



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CARLOS ALBERTO RECH

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A ADESÃO E
METABOLISMO DE OSTEOLASTOS, FIBROBLASTOS E
CÉLULAS EPITELIAIS SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO *IN VITRO***

RIBEIRÃO PRETO

2018

Carlos Alberto Rech

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO SOBRE A ADESÃO E
METABOLISMO DE OSTEÓBLASTOS, FIBROBLASTOS E
CÉLULAS EPITELIAIS SOBRE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO *IN VITRO***

Tese apresentada à Universidade de Ribeirão Preto
UNAERP como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor em Odontologia.

Orientadora : Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso
Co-orientadora: Profa. Dra. Yara T. C.a Silva Sousa

RIBEIRÃO PRETO
2018

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Rech, Carlos Alberto, 1974 -

Efeitos da Fotobiomodulação sobre a Adesão e Metabolismo de Osteoblastos,
Fibroblastos e células epiteliais sobre Superfícies de Titânio *in vitro*

Carlos Alberto Rech - Ribeirão Preto, 2018.
41 f.: il. color.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Gonçalves Basso.

Tese (doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, Odontologia,
área de concentração: Implantodontia. Ribeirão Preto, 2018.

Dedico este trabalho a meu pai Lino ,
minha mãe lara (*in memoriam*)
minha irmã Josiane
e minha namorada Daniela

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**.

À coordenadora do curso de pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação e empreendedorismo no desenvolvimento desse Doutorado Interinstitucional;

Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr – UNESP), onde todos os procedimentos experimentais foram realizados.

A minha Orientadora **Profa. Dra. Fernanda G. Basso**, pela orientação, pelo auxílio e prontidão inestimáveis para a realização e conclusão desse trabalho ;

À Profa. Dra. Erica Alves Gomes;

Ao Prof. Dr Fuad Jacob Abi Rached Jr.;

Ao Prof. Dr. Edson Alfredo;

A minha amiga **Thais Veiga**

Aos meus colegas do Curso de Doutorado;

Aos meus colegas de trabalho da IMED

RESUMO

A migração e adesão de osteoblastos bem como a síntese de matriz mineralizada são de suma importância para osseointegração dos implantes orais. Por sua vez, a formação de um selamento biológico efetivo é essencial para a longevidade deste tratamento e depende diretamente da adesão de células da mucosa oral à superfície dos componentes protéticos dos implantes (abutments). A fotobiomodulação tem sido usada com o intuito de melhorar a adesão e proliferação celular em regiões perimplantares. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da aplicação da fotobiomodulação utilizando laser de baixa intensidade (LBI) e diodos emissores de luz (LED) sobre células dos tecidos ósseo e mucoso cultivadas sobre discos de titânio usinado (Ti). Foram utilizadas linhagens celulares humanas de osteoblastos (SaOs-2), fibroblastos (HGF) e células epiteliais (NOK). Estas células foram cultivadas sobre os discos de Ti na densidade de 5×10^4 células/disco mantidas em meio de cultura (DMEM) suplementado com solução antibiotica/antimicótica e 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio livre de SFB e as células foram submetidas às irradiações. Foram realizadas 3 (três) irradiações, com intervalos de 24 horas, na densidade de energia de 3 J/cm^2 , com área de irradiação de 2 cm^2 e distância de 2,5cm, utilizando dispositivos especialmente desenvolvidos para cultura de células. Para a LBI, foi utilizado o dispositivo LaserTABLE, no comprimento de onda de 780nm e irradiância de 25mW, enquanto para a luz de LED, o dispositivo LEDTABLE foi aplicado, nos parâmetros de 810nm, 20mW. Após as irradiações, foi determinado o número de células aderidas ao substrato de Ti e espreadimento, por meio de fluorescência direta. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de Alamar Blue e também foram avaliadas a síntese de proteína total e de colágeno, bem como atividade de fosfatase alcalina (ALP) pelos osteoblastos. Os dados foram submetidos à análise estatística pelos testes de ANOVA One Way complementado por Tukey, com nível de significância de 5%. A adesão das células epiteliais foi significativamente afetada pela fototerapia, enquanto para as outras células esta adesão não foi significativamente afetada. A viabilidade também foi positivamente influenciada pelo LBI e LED, bem como a síntese de proteína total e colágeno, de forma distinta para cada tipo celular. A atividade de ALP foi estimulada apenas para o grupo submetido a LBI. Desta forma, a aplicação da fototerapia pode resultar em melhora nas funções celulares relacionadas ao processo de reparo peri-implantar.

Palavras-chave: Osteoblastos. Fibroblastos. Células Epiteliais. Laserterapia de Baixa Intensidade. LED

ABSTRACT

Osteoblast migration and adhesion, as well as synthesis of mineralized matrix are of great importance for osseointegration of dental implants. For its turn, the formation of an effective biological sealing is essential for the longevity of this treatment, directly depending on the adhesion of oral mucosa cells to the prosthetic components of implants (abutments). Phototherapy has been used aiming at enhance cellular adhesion and proliferation in peri-implant regions. This study aimed to assess the influence of low-level laser therapy (LLLT) and LED over an in vitro implant model, by means of adhesion and metabolism of fibroblasts, osteoblasts and epithelial cells on titanium surfaces. Osteoblast SaOs-2 cells, fibroblast (HGF) and keratinocytes (NOK) were used. Cells were maintained in culture medium (DMEM), supplemented by antibiotic/antimycotic solution and 10% fetal bovine serum. After 24 hours, culture medium was replaced by FBS-free DMEM. Three irradiations were performed at energy density of $3\text{J}/\text{cm}^2$ at each 24 hours.. For LLLT, LASERTABLE device was used with a wavelength of 780nm and 25mW, while for LED a LEDTABLE device was used with parameters of 810nm, 20mW, at a density of $3\text{J}/\text{cm}^2$. After irradiations, the number of adhered cells to substrate (Ti) and spreading was determined by means of direct fluorescence. Cell viability was determined by Alamar Blue assay and total protein and collagen synthesis were also evaluated as also ALP activity by osteoblasts. Data were submitted to ANOVA complemented by Turkey statistical tests at a 5% significance level. Adherence of epithelial cells was significantly affected by phototherapy, while no significant effect was observed for the other cell lines. Cell viability was also positively affected by LLLT and LED, as also protein and collagen synthesis, in distinct patterns according to each cell line. Alkaline phosphatase (ALP) activity was higher only for LLLT group. Therefore, phototherapy may result in enhancement of cellular functions related to peri-implant repair.

Key-words: Osteoblast. Fibroblast. Epithelial cells. Low-Level Laser Therapy. LED.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	08
2.	PROPOSIÇÃO	13
	2.1 OBJETIVO GERAL	13
	2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	14
	3.1 DISCOS DE TITÂNIO	14
	3.2 CULTURA DE CÉLULAS	15
	3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
	3.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ADERIDAS	20
	3.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	20
	3.6 ANÁLISE DA SÍNTESE DE PROTEINA TOTAL	20
	3.7 ANÁLISE DA SÍNTESE DE COLÁGENO	21
	3.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA	22
	3.9 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	23
4.	RESULTADOS	24
	4.1 ANÁLISE DA RUGOSIDADE DOS DISCOS	24
	4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ADERIDAS	24
	4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	31
	4.4 ANÁLISE DA SÍNTESE DE PROTEINA TOTAL	33
	4.5 ANÁLISE DA SÍNTESE DE COLÁGENO	35
	4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA	36
5.	DISCUSSÃO	38
6.	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da instalação dos implantes osseointegrados orais está diretamente relacionado com a obtenção de uma conexão estável entre a superfície dos implantes e os tecidos peri-implantares (EISENBARTH et al., 1996; FRANCHI et al., 2005; JOOS et al., 2006). Esta fixação é obtida a partir da formação de tecido ósseo ao redor do implante (osseointegração), que garante a estabilidade e funcionalidade deste procedimento reabilitador, bem como dos tecidos moles circundantes (KHADRA et al., 2005; CONSOLARO et al., 2010; SALVI et al., 2015; AYUKAWA et al., 2016; ESFAHANIZADEH et al., 2016).

Este processo se inicia a partir da obtenção da hemostasia primária, por meio da formação de um coágulo e tecido de granulação peri-implantares, seguido da migração e adesão de osteoblastos para a superfície do implante (KASEMO e GOLD, 1999). Então, estas células iniciam a formação de uma matriz colágena e sua mineralização, que culminarão na formação de um tecido ósseo maduro em aproximadamente 10 semanas (BERGLUNDH et al., 2003; MEYER et al., 2004; COLNOT et al., 2007).

A aceleração da migração e metabolismo das células osteoblásticas aderidas a superfície dos implantes pode resultar também na obtenção de estabilidade implantar mais precoce, o que resulta em melhor prognóstico para os implantes osseointegrados.

Diversas estratégias tem sido propostas para obter maior adesão e metabolismo destas células como alterações de superfície dos componentes dos implantes, aplicação de fatores de crescimento e outras moléculas bioativas e a aplicação da fotobiomodulação utilizando laserterapia de baixa intensidade (LBI) e diodos emissores de luz (LED) (BOLDRINI et al., 2013).

Os benefícios da fotobiomodulação são demonstrados deste a década de 1960, quando Mester et al. (1968) demonstraram um aumento de síntese de colágeno em feridas. Desde então, a LBI tem apresentado efeitos positivos em diferentes células e tecidos, como osteoblastos e fibroblastos, demonstrando aumento da proliferação, expressão gênica e síntese protéica destas células. Esta terapia não é invasiva e apresenta capacidade de penetração tecidual, que é diretamente proporcional ao comprimento de onda utilizado. Porém, seus efeitos estão diretamente relacionados aos parâmetros utilizados, que além do comprimento de onda somam-se densidade de energia aplicada, área irradiada, distância do tecido e potência.

Já os LEDs foram aplicados na fotobiomodulação tecidual a partir dos anos 1990 e se mostram como uma alternativa com menor custo (MESTER et al. 1968; CERNAVIA et

al., 1994; WALSH 1997; YEH, WU, CHENG, 2010). Contudo, esta modalidade apresenta menor capacidade de penetração tecidual e, apesar de apresentarem princípios semelhantes, estas terapias podem apresentar efeitos distintos sobre os tecidos.

Na Implantodontia, os estudos envolvendo a fotobiomodulação tem apresentado enfoque principalmente na bioestimulação da proliferação e metabolismo de células ósseas, através do uso da LBI e LEDs, o que auxiliaria no processo de osseointegração KHADRA et al., 2005b; LINS et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012; MARISCAL ,2013; MAYER et al., 2015; ESFAHANIZADEH et al., 2016 ;BOSSHARDT et al. 2017).

Porém, ainda não há um consenso sobre os parâmetros desta modalidade terapêutica, já que, como descrito anteriormente, a alteração de apenas um parâmetro da irradiação pode resultar em efeito totalmente distinto. Um estudo realizado por Maior, 2014 com aplicação de LBI (GaAIs) com comprimento de onda de 830 nm e densidade de 2 J/cm² sobre culturas osteogênicas demonstrou aumento da proliferação destas células. Por outro lado, a mesma aplicação da LBI (GaAIs), porém no comprimento de onda de 915 nm e com mesma densidade de energia (2J/cm²) sobre osteoblastos humanos não apresentou resultados significativos sobre a viabilidade e proliferação destas células (PARENTI et al., 2013). Outro estudo, sobre células de linhagem osteoblástica humana (SaOs-2) foram submetidas a irradiação de laser diodo (GaAIs) com comprimento de onda de 915 nm, mas com densidades de energia de 0, 5, 10, and 15 J/cm². A LBI promoveu maior expressão gênica de colágeno tipo I e menor tempo de cicatrização através do estímulo de migração celular e deposição de colágeno pelos osteoblastos (TSCHON et al., 2015). Adicionalmente, a utilização da LBI no com comprimento de onda de 808 nm, irradiância de 50 mW e densidade de 11 J/cm² afetou positivamente as características do tecido ósseo, favorecendo a osseointegração (BOLDRINI et al., 2013).

Outro fator muito importante na avaliação da resposta celular frente a um determinado tratamento é a utilização de modelos experimentais adequados, que simulem da melhor forma as características teciduais. Já foi demonstrado que o tipo de substrato utilizado durante os estudos in vitro alteram significativamente a resposta celular (REF). Assim, desde 1996 foi demonstrado que a utilização de substratos que se assemelhem àquele utilizado durante a instalação dos implantes osseointegrados resultam em resultados mais confiáveis sobre a adesão e o metabolismo celular. Desta forma, a utilização de substratos de titânio, sendo este o material mais utilizado para a confecção de parafusos de implantes osseointegrados é de extrema relevância para os estudos que avaliam os efeitos da fotobiomodulação na resposta celular. Dito isto, é importante ressaltar

que muitos estudos anteriores não utilizaram este modelo experimental e, portanto, a grande diversidade de resultados também pode estar relacionada a este fator.

Estudos *in vivo* demonstraram que a aplicação da fotobiomodulação com LBI sobre a interface óssea após a instalação de implantes osseointegrados resultou em melhor organização lamelar na interface periimplantar, o que sugere que a LBI poderia ter um efeito positivo na maturação do osso durante o período de osseointegração (TORRES e TEIXEIRA, 2008; PETRI, 2010; ESFAHANIZADEH et al., 2016; BOSSHARDT et al., 2017).

O potencial ósseo para regeneração depende do suprimento vascular amplo, pois os osteoblastos exercem suas atividades apenas nas proximidades de vasos sanguíneos, e a simples redução do oxigênio para essas células pode direcionar fenotipicamente à formação de tecido fibroso ou fibrocartilaginoso. A formação de canais de Havers maiores no osso permitiria maior vascularização sanguínea, melhorando o potencial de regeneração e maturação óssea. Este aumento do suprimento vascular causado pela irradiação laser foi confirmado em tempo real num experimento em humanos num delineamento randomizado, duplo-cego, placebo- controlado, numa profundidade de 8mm do ponto de irradiação (BANZER et al., 2006). Um estudo *in vivo* não apresentou alterações significativas na neovascularização local para os grupos submetidos à irradiação com LBI. Porém, um aumento do número de fibroblastos foi observado no tecido perimplantar. (ATASOY et al., 2017).

A fosfatase alcalina (ALP) participa ativamente do processo de mineralização da matriz óssea, sendo então muito importante para o processo de osseointegração. No que tange a estudos comparando LBI e LED, apresentaram-se resultados positivos sobre a atividade de fosfatase alcalina por osteoblastos (PAGIN et al., 2014). E outros estudos também demonstram um aumento na proliferação e migração de osteoblastos após o uso de LBI e LED (WHELAN et al, 2001; YANAMOTO et al.; 2001; PIRES OLIVEIRA,, 2008; GRASSI et al., 2011; HUERTAS et al., 2014; GINANI et al., 2015; KUNIMATSU et al., 2018. Discordante deste pensamento, no entanto, SCHWARTZ-FILHO et al., 2011).

O efeito da fotobiomodulação sobre a atividade de ALP por osteoblastos murinos (MC3T3) utilizando LED e LBI nas densidades de energia de 3 e 5 J/cm² também foi avaliado, sendo demonstrado que esta atividade não foi influenciada pela aplicação das distintas modalidades (PAGIN et al., 2014). Outro estudo, utilizando LBI (InGalp – 660nm e AIAIAs – 780nm) em parâmetros distintos (20mW, 1.9J/cm² or 3.8J/cm²), no entanto, demonstraram que as células MC3T3 irradiadas apresentaram maior atividade de ALP (OLIVEIRA et al. 2017).

Além do processo de integração com o tecido ósseo, a formação de um selamento biológico, a partir da íntima relação dos tecidos mucosos orais com os componentes protéticos do implante também é de suma importância para o sucesso deste tratamento . Este selamento tem o objetivo de reduzir a colonização bacteriana na região peri-implantar, reduzindo assim, a incidência de peri-implantites, que resulta na diminuição da longevidade do tratamento com implantes osseointegráveis.

O selamento biológico atua não só como uma barreira física, mas também como uma barreira imunológica contra os patógenos envolvidos no desenvolvimento da peri-implantite. Desta forma, a obtenção deste selamento deve ser a mais precoce possível.

A formação deste selamento é diretamente relacionada a adesão das células do tecido epitelial e conjuntivo à superfície do componente protético denominado pilar ou “abutment”. Tendo essa idéia em mente, a fotobiomodulação também tem sido estudada e empregada com o propósito de estimular a proliferação e metabolismo das células desses tecidos (KHADRA et al., 2005a ; KHADRA et al., 2005b; CONSOLARO et al., 2010; LINS et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012; MARISCAL ,2013; MAYER et al., 2015; SALVI et al., 2015; AYUKAWA et al., 2016; ESFAHANIZADEH et al., 2016 ;BOSSHARDT et al. 2017; BASSO et al., 2018).

Assim, com relação a irradiação dos tecidos mucosos peri-implantares, de forma geral, estudos *in vitro* têm demonstrado que a aplicação de fototerapia no comprimento de onda de espectro vermelho (665 – 780nm) tem apresentado efeitos positivos na estimulação da proliferação de fibroblastos e células epiteliais (KREISLER et al, 2003; MARQUES et al, 2004; MOORE et al., 2005, KHADRA et al., 2005a; PAGIN et al., 2014). Constatação contrária foi observada quando uma irradiação com comprimento de onda de 410nm foi usada sobre fibroblastos de quelóide humano, mostrando uma menor expressão do colágeno tipo I (LEE,et al., 2017).

Em relação à aplicação de LED, constatou-se que este pode influenciar a adesão, diferenciação e proliferação dos fibroblastos gengivais humanos, através da estimulação do gene de elastina (RONCATI et al., 2016).

Observou-se também que doses muito baixas não promovem efeitos biológicos, enquanto densidades elevadas inibem as funções celulares (SOMMER et al., 2001; TEUSCH, 2015; BASSO et al, 2016). Contudo, se comparadas pequenas e altas densidades de energia, as primeiras levam a melhores efeitos de cicatrização comparadas às segundas (PELLICIOLI et al., 2014).

Os efeitos da fototerapia sobre estes tecidos tem sido relacionados a um aumento da capacidade mitogênica, bem como da expressão de moléculas da matriz extracelular e

fatores de crescimento. Além disso, a irradiação de células da mucosa oral com LBI e LED tem resultado em diminuição da expressão e síntese de citocinas inflamatórias (LINS, 2010; CHAVES et al., 2014; ALMEIDA, 2015). A terapia com laser de baixa potência exerce efeitos anti-inflamatórios importantes nos processos iniciais da cicatrização: redução de mediadores químicos, de citocinas, do edema, diminuição da migração de células inflamatórias e incremento de fatores de crescimento, contribuindo diretamente para o processo de reabilitação tecidual (LINS et al., 2010; PIVA et al., 2011).

Assim, ratifica-se que o sucesso dos tratamentos com implantes osseointegráveis depende, intimamente do processo de cicatrização e do potencial de células osteogênicas em induzir a formação de uma nova matriz óssea, bem como de um adequado selamento biológico dos tecidos mucosos, a partir da proliferação de osteoblastos, fibroblastos e células epiteliais (KHADRA et al., 2005). E, tanto irradiações com LBI e LED têm sido recorrentemente testadas no intuito de influenciar positivamente nessa proliferação (DÖRTBUDAK et al., 2002; MOORE et al., 2005; PAGIN et al., 2014; MAIOR, 2014; MAYER et al., 2015). Khadra (2004) em estudo *in vivo*, utilizando coelhos, demonstrou que implantes irradiados tem melhor selamento que implantes não irradiados (KHADRA et al., 2004).

A importância do presente estudo é justificada pela possível aceleração do reparo e secamente peri-implantar principalmente em pacientes sistemicamente comprometidos como diabéticos ou que apresentem osteoporose.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fotobiomodulação, utilizando-se LBI e LED no metabolismo de células envolvidas no processo de osseointegração e formação de selamento biológico, em modelo *in vitro*.

2.2 Objetivo específico

Determinar o efeito da LBI (com comprimento de onda de 780nm, irradiância de 25mW e densidade de energia de 3 J/cm²) e LED (nos parâmetros de 810nm, 20mW, também com densidade de 3J/cm²) sobre a adesão e viabilidade celular, bem como a síntese de proteína total, síntese de colágeno e atividade de fosfatase alcalina (ALP) de osteoblastos, fibroblastos e células epiteliais cultivados sobre discos de titânio usinado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DISCOS DE TITÂNIO

Foram obtidos 72 discos de titânio usinados (Realum, São Paulo, SP, Brasil) a partir de cilindros de titânio comercialmente puro, com 13mm de diâmetro e 1,5mm de espessura. Todos os discos foram lixados com lixas d'água de granulações de 400, 600 e 1200, para obtenção de rugosidade superficial padronizada (Figura 1).

Para cada tipo celular, foram utilizados 24 discos, que foram utilizados para a análise da adesão (n=4), viabilidade (n=6), síntese de proteína total e de colágeno (n=6) e atividade de ALP para os osteoblastos (n=6).

Figura 1. Discos de titânio usinado, comercialmente puro (13mmx 1,5mm)



Fonte: Autor

3.1.1 LIMPEZA DOS DISCOS

Para remover qualquer material orgânico aderido à superfície, os discos foram submetidos a limpeza em ultrassom, de acordo com o seguinte protocolo:

- 1) Imersão por 30 minutos em acetona;
- 2) Imersão por 30 minutos em água destilada;
- 3) Imersão por 30 minutos em etanol 100%;
- 4) Imersão por 30 minutos em água destilada;

Após limpeza, os discos foram esterilizados em autoclave específica para esse fim.

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas linhagens celulares de osteoblastos humanos (SaOs-2) (American Types of Cell Culture – ATCC # HTB85), fibroblastos de gengiva humana (HGF) (CAAE #) e células epiteliais de gengiva (NOK – Cellosaurus Cell Line – CVCL # BW57). Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco), contendo solução antibiótica/antimicótica (10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de amfotericina B - Gibco) e suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37°C.

3.2.1 OSTEOLASTOS

Para a realização dos experimentos foi utilizada uma cultura imortalizada de osteoblastos humanos (SaOs-2 – ATCC #HTB85). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, até o momento do experimento. Os subcultivos celulares foram realizados utilizando tripsina/EDTA 0,25% (Gibco).

3.2.2 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos de gengiva foram obtidos de pacientes jovens e saudáveis, não-fumantes após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP (CAAE #1432113.7.0000.5416). Após obtenção do fragmento de tecido gengiva, este foi levado ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, onde as células foram isoladas por meio da técnica de digestão enzimática.

Para tanto, o fragmento de tecido foi incubado em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB - Gibco), contendo 3mg/mL de collagenase tipo I (3 mg/ml; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) por 24 horas. Após este período, os fragmentos celulares foram transferidos para um tubo estéril e centrifugados. A seguir, estes fragmentos foram resuspenso em meio de cultura contendo 10% de SFB e transferidos para um frasco de cultura celular de 25cm², até a obtenção de confluência de 80%. Os procedimentos de subcultivo celular foram realizados utilizando tripsina 0,25% (Gibco).

Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB até o momento da realização dos experimentos.

3.2.3 CÉLULAS EPITELIAIS

As células epiteliais (NOK - CVCL # BW57) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Gibco) contendo solução antibiótica e 10% de SFB até o momento da realização dos experimentos. Os procedimentos de subcultivo desta linhagem foram realizados também com tripsina 0,25% (Gibco).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização do experimento, após a esterilização, os discos foram posicionados no fundo de placas de 24 compartimentos (Figura 2).

Figura 2. Esquema representativo dos discos de Ti posicionados em placas de 24 compartimentos, contendo meio de cultura DMEM.



Fonte: Autor

A seguir, as células (osteoblastos, fibroblastos e células epiteliais) foram cultivadas isoladamente sobre discos de Ti usinados, previamente posicionados em placas de 24 compartimentos, na densidade de 5×10^4 células por disco. Foram estabelecidos os grupos experimentais descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais estabelecidos para cada linhagem celular

Grupo	Tratamento
Controle	-
LBI	LBI (LaserTABLE) Comprimento de onda: 780 nm Irradiação contínua Irradiância: 25 mW/cm ² Densidade de energia: 3 J/cm ² Área: 2 cm ² Distância: 2,5 cm
LED	LED (LEDTABLE) Comprimento de onda: 810 nm Irradiação contínua Irradiância: 20 mW/cm ² Densidade de energia: 3 J/cm ² Área: 2 cm ² Distância: 2,5 cm

Fonte: Autor

Após 24h, tendo-se divididos os grupos, o meio de cultura foi substituído por meio livre de SFB e as células, submetidas a irradiações com diodos de laser e LED, por meio de protótipos especificamente delineados para estudos *in vitro*.

Foram realizadas 3 (três) irradiações, a cada 24h, na densidade de energia de 3J/cm². As irradiações foram feitas em compartimentos alternadas nas placas para que não houvesse influência da irradiação de uma célula para outra. Para LBI, foi utilizado um dispositivo LaserTABLE com laser tipo InGaAsP, com comprimento de onda de 780nm e

irradiância de 25mW , enquanto a luz de LED foi realizada com um dispositivo LEDTABLE nos parâmetros de 810nm, 20mW, também com densidade de 3J/cm².

Após 24h da última irradiação, totalizando 5 dias de cultura, foram realizadas as análises descritas a seguir (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do delineamento experimental seguido durante a realização do estudo.



Fonte: Autor

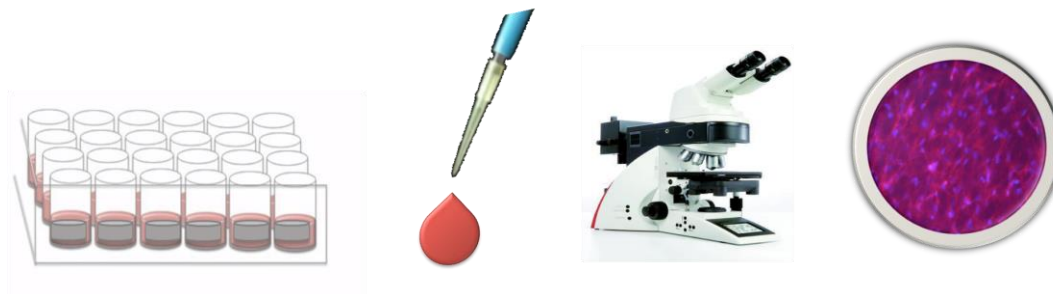
3.4 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ADERIDAS

Para avaliar o número e o espreadimento das células sobre os discos de titânio, as amostras foram submetidas à fluorescência direta, utilizando um marcador do citoesqueleto celular. As amostras foram então fixadas em paraformaldeído 4% por 8 horas a 4°C. A seguir, foram submetidas a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) 1x e permeabilização com triton x-100 0,1% em PBS (Sigma-Aldrich) por 15 minutos. Após lavagem em PBS, as amostras foram tratadas com faloidina (1:200, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA) por 30 minutos.

O número de células que permaneceram aderidas foi determinado por meio da marcação nuclear com um intercalante de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Hoescht, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Após o contato com o marcador fluorescente, a marcação nuclear foi realizada com o reagente na concentração 1:5000 em PBS por 15 minutos. As amostras foram então avaliadas em microscópio invertido acoplado à

fluorescência (EVOS) (Figura 4). Foram obtidas 5 fotomicrografias de cada amostra, que foram submetidas a análise em software ImageJ.

Figura 4. Representação esquemática do protocolo de fluorescência direta



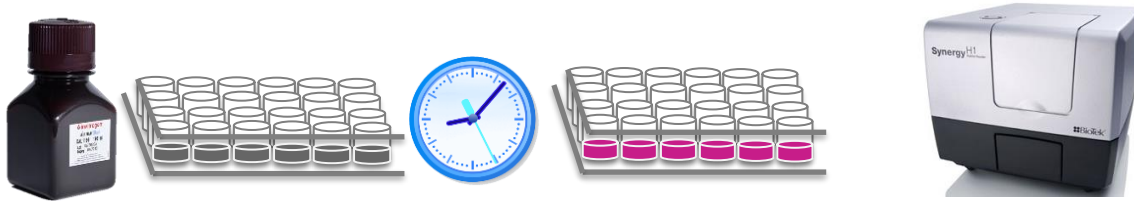
Fonte: Autor

3.5 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada por meio do reagente Alamar Blue (Invitrogen), o qual se baseia na incorporação de um indicador de oxirredução que apresenta alteração de cor em resposta a redução química do meio de cultura em decorrência da respiração aeróbica das células. Sobre as células cultivadas nos discos de Ti, foram adicionados 900 μL de meio de cultura (DMEM) sem soro fetal bovino associado a 100 μL de solução Alamar Blue. As células foram incubadas por 4 horas (37°C e 5% de CO_2). Após este período, 2 alíquotas de 100 μL foram obtidas de cada compartimento e então transferidas para uma placa de 96 compartimentos. A fluorescência das amostras foi determinada em fluorímetro (Synergy – H1 – Biotek Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 570 e 600 nm (Figura 5).

Os dados foram expressos em porcentagem. A média dos resultados obtidos para o grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade, sendo os outros grupos experimentais expressos em função deste grupo.

Figura 5. Representação esquemática do protocolo de Alamar Blue, para determinação da viabilidade das células em cultura, após os tratamentos propostos.

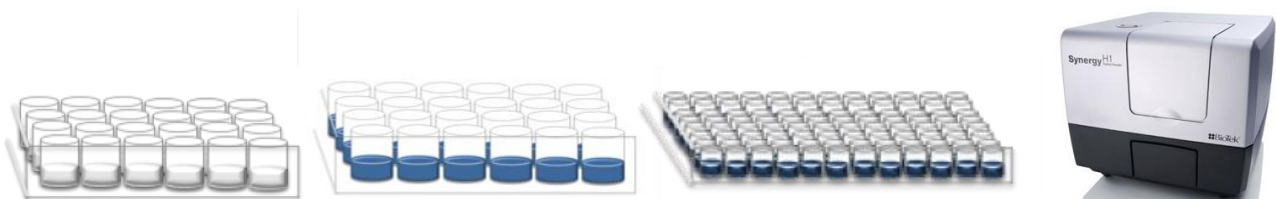


Fonte: Autor

3.6 ANÁLISE DA SÍNTESE DE PROTEÍNA TOTAL

A produção de proteína total foi determinada pelo método de Lowry, conforme metodologia previamente descrita (BASSO et al., 2013a). Após os tratamentos propostos, as células foram lisadas em Lauril sulfato de sódio 1% por 40 minutos, a temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 1mL de Lowry Reagent (Sigma-Aldrich), seguido de incubação por 20 minutos e adição do Reagente de Folin & Ciocautel's (Sigma-Aldrich). Após 30 minutos, a concentração de proteínas de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro a 655 nm (Synergy H1– Biotek), de acordo com uma curva padrão com concentrações pré-determinadas de albumina (Figura6). Os dados de síntese de proteína total fo-ram expressos em porcentagem. A média dos resultados obtidos para o grupo controle foi considerada como 100% de síntese, sendo os outros grupos experimentais expressos em função deste grupo.

Figura 6 Representação esquemática do protocolo síntese de proteína total.

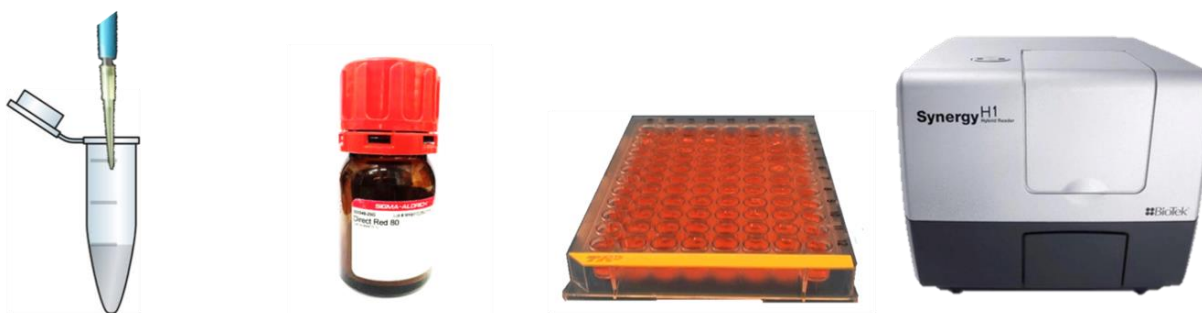


Fonte: Autor

3.7 ANÁLISE DA SÍNTESE DE COLÁGENO

A síntese de colágeno total foi determinada pelo método colorimétrico de Sirius Red (ORRISS et al., 2009), sem, contudo, diferenciar o tipo de colágeno. Para tanto, após 24 horas da última irradiação, o meio de cultura de cada amostra foi coletado e armazenado a -20°C . Para a realização da metodologia, alíquotas de $400\ \mu\text{L}$ foram adicionadas a tubos de $1,5\ \text{mL}$, juntamente com $400\ \mu\text{L}$ da solução de Direct Red 0,1% (Sigma-Aldrich). A seguir, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente, sob agitação a $400\ \text{rpm}$. Após esta incubação, as amostras foram centrifugadas ($12000\ \text{rpm}$, 10 minutos). O material sobrenadante foi descartado e a fração precipitada (“pellet”) foi lavada com $800\ \mu\text{L}$ ácido clorídrico ($\text{HCl} - 0,1\ \text{M}$), seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Finalmente, o pellet foi re-suspendido em $300\ \mu\text{L}$ hidróxido de sódio ($\text{NaOH} - 0,5\ \text{M}$) até obtenção de solução homogênea. Duas alíquotas de $100\ \mu\text{L}$ de cada amostra foram, então, transferidas para uma placa de 96 compartimentos e analisadas em espectrofotômetro a $555\ \text{nm}$ (Synergy H1 – Biotek). (Figura 7). Os dados foram expressos em porcentagem. A média dos resultados obtidos para o grupo controle foi considerada como 100% de síntese de colágeno, sendo os outros grupos experimentais expressos em função deste grupo.

Figura 7. Representação esquemática do protocolo de síntese de colágeno



Fonte: Autor

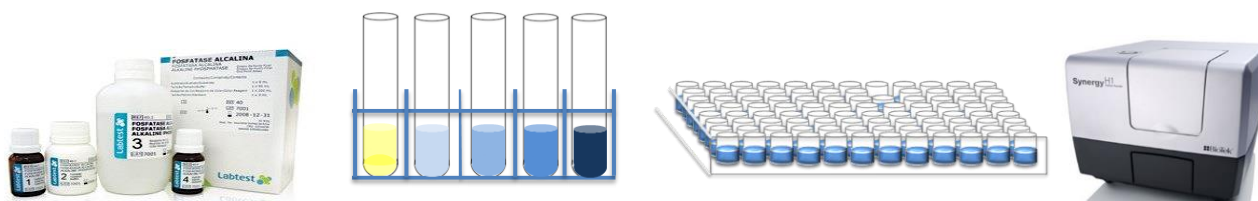
3.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP)

A análise foi realizada utilizando o Kit de Fosfatase Alcalina (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). As amostras foram lisadas em lauril sulfato de sódio 0,1% por 40 minutos. Tubos individuais preparados contendo $500\ \mu\text{L}$ de tampão e $50\ \mu\text{L}$ de substrato foram incubados a 37°C por 2 minutos, conforme recomendação do fabricante. A seguir, uma alíquota de $50\ \mu\text{L}$ de cada amostra foi adicionada ao tubo correspondente e as

mesmas foram incubadas por mais 10 minutos. Após este período, se adicionou o reagente de cor, e alíquotas de 200 μ L de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 compartimentos e analisadas em espectrofotômetro a 590nm (Synergy H1– Biotek) (Figura 8). A atividade de ALP foi determinada por meio de curva padrão com concentrações conhecidas da enzima (BASSO et al., 2013b). Os resultados de atividade de ALP foram normalizados pela síntese de proteína total de cada amostra.

Os dados foram expressos em porcentagem. A média dos resultados obtidos para o grupo controle foi considerada como 100% de atividade de ALP, sendo os outros grupos experimentais expressos em função deste grupo.

Figura 8 Representação esquemática do protocolo de atividade de ALP.



Fonte: Autor

3.9 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Observados parâmetros de normalidade, foram aplicados testes estatísticos paramétricos one-way ANOVA One Way, complementado por Tukey, com inferências estatísticas considerando nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DA RUGOSIDADE DOS DISCOS

A análise da rugosidade dos discos de titânio mostrou uma média de 0,3 μm .

4.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS ADERIDAS

A análise qualitativa da adesão dos osteoblastos ao substrato de titânio revelou que não houve diferença significativa na distribuição celular para os diferentes tratamentos, porém, quando as células foram irradiadas com LBI, menor marcação dos filamentos de actina foi observada, demonstrando menor espreadimento celular (Figura 9).

Por meio da análise quantitativa do número de células aderidas também foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à adesão de osteoblastos ao substrato entre os três grupos experimentais : controle (C), laser de baixa intensidade (LBI) e luz emitida por diodo (LED) (Figura 10) .

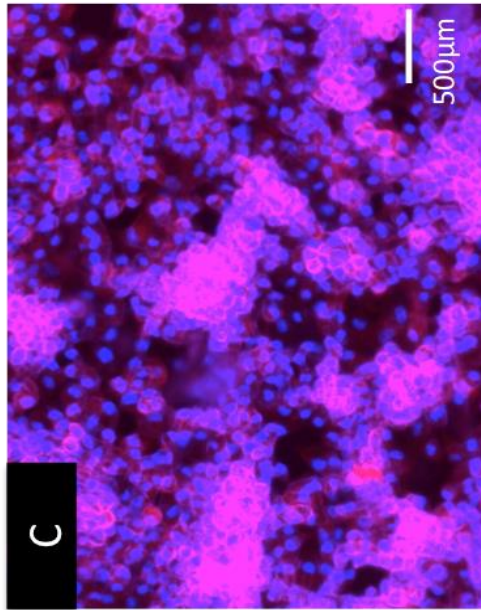
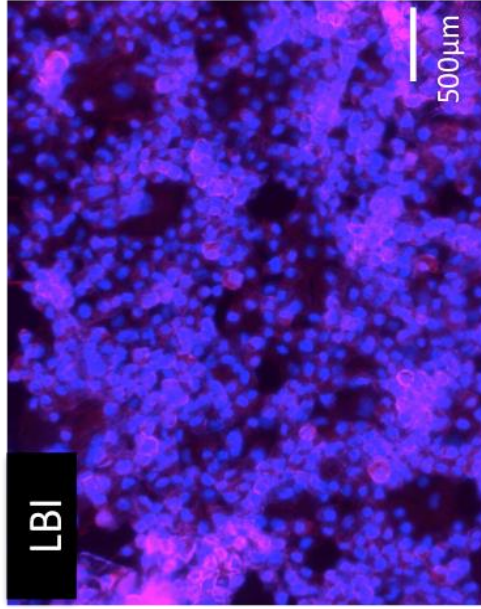
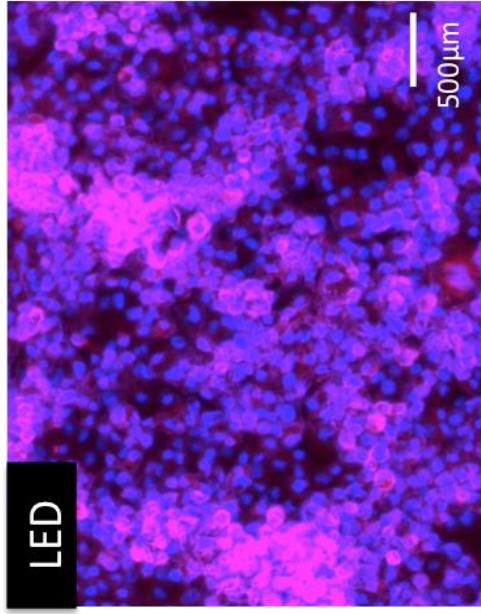
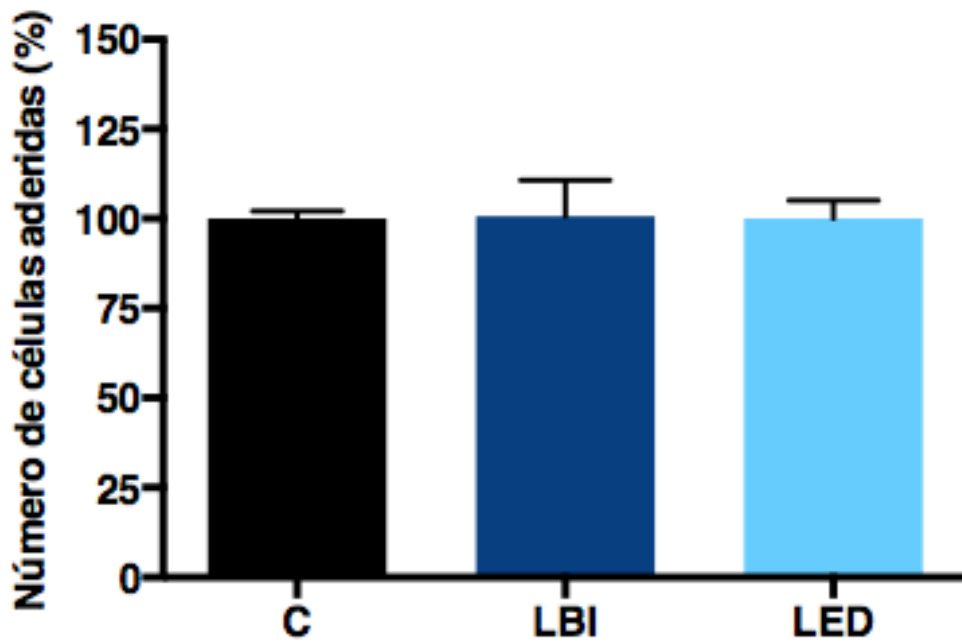


Figura 10. Análise quantitativa do número de células aderidas (osteoblastos) à superfície de Ti após os tratamentos propostos.



Fonte: Autor

Em relação à adesão de fibroblastos, as análises qualitativa e quantitativa não demonstraram diferença entre os grupos experimentais e o grupo controle (Figuras 11 e 12).

Figura12. Análise da adesão dos fibroblastos, por meio de fluorescência direta (x 20)

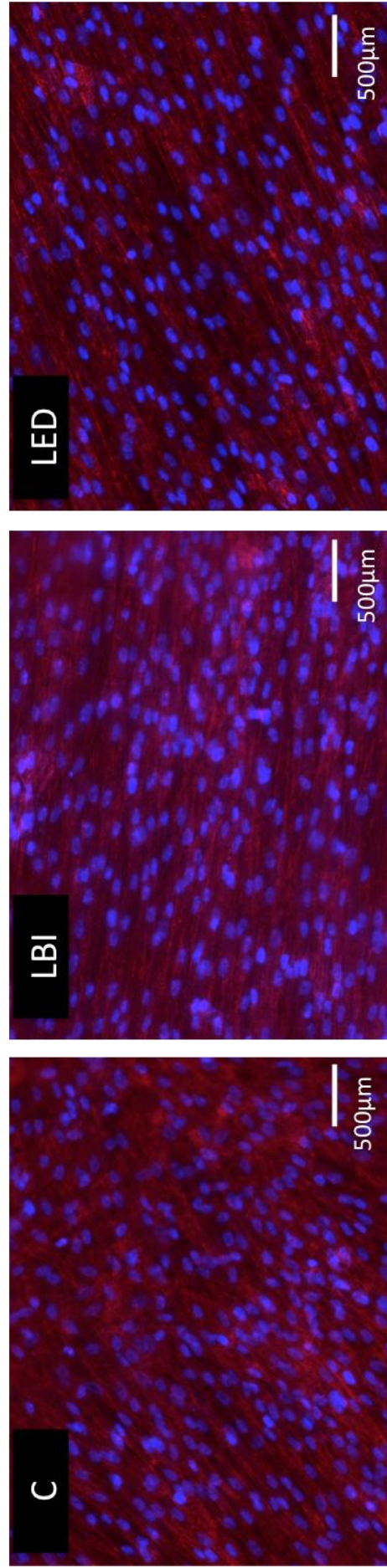
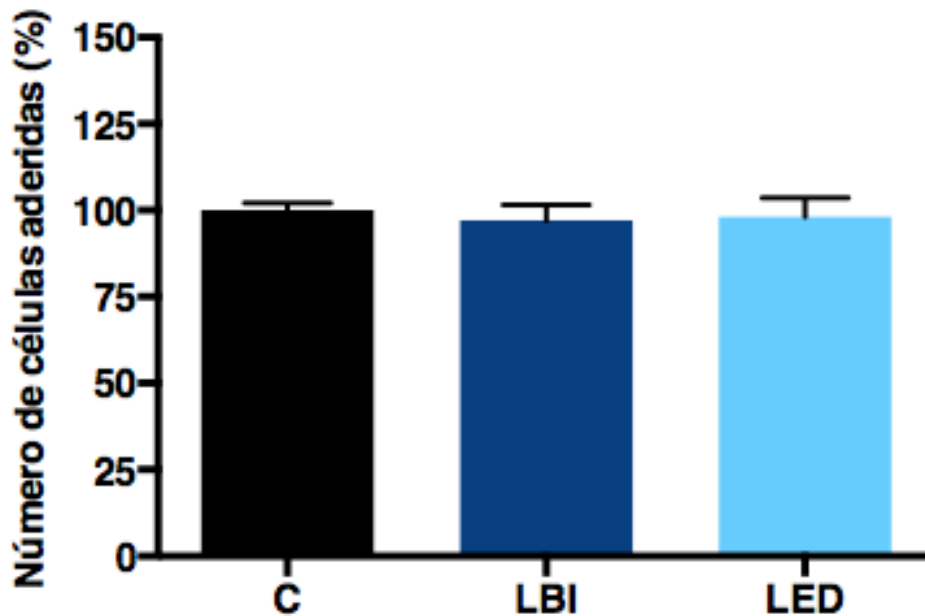


Figura 12. Análise quantitativa do número de células aderidas (fibroblastos) à superfície de Ti após os tratamentos propostos. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Em relação às células epiteliais, houve um aumento significativo nos grupos LBI e LED quando comparados ao grupo controle (C), no entanto, sem diferença significativa entre os grupos LBI e LED (Figuras 13 e 14)

Figura 14. Análise da adesão das células epiteliais por meio de fluorescência direta (x 20)

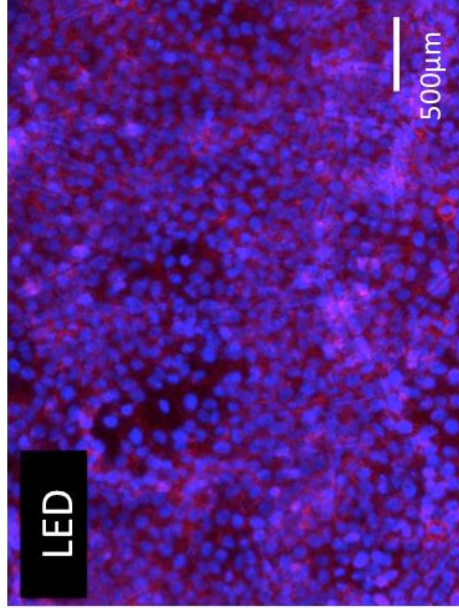
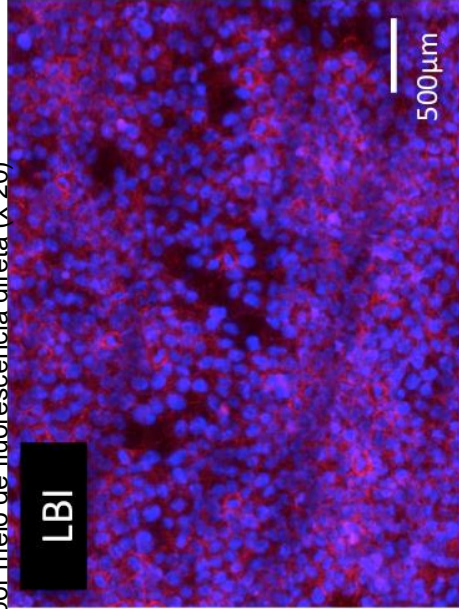
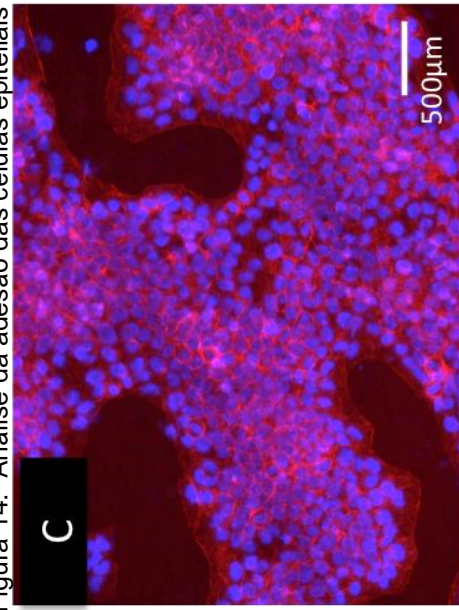
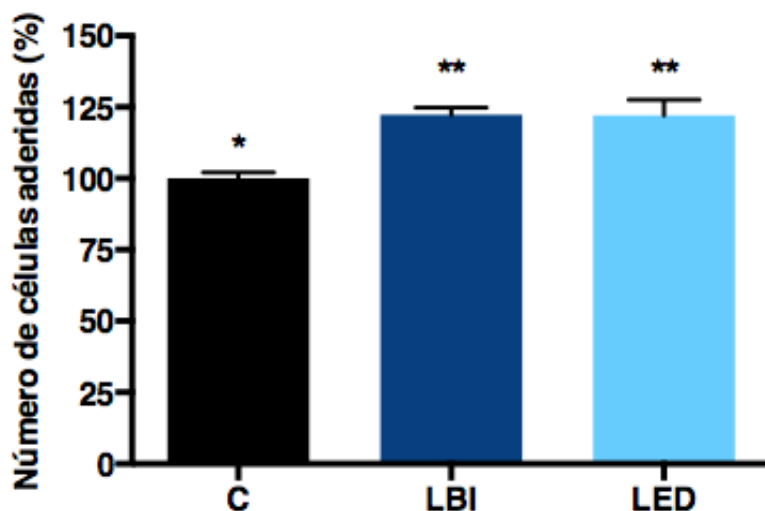


Figura 14. Análise quantitativa do número de células aderidas ((células epiteliais) à superfície de Ti após os tratamentos propostos. Grupos identificados com símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

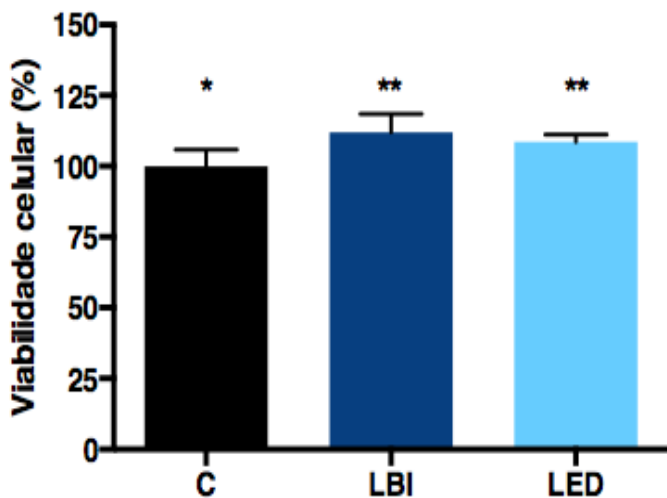
4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Em relação à viabilidade celular pode-se constatar aumento significativo de viabilidade de osteoblastos quando as células foram tratadas com LBI e LED (Figura 15).

Quanto aos fibroblastos, observou-se melhores ganhos no grupo LBI, enquanto os grupos LED e C apresentaram resultados estatisticamente semelhantes (Figura 16).

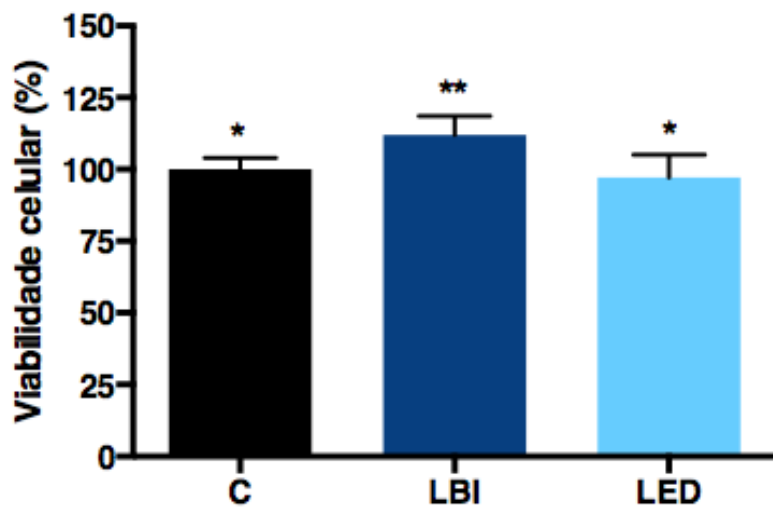
Já em relação às células epiteliais, os maiores escores foram obtidos no grupo LED, e os grupos LBI e C apresentaram resultados similares entre si, porém menores que os encontrados para o grupo LED (Figura 17)

Figura 15. Análise da viabilidade dos osteoblastos submetidas aos diferentes tratamentos.. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



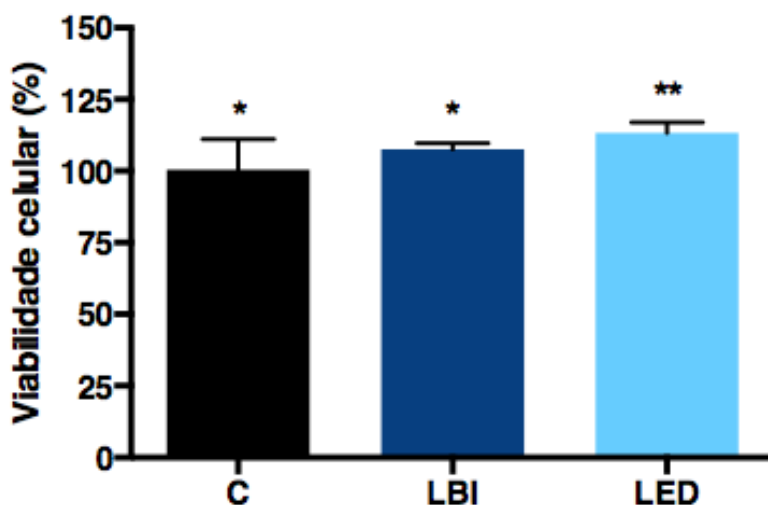
Fonte: Autor

Figura 16. Análise da viabilidade dos fibroblastos submetidas aos diferentes tratamentos.. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Figura 17. Análise da viabilidade das células epiteliais submetidas aos diferentes tratamentos.. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

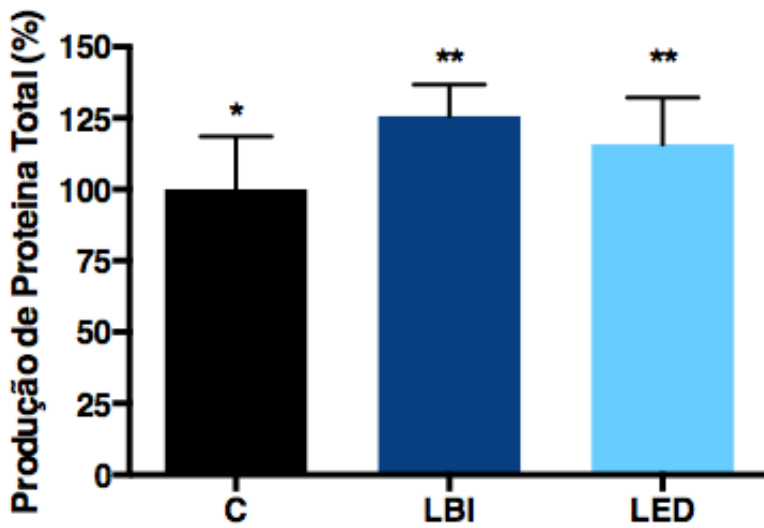
4.4 ANÁLISE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA TOTAL

A avaliação de produção de proteína total, determinada pelo método de Lowry, demonstrou que para os osteoblastos houve aumento significativo para os grupos LBI e LED, quando comparados ao grupo controle (Figura 18).

Para os fibroblastos, aumento da síntese de PT foi observado apenas para o grupo LBI. (Figura 19).

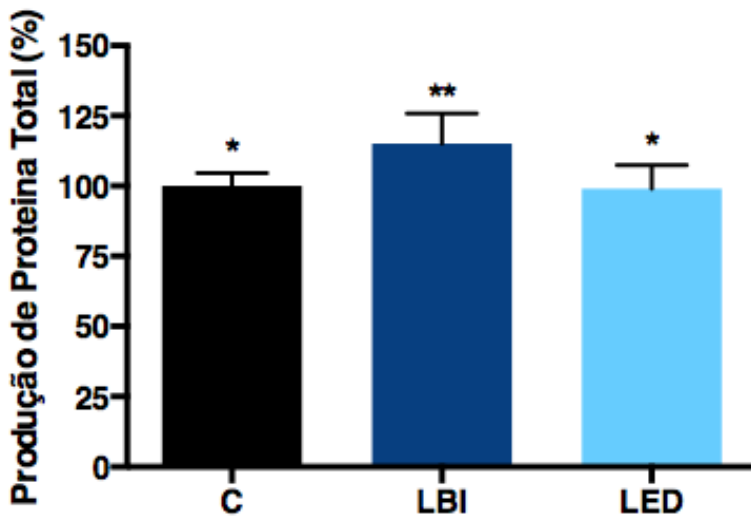
A síntese de proteína total das células epiteliais foi semelhante para todos os grupos avaliados, experimentais e controle (Figura 20).

Figura 18. Análise da síntese de proteína total por osteoblastos submetidos aos diferentes tratamentos.*Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

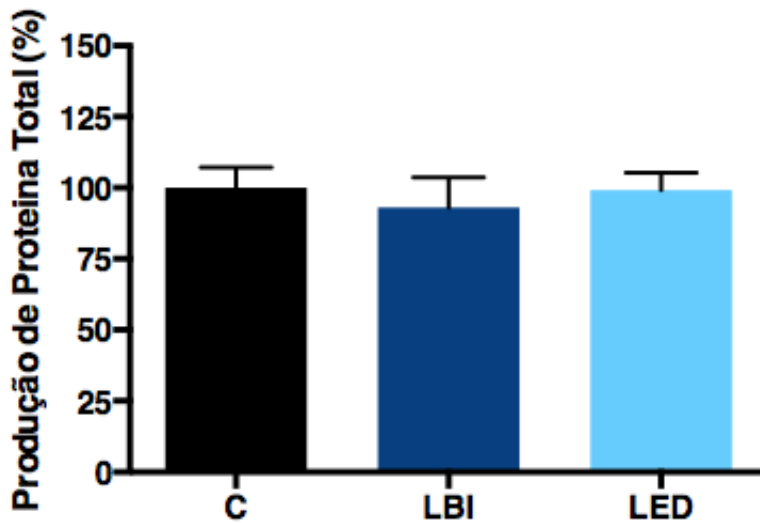
Figura 19. Análise da síntese de proteína total por fibroblastos. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Figura 20. Análise da síntese de proteína total por células epiteliais submetidas aos diferentes tratamentos.

*Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

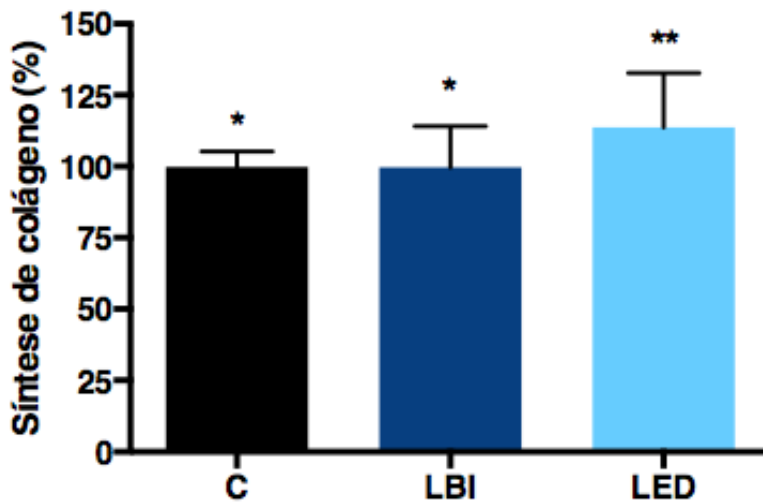
4.5 ANÁLISE DE SÍNTESE DE COLÁGENO

A síntese de colágeno total, determinada pelo método colorimétrico de Sirius Red apresentou os seguintes resultados:

Houve uma maior síntese de colágeno no grupo irradiado por LED para os osteoblastos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e LBI (Figura 21).

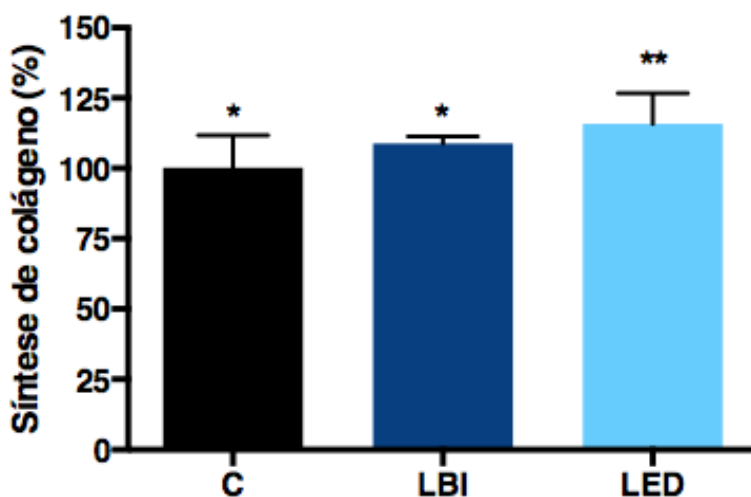
Em relação aos fibroblastos houve, também, superioridade no grupo LED. Comparando-se apenas os grupos LBI e C, ambos apresentaram resultados estatisticamente similares (Figura 22).

Figura 21. Análise da síntese de colágeno por osteoblastos submetidos aos diferentes tratamentos. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Figura 22. Análise da síntese de colágeno por fibroblastos submetidos aos diferentes tratamentos. *Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



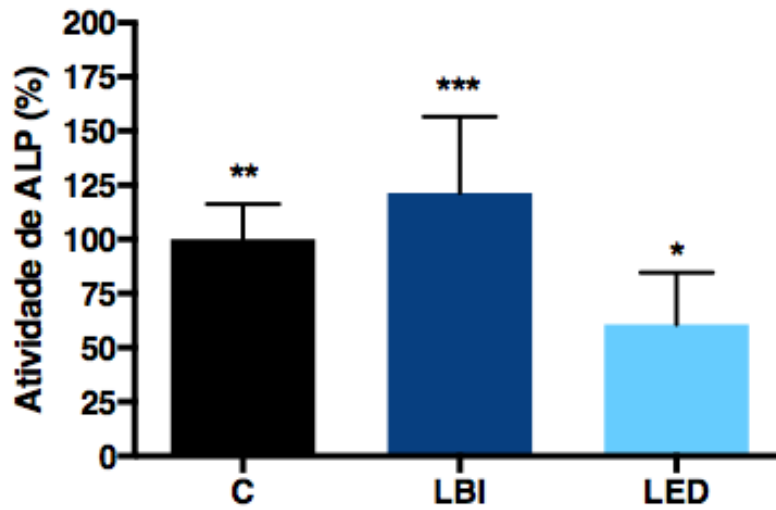
Fonte: Autor

4.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina pelos osteoblastos cultivados sobre o substrato de titânio mostrou-se superior, em relação aos osteoblastos, no grupo LBI, seguida pelo grupo C e com menores valores para o grupo LED (Figura 23).

Figura 23. Análise da atividade de ALP por osteoblastos submetidos aos diferentes tratamentos..

*Grupos identificados por símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Autor

Figura 24. Quadro comparativo da superioridade dos tratamentos distribuídos entre as variáveis analisadas e os tipos de células. Campos marcados com (*) indicam igualdade entre tratamentos e grupo controle. Campos marcados com (-) indicam onde as análises não se aplicam.

	Morfologia Celular	Viabilidade Celular	Síntese Proteína Total	Síntese de Colágeno	Atividade ALP
Osteoblastos	*	LBI	LBI	LED	LBI
Fibroblastos	*	LBI	LBI	LED	-
Células Epiteliais	LBI e LED	LED	*	-	-

5. DISCUSSÃO

A osseointegração, bem como a formação de um selamento mucoso em torno de implantes osseointegráveis está intimamente ligada a longevidade desse tipo de tratamento. Para que isso ocorra de forma satisfatória, é imprescindível a proliferação de células envolvidas no processo como osteoblastos, fibroblastos e células epiteliais. Tudo que favoreça isso é de suma importância e estudos têm se dedicado a avaliar os efeitos da fotobiomodulação celular através de aplicação de laser de baixa Intensidade e LED. (KHADRA et al., 2005b; LINS et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012; MARISCAL ,2013; MAYER et al., 2015; ESFAHANIZADEH et al., 2016 ;BOSSHARDT et al. 2017).

Especificamente no que tange o processo de osseointegração, a adesão de osteoblastos à superfície do implante, bem como a síntese e mineralização de matriz estão diretamente relacionadas ao processo de reparo desse tecido (KHADRA et al., 2005a; JOOS et al., 2006; CHANG et al., 2010; CONSOLARO et al.,2010; SALVI et al., 2015; AYUKAWA et al., 2016; ESFAHANIZADEH et al., 2016 BASSO et al., 2018).

No presente estudo, a avaliação do efeito da fototerapia utilizando LBI e LED em modelo *in vitro* sobre a adesão dos osteoblastos ao substrato de titânio usinado, não revelou diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle. Exceção feita em relação ao espraçamento celular que, para o grupo submetido ao LBI, as células apresentaram menor expressão de filamentos de actina, demonstrando menor espraçamento citoplasmático. No entanto, o número de células aderidas foi semelhante para todos os grupos controle, LBI e LED. Esses dados corroboram com os achados de SCHWARTZ-FILHO et al. (2011) e PARENTI et al. (2013) e difere de outros autores (WHELAN et al, 2001; YANAMOTO et al., 2001; PIRES OLIVEIRA et al., 2008; KHADRA et al., 2005; GRASSI et al., 2011; BOLDRINI et al., 2013; HUERTAS et ,al., 2014; GINANI et al., 2015; MAIOR, 2014 e KUNIMATSU et al., 2018).

Os diferentes resultados observados entre os estudos são provavelmente derivados da utilização de diferentes parâmetros e modelos de irradiação celular. Sabe-se que a alteração de quaisquer fatores – densidade, potência, área, distância – resulta em fenótipos celulares distintos. A falta de padronização entre os parâmetros utilizados pode ser o principal fator relacionado com os resultados negativos da fotobiomodulação. Desta forma, para o presente estudo utilizamos dispositivos especificamente desenvolvidos para estudos em cultura de células, a LaserTABLE e a LEDTABLE, que oferecem irradiação

padronizada (área e distância) para todos os compartimentos em que as células estão cultivadas (BASSO et al. 2012).

Além disso, alguns estudos avaliaram o efeito da fototerapia em modelos cujas células foram semeadas em substratos de poliestireno e, no presente estudo, estas células foram semeadas sobre substratos de titânio, simulando a interação destas com o implante osseointegrado, tentando-se, dessa forma, chegar o mais próximo possível de uma situação *in vivo*. Este fator também pode alterar a resposta celular, já que estas podem apresentar fenótipo distinto quando cultivadas em diferentes substratos (ALGHAMDI et al., 2012). Este é também um fator diferencial do presente estudo, já que dos estudos prévios avaliando a fotobiomodulação visando elucidar seu efeito no reparo peri-implantar, poucos utilizaram substratos de titânio (NAGAI et al., 2002; DEPFRICH et al., 2008; PETRI et al. 2010; CANKAYA et al., 2011; MIAO et al., 2017).

Demonstrou-se que quando os osteoblastos são cultivados sobre este tipo de substrato estas células apresentam adesão, espraiamento e metabolismo distintos àqueles apresentados para superfícies de poliestireno, podendo, portanto, influenciar diretamente no resultado obtido (GROESSNER-SCHREIBER e TUAN, 1992).

Apesar das terapias com LBI e LED não terem estimulado a adesão dos osteoblastos, deve-se ressaltar que estas também não atuaram como um fator negativo quantitativo para esta adesão, sem efeito prejudicial para a interação dos osteoblastos com os substratos de titânio. Porém, o menor espraiamento observado para o grupo LBI no presente estudo, pode estar associado a uma fraca adesão dos osteoblastos ao substrato, o que também pode resultar em reparo tecidual mais lento (JOOS et al., 2006; CHANG et al., 2010).

Outro fator a ser considerado no estudo, neste caso como fator limitante, é a interação da luz laser e LED com o substrato metálico. Até o presente momento, não foi demonstrado se existe uma relação de absorção, reflexão ou ainda um efeito térmico quando desta interação, que possa estar relacionado a um efeito deletério às células cultivadas. Tendo apenas estudo de efeito térmico quando de fotobiomodulação sobre a pele (JON-JONSEN, 2011).

Um terceiro fator diferencial deste estudo é a avaliação das diferentes células envolvidas no reparo peri-implantar, sendo estas constituintes dos tecidos ósseo e mucoso (epitélio e conjuntivo), de forma a elucidar de maneira abrangente a interação da fotobiomodulação sobre todos os tecidos que podem ser expostos a esta modalidade terapêutica.

A interface entre o tecido gengival e o implante dental também deve apresentar uma íntima relação. Ela promove uma barreira física e biológica, que protege os tecidos perimplantares da invasão de patógenos, já que o epitélio atua como barreira física e imunológica (HYNES, 2002; AN et al., 2012). Após a instalação dos implantes, estas células devem aderir ao *abutment*, sendo que esta adesão deve ser seguida da expressão de marcadores fenotípicos relacionados a síntese de moléculas de adesão e de moléculas da matriz extracelular, bem como de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e imunoglobulinas (HYNES, 2002; LINS, 2010; AN et al., 2012; CHAVES et al., 2014; DORKHAN, 2014; ALMEIDA, 2015).

Assim, a formação de uma barreira efetiva é crucial para a manutenção dos componentes dos implantes e para a hemostasia local (KHADRA et al., 2005a ; KHADRA et al., 2005b; CONSOLARO et al.,2010; LINS et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012; MARISCAL ,2013; MAYER et al., 2015; SALVI et al., 2015; AYUKAWA et al., 2016; ESFAHANIZADEH et al., 2016 ;BOSSHARDT et al. 2017; BASSO et al., 2018). E, uma menor interação das células da mucosa oral com os componentes protéticos pode afetar o estabelecimento desse selamento biológico (AN et al. 2012). Também para estimular esse selamento mucoso se aplicam técnicas de fotobiomodulação.

Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a aplicação da fotobiomodulação no comprimento de onda de espectro vermelho e infra-vermelho próximo (665 – 780nm), como os utilizados no presente estudo, tem apresentado efeitos positivos na proliferação de fibroblastos e células epiteliais, acelerando o processo de adesão focal dessas células ao titânio (KREISLER et al, 2003; MARQUES et al, 2004; MOORE et al., 2005, KHADRA et al., 2005a; PAGIN et al., 2014). No presente estudo não houve diferença significativa entre os grupos Controle, LBI e LED quando da análise de adesão de fibroblastos. Maior adesão contudo, foi observada para as células epiteliais submetidas a LBI e LED , sem diferença estatística entre ambas terapias.

A viabilidade dos osteoblastos foi maior para os grupos submetidos ao LBI e LED, corroborando com os estudos de KHADRA et al., 2005b; LINS et al., 2010; TERHEYDEN et al., 2012; MARISCAL ,2013; MAYER et al., 2015; ESFAHANIZADEH et al., 2016 ;BOSSHARDT et al. 2017). Para as células da mucosa oral, resultados distintos foram observados, sendo que para os fibroblastos, a terapia com LBI resultou em maior viabilidade para estas células, enquanto o LED apresentou os melhores resultados para as células epiteliais.

Estes resultados também podem estar associados aos diferentes níveis de interação da luz com as células em cultura. Já foi demonstrado que maiores comprimentos de onda apresentam maior penetração tecidual e podem afetar as organelas celulares de formas distintas. (SOMMER et al., 2001; PELLICCIOLI et al., 2014; TEUSCH, 2015; BASSO et al., 2016).

A síntese de proteína total reflete o estado metabólico das células em cultura. Ambas as terapias, LBI e LED promoveram aumento do metabolismo dos osteoblastos, enquanto os fibroblastos foram estimulados apenas para a terapia com LBI. As células epiteliais não apresentaram alterações metabólicas após as irradiações.

Após a adesão das células ao substrato, o processo de reparo peri-implantar também está associado a síntese e deposição de matriz extracelular, composta principalmente por colágeno tipo I (AN et al., 2012).

O grupo irradiado por LED mostrou melhor resultado para a síntese de colágeno pelos osteoblastos e fibroblastos, corroborando com os estudos de Lam et al. (1986) e Nanami et al. (1993). Para as células epiteliais, uma equidade estatística foi observada para todos os grupos experimentais. Assim, a síntese de matriz extracelular nos tecidos mesenquimais pode ser acelerada para os grupos submetidos à fototerapia com LED. Deve-se lembrar que esses efeitos dependem dos parâmetros de irradiação, principalmente de comprimento de onda e dose (SOMMER et al., 2001; CHAVES et al., 2014; PELLICCIOLI et al., 2014; TEUSCH, 2015; BASSO et al., 2016).

Além da síntese de matriz, a capacidade de mineralização também é um fator muito importante no processo de osseointegração dos implantes orais. Uma das enzimas que participa ativamente do processo de mineralização óssea é a fosfatase alcalina. Os resultados deste estudo demonstraram que a atividade desta enzima pelos osteoblastos cultivados sobre o substrato de titânio mostrou-se superior para o grupo LBI em relação aos demais grupos. As células submetidas à fototerapia com LED apresentaram redução desta atividade após 5 dias em cultura. Também, alguns estudos demonstraram aumento da atividade de ALP por osteoblastos em cultura após a irradiação com LBI, em parâmetros semelhantes aos aplicados neste estudo. (KHADRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2017).

As diferentes fototerapias aplicadas sobre as células em cultura apresentaram resultados distintos no que se refere a adesão, viabilidade e metabolismo celulares. Assim, fica evidente que é necessário realizar mais experimentos *in vitro* e *in vivo*, a fim de elucidar os eventos moleculares para padronizar e otimizar o uso destas terapias. Fica evidente

também que a seleção do tipo de fototerapia a ser aplicada deve ser baseada no tecido alvo, e também na etapa do processo de reparo peri-implantar em que se deseja atuar.

6 CONCLUSÕES

De forma geral, a aplicação de ambas as modalidades de fotobiomodulação resultou em melhora das funções celulares relacionadas com os processos de reparo dos tecidos peri-implantares. Porém, estas respostas foram distintas para cada tipo celular.

Além disso, é possível concluir que:

- A fotobiomodulação com LBI e LED resultou em aumento da adesão das células epiteliais, sem resultados significativos para osteoblastos e fibroblastos;
- A viabilidade celular dos osteoblastos foi maior nos grupos LBI e LED, enquanto para os fibroblastos foi no grupo LBI e, para as células epiteliais foi no grupo LED
- Maior atividade celular foi observado quando os osteoblastos foram irradiados com ambas as modalidades, sendo que apenas a LBI promoveu efeitos significativos para os fibroblastos de gengiva. A atividade celular das células epiteliais não foi significativamente afetado.
- As células mesenquimais apresentaram maior síntese de colágeno após fototerapia com LED in vitro, sem alterações para as células de origem epidérmica.
- A atividade de ALP pelos osteoblastos cultivados sobre o substrato de titânio foi melhor com aplicação de LBI e piorada com a aplicação de LED.
- O efeito estimulatório da fotobiomodulação depende, intimamente, da relação entre o tipo de luz que é aplicada e tipos celulares distintos.

REFERÊNCIAS

- AL-GHAMDI, K.M.; KUMAR, A., MOUSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med. Sci.**, v. 27, p.237-49, 2012.
- ALMEIDA, J.S. de. Avaliação de células fibroblásticas submetidas à terapia laser de baixa potência / Juliana Serpeloni de Almeida. Londrina: [s.n], 2015. 60f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências da Reabilitação). Universidade Norte do Paraná.
- AN, N.; RAUSCH-FAN, X.; WIELAND, M.; MATEJKA, M.; AANDRUKHOV, O.; SCHEDLE, A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. **Dent. Mater.**, v. 28, p. 1207-14, 2012.
- ATASOY, K.T.; KORKMAZ, Y.T.; ERSAN, O.E.; HANCI, H. The efficacy of low-level 940 nm laser therapy with different energy intensities on bone healing **Braz. Oral Res.**, v. 31, e7, 2017.
- AYUBIANMARKAZI, N.; et al. An in vitro evaluation of the responses of human osteoblast-like SaOs-2 cells on SLA titanium surfaces irradiated by different powers of CO₂ lasers. **Lasers Med. Sci.**, v. 30, p. 2129-34, 2015.
- AYUKAWA, A.I.; KONDO, R.; et al. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. **J. Prosthodont. Res.**, v. 60, p. 3-11, 2016.
- BANZER, W.; HÜBSCHER, M.; SEIB, M.; VOGT, L. Short-time effects of laser needle stimulation on the peripheral microcirculation assessed by laser doppler spectroscopy and near-infrared spectroscopy. **Photomed. Laser Surg.**, v. 24, p. 575-80, 2006.
- BASSO, F.G.; PANSANI, T.N., TURRIONI, A.P.S.; et al. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int. J. of Dentistry*, v. 2012, article ID 719452, 6p, 2012. [https:// doi.org/10.1155/2012/719452](https://doi.org/10.1155/2012/719452)
- BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; OLIVEIRA, T.F. Cytotoxic effects of zoledronic acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. **Braz Dent J.**, v. 24, p. 551-8, 2013(a).
- BASSO, F.G.; OLIVEIRA, C.F.; KURACHI, C. et al. **Lasers Med Sci.**, v. 28, p. 367-74, 2013(b).
- BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; SOARES, G.G., et al. LLLT Effects on Oral Keratinocytes in an Organotypic 3D Model. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, p. 190-94, 2018.
- BASSO, F.G.; SOARES, D.G., et al. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. **Lasers Med Sci.**, v. 31, p. 973-8, 2016.
- BERGLUNDH, T.; ABRAHAMSSON, I. et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clin. O. Impl. Research**, v. 14, p. 251-62, 2003.
- BOLDRINI, C.; DE ALMEIDA, J.M., et al. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone–titanium implant interface. **Lasers Med Sci.**, v. 28, p. 349-52, 2013.

BOSSHARDT, D.D.; CHAPPUIS, V.; BUSER, D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. **Periodontology** **2000**, v. 73, p. 22–40, 2017.

CANKAYA, A.B.; ERDEM, M.A. et al. Evaluation of Light-Emitting Diode (LED-660 Nm) Application over Primary Osteoblast-Like Cells on Titanium Surfaces: An In Vitro Study. **Int. J. Med. Sci.**, v. 8, p. 584-93, 2011.

CERNAVIA, L.; PUGATSCBEW, A., et al. Laser applications in dentistry: a review of the Literature. **Australian Dental Journal**, v. 39, p. 28-32, 1994.

CHANG, P.; LANG, N.P.; GIANOBILE, W.V. Evaluation of functional dynamics during osseointegration and regeneration associated with oral implants: a review. **Clin Oral Impants Res.**, v. 21, p. 1-12, 2010.

CHAVES, M.E.; ARAUJO, A.R., et al. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. **An_Bras_Dermatol.**, v.89, p. 616-23, 2014.

COLNOT, C.; ROMERO, D.M.; et al. Molecular analysis of healing at a bone-implant interface. **J. of Dent. Research**, v. 86, p. 862-67, 2007.

CONSOLARO, A.; CARVALHO, R.S. de; FRANCHISCONE, J.R.C. et al. Saucerização de implantes osseointegrados e o planejamento de casos clínicos ortodônticos simultâneos. **Dental Press J Orthod.**, v.15, p.19-30, 2010.

DEPPRICH, R.; OMMERBORN, M. et al. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. **Head & Face Medicine**, doi:10.1186/1746-160X-4-29

DORKHAN, M.; Yücel-Lindberg, T., et al. Adherence of human oral keratinocytes and gingival fibroblasts to nano-structured titanium surfaces. **BMC Oral Health**, v. 14, p. 75, 2014.

DÖRTBUDAK, O.; HAAS, R.; MAILA-POKORNY, G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. **Clin. Oral Implants Res.**, v. 3, p. 288-92, 2002

EISENBARTH, E.; MEYLE, J.; et al. Influence of the surface structure of titanium materials on the adhesion of fibroblasts. **Biomaterials**, v. 17, p. 1399-1403, 1996.

ESFAHANIZADEH, N.; MOTALEBI, S., et al. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. **Lasers_Med. Sci.**, v. 31, p. 863-73, 2016.

FRANCHI, M.; MARTINI, D.; ORSINI, E.; et al. Biological fixation of endosseous implants. **Micron.**, v. 36, p. 665-71, 2005.

GAMZE, B.A.; AYSE, A.C.; MURAT, G. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. **Lasers Med Sci.**, v. 32, p. 591-99, 2017.

GINANI, F. et al. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci.**, v. 30, p. 2189-94, 2015.

- GRASSI, F.R.; CICCOLELLA, F. et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 25, p. 603-14, 2011.
- GROESSNER-SCHREIBER, B.; TUAN, R.S. Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v. 101, p. 209-17, 1992.
- HUERTAS, R.M.; LUNA-BERTOS, E.D., et al. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation **Biol Res Nurs.**, v. 16, p. 191-6, 2014.
- HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11-25, 1992.
- JON JOENSEN, P.T.; DEMMINK J.H. et al. The Thermal Effects of Therapeutic Lasers with 810 and 904 nm Wavelengths on Human Skin. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 3, p. 145-53, 2011.
- JOOS, U; WIESMANN, H.P.; SZUWART, T.; MEYER, U. Mineralization at the interface of implants. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.35, p. 783-90, 2006.
- KASEMO, B.; GOLD, J. Implant surfaces and interface processes. *Adv. Dental Research*, v. 8, p. 13, 1999.
- KHADRA, M.; RONOLD, H., et al. Low-level laser therapy stimulates bone–implant interaction: an experimental study in rabbits. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 15, p. 325-32, 2004.
- KHADRA, M.; KASEM, N., et al. Laser therapy accelerates initial attachment and subsequent behaviour of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material: A scanning electron microscopic and histomorphometric analysis. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 16, p. 168-75, 2005(a).
- KHADRA, M.; LYGSTADAAS, S.P.L. et al. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **Wiley Periodicals, Inc.**, v73, p. 55-62, 2005(b)
- KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B., et al. Low-level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med.**, v. 30, p. 365-69, 2003.
- KUNIMATSU, R., GUNJI, H., et al. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. **Lasers Med Sci.** p. 1-8, 2018 doi.org/10.1007/s10103-017-2426-0
- LAM, T.S.; ABERGEL, R.P., et al. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. **Lasers Life Sci**, v. 1, p. 61-77, 1986.
- LEE, H.S.; JUNG, S.E., et al. Low-Level Light Therapy with 410 nm Light Emitting Diode Suppresses Collagen Synthesis in Human Keloid Fibroblasts: An *In Vitro* Study. **Ann Dermatol.**, v. 29, p. 149-155, 2017.

LINS, R.D.A.U.; LUCENA, K.C.R., et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol.**, v. 85, p. 849-55, 2010.

MAIOR, José Daniel de Sousa. Efeitos da radiação laser de baixa intensidade na produção de radicais livres em células osteoblásticas humanas cultivadas sobre placas de titânio / -- São Paulo; SP: [s.n.], Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Cruzeiro do Sul. 2014)

MARISCAL MUÑOZ, Eduardo Diferenciação de osteoblastos cultivados sobre superfícies de titânio modificadas por irradiação com laser Yb:YAG pulsado de alta potência/ Araraquara: [s.n.], 2013 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia)

MARQUES, M.M.; PEREIRA, A.N., et al. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultra structure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med.**, v. 34, p. 260-65, 2004.

MAYER, L. ; VACILOTTO, F. et al. Histologic and Resonance Frequency Analysis of Peri-Implant Bone Healing After Low-Level Laser Therapy: An In Vivo Study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 30, p. 1028-35, 2015.

MESTER, E.; JUHÁSZ, J.; VARGA, P.; KARIKA, G. Lasers in clinical practice. **Acta Chir Acad Sci Hung**, v. 9, p. 349-57, 1968.

MEYER, U.; JOOS, U.; et al. Ultrastructural characterization of the bone/implant interface of immediately loaded dental implants. **Biomaterials**, v. 25, p. 1959-67, 2004.

MIAO, X.; WANG, D. et al. The response of human osteoblasts, epithelial cells, fibroblasts, macrophages and oral bacteria to nanostructured titanium surfaces: a systematic study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1415–30, 2017

MOORE, P.; RIDGWAY, T.D.; HIGBEE, R.G., et al. Effect of wavelenght on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. **Lasers Surg Med**, v.36, p. 8-12, 2005.

NAGAI, M.; HAYAKAWAI, T. In vitro Study of Collagen Coating of Titanium Implants for Initial Cell Attachment. **Dental Materials Journal**, v. 21, p. 250-60, 2002.

NANAMI, T.; SHIBA, H.; IKEUCHI, S., et al. Clinical applications and basic studies of laser in dentistry and oral surgery. **Keio J Med**, v. 42, p. 199-201, 1993.

OLIVEIRA, F.A.; MATOS, A.A., et al. Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and matrix metalloproteinase-2 activities of osteoblasts. **J Photochem Photobiol B.**, v. 169, p. 35-40, 2017.

ORRISS I.R.; KEY M L.; COLSTON K.W.; ARNETT T.R. Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobiphosphonates. **J Cellular Biochemistry**. 106:1; 109-118, 2009

- PAGIN et al., Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. **Lasers Med Sci** 2014; 29:55-59
- PARENTI, S.I., et al. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast-like cells cultured on porous hydroxyapatite scaffolds. **Ann Ist Super Sanità** , v. 49, p. 255-60, 2013.
- PELLICIONI, A.C.A.; MARTINS, M.D., et al. Laser phototherapy accelerates oral keratinocyte migration through the modulation of the mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, 2014 doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028002.
- PETRI, A.D.; TEIXEIRA, L.N., et al. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium.. **Braz_Dent J.**, v. 21, p. 491-8, 2010.
- PIRES, O. D.A.; OLIVEIRA, R.F. , et al. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells..**Photomed Laser Surg.**, v. 26, p. 401-4, 2008.
- PIVA, J.A.A.C.; ABREU, E.M.C.; et al. Effect of low-level laser therapy on the initial stages of tissue repair: basic principles. **An Bras Dermatol.**, v. 86, p. 947-54, 2011.
- RONCATI, M.; LAURITANO, D.; et al. Evaluation Of Light-Emitting Diode (Led-835 Nm) Application Over Human Gingival Fibroblast: An In Vitro Study. **Journal Of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 30, p.161-167, 2016.
- SALVI, G.E.; BOSSHARDT, D.D.; et al. Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. **Periodontol 2000**, v. 68, p. 135-52, 2015.
- SCWRATZ-FILHO, H.O.; REIMER, A.C., et al. Effects of low-level laser therapy (685 nm) at different doses in osteogenic cell cultures. **Lasers Med Sci** , v. 26, p. 539-43, 2011.
- SOARES, R.D. Análise in vitro da adesão e proliferação de osteoblastos sobre a superfície da zircônia tratada por laser de er,cr:y:sgg (erbium- chromium: yttrium, scandium, gallium , garnet). 2012 Dissertação (Mestrado) Universidade Guarulhos
- SOMMER, A.P.; PINHEIRO, A.L.; MESTER, A.R.; FRANKE, R.P.; WHELAN, H.T. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **J Clin Laser Med Surg.**, v. 19, p. 29-33, 2001.
- TERHEYDEN, H.; LANG, N.P.; et al. Osseointegration–communication of cells. **Clin Oral Implants Res**, v. 23, p. 1127-35, 2012.
- TEUSCH, M.; BALMAYOR, E.R.; et al. Phototherapy with LED light modulates healing processes in an in vitro scratch-wound model using 3 different cell types. **Dermatol_Surg.** v. 41, p. 261-8, 2015.
- TORRES, M.; TEIXEIRA, E.R. Influência do laser de baixa potência (GaAlAs - lambda830nm) na formação óssea em relação à estabilidade primária em osso tipo IV. **Rev Odonto Ciência**, v. 23, p. 175-81, 2008
- SCHON, M.; INCERTI-PARENTI, S. et al. Photobiomodulation with a low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. **Journal of Biomedical Optics** , v. 20 2015. DOI: [10.1117/1.JBO.20.7.078002](https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.7.078002)

WALSH , L. The current status of low level laser therapy in dentistry. Pan 1. Soft tissue applications. **Australian Dental Journal**, v. 41, p. 247-54, 1997.

WHELAN, H.T.; SMITS, R.L.; et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **J Clin Laser Med Surg**, v. 19, p. 305-14, 2001.

YANAMOTO, M.; TAMURA, K.; et al. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 16, p. 213-17, 2001.

YEH, N.G.; WU, C.; CHENG, T.C. Light-emitting diodes - their potential in biomedical applications. **Renew Sust Energ Rev**, v. 14, p. 2161-6, 2010.