sempre me incentivaram ao longo destes 5 anos; sem eles este objetivo não seria atingido! Amo-vos! Aos meus irmãos, que sempre acreditaram e nunca duvidaram das capacidades da maninha mais nova e a toda a família!

A todos os meus amigos, que de certa forma acharam que estava louca por trabalhar e estudar ao mesmo tempo e estar constantemente neste vaivém de viagens entre França e Portugal, apesar de ter perdido alguns momentos importantes, sempre compreenderam e apoiaram.

A todos os meus colegas de turma, esta turma magnífica, onde sempre reinou a partilha e a união, juntos somos mais fortes e juntos chegamos ao fim desta etapa! Aos meus "espanholitos" preferidos, obrigada a todos em geral e em particular à minha binómia Lucía e às minhas, Graciela e Sara.

À minha co-orientadora, Mestre Sofia Oliveira, por toda a partilha de conhecimento e paciência nos ensaios laboratoriais realizados neste trabalho, assim como as restantes companheiras de laboratório.

Por último, mas não menos importante a todos os professores que tive o privilégio de conhecer, em especial à minha orientadora, Mestre Aline Gonçalves, pelo acompanhamento, orientação, motivação e incentivo demonstrado ao longo da realização deste trabalho, sempre com a maior disponibilidade e simpatia.

RESUMO

Introdução: A fotobiomodulação (PBM) é um tratamento não-invasivo que utiliza irradiação de luz de baixa intensidade para estimular células e tecidos em todo o corpo. Em particular, vários estudos *in vitro* mostram que a PBM aumenta a viabilidade, proliferação e diferenciação de osteoblastos. Por este motivo, esta técnica tem sido utilizada em medicina dentária para promover aceleração do movimento ortodôntico.

Objetivos: O objetivo deste estudo é propor um conjunto de parâmetros ótimos de PBM para estimular as células osteoblásticas e assim, a formação óssea no periodonto, acelerando o movimento ortodôntico.

Material e Métodos: Uma linha celular de osteoblastos fetais humanos (hFOB) foi cultivada em placas de 12 poços. As células foram divididas em grupos experimentais de acordo com o comprimento de onda (655 nm, 850 nm e 940 nm) e a densidade de potência (5 e 10 mW/cm²) aplicada. Todos os grupos foram estimulados uma vez, durante 3 minutos, em modo contínuo. Um ensaio MTS foi usado para determinar a viabilidade celular em todos os grupos nos seguintes *timepoints* (1 h, 24 h e 72 h).

Resultados: Os grupos que apresentaram melhores resultados foram os grupos 655 nm (10 mW/cm²), 810 nm (5 mW/cm²) e 940 nm (5 mW/cm²).

Conclusões: Os efeitos induzidos pela irradiação nos osteoblastos são rápidos e de curta duração e, para melhorar a otimização do protocolo, a estimulação deveria ser efetuada todos os dias durante alguns dias. Para perceber melhor os efeitos provocados pela irradiação, outras análises deveriam ser efetuadas como estudar o efeito da irradiação na proliferação celular.

Palavras-Chave: fotobiomodulação; terapia de luz de baixo nível; osteoblastos; remodelação óssea, movimento dentário ortodôntico; ortodontia.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation (PBM) is a non-invasive treatment that uses low-intensity light irradiation to stimulate cells and tissues throughout the body. In particular, several *in vitro* studies shows that PBM increases the viability, proliferation, and differentiation of osteoblasts. For this reason, this technique has been used in dentistry to promote acceleration of orthodontic movement.

Objectives: The aim of this study is to propose a set of optimal PBM parameters to stimulate osteoblastic cells and thus bone formation in the periodontium by accelerating orthodontic movement.

Material and Methods: A human fetal osteoblast (hFOB) cell line was grown and further seeded in 12-well plates. The cells were divided into different experimental groups according to the wavelength (655 nm, 850 nm and 940 nm) and power density (5 and 10 mW/cm²) applied. All groups were stimulated once for 3 minutes in continuous mode. The MTS assay was used to determine cell viability in all groups at the following timepoints (1 h, 24 h and 72 h).

Results: The groups that presented better results were the 655 nm (10 mW/cm²), 810 nm (5 mW/cm²) e 940 nm (5 mW/cm²).

Conclusions: The effects induced by irradiation on osteoblasts are rapid and of short duration and, to improve protocol optimization, stimulation should be performed every day for a few days. To better understand the effects caused by irradiation, other analyzes should be carried out, such as studying the effect of irradiation on cell proliferation.

Keywords: photobiomodulation; low level light therapy; osteoblasts; bone remodeling; orthodontic tooth movement; orthodontics.

Índice Geral

1- Introdução	1
2- Material e Métodos	3
2.1- Cultura Celular.....	3
2.1.1- Protocolo Laboratorial.....	3
2.2- Protocolo de irradiação.....	9
2.3- Ensaio de viabilidade celular.....	10
2.3.1- Protocolo Laboratorial.....	11
3- Resultados	13
3.1- Efeito da estimulação na viabilidade celular.....	13
4- Discussão	15
5- Conclusão	17
6- Referências Bibliográficas	19

Índice de Figuras

Figura 1 - Imagem Microscópica 10x cultura celular de osteoblastos.....	3
Figura 2 - Colocação do falcon na centrífugadora.....	5
Figura 3 - Falcon depois de retirar da centrífugadora com o pellet e o sobrenadante.....	5
Figura 4 - Esquema do hemocitómetro.....	6
Figura 5 - Pipetagem de 10 µL para a câmara de Neubauer.....	7
Figura 6 - Esquema das placas de 12 poços para cada Timepoint (1 h, 24 h e 72 h).....	9
Figura 7 - Esquema do procedimento de fotobiomodulação (PBM).....	10
Figura 8 - Placa de 96 poços identificada com todas as condições.....	11
Figura 9 - Placa de 96 poços com MTS após 4 h de incubação.	12
Figura 10 - Resultados obtidos no leitor de microplacas com software informático.....	12
Figura 11 - Resultados para o primeiro timepoint – 1 h.....	13
Figura 12 - Resultados para o segundo timepoint – 24 h.....	14
Figura 13 - Resultados para o terceiro timepoint – 72 h.....	14

Lista de SIGLAS e Abreviaturas

PBM – Fotobiomodulação

OTM – Movimento dentário ortodôntico

PDL – Ligamento periodontal

LLLT – Tratamento com laser de baixa intensidade

LED – Díodos emissores de luz

CCO – Citocromo C Oxidase

ATP – Adenosina trifosfato

hFOB – Osteoblastos fetais humanos

CO₂ – Dióxido de Carbono

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

PBS – Solução tampão: fosfato-salino

1- Introdução

Atualmente, inúmeros pacientes procuram a felicidade num sorriso perfeito, existindo para isso a necessidade de efetuar um tratamento ortodôntico, procedimento dentário importante para restabelecer a estética, a estabilidade, a função e oclusão.

A duração e a dor dentária, são as principais preocupações dos pacientes quando ponderam efetuar um tratamento ortodôntico ou mesmo interrompê-lo^{1,2}, motivo pelo qual os pacientes procuram um tratamento eficaz num curto período de tempo.³ Para além disso, o tratamento prolongado aumenta o risco de cáries, doenças periodontais⁴, reabsorção óssea alveolar, reabsorção radicular, etc.^{5,6}

Para reduzir o tempo de tratamento é necessário a aceleração do movimento dentário ortodôntico (OTM), podendo ser alcançado através de métodos que aceleram os fenómenos biológicos envolvidos no movimento ou melhorando a mecânica e as técnicas ortodônticas. O OTM ocorre na presença de estímulos mecânicos envolvendo a remodelação do osso alveolar e do ligamento periodontal (LPD).¹ No tratamento ortodôntico, o movimento dentário é controlado pela remodelação óssea, processo que se baseia na diferenciação de células-tronco mesenquimais e precursoras em osteoblastos (promovem a reabsorção óssea no local de pressão) e osteoclastos (promovem a formação óssea no local de tensão).^{5,7} A resposta complexa de componentes celulares, incluindo LPD, à força aplicada, permite que o movimento dentário ocorra.⁷

Existem muitas técnicas para a aceleração do OTM, podem ser cirúrgicas, sendo a corticomia alveolar a técnica de eleição,³ ou não cirúrgicas, menos invasivas e mais conservadoras. Nas não cirúrgicas, os métodos recorrem a fatores físicos como a terapia de luz de baixo nível (LLLT) ou fatores farmacológicos.^{3,8}

A LLLT também conhecida como fotobiomodulação (PBM) consiste na utilização de lasers de baixa energia ou diodos emissores de luz (LED) para modificar a biologia celular pela exposição à luz, dentro do espectro visível e infravermelho (600-1200 nm)^{2,3,9} e é uma ferramenta clínica em constante crescimento para uma variedade de aplicações na medicina regenerativa e dentária, incluindo redução de processos inflamatórios, alívio da dor, aceleração da cicatrização de feridas, proliferação de fibroblastos, síntese de colagénio, regeneração nervosa.¹⁰⁻¹³ Em particular, a aceleração da regeneração óssea tem sido alvo

de estudos recentes, por trazer potenciais benefícios nas terapias clínicas da ortodontia, periodontologia, implantologia, etc.^{9,14}

O mecanismo de ação da PBM ainda não é totalmente compreendido; é baseado em fotoquímica e reações fotobiológicas em células e tecidos devido à estimulação apenas da luz sem qualquer aumento térmico.^{9,11} Este é descrito pela absorção da luz no infravermelho pelo recetor mitocondrial predominante, o Citocromo C Oxidase (CCO), aumentando assim, a produção de adenosina trifosfato (ATP). Presume-se que o aumento da produção de ATP aumenta a atividade metabólica intracelular, a síntese de DNA e RNA e a remodelação do tecido periodontal.^{2,3,15} O aumento da quantidade de ATP em células ósseas bem vascularizadas, promove a proliferação e diferenciação celular, criando um ambiente favorável ao movimento dentário.³

Apesar dos resultados favoráveis, alguns estudos mostram-se contraditórios. Tais discrepâncias podem ser atribuídas às variações nos protocolos de irradiação e/ou nos modelos experimentais utilizados, utilizando diferentes parâmetros de laser, condições de exposição, protocolos *in vitro* e sistemas de culturas celulares diferentes ou reportando-os erroneamente, o que torna difícil interpretar e aplicar os resultados à prática clínica.

O OrthoPulse®, é um dispositivo já existente no mercado, que promove a aceleração do OTM, através da aplicação de LED, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), com um comprimento de onda de 850 nm.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é examinar o efeito de diferentes comprimentos de onda e densidades de potência no tratamento com PBM a fim de propor um conjunto de parâmetros ótimos de PBM para estimular as células osteoblásticas e, assim, a formação óssea no periodonto, acelerando o movimento dentário ortodôntico.

2- Material e Métodos

2.1- Cultura Celular

A linha celular de osteoblastos fetais humanos (hFOB) foi adquirida na empresa *American Type Culture Collection* (ATCC, USA). As células foram mantidas em meio de cultura basal DMEM:F12 sem vermelho de fenol (PAN-Biotech GmbH, Germany), constituído com 10% soro bovino fetal (FBS) (PAN-Biotech GmbH, Germany) e 0,3 mg/ml de antibiótico G418 (PAN-Biotech GmbH, Germany), a 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 100% de humidade. O meio foi trocado duas vezes por semana. A figura 1 apresenta a morfologia dos osteoblastos observados ao microscópio.

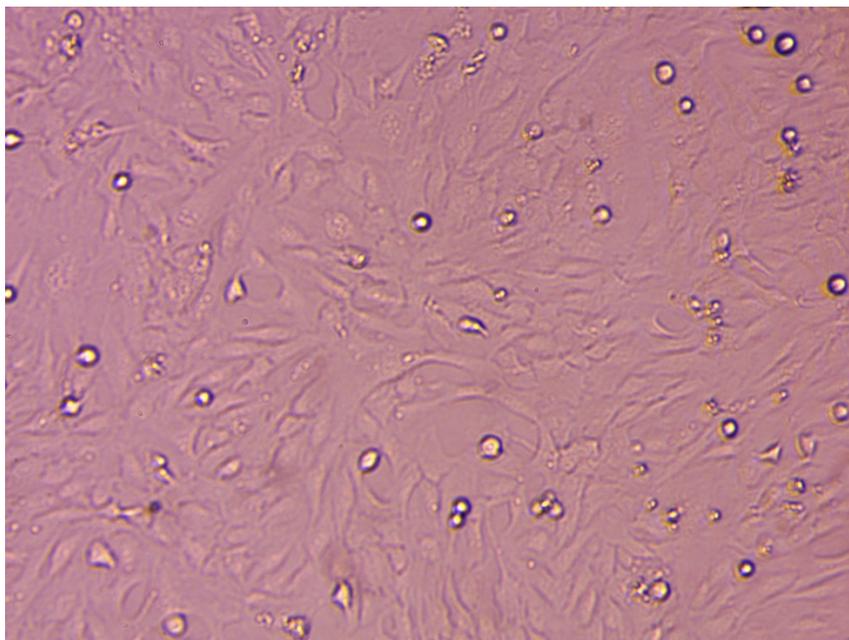


Figura 1- Imagem microscópica (10x) da cultura celular de osteoblastos.

2.1.1- Protocolo Laboratorial

- i. Retirar as células que colocamos em cultura 72 h antes. Foram usadas em passagem 12 (passagem é o número de vezes que as células foram subcultivadas);
- ii. Observar a confluência ao Microscópio (Kern, Germany). Confluência é a percentagem da área do frasco de cultura coberto pelas células aderentes. As células foram tripsinizadas quando uma confluência de 80-90% foi atingida.

- Lente 10x;
- Células mortas: suspensas no meio
- Osteoblastos: fenótipo alongado
- iii. Descongelar Tripsina/EDTA (Biowest, France) e aquecer a 37°C a solução salina (PBS) e meio de cultura,;
- iv. Retirar o meio de cultura do frasco;
- v. Lavar as células com PBS duas vezes. O PBS irá remover totalmente meio de cultura que poderá ter ficado ainda no frasco antes de se colocar a solução de tripsina/EDTA, uma vez que a presença de FBS do meio de cultura inibe a ação da tripsina/EDTA;
 - T75: 10 mL de PBS
- vi. Colocar a solução de tripsina/EDTA para destacar as células da superfície onde foram cultivadas;
 - 5 min a 37°C, 5% CO₂ e a 100% de humidade
 - T75: 2 mL de tripsina/EDTA
- vii. Adicionar meio de cultura (4x o volume da tripsina/EDTA) para neutralizar a ação da tripsina/EDTA. Uma exposição prolongada em tripsina/EDTA é tóxica para as células daí que se adicione meio para neutralizar a sua ação após os 5 min da sua incubação.
 - Portanto, se 2 mL de tripsina/EDTA → 8 mL de meio de cultura
- viii. Aspirar o meio dos dois frascos e colocar num tubo *falcon*,
- ix. Centrifugar o tubo *falcon* a 300G durante 5min (Figura 2);



Figura 2- Colocação do *falcon* na centrífugadora.

- x. Retirar cuidadosamente o *falcon* com as células da centrífugadora;
- xi. Aspirar o sobrenadante (constituído essencialmente por meio de cultura e células mortas) e ressuspender o *pellet* (composto pelas células depositadas no fundo do tubo) com 5 mL de meio; (Figura 3)

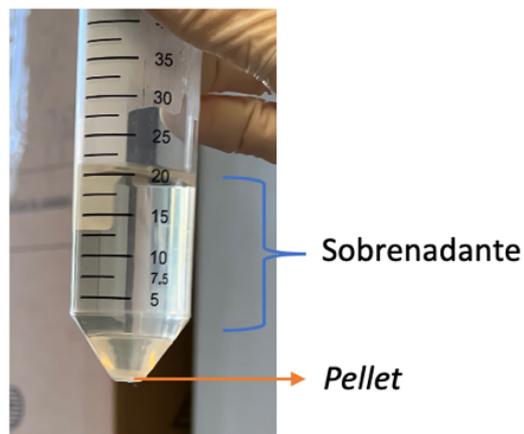


Figura 3 - *Falcon* depois de retirar da centrífugadora com o *pellet* e o sobrenadante.

- xii. Colocar 20 μ L de solução 0.4% azul tripano num *ependorf*;
- xiii. Colocar 20 μ L da suspensão celular anteriormente ressuspensa no *ependorf* com azul tripano;

xiv. Contabilizar as células ao microscópio a 10x;

Para contabilizar as células, utiliza-se azul tripano que é um corante que, quando as células estão vivas, não consegue penetrar a membrana celular, uma vez que esta é impermeável a este corante. No entanto, células mortas são permeáveis ao azul tripano, apresentando uma cor azul quando observadas ao microscópio, ao contrário das células vivas que não aparecem coradas. Este método não diferencia entre células apoptóticas e necróticas. Para a contagem de células é utilizado um hemocitômetro (Figura 4), também designado por câmara de *Neubauer*, que consiste numa lâmina de microscópio de vidro espesso com uma câmara recortada de dimensões precisas. Isso permite que um volume definido de suspensão celular seja depositado na câmara, onde as células são contadas.¹⁶

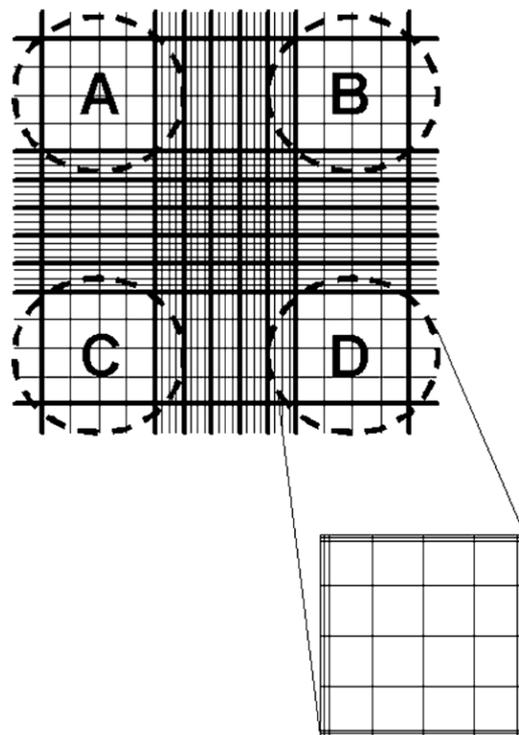


Figura 4- Esquema do hemocitômetro.¹⁶

- Pipetar 10 μ L da suspensão celular com o azul tripano para a câmara de *Neubauer* (Figura 5);



Figura 5 - Pipetagem de 10 μ L para a câmara de *Neubauer*

- Contagem dos 4 quadrados em cada com um contador;
- 1ª Câmara \rightarrow 620 células \times 2 = 1240 (Multiplica-se por 2 devido ao fator de diluição (1:2))
- 2ª Câmara \rightarrow 420 células \times 2 = 840
- Calcula-se a média das 2 câmaras;

$$n^{\circ}\text{células} = \frac{1240 + 840}{2} = 1040 \text{ células}$$

- Para obter a concentração celular, multiplica-se por 10.000 (volume de solução que está em cada quadrado) e divide-se por 4 quadrados;

$$\text{Concentração celular} = \frac{1040 \times 10000}{4} = 2.6 \times 10^6 \text{ Células/mL}$$

$$n^{\circ}\text{células em 5mL} = \frac{2.6 \times 10^6 \times 5}{1} = 13 \times 10^6 \text{ Células}$$

- Para o ensaio necessitam-se de 21 placas com 4 réplicas de cada (ver por favor próxima secção Protocolo de irradiação). Cada poço deverá conter 1 mL. No entanto, devido a erros de pipetagem e, para evitar que os últimos poços não tenham volume de suspensão, consideramos sempre um valor excedente. Assim temos:

$$21 \text{ placas} \times 4 \text{ réplicas} \times 1 \text{ mL} = 84 \text{ poços} \longrightarrow 84 \text{ mL} \longrightarrow 90 \text{ mL}$$

$$90 \text{ mL} \times 20\,000 \text{ células} = 1.80 \times 10^6 \text{ células} \checkmark$$

(células suficientes para os estudos)

$$c_{in} = 2,6 \times 10^6 \text{ células/mL}$$

$$V_{in} =$$

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

$$V_f = 90 \text{ mL}$$

- A concentração inicial refere-se à concentração de células que foi anteriormente calculada através do hemocítmetro. A concentração final refere-se à concentração de células que cada poço terá. O volume final refere-se ao volume total necessário para preencher todos os poços do estudo com a concentração final. Através da equação seguinte, obtém-se o volume inicial da suspensão celular que deve ser retirado:

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

$$2.6 \times 10^6 \times V_{in} = 2 \times 10^4 \times 90 \longrightarrow V_{in} = 0,69 \text{ mL}$$

- xv. Colocar num frasco 0,69 mL da suspensão celular;
- xvi. Adicionar 89,31 mL de meio de cultura para perfazer o volume final de 90 mL;
- xvii. Realizar *up and down* da suspensão celular para homogeneizar a distribuição das células na solução;
- xviii. Colocar 1 mL da suspensão celular com concentração definida (2×10^4 células/mL) em cada poço;
- xix. Cultura das células nos poços concluída;
- xx. Incubar as placas de 12 poços com as células cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ e a 100% de humidade;
- xxi. Colocar as células que não foram utilizadas em cultura;

2.2- Protocolo de irradiação

As células foram irradiadas com LEDs de comprimentos de onda 655 nm, 810 nm e 940 nm e duas densidades de potência foram testadas 5 mW/cm² e 10mW/cm² durante 3 minutos em modo contínuo e apenas uma vez.

Tal como referido anteriormente, as células foram cultivadas em 21 placas de 12 poços (Figura 6), com uma concentração de 2x10⁴ células/mL/poço e na passagem nº 12. Utilizou-se uma placa com quatro poços para cada condição para evitar a interferência da luz entre condições, pois as placas são transparentes. Após incubação de 72 h para adesão aos poços, as células foram estimuladas com LEDs (Figura 7).

A condição de controlo foi constituída apenas por células que não foram irradiadas, mas a placa de estimulação foi colocada no topo desligada de forma a estar sob as mesmas condições que as outras amostras.

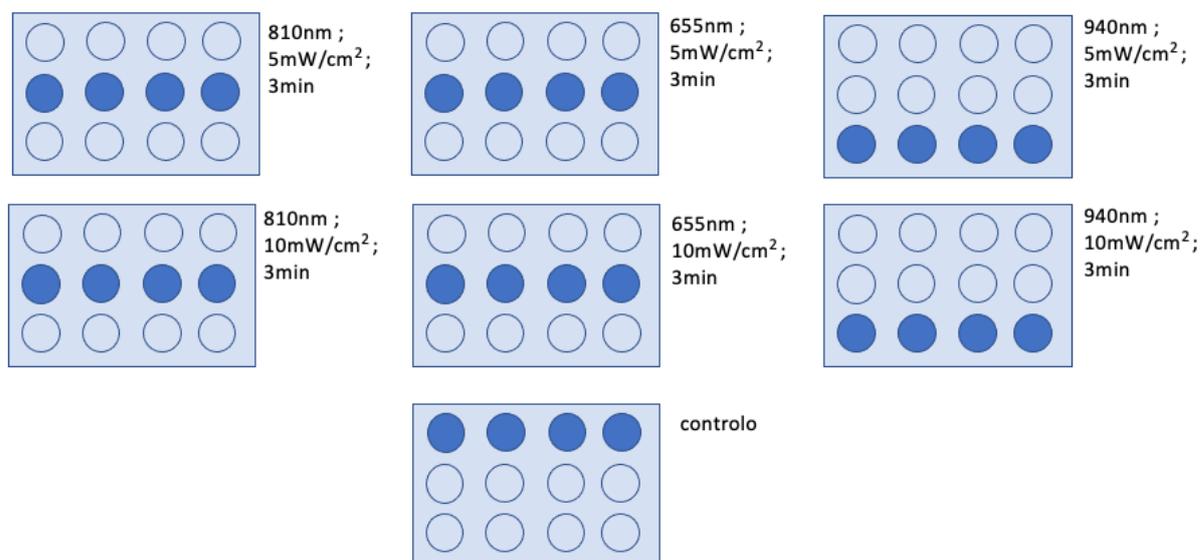


Figura 6 - Esquema das placas de 12 poços para cada *timepoint* (1 h, 24 h e 72 h)

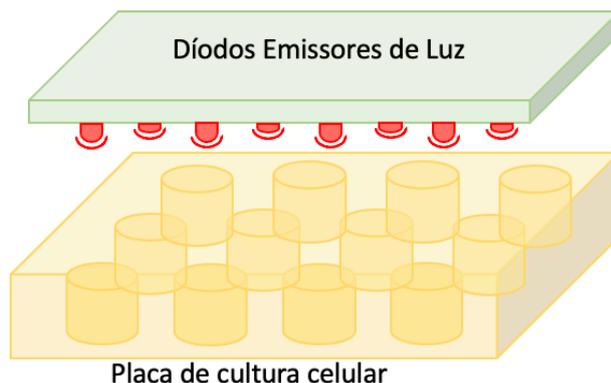


Figura 7- Esquema do procedimento de PBM.

2.3- Ensaio de 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.

O MTS é um composto de tetrazólio que é reduzido por nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) presentes em células metabolicamente ativas. Essa redução leva à produção de um produto formazan (cor acastanhada), que é solúvel em meio de cultura. A quantidade de formazan produzida pode ser analisada colorimetricamente a 490 nm de absorvância e é diretamente proporcional à quantidade de células metabolicamente ativas em cultura.¹⁷

A viabilidade celular dos osteoblastos foi analisada pelo ensaio MTS (Bio Vision, USA) nos *timepoints* 1 h, 24 h e 72 h. 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 absorvância detetada é resultado 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 CO₂ 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 colocada num leitor de microplacas (Epoch, BioTek, USA) onde a absorvância foi medida a 490 nm. Para os cálculos, a absorvância do branco foi subtraída à absorvância de cada condição.

2.3.1- Protocolo Laboratorial

- i. Desligar a luz da câmara de fluxo laminar (porque o MTS reage com luz, uma vez que é fotossensível);

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

$$\begin{array}{r} 10 \mu\text{L} \quad \text{—} \quad 100 \mu\text{L} \\ x \quad \text{—} \quad 1000 \mu\text{L} \\ \hline x = 100 \mu\text{L em cada poço} \end{array}$$

- ii. Adicionar 100 µL de MTS a cada poço;
- iii. Cobrir com uma folha de alumínio e incubar durante 4 h a 37°C, 5% CO₂ e 100% humidade;
- iv. Após 4 h de incubação, retirar as placas da incubadora com a luz desligada;
- v. Transferir para uma placa de 96 poços o volume dos poços e ler no leitor de microplacas, previamente identificada (Figura 8);

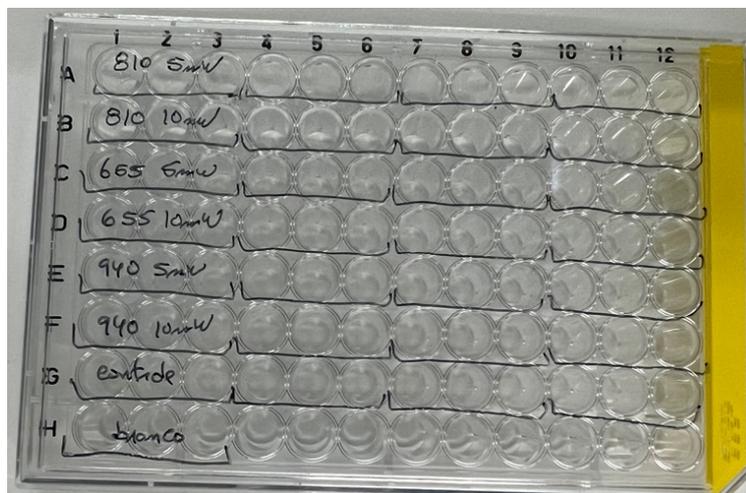


Figura 8 - Placa de 96 poços identificada com todas as condições.

- Transferir em triplicado cada poço 200 µl;
 - Realizar *up and down* para homogeneizar e pipetar o volume
- vi. Ler a placa no leitor de microplacas a uma absorbância de 490 nm (Figura 9);

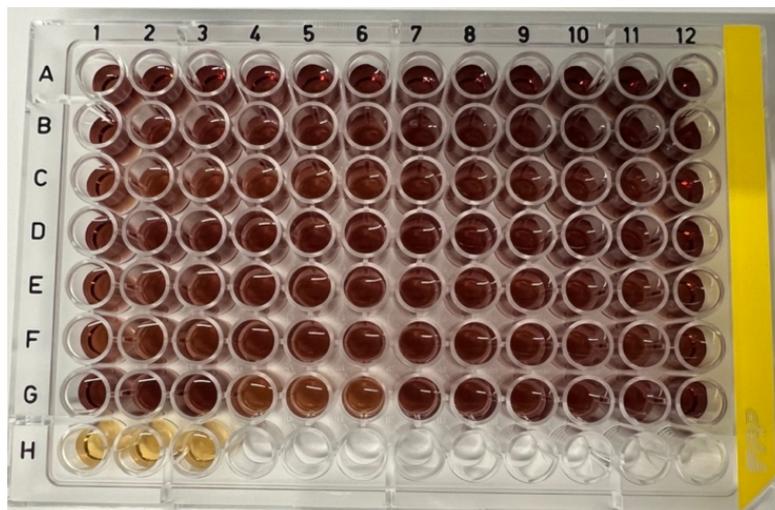


Figura 9 - Placa de 96 poços com MTS após 4 h de incubação.

vii. Observar os resultados obtidos pelo software informático (Figura 10):

Plate 1

Matrix: Statistics

Data: 490 Read Index: Show

	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

Edit Mask Help

Figura 10 – Resultados obtidos no leitor de microplacas com software informático.

3- Resultados

3.1- Efeito da estimulação na viabilidade celular

Após a leitura das placas de 96 poços no leitor de microplacas, os dados foram tratados e os seguintes gráficos foram elaborados para cada *timepoint* (1 h, 24 h e 72 h).

Como podemos observar na figura 11 do primeiro *timepoint* 1h, as células irradiadas com LEDs apresentaram atividade metabólica aumentada em comparação com o grupo de controle. É possível verificar que os grupos que apresentam melhores resultados em termos de viabilidade celular ao fim de 1h de estimulação são os grupos 940 nm a 5 mW/cm²; 810 nm a 5 mW/cm² e 940nm a 10 mW/cm².

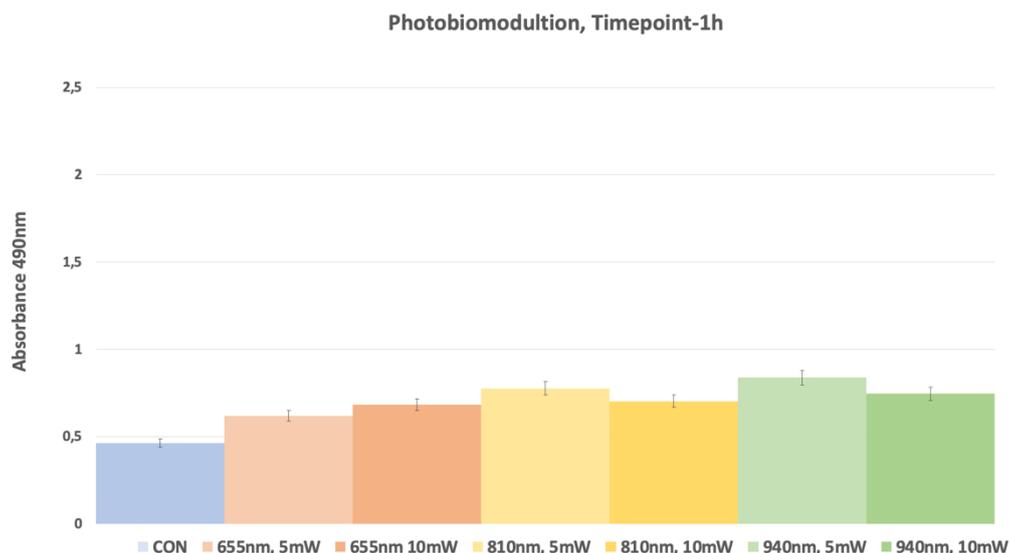


Figura 11 – Resultados para o primeiro *timepoint* - 1h.

Relativamente ao segundo *timepoint*, 24 h (Figura 12), apenas os grupos 655 nm a 10 mW/cm² e ambas as densidades de potência para o LED com comprimento de onda de 810 nm tiveram melhores resultados do que o grupo de controle. As restantes condições mostraram resultados comparáveis ao do grupo de controlo.

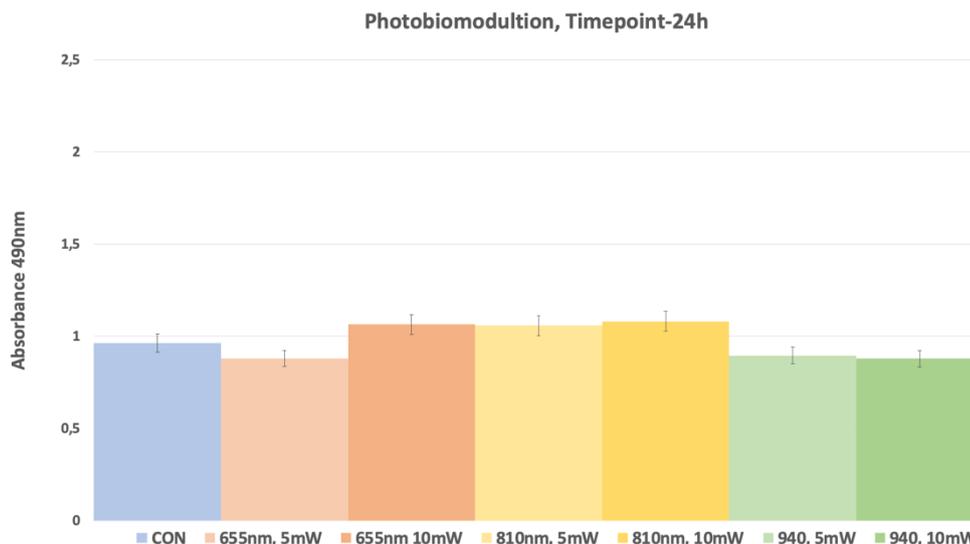


Figura 12 – Resultados para o segundo *timepoint*- 24 h.

No terceiro *timepoint*, 72 h (Figura 13), apenas o grupo 810 nm a 5 mW/cm² apresentou resultados idênticos ao grupo de controle, todos os outros apresentaram resultados ligeiramente mais baixos.

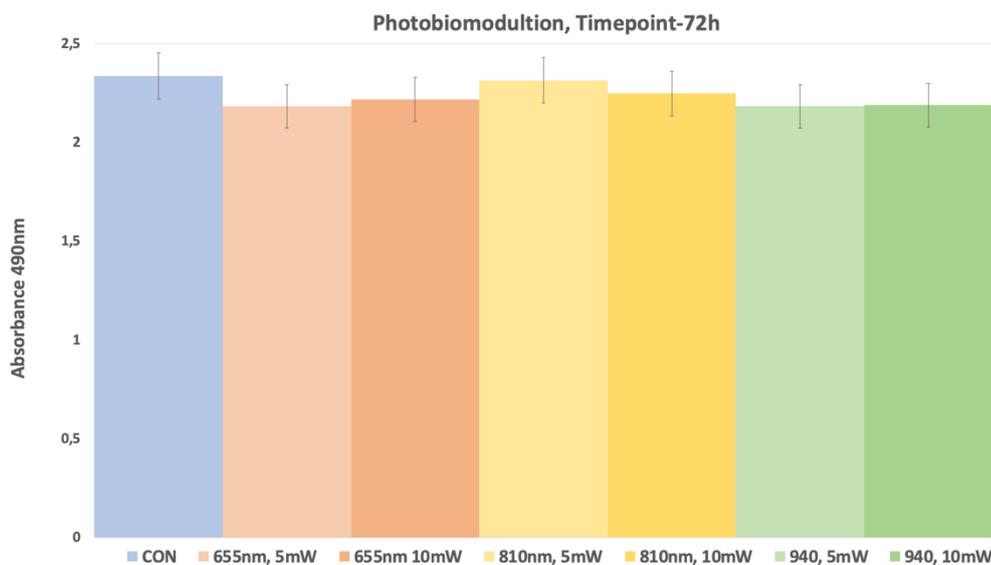


Figura 13 – Resultados para o terceiro *timepoint*- 72 h.

Analisando os 3 *timepoints*, podemos verificar que de uma maneira geral, a viabilidade celular aumentou ao longo do tempo e que a estimulação com LEDs não afetou de forma negativa as células. Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que os grupos que apresentam melhores resultados em termos de viabilidade celular pelo ensaio MTS ao longo dos 3 *timepoints* foram as condições 655 nm a 10 mW/cm² (particularmente após 1h de estimulação), 810 nm a 5 mW/cm² (para todos os *timepoints*) e 940 nm a 5mW/cm² (particularmente após 1h de estimulação).

4- Discussão

A PBM tem sido investigada há vários anos em diferentes áreas da medicina, vários estudos foram realizados, mas devido à grande variedade de parâmetros e métodos utilizados é difícil comparar os estudos entre si. O comprimento de onda da luz pode variar entre os 600 nm e os 1200 nm, diferentes lasers podem ser usados como o díodo GaAlAs ou LEDs, bem como variadas densidades de potência.

O objetivo do nosso estudo foi propor um conjunto de parâmetros ótimos de PBM para estimular os osteoblastos e, assim, potenciar a formação óssea no periodonto, acelerando o movimento ortodôntico. Para isso, comparamos os efeitos da irradiação com díodos de baixa intensidade (LEDs) com três comprimentos de onda e duas densidades de potência. Os resultados demonstram que, de uma forma geral, existem diferenças significativas no primeiro e no segundo *timepoint* (1 h e 24 h) destacando os grupos 655 nm a 10 mW/cm², 810nm a 5 mW/cm² e 940 nm a 5 mW/cm². No terceiro *timepoint* (72 h), não houve diferenças na viabilidade celular entre os grupos em estudo e o grupo de controle. Estes resultados indicam que apenas uma sessão de irradiação poderá não ser suficiente para induzir alterações significativas na atividade dos osteoblastos. De facto, após 3 dias da estimulação, os efeitos observados às 24 h não perduraram, sugerindo que os efeitos provocados pela irradiação são de curto prazo.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com relatos de diferentes estudos. Bölükbaşı Ateş *et al.*¹² relataram que embora tenha havido um aumento da viabilidade celular 24 h após a irradiação nos grupos de laser de 635 nm e 809 nm em comparação com o controle, não houve nenhuma diferença na viabilidade celular nos *timepoints* de 48 h ou 72 h após a irradiação para os mesmos comprimentos de onda. Incerti Parenti *et al.*¹⁵ relataram que com o comprimento de onda de 915 nm e com uma densidade de energia de 10 J/cm² obtiveram uma viabilidade celular significativamente maior do que o grupo controle. No entanto, todos os outros grupos, com tempos de exposição e densidades de energia diferentes, não obtiveram diferenças significativas quando comparadas com o grupo de controle.

Jawad *et al.*¹⁴ explorou comprimentos de onda na ordem dos 940 nm e, apesar de estimularem os osteoblastos todos os dias durante 7 dias, mostraram que houve um aumento significativo nas taxas de viabilidade celular de todos os grupos em relação ao

grupo de controle e ao longo do tempo. O dia 7 obteve os melhores resultados em todos os grupos. No futuro, uma estimulação diária e durante 7 dias dos osteoblastos com as condições estudadas neste trabalho poderá elucidar melhor os efeitos da irradiação (tempo e periodicidade) nos osteoblastos.

5- Conclusão

De acordo com os resultados apresentados, podemos concluir que o grupo que apresentou maior viabilidade celular nos *3 timepoints* foi a condição 810 nm a 5 mW/cm².

Podemos também verificar que, independentemente do comprimento de onda e da potência aplicada, após 1 h todos os grupos apresentaram maior viabilidade celular que o grupo de controle e após 24 h algumas condições apresentaram melhores resultados que o grupo controle. Não obstante, após 72 h nenhum grupo experimental apresenta melhores resultados que o grupo de controle. Os nossos resultados sugerem que os efeitos induzidos pela irradiação nos osteoblastos são rápidos e de curta duração e, para melhorar a otimização do protocolo, a estimulação deveria ser efetuada todos os dias durante alguns dias.

Para perceber melhor os efeitos provocados pela irradiação, outras análises deveriam ser efetuadas como estudar o efeito da irradiação na proliferação celular (por exemplo, contar células com o azul tripano e ver a evolução ao longo do tempo) e, também, na manutenção do fenótipo osteoblástico através da quantificação da expressão de marcadores osteoblásticos (por exemplo, fosfatase alcalina, RANKL e osteoprotegerina).

6- Referências Bibliográficas

1. Impellizzeri A, Horodyski M, Fusco R, Palaia G, Polimeni A, Romeo U, et al. Photobiomodulation therapy on orthodontic movement: Analysis of preliminary studies with a new protocol. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020 May 2;17(10).
2. Shaughnessy T, Kantarci A, Kau CH, Skrenes D, Skrenes S, Ma D. Intraoral photobiomodulation-induced orthodontic tooth alignment: A preliminary study. *BMC Oral Health*. 2016;16(1).
3. Jedliński M, Romeo U, del Vecchio A, Palaia G, Galluccio G. Comparison of the effects of photobiomodulation with different lasers on orthodontic movement and reduction of the treatment time with fixed appliances in novel scientific reports: A systematic review with meta-analysis. Vol. 38, *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. Mary Ann Liebert Inc.; 2020. p. 455–65.
4. Goymen M, Gulec A. Effect of photobiomodulation therapies on the root resorption associated with orthodontic forces: a pilot study using micro computed tomography. *Clinical Oral Investigations*. 2020 Apr 1;24(4):1431–8.
5. 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. Vol. 30, *Lasers in Medical Science*. Springer London; 2015. p. 1609–18.
6. Nimeri G, Kau CH, Corona R, Shelly J. The effect of photobiomodulation on root resorption during orthodontic treatment. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*. 2014 Jan 15;6:1–8.
7. Chaweewannakorn C, Santiwong P, Surarit R, Sritanaudomchai H, Chintavalakorn R. The effect of LED photobiomodulation on the proliferation and osteoblastic differentiation of periodontal ligament stem cells: in vitro. *Journal of the World Federation of Orthodontists*. 2021 Jun 1;10(2):79–85.
8. Almpanti K, Kantarci A. Nonsurgical Methods for the Acceleration of the Orthodontic Tooth Movement. *Frontiers of Oral Biology*. 2015;18:80–91.
9. Mergoni G, Vescovi P, Belletti S, Uggeri J, Nammour S, Gatti R. Effects of 915 nm laser irradiation on human osteoblasts: a preliminary in vitro study. *Lasers in Medical Science*. 2018 Aug 1;33(6):1189–95.
10. Huang TH, Lu YC, Kao CT. Low-level diode laser therapy reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced bone cell inflammation. *Lasers in Medical Science*. 2012 May;27(3):621–7.
11. Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells . *Journal of Biomedical Optics*. 2014 Oct 3;19(10):108002.
12. Bölükbaşı Ateş G, Ak Can A, Gülsoy M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. *Lasers in Medical Science*. 2017 Apr 1;32(3):591–9.
13. Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Abe T, Medina CC, Nakajima K, et al. Examination of the effect of the combined use of Nd:Yag laser irradiation and mechanical force loading on bone metabolism using cultured human osteoblasts. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2020;11(2):138–43.



14. Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro . *Journal of Biomedical Optics*. 2013 Dec 10;18(12):128001.
15. Incerti Parenti S, Tschon M, Sartori M, Visani A, Aroni E, Fini M, et al. Evidence from systematic reviews on photobiomodulation of human bone and stromal cells: Where do we stand? Vol. 685, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press Inc.; 2020.
16. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*. 2011;740:7–12.
17. 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>