



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**Efeito da fotobiomodulação usando LED de emissão vermelha sobre o
metabolismo de osteoblastos humanos**

FERNANDO CÉSAR MOREIRA

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
Profissional em Tecnologia das Radiações em
Ciências da Saúde na Área de Concentração
Processos de Radiação na Saúde**

Orientador: Dr^a Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2025

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Mestrado
Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde**

**Efeito da fotobiomodulação usando LED de emissão vermelha sobre o
metabolismo de osteoblastos humanos**

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
Profissional em Tecnologia das Radiações
em Ciências da Saúde na Área de
Concentração Processos de Radiação na
Saúde**

Orientador: Dr^a Martha Simões Ribeiro

São Paulo

2025

Fernando César Moreira

**Efeito da fotobiomodulação usando LED de emissão vermelha sobre o
metabolismo de osteoblastos humanos**

Comissão julgadora

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia
Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Presidente e orientador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São Paulo, 03 de setembro de 2025.

DADOS CURRICULARES

FCM

NASCIMENTO: 01/02/1969 – Ibitinga – São Paulo

FILIAÇÃO: José Celso Moreira
Rosa Campiteli Moreira

2025

Graduado em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (1991). Possui especialização e mestrado em Ortodontia pela Fundação Hermínio Ometto – FHO/Uniararas (2013), e doutorado em Biologia Craniofacial e Biomateriais pela FOAr – UNESP (2020). Realizou pós-doutorado na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (2021), com pesquisa voltada à Ortodontia digital, aplicando tecnologia CAD/CAM no planejamento e tratamento ortodôntico. Concluiu pós-graduação stricto sensu em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (2023). Atua com ênfase em Ortodontia digital e Biomateriais. É coordenador do curso de Odontologia da Faculdade Unibalsas e coordenador acadêmico da pós-graduação na Cruzeiro do Sul Educacional. Especialista em Gestão de Instituições de Educação Superior pela Hoper Educação (2022). Membro da Comissão do Sistema Nacional de Avaliadores do Ensino Superior – MEC/BASis.

AGRADECIMENTOS

Dedico esta dissertação à memória dos meus amados pais, José Celso Moreira e Rosa Campiteli Moreira, e do meu irmão, José Ricardo Moreira, cuja presença continua viva em mim através dos valores, ensinamentos e amor que me deixaram. Também dedico à minha irmã Fabiana Moreira, pela cumplicidade e apoio constante; à minha esposa Ana Paula, por sua paciência, incentivo e parceria incondicional ao longo desta jornada; e ao meu filho Fernando Amaral, que representa o futuro e a razão de muitas das minhas conquistas. A cada um de vocês, minha eterna gratidão e carinho.

À minha orientadora, Dr. Martha Simões Ribeiro, minha profunda gratidão pela orientação generosa, pela sabedoria compartilhada e pela confiança depositada ao longo desta caminhada. Aos professores doutores Orlando, Denise, Renato, Daniel, Carlos e Patrick, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), minha sincera gratidão pela oportunidade, apoio, aprendizado e compartilhamento de conhecimento ao longo desta jornada. À secretária de pós-graduação, Andreia e Letícia, meu profundo agradecimento pela atenção, agilidade e suporte constante.

Aos professores Dr. Helder Jacob, Dr^a Taisa Pansani e Dr. Carlos Alberto de Souza Costa, minha sincera gratidão pela valiosa colaboração na elaboração deste trabalho. Agradeço também à dedicada equipe de alunos da pós-graduação e a todos os profissionais envolvidos, cujo apoio técnico e intelectual foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa. Estendo meu reconhecimento à Faculdade de Odontologia de Araraquara (Unesp), pelo uso do laboratório e pela estrutura disponibilizada, que contribuíram significativamente para a realização deste estudo.

Aos colegas do curso de Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde, minha admiração e gratidão pela troca de experiências, companheirismo e incentivo mútuo.

À FAPEMA - Programa Nacional de Apoio à Geração de Empreendimentos Inovadores - Maranhão – contrato nº 13/2023

“Sou feito de partículas e de perguntas. No entrelaçar do átomo e da alma, busco no invisível a cura que transforma, na ciência a luz que revela, e na docência o caminho que compartilha. Porque conhecer é mais que entender — é honrar o mistério do universo e servir à saúde com propósito.” — Fernando*

* Fernando Cesar Moreira; 2025.

Moreira, Fernando César. Efeito da fotobiomodulação usando LED vermelho sobre o metabolismo de osteoblastos humanos. 2025. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - (IPEN/CNEN-SP) - São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: A fotobiomodulação (FBM) com LED de emissão vermelha (630 nm) tem sido aplicada para promover regeneração tecidual e modular funções celulares. Este estudo avaliou seus efeitos na viabilidade, metabolismo e migração de osteoblastos SAOS-2 *in vitro*. **Materiais e Métodos:** Três grupos experimentais (G2, G4 e G6) receberam densidades de energia de 2, 4 e 6 J/cm², respectivamente, após 24 h do cultivo celular, em três aplicações consecutivas, com intervalo de 12 h, sendo comparados a um grupo controle, que não foi irradiado. Foram avaliados a viabilidade celular, proteína total, fosfatase alcalina (ALP), síntese de colágeno total, formações nodulares de matriz e o potencial de proliferação celular no fechamento da ferida. **Resultados:** A viabilidade celular, avaliada pelo ensaio AlamarBlue, não mostrou diferenças significativas entre os grupos. A produção de proteína total e a síntese de colágeno aumentaram significativamente após 14 dias, especialmente no grupo com 6 J/cm². A ALP foi maior aos 7 dias. A formação de matriz mineralizada aumentou significativamente após 14 dias. A proliferação celular, analisada pelo ensaio de *scratch*, foi maior no grupo com 2 J/cm². A microscopia eletrônica de varredura revelou maior densidade celular no grupo com 6 J/cm². **Conclusão:** A FBM com LED de emissão vermelha estimulou o metabolismo dos osteoblastos sem causar danos, sendo a dose de 6 J/cm² eficaz na síntese de colágeno após 14 dias, enquanto a dose de 2 J/cm² promoveu maior fechamento da ferida. Os resultados sugerem que a FBM pode ser uma ferramenta promissora na modulação da atividade de osteoblastos. Além disso, diferentes densidades de energia são requeridas, conforme o objetivo terapêutico almejado.

Palavras-chave: Fosfatase Alcalina; Matriz Mineralizada; Migração Celular; Produção de Colágeno; Proliferação Celular

Moreira, Fernando César. Effect of photobiomodulation using red LED on the metabolism of human osteoblasts. 2025. Dissertation (Professional Master's in Radiation Technology in Health Sciences) – Institute for Energy and Nuclear Research (IPEN/CNEN-SP), São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Introduction: Photobiomodulation (PBM) with a red LED (630 nm) has been applied to promote tissue regeneration and modulate cellular functions. This study evaluated its effects on viability, metabolism, and migration of SAOS-2 osteoblasts in vitro.

Materials and Methods: Three experimental groups (G2, G4, and G6) received energy densities of 2, 4, and 6 J/cm², respectively, 24 hours after cell culture initiation, in three consecutive applications at 12-hour intervals, and were compared to a non-irradiated control group. Cell viability, total protein, alkaline phosphatase (ALP) activity, total collagen synthesis, nodular matrix formation, and cell migration potential were assessed. **Results:** Cell viability, assessed by the AlamarBlue assay, showed no significant differences between groups. Total protein production and collagen synthesis significantly increased after 14 days, especially in the 6 J/cm² group. ALP activity was higher at day 7. Mineralized matrix formation significantly increased after 14 days. Cell migration, analyzed by scratch assay, was greater in the 2 J/cm² group. Scanning electron microscopy revealed higher cell density in the 6 J/cm² group.

Conclusion: PBM with red LED emission stimulated osteoblast metabolism without causing damage, with the 6 J/cm² dose being effective for collagen synthesis after 14 days, while the 2 J/cm² dose promoted greater cell migration. These results suggest that PBM may be a promising tool for modulating osteoblast activity. Furthermore, different energy densities are required depending on the intended therapeutic goal.

Keywords: Alkaline Phosphatase; Bone Matrix; Cell Migration, Collagen Biosynthesis, Cell Proliferation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma demonstrando o design experimental. Distribuição dos grupos, períodos e densidades de energia utilizadas em osteoblastos humanos.....	12
Figura 2 Dispositivo LEDTable. Placa de cultura posicionada no dispositivo por meio de encaixe tipo “gaveta” (A), distância entre a placa e a fonte de luz (B), disposição dos 24 LEDs e colimadores (C), e dispositivo irradiando a placa com o meio de cultura (D).....	15
Figura 3 Viabilidade celular de osteoblastos humanos, avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).....	20
Figura 4 Produção de proteína total (mg/mL) por osteoblastos obtidos por meio de cultura celular avaliada em 7 e 14 dias, de acordo com o emprego de diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).....	21
Figura 5 Atividade de fosfatase alcalina (U/L) por osteoblastos humanos avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).....	22
Figura 6 Atividade de fosfatase alcalina (U/L) por osteoblastos humanos avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).....	23
Figura 7 Formações nodulares de matriz mineralizada nos grupos experimentais avaliados. Análise comparativa entre diferentes DE nos períodos de 7 e 14 dias. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).....	23
Figura 8 Imagens obtidas por microscopia óptica (40x) de formações nodulares de matriz em osteoblastos humanos irradiados com diferentes densidades de energia, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias.....	24
Figura 9 Acima observam-se imagens do fechamento da lesão para os diferentes grupos. Abaixo é plotada a área da lesão (mm ²) em função da DE empregada para osteoblastos humanos. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).....	24
Figura 10 Elétron-micrografias de osteoblastos dos grupos irradiados com densidades de energia de 2, 4 e 6 J/cm ² (aumento de 500x e 1500x).....	25

SUMÁRIO

Introdução.....	11
Materiais e Métodos.....	12
Grupos experimentais.....	12
Cultura Celular.....	12
Dispositivos e parâmetros de irradiação.....	14
Avaliação da viabilidade celular (n=8).....	15
Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada.....	16
Produção de proteína total (n=8).....	17
Atividade da fosfatase alcalina (ALP) – 7 e 14 dias.....	17
Síntese de colágeno total pelo ensaio de <i>Sirius Red</i> (n=8).....	17
Análise da migração celular.....	18
Análise da morfologia celular por MEV (n=2).....	19
Análises estatísticas.....	19
Resultados.....	20
Avaliação da viabilidade Celular.....	20
Produção de Proteína Total.....	21
Atividade de Fosfatase Alcalina.....	21
Síntese de colágeno total.....	22
Análise das Formações Nodulares de Matriz.....	22
Análise da Migração Celular.....	24
Avaliação da morfologia celular por MEV.....	25
Discussão.....	26
Conclusão.....	31
Referências Bibliográficas.....	32

1. Introdução

O potencial terapêutico da fotobiomodulação (FBM) tem sido amplamente estudado em pesquisas evidenciando sua capacidade de contribuir para o metabolismo celular no processo de remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica (1,2,3,4). O objetivo principal é acelerar a regeneração tecidual, promovendo diferenciação e proliferação celular, além de modular a liberação de fatores de crescimento pelas células irradiadas (5). Diversos estudos analisaram os efeitos da FBM no metabolismo dos osteoblastos, evidenciando uma aceleração na regeneração da sutura palatina mediana na proliferação, diferenciação e mineralização óssea (6,7). A estimulação dos osteoblastos por irradiação eletromagnética com diodo emissor de luz (LED) de emissão vermelha tem demonstrado favorecer o aumento na deposição de hidroxiapatita de cálcio, resultando em uma aceleração no processo de maturação óssea (7).

De acordo com a literatura, a teoria mais aceita para o mecanismo de ação da FBM envolve o aumento do metabolismo celular e a síntese de moléculas como adenosina trifosfato (ATP), espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (5). Nesse contexto, estudos tem sugerido que a fotossensibilização da enzima citocromo C oxidase seja o fator determinante para desencadear as respostas celulares (8). Essas reações são consideradas efeitos primários, enquanto os efeitos secundários estão relacionados ao aumento da expressão gênica de proteínas, à ativação de vias como NF-K β e às alterações no gradiente do fluxo de cálcio (5).

A aplicação da radiação eletromagnética usando LED de emissão vermelha ($\lambda=630$ nm) nas doses de 2 J/cm² e 4 J/cm² tem demonstrado fotobioestimulação em culturas de células osteoblastos, além de exercer efeitos de citoproteção (5). Um estudo recente, comparou o efeito da irradiação de um LED ($\lambda=640$ nm) e um laser de baixa intensidade ($\lambda=940$ nm) na diferenciação osteogênica e odontogênica de células-tronco, e concluiu que o laser e o LED, respectivamente, com emprego de densidade de energia de 4 J/cm² estimulou a osteogênese e diferenciação de células-tronco sem afetar adversamente a viabilidade celular (9).

Diante das incertezas e variáveis envolvidas na aplicação de um protocolo eficaz do uso do LED de emissão vermelha em células e tecidos ósseos, torna-se fundamental a realização de estudos para determinar a dose ideal de energia e a densidade de potência mais eficaz, para garantir a viabilidade e a sobrevivência celular. Essa complexidade decorre da dificuldade em transpor com precisão o modelo

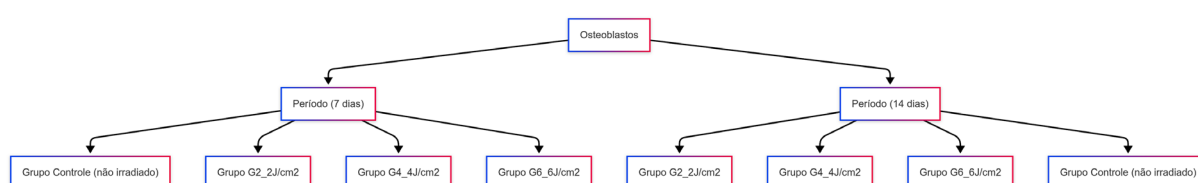
celular para o organismo animal, impactando diretamente sua aplicação na prática clínica. Fatores como a distância entre a fonte de luz, o tipo de cultura celular, o intervalo entre as irradiações, a densidade de potência (DP) e energia (DE) utilizada são essenciais para a padronização dos parâmetros, uma vez que não existe um protocolo estabelecido na literatura (1,2). Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivo analisar os diferentes parâmetros do LED com emissão $\lambda=630$ nm sobre o processo de migração celular e o metabolismo dos osteoblastos humanos *in vitro*. Além disso, os efeitos foram avaliados em diferentes densidades de energia em dois períodos de análise, aos 7 e 14 dias.

2. Materiais e Métodos

2.1. Grupos experimentais

As culturas celulares foram realizadas no Laboratório de Engenharia Celular e Tecidual (FCF, Unesp, Araraquara, São Paulo) e divididas em grupo controle (GC) e três grupos experimentais analisando o emprego de diferentes densidades de energia, G2, G4, e G6 com fluências de 2, 4, e 6 J/cm², respectivamente (Figura 1).

Figura 1 Fluxograma demonstrando o design experimental. Distribuição dos grupos, períodos e densidades de energia utilizadas em osteoblastos humanos.



Fonte: Elaboração própria

2.2. Cultura Celular

A sequência e a cronologia dos experimentos estão representadas na linha do tempo descritas na Tabela 1. Os osteoblastos da linhagem SAOS-2 foram cultivados em frascos de cultura plásticos (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) contendo meio de cultura Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 1% de estreptomicina e penicilina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e

10% de soro fetal bovino (SFB), os quais foram mantidos em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade.

Tabela 1. Linha do tempo descrevendo o protocolo experimental.

Dia Experimental	Ensaio	Descrição/Observação
D0	Semeadura celular	Semeadas 30.000 células/poço
D1	Migração celular (<i>scratch assay</i>): Lesão <i>in vitro</i>	24 h após semeadura
D1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	Após cultivo, semeadura em placa com meio sem SFB
D1	Primeira irradiação	24 h após semeadura
D1	Segunda irradiação	12 h após a primeira (mesmo dia, segundo período)
D2	Terceira irradiação	12 h após a segunda
D3	Migração celular (<i>scratch assay</i>): análise quantitativa da área da lesão	24 h após a última irradiação; fixação e coloração celular, análise microscópio óptico
D3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	24 h após a última irradiação; fixação celular e preparo das lamínulas
D7 e D14	Viabilidade celular (AlamarBlue®)	Após cultivo com meio sem SFB e irradiações
D7 e D14	Proteína total (Lowry)	Mensuração da concentração proteica / Após cultivo em meio osteogênico com 10% SFB
D7 e D14	Fosfatase alcalina (ALP)	Mensuração da atividade enzimática / uso dos mesmos lisados das amostras para proteína total
D7 e D14	Colágeno total (Sirius Red)	Quantificação do colágeno total solúvel (tipos I a IV)
D7 e D14	Formação de matriz mineralizada (Alizarina)	Coloração de matriz mineralizada / análise qualitativa por meio de um microscópio óptico

Fonte: Elaboração própria

Após a obtenção da quantidade necessária de células para o experimento, 30.000 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SFB). Decorridas

24 h do cultivo, o meio de cultura foi substituído por um novo meio de cultura sem SFB e as amostras foram submetidas a três exposições ao LED de emissão vermelha ($\lambda=630$ nm), com um intervalo de 12 h entre cada aplicação. Posteriormente, a morfologia celular e os efeitos da FBM sobre o metabolismo celular foram avaliados.

2.3. Dispositivos e parâmetros de irradiação

As células foram irradiadas de acordo com os grupos e o protocolo de irradiação estabelecidos (Figura 1). O dispositivo LEDTable, desenvolvido pelo Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica de São Carlos (USP), foi utilizado para irradiar as amostras. A superfície óptica e irradiadora do aparelho é composta por 24 LEDs de emissão vermelha, dispostos de maneira equitativa, permitindo que cada LED ilumine individualmente e de forma homogênea a base de cada compartimento da placa acrílica de 24 poços (Figura 2). O LEDTable foi projetado para manter uma distância fixa entre a fonte de luz LED e a placa, garantindo padronização da distribuição uniforme da luz entre os poços com o cultivo celular (Figura 2). Os parâmetros utilizados neste estudo estão representados abaixo na Tabela 2.

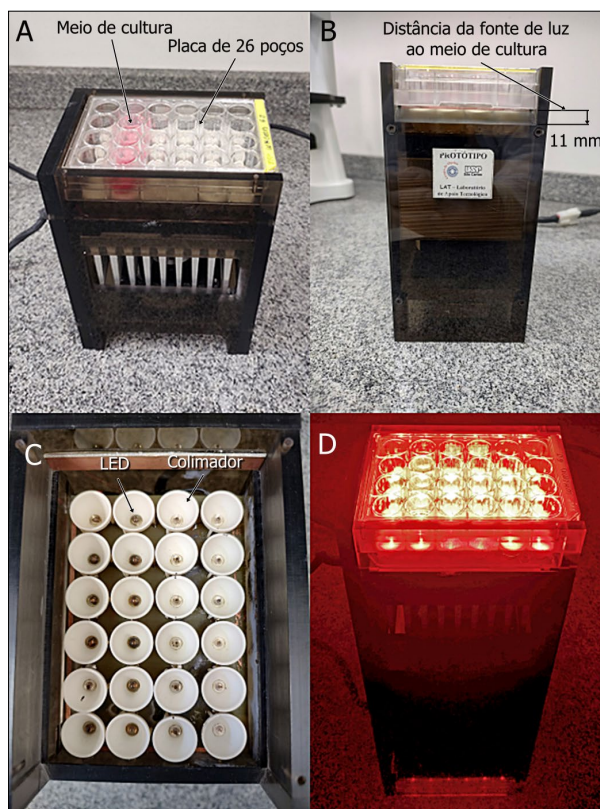
Tabela 2. Parâmetros da fotobiomodulação.

*Fonte de Luz	
Comprimento de onda (nm)	630 nm (± 10 nm)
Área do feixe (cm²)	1,91 cm ²
Densidade de Potência (W/cm²)	45 mW/cm ²
Densidade de Energia (J/cm²)	2 J/cm ² , 4 J/cm ² , 6 J/cm ²
Tempo de irradiação (min, s)	44 s, 1 min e 30 s, 2 min e 15 s
Distância entre a fonte de luz LED e a placa (mm)	11 mm

* Dispositivo LEDTable – Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp

Fonte: Elaboração própria

Figura 2 Dispositivo LEDTable Placa de cultura posicionada no dispositivo por meio de encaixe tipo “gaveta” (A), distância entre a placa e a fonte de luz (B), disposição dos 24 LEDs e colimadores (C), e dispositivo irradiando a placa com o meio de cultura (D).



* Dispositivo LEDTable – Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp

Fonte: Elaboração própria

Deste modo, por meio de um colimador, o feixe de luz é direcionado de tal maneira a irradiar toda base de cada compartimento da placa, cobrindo toda a área onde as células foram cultivadas, mantendo constantes a fluência e a densidade de potência irradiada. As doses de energia foram determinadas com base em estudo prévio (10). Os osteoblastos foram submetidos à irradiação com uma densidade de potência fixa de 45 mW/cm^2 e três doses de energia distintas: 2, 4 e 6 J/cm^2 . O tempo de exposição para cada condição foi de 44 s, 1 min e 30 s, e 2 min e 15 s, respectivamente.

2.4. Avaliação da viabilidade celular (n=8)

O ensaio AlamarBlue® (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular nos períodos de 7 e 14 dias após o início da cultura celular

para investigação da resposta celular frente à diferentes doses de energia. Esse método detecta a respiração celular aeróbica por meio de uma reação de oxirredução, que converte a resazurina, um corante azul e não fluorescente, em resorufina, um corante vermelho fluorescente, em resposta à atividade metabólica das células (11).

Após a irradiação, as células cultivadas receberam 450 μ L de meio de cultura DMEM, sem SFB, juntamente com 50 μ L da solução AlamarBlue®. As células foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por um período de 4 h. Após esse intervalo, foram coletadas duas alíquotas de 100 μ L de cada compartimento e transferidas para os respectivos poços de uma placa de 96 compartimentos. A fluorescência das amostras foi mensurada por fluorimetria (Synergy-H1, Biotek, Winooski, EUA), utilizando os comprimentos de onda de 570 nm (excitação) e 600 nm para a leitura da intensidade de sinal.

2.5. Análise qualitativa e quantitativa de formações nodulares de matriz mineralizada

Após o protocolo de irradiação (Tabela 1) as células foram mantidas em meio osteogênico (DMEM com 10% de SFB, 0,2M de L-ácido ascórbico e 5M de β -glicerofosfato). Então as avaliações foram realizadas nos períodos de 7 e 14 dias após o início da cultura celular. Para o processamento das amostras, os osteoblastos foram lavados com 1 mL/poço de água destilada e fixados em álcool 70% (2 mL) por 1 h a 4°C. Posteriormente, a solução alcoólica foi descartada e as células passaram por lavagens com 1 mL/poço de água deionizada. A coloração dos nódulos mineralizados foi realizada utilizando vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich®, St Louis, Missouri, EUA) a 40 mM em água deionizada sob agitação, por um período de 40 min à temperatura ambiente. Após essa etapa, os poços foram lavados por 2 vezes com água destilada para remoção do excesso de corante.

A análise qualitativa foi conduzida por meio de um microscópio óptico com ampliação de 40x (Olympus BX51, Miami, USA) permitindo a captura de imagens das formações nodulares. A avaliação quantitativa foi realizada mediante a solubilização dos nódulos em cloreto de cetilpiridínio (10% em PBS – Sigma-Aldrich®) e subsequente leitura da absorbância em espectrofotômetro a 692 nm (Synergy-H1, Biotek, Winooski, EUA), (12).

2.6. Produção de proteína total (n=8)

A quantificação da produção total de proteínas foi realizada utilizando o método de Lowry (13), avaliando os períodos experimentais de 7 e 14 dias. As células foram submetidas à lise em uma solução de lauril fosfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich®), utilizando um volume de 1 mL/poço e um tempo de incubação de 40 min. Após esse intervalo, as amostras foram homogeneizadas, seguido da adição de 1 mL do reagente Lowry (Sigma-Aldrich®) e incubação por 20 min. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do reagente fenólico de Folin & Ciocalteu (Sigma-Aldrich®), com uma nova incubação de 30 min.

Para a mensuração da concentração proteica, foram coletadas alíquotas de 100 µL das amostras e transferidas para placas de 96 poços. A absorbância das amostras foi determinada por espectrofotometria a 655 nm (Synergy-H1, Biotek, Winooski, EUA). A quantificação da produção total de proteínas foi realizada com base em uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de albumina.

2.7 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) – 7 e 14 dias

A atividade da ALP (fosfatase alcalina Labtest, Lagoa Santa, Brasil) foi quantificada a partir dos mesmos lisados celulares utilizados na determinação do conteúdo de proteína total. A mensuração da atividade enzimática baseou-se na liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato.

Inicialmente, 50 µL de timolftaleína monofosfato foram combinados com 0,5 mL de tampão dietanolamina (0,3 M, pH 10,1) e mantidos por 2 min a 37°C. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota de 50 µL dos lisados celulares, e a solução foi incubada por 10 min a 37°C. O desenvolvimento da coloração foi promovido pela adição de 2 mL de uma solução composta por Na₂CO₃ (0,09 M) e NaOH (0,25 M). Após um período de 30 min, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Synergy-H1, Biotek, Winooski, EUA) em um comprimento de onda de 590 nm. A quantificação da atividade da fosfatase alcalina foi realizada com base na curva padrão do Kit fornecido pelo fabricante. Os dados foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo total de proteína (14).

2.8 Síntese de colágeno total pelo ensaio de *Sirius Red* (n=8)

A quantificação do colágeno sintetizado pelos osteoblastos em meio de cultura foi realizada pelo método *Sirius Red*, que se baseia na interação seletiva do corante

Direct Red (Sigma-Aldrich®) em solução de ácido pícrico saturado com as fibras colágenas dos tipos I a IV, permitindo a determinação do colágeno total solúvel presente na amostra.

Inicialmente, as amostras do meio de cultura foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. Posteriormente, 200 µL da solução de *Direct Red* (0,5 M em ácido pícrico) foram adicionados a 200 µL do meio de cultura coletado em tubos cônicos de 1,5 mL. As soluções foram mantidas sob agitação a 400 rpm e temperatura ambiente (23°C) por um período de 60 min (Thermomixer, Eppendorf, Alemanha). Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a 12.000 x g, seguida do descarte do sobrenadante. Em seguida, 300 µL de ácido clorídrico (HCl, 0,1 M) foram adicionados e uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições. O sobrenadante foi novamente descartado, e as amostras foram homogeneizadas mediante a adição de 250 µL de hidróxido de sódio (NaOH, 0,5 M). Alíquotas de 100 µL da solução, foram transferidas para placas de 96 compartimentos, onde a análise da absorbância foi realizada no espectrofotômetro (Synergy-H1, Biotek, EUA) em comprimento de onda de 555 nm. Os valores de absorbância obtidos foram utilizados para a quantificação do colágeno presente na amostra (15).

2.9 Análise da migração celular (*Scratch assay*)

Para a realização deste experimento, foram semeadas 100.000 células em cada poço de uma placa de 24 poços, contendo meio de cultura completo. Após 24 h, a lesão *in vitro* foi realizada por meio da aplicação controlada da extremidade de uma ponteira de 1 ml com aproximadamente 0,8 mm de diâmetro (15). O meio de cultura foi substituído por um meio sem SFB e as células submetidas a três ciclos de irradiação com o LED, administrados em intervalos de 12 h, utilizando o dispositivo LEDTable (Figura 2).

Após 24 h da última exposição à irradiação, as células foram fixadas em álcool 70% por um período de 1 h. Em seguida, procedeu-se à coloração com violeta leucocristal a 0,1%, durante 30 min, seguida de três lavagens sucessivas com água deionizada para a remoção de excessos. A análise das amostras foi realizada por meio da aquisição de imagens das áreas lesionadas, utilizando um microscópio óptico com ampliação de 40x (Olympus BX51, Miami, USA). O fechamento da ferida foi avaliado nas três densidades de energia empregadas nas amostras (2, 4 e 6 J/cm²),

medindo-se a distância entre as bordas opostas das lesões. A análise quantitativa da área da lesão foi conduzida por meio do software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, EUA), permitindo a obtenção de medidas da área remanescente da ferida (15).

2.10 Análise da morfologia celular por MEV (n=2)

Inicialmente, 30.000 células/poço foram semeadas sobre lamínulas circulares de vidro de 13 mm (Olen, Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil), previamente posicionadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura completo. Após 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio sem SFB e os grupos submetidos à irradiação. Após 24 h da última exposição à irradiação, as amostras dos grupos experimentais e controle foram preparadas para caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando o equipamento FEI Inspect S50 (Hillsboro, EUA). A fixação celular foi realizada por meio da incubação em 1 mL de solução tamponada de glutaraldeído a 2,5% por 2 h, seguida de um processo de desidratação gradual em etanol, com concentrações ascendentes de 30%, 50%, 70%, 95% e 100%, por um período de 30 min em cada solução (16). As amostras foram submetidas a um tratamento de secagem química com 1,1,1,3,3,3-hexametildissilazano (HMDS) (Acros Organics, Springfield, EUA) por três ciclos consecutivos de 20 min cada. Posteriormente, as lamínulas circulares de vidro foram montadas sobre *stubs* metálicos e armazenadas em um dessecador. As amostras preparadas nos *stubs* foram então recobertas com uma fina camada de ouro por meio da técnica de pulverização catódica, garantindo uma superfície condutiva adequada para análise por MEV. A análise morfológica das amostras foi realizada com registros obtidos nos aumentos de 500x e 1500x, permitindo a avaliação detalhada das características estruturais das células irradiadas (16).

2.11. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em 2 ocasiões, totalizando um N=8. Os dados quantitativos provenientes das análises de viabilidade celular, síntese de proteína total, síntese de ALP, síntese de colágeno, produção de nódulos mineralizados e migração celular foram exportados para o software GraphPad Prism, versão 9.0.0 (GraphPad Software, Boston, EUA), onde foram submetidos à análise estatística. Inicialmente, a normalidade e homogeneidade dos dados foram avaliadas.

Então, para a comparação entre grupos submetidos a diferentes doses de irradiação e períodos de avaliação, aplicou-se a análise de variância ANOVA a 2 fatores seguidos pelo pós-teste de Tukey para identificação de diferenças estatisticamente significativas. No teste de migração celular onde a única variável foram os grupos submetidos à diferentes doses de irradiação foi aplicado o teste de ANOVA a um critério seguido pelo pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância estatística. Os dados qualitativos provenientes das imagens de MEV foram avaliados de maneira descritiva.

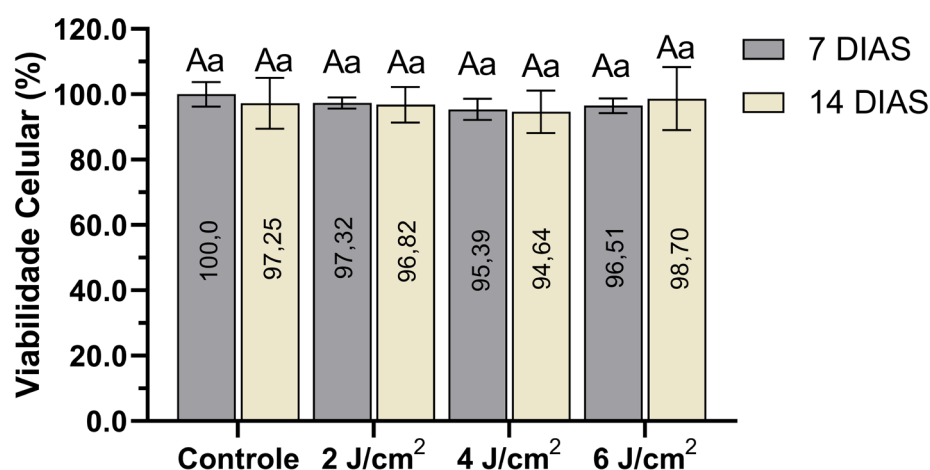
3. Resultados

Os dados obtidos das amostras foram submetidos à análise estatística, permitindo a comparação entre os grupos experimentais e o grupo controle dentro de cada período estabelecido. Adicionalmente, foram avaliadas as diferenças estatísticas entre os períodos de 7 e 14 dias dentro de cada grupo.

3.1. Avaliação da viabilidade Celular

Osteoblastos submetidos à irradiação com o LED de emissão vermelha, nas doses de 2, 4 e 6 J/cm², não apresentaram diferença na viabilidade celular quando comparados ao grupo controle. Também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparados os períodos de 7 e 14 dias de análise (Figura 4).

Figura 3 Viabilidade celular de osteoblastos humanos, avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

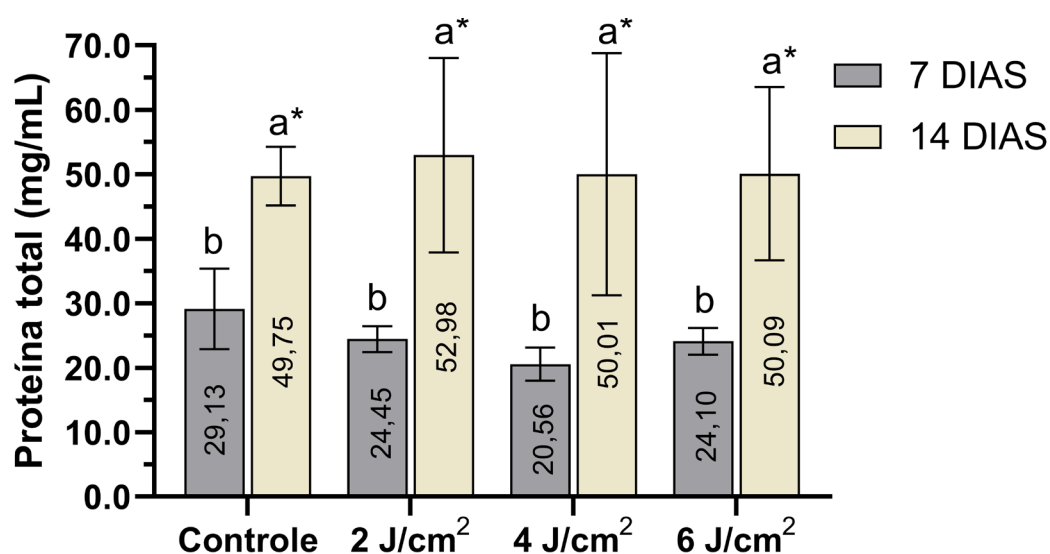


Fonte: Elaboração própria

3.2. Produção de Proteína Total

A produção de proteína total pelos osteoblastos aumentou significativamente (quase 2x) no período de 14 dias quando comparado ao período de 7 dias (Figura 4). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos após 7 ou 14 dias ($p > 0,05$).

Figura 4 Produção de proteína total (mg/mL) por osteoblastos obtidos por meio de cultura celular avaliada em 7 e 14 dias, de acordo com o emprego de diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).

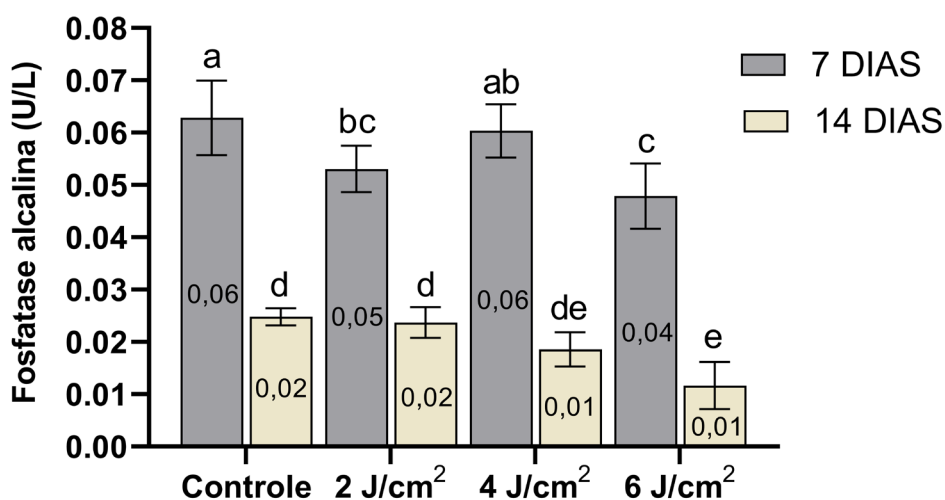


Fonte: Elaboração própria

3.3. Atividade de Fosfatase Alcalina

Foi observado que todos os grupos tiveram redução na atividade da enzima ALP aos 14 dias de análise se comparados aos respectivos grupos no período de 7 dias $p < 0,05$ (Figura 5). Aos 7 dias de análise, o grupo 6 J/cm² apresentou a menor atividade de ALP se comparado aos grupos controle e 4 J/cm². No entanto, aos 14 dias de análise, apenas o grupo 6 J/cm² apresentaram atividade de ALP inferior aos demais grupos $p < 0,05$ (Figura 5).

Figura 5 Atividade de fosfatase alcalina (U/L) por osteoblastos humanos avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

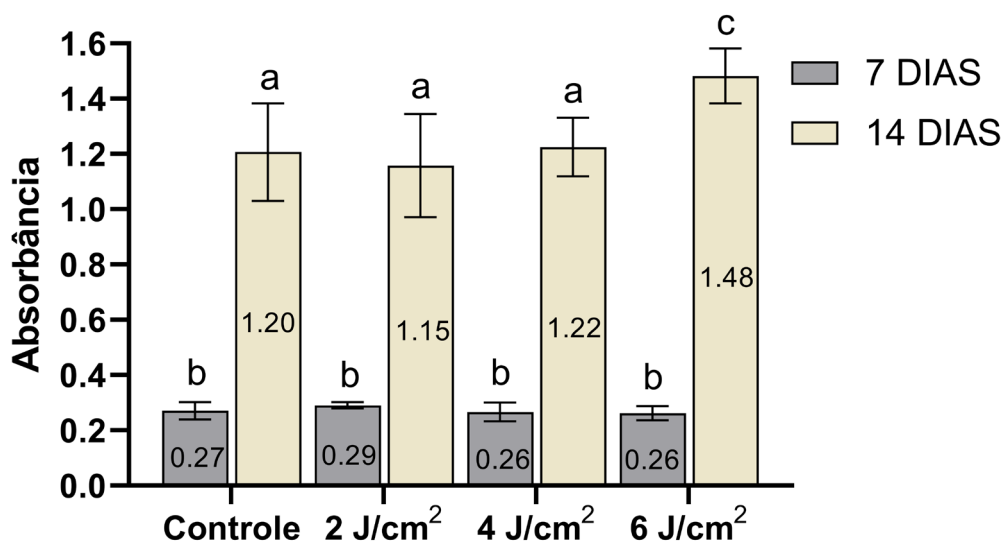
3.4. Síntese de colágeno total

A síntese de colágeno total produzida pelos osteoblastos apresentou um aumento significativo no período de 14 dias em todos os grupos se comparados aos respectivos grupos no período de 7 dias (Figura 6). Também foi observado que o grupo submetido à irradiação com densidade de energia de 6 J/cm^2 após 14 dias de cultivo teve uma maior síntese de colágeno quando comparado aos demais grupos.

3.5. Análise das Formações Nodulares de Matriz

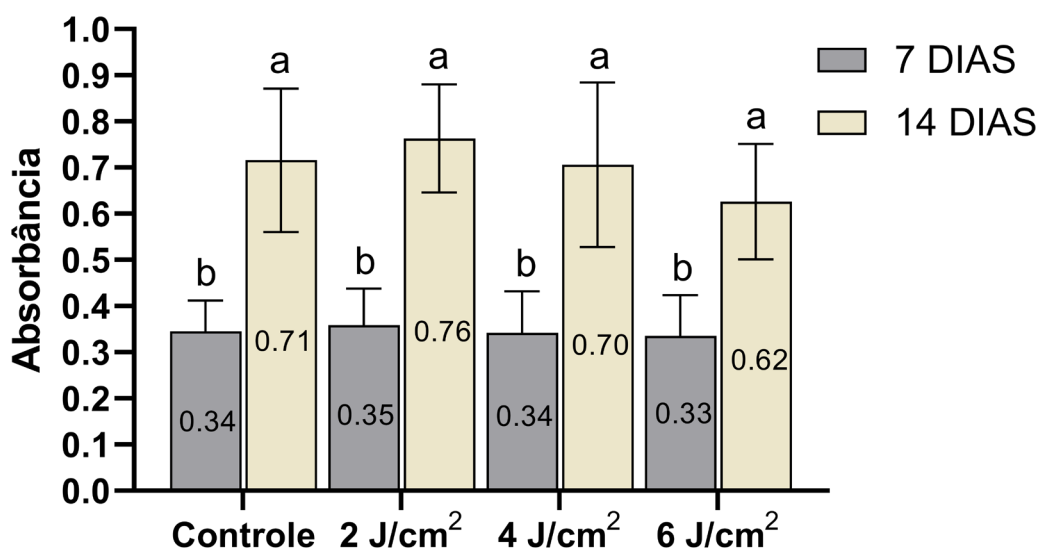
Os grupos analisados após 14 dias apresentaram uma atividade mais intensa de formação nodular em comparação aos grupos avaliados no período de 7 dias ($p < 0,05$). Em 14 dias, o grupo 2 J/cm^2 apresentou um aumento significativo de aproximadamente 24% de formações nodulares, comparado aos outros grupos (Figuras 7 e 8).

Figura 6 Síntese de colágeno por osteoblastos humanos avaliada em 7 e 14 dias, nas diferentes densidades de energia. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).



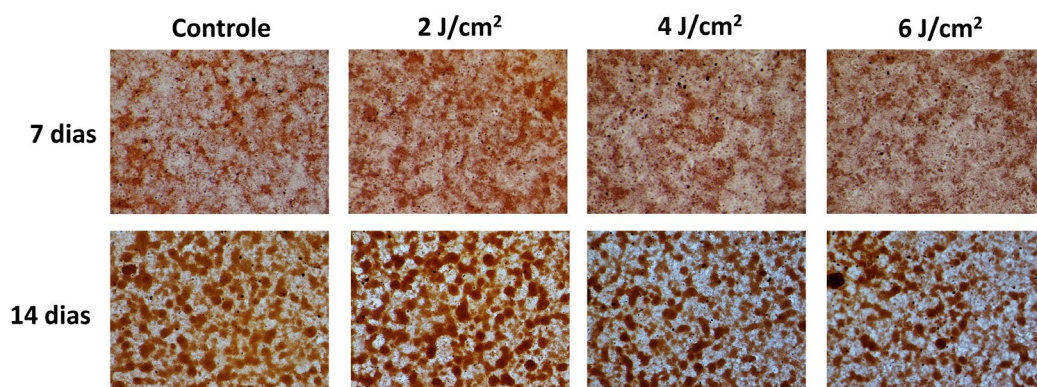
Fonte: Elaboração própria

Figura 7 Formações nodulares de matriz mineralizada nos grupos experimentais avaliados. Análise comparativa entre diferentes densidades de energia nos períodos de 7 e 14 dias. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração própria

Figura 8 Imagens obtidas por microscopia óptica (40x) de formações nodulares de matriz em osteoblastos humanos irradiados com diferentes densidades de energia, nos períodos experimentais de 7 e 14 dias.

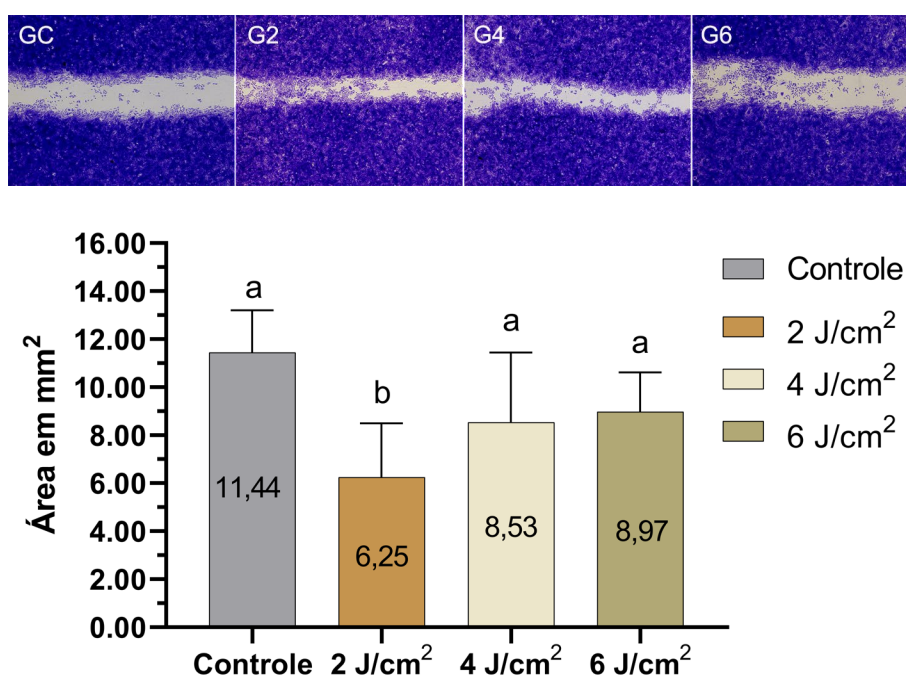


Fonte: Elaboração própria

3.6. Análise da Migração Celular

A área da lesão *in vitro* variou entre 6,25 mm² e 11,44 mm². As células irradiadas com 2 J/cm² apresentaram o maior fechamento da ferida (6,25 mm²), seguidas pelas doses de 4 e 6 J/cm², que resultaram em áreas de 8,55 mm² e 8,97 mm², respectivamente, 24 h após a última exposição ao LED (Figura 9).

Figura 9 Acima observam-se imagens do fechamento da lesão para os diferentes grupos. Abaixo é plotada a área da lesão (mm²) em função da densidade de energia empregada para osteoblastos humanos. Letras diferentes indicam significância estatística (Tukey, $p < 0,05$).

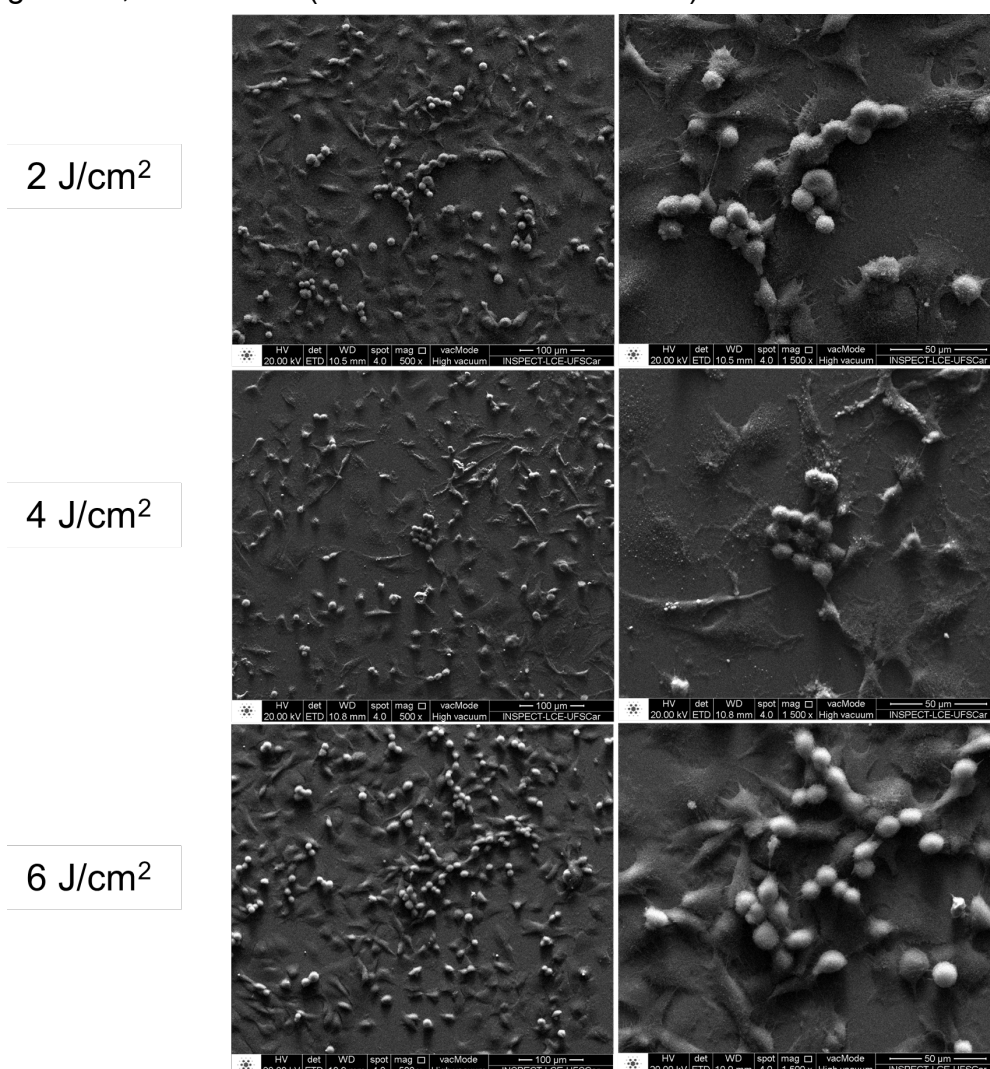


Fonte: Elaboração própria

3.7. Avaliação da morfologia celular por MEV

A distribuição celular e a morfologia dos osteoblastos cultivados em meio de cultura estão representadas na Figura 10. A caracterização morfológica dos osteoblastos por MEV revelou um aumento na densidade celular nas amostras irradiadas com 2 e 6 J/cm². As amostras irradiadas com 6 J/cm² mostrou grupos de células com a estrutura preservada, apresentando maior quantidade de prolongamentos citoplasmáticos e mitoses em comparação aos grupos irradiados com outras densidades de energia.

Figura 10 Elétron-micrografias de osteoblastos dos grupos irradiados com densidades de energia de 2, 4 e 6 J/cm² (aumento de 500x e 1500x).



Fonte: Elaboração própria

4. Discussão

Este estudo analisou o metabolismo e o processo de migração celular (fechamento da ferida) de osteoblastos em meio de cultura após o emprego de um LED de emissão vermelha ($\lambda = 630 \text{ nm}$) com distintas densidades de energia (2, 4 e 6 J/cm^2), empregando-se três diferentes tempos de irradiação (44 s, 1 min e 30 s e 2 min e 15 s) a uma densidade de potência fixa de 45 mW/cm^2 . Os resultados demonstraram que a irradiação dos osteoblastos influenciou na modulação da resposta celular dependendo das densidades de energia utilizadas.

A viabilidade celular não foi alterada pela irradiação e manteve-se elevada (acima de 94%) independentemente da densidade de energia (2, 4 e 6 J/cm^2), do tempo de exposição (7 e 14 dias) ou da interação entre estes fatores (Figura 3). Estes resultados indicam que os parâmetros utilizados não apresentaram toxicidade aos osteoblastos, o que está de acordo com estudos anteriores (17,18,19,20). Um estudo prévio demonstrou que a FBM, com fluências de 0,5, 1 e 2 J/cm^2 ($\lambda = 635 \text{ nm}$), não exerceu efeito significativo sobre a viabilidade de osteoblastos (18). Embora alguns autores tenham relatado aumento na viabilidade de células ósseas (1,21,22), tais divergências podem estar relacionadas a diferenças nos comprimentos de onda, densidades de energia, potências aplicadas e protocolos de irradiação. Além disto, foi demonstrado que a viabilidade celular tende a ser mais afetada nos momentos iniciais após a irradiação, especialmente durante a fase proliferativa celular (1). Considerando a resposta bifásica à dose (23), a resposta celular à irradiação eletromagnética pode variar conforme a densidade de energia aplicada, sendo que baixas doses podem ser insuficientes para induzir efeitos biológicos, enquanto fluências elevadas podem desencadear respostas inibitórias ou citotóxicas (20,24). Ademais, variações nas linhagens celulares utilizadas entre os diferentes estudos também podem contribuir para as discrepâncias observadas (19). Assim, a viabilidade celular observada nesse estudo, demonstrou que as células continuaram viáveis e saudáveis em quase toda totalidade (próximo de 100%).

A osteogênese foi investigada pelos indicadores dos testes de atividade de conteúdo de proteína total, quantificação de colágeno, fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização. A produção de proteína total não foi influenciada pela FBM. Nenhuma diferença foi observada entre as doses de 2, 4 e 6 J/cm^2 dentro de cada período analisado, que também não diferiram do grupo controle. No entanto, a

produção de proteína total aumentou significativamente quando os períodos de 7 e 14 dias foram comparados entre si (Figura 4). Utilizando o mesmo dispositivo LEDTable, um estudo prévio também não observou influência do LED de emissão vermelha na produção de proteína total de odontoblastos, nas doses de 2 e 4 J/cm², apesar do tipo de células diferirem deste estudo (5). Aqui, quando os valores médios de ambos os períodos foram comparados entre si, observou-se um aumento de 70% para o controle, porém, mais de 100% para amostras irradiadas, independente da densidade de energia (2, 4 e 6 J/cm²). Quando comparado ao grupo controle no período de 14 dias, houve um aumento de aproximadamente 6,50% no grupo 2 J/cm², seguido de 0,52% no grupo de 4 J/cm² e 0,68% no grupo de 6 J/cm² (Figura 4). O grupo irradiado com 2 J/cm² apresentou valores maiores, em ambos os períodos, quando comparado aos demais grupos irradiados. Importante, este estudo corrobora com outros autores no qual a FBM não produziu efeito deletério (5) de acordo com o efeito bifásico nas respostas celulares (23).

A síntese de colágeno foi influenciada pela irradiação com LED de emissão vermelha. Independentemente da densidade de energia aplicada, houve um aumento aproximado de 5 vezes ao longo de 14 dias, quando comparados os períodos (7 e 14 dias) entre si (Figura 6). No período de 7 dias, a FBM não promoveu síntese de colágeno significativa, embora tenha se observado um leve aumento no grupo 2 J/cm² (0,29) em comparação aos demais grupos desse mesmo intervalo (Figura 6). Entretanto, em 14 dias, o grupo irradiado com 6 J/cm² (1,48) apresentou um aumento significativo de 23% em relação ao controle (1,20), e apenas 1,7% em relação ao grupo irradiado com 4 J/cm² (1,22). Estes achados corroboram parcialmente com estudo anterior que avaliou o efeito da FBM em osteoblastos irradiados nos períodos de proliferação e diferenciação celular, utilizando a linhagem SAOS-2 e uma densidade de energia de 1,5 J/cm² (λ = 660 nm), tendo sido observado efeito significativo na fase de diferenciação, com aumento expressivo na produção de colágeno (25). Os autores sugerem que os efeitos da FBM podem ser modulados pelo estágio de maturação celular, com maior síntese de colágeno na fase de diferenciação, potencializada pela irradiação com luz vermelha (25).

A FBM influenciou a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e todos os grupos mostraram uma redução significativa após 14 dias de cultivo. A atividade de ALP foi em média, 2,5 vezes menor (250%) no período 14 dias em comparação aos 7 dias (Figura 5), com redução de 66% no grupo controle e de 60%, 83% e 75% nos grupos

irradiados com 2, 4 e 6 J/cm², respectivamente. A osteogênese *in vitro* ocorre em três fases sequenciais e interdependentes: proliferação celular, maturação da matriz extracelular e mineralização (26). Durante as fases de proliferação e de maturação, a ALP tende a ser mais elevada, desempenhando um papel essencial, atuando na liberação de fosfato inorgânico a partir de ésteres fosfatados, promovendo a deposição de cristais de hidroxiapatita na presença de cálcio (26). Neste estudo, a atividade da ALP diminuiu em todos os grupos experimentais ao longo do tempo, com os menores valores registrados no grupo irradiado com 6 J/cm² em ambos os períodos, significativamente menor que o grupo controle (Figura 5). Nossos resultados contrastam com estudos anteriores que relataram aumento da atividade de ALP durante as fases proliferativa e de diferenciação celular após FBM, provavelmente devido aos momentos de observação (25). Naquele estudo, os autores avaliaram a atividade de ALP nas fases de proliferação e diferenciação celular. As células foram irradiadas nos dias 2, 3 e 4 e, depois, nos dias 7, 8 e 9. Os resultados foram avaliados nos dias 5 e 10. Aqui, nossos resultados indicam que em 14 dias, as células já avançaram para a fase de mineralização, quando menores concentrações de ALP são observadas (27).

Por outro lado, a formação de nódulos mineralizados foi significativamente maior, independentemente da densidade de energia aplicada, confirmando que em 14 dias, as células se encontram na fase de mineralização. Neste momento, observou-se um aumento superior a 100% na formação de nódulos em comparação ao período de 7 dias. Contudo, ao comparar os grupos irradiados em ambos os períodos com diferentes densidades de energia (2, 4 e 6 J/cm²), não houve diferença estatística significativa (Figura 9). A atividade da ALP atingiu seu pico aos 7 dias, e diminuiu em 14 dias, contribuindo para a formação de nódulos mais evidente aos 14 dias. Isso indica que a ALP atuou como marcador para diferenciação dos osteoblastos, preparando a matriz extracelular para a mineralização (28). Interessantemente, um estudo prévio mostrou que a combinação de estresse mecânico e FBM potencializou a mineralização de osteoblastos, superando os efeitos isolados somente da irradiação com LED de emissão vermelha ou do estímulo mecânico isolado, após quatro semanas de tratamento (29). De acordo com os autores, estes achados podem ser explicados pelo aumento da função celular pela regulação da expressão gênica no núcleo da célula. Em nosso estudo, os osteoblastos foram expostos exclusivamente à irradiação vermelha, sem aplicação de nenhum estímulo que provocasse estresse

nos osteoblastos. Neste trabalho, a FBM promoveu efeitos biológicos relevantes, principalmente para a síntese de colágeno, na dose de 6 J/cm². A mesma dose foi também capaz de diminuir significativamente a atividade da ALP. Esta dose parece ter favorecido um estágio mais avançado de maturação da matriz nos osteoblastos, no qual a atividade de ALP tende a declinar, enquanto a síntese de colágeno tipo I continua ou se intensifica, sugerindo que a FBM, nessa dose, estimulou a deposição de matriz extracelular, preparando as células para a mineralização subsequente.

A irradiação dos osteoblastos com luz vermelha acelerou a migração celular promovendo o fechamento da ferida em todos os grupos após 24 h quando comparados ao grupo controle (Figura 9). O resultado mais pronunciado foi o apresentado pelo grupo irradiado com 2 J/cm² (6,25 mm²) em comparação ao controle (11,44 mm²). A migração celular foi significativamente maior empregando-se a dose de energia mais baixa, com redução da área da lesão em 45% (2 J/cm²), 25% (4 J/cm²) e 21% (6 J/cm²). Estudo prévio também mostrou que um LED de emissão vermelha ($\lambda = 637$ nm) foi capaz de acelerar o processo de migração de osteoblastos (22).

A caracterização morfológica dos osteoblastos por MEV revelou um aumento na densidade celular nas amostras irradiadas com 2 e 6 J/cm² (Figura 10). As amostras irradiadas com 6 J/cm² mostraram grupos de células com estrutura preservada, apresentando maior quantidade de prolongamentos citoplasmáticos e mitoses em comparação com os outros grupos. Além disto, as imagens comparativas dos osteoblastos irradiados com 4 J/cm² mostraram maior quantidade de células lisadas e contração citoplasmática, bem como uma diminuição na quantidade de células e adesão celular em relação aos demais grupos, embora não tenha sido feito uma análise quantitativa.

O principal desafio nos estudos em biofotônica consiste em estabelecer a dose ideal de energia capaz de modular efetivamente o metabolismo celular e, assim, acelerar os processos de cicatrização tecidual. Considerável esforço tem sido dedicado à definição de parâmetros de irradiação adequados para osteoblastos, visando à indução de uma resposta celular bifásica (23), caracterizada por efeitos estimuladores em baixas doses e inibitórios em doses elevadas. Diversas variáveis influenciam a proliferação e diferenciação celular, incluindo o tipo celular, a densidade de energia, o comprimento de onda, o tempo de exposição e a frequência de aplicação. Neste contexto, o presente estudo avaliou os efeitos da irradiação em culturas de osteoblastos utilizando três densidades de energia (2, 4 e 6 J/cm²),

previamente descritas na literatura como promissoras para a fotobioestimulação óssea (22,25,21). Este estudo demonstrou que a irradiação com LED de emissão vermelha evidenciou efeitos bioestimulantes dose-dependentes em osteoblastos humanos da linhagem SAOS-2. A dose de 2 J/cm² favoreceu processos iniciais como migração celular, sendo importante em fases precoces no processo de reparo tecidual. A dose de 4 J/cm² mostrou efeitos intermediários em todos os marcadores, com moderada produção de colágeno e indução de mineralização óssea. Entretanto, a dose de 6 J/cm² induziu significativamente a síntese de colágeno, promovendo diferenciação e maturação celular, importante para a fase de mineralização óssea na correção de mordida cruzada posterior na terapia ortodôntica.

Os resultados demonstraram que nenhuma das doses testadas comprometeu a viabilidade celular, conforme demonstrado pelo ensaio de ensaio AlamarBlue®. Embora não tenham sido observados resultados significativamente diferentes entre o controle e a FBM para o conteúdo de proteínas totais, e formação de nódulos mineralizados, observou-se que a dose mais alta (6 J/cm²) significativamente promoveu maior síntese de colágeno tipo I e diminuição da síntese de ALP, enquanto a dose de 2 J/cm² induziu aumento significativo no fechamento da ferida. Esse padrão é consistente com a literatura, que demonstra que diferentes respostas biológicas em células osteogênicas podem ter intervalo de estímulo distintos: a proliferação e migração frequentemente requerem doses mais baixas, enquanto a expressão de marcadores de matriz extracelular, como colágeno, pode demandar doses maiores ou repetidas, refletindo a ativação de vias de sinalização diferenciadas (30,31). Assim, nossos resultados reforçam a necessidade de definir protocolos de FBM específicos para cada objetivo terapêutico requerido.

Apesar das limitações inerentes ao modelo *in vitro*, como a ausência da complexidade do microambiente fisiológico, da interação com outros tipos celulares e teciduais, fatores sistêmicos intrínsecos e inexistência de estímulos desencadeadores de estresse celular, os resultados obtidos reforçam a necessidade e relevância da padronização dos protocolos de fotobiomodulação. As diferentes densidades de energia empregadas modulam etapas distintas da fisiologia dos osteoblastos, o que demonstra a necessidade de protocolos personalizados de acordo com cada objetivo exigido na biomecânica ortodôntica. Sendo assim, os parâmetros adotados neste estudo podem servir como referência para futuras pesquisas em modelos celular e

animal, visando à validação dos efeitos terapêuticos na proliferação celular e no potencial osteogênico da luz LED vermelha.

5. Conclusão

Este estudo evidenciou que a exposição de osteoblastos ao LED de emissão vermelha, aplicada com diferentes densidades de energia, foi capaz de modular o metabolismo celular. De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

1. A FBM, nas distintas densidades de energia empregadas e nos períodos experimentais avaliados, não induziu danos celulares detectáveis;
2. A produção de proteína total não foi influenciada significativamente pela irradiação, embora tenha sido observado um discreto aumento com a dose de 2 J/cm² no período de 14 dias;
3. A FBM promoveu a síntese de colágeno de forma significativa apenas com a dose de 6 J/cm², sendo este efeito observado após 14 dias de tratamento;
4. A FBM diminuiu significativamente a síntese de fosfatase alcalina em relação ao controle, em ambos os períodos avaliados, na dose de 6 J/cm²;
5. A formação de matriz mineralizada não foi influenciada significativamente pela irradiação, sendo a dose de 2 J/cm² associada aos maiores valores;
6. A FBM em osteoblastos promoveu migração celular em todas as densidades de energia analisadas, com o grau de fechamento observado na dose de 2 J/cm² significativamente maior.

Referências

- [1] GONÇALVES, A. et al. Optimization of a Photobiomodulation Protocol to Improve the Cell Viability, Proliferation and Protein Expression in Osteoblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts for Accelerated Orthodontic Treatment. *Biomedicines*, v. 12, n. 1, 2024.
- [2] WANG, X. et al. The Effects and Mechanisms of PBM Therapy in Accelerating Orthodontic Tooth Movement. *Biomolecules*, v. 13, n. 7, 2023.
- [3] ALSHAHRANI, I. et al. Photobiomodulation in acceleration of orthodontic tooth movement: A systematic review and meta analysis. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 47, p. 102220, 2019.
- [4] MEME', L. et al. Photobiomodulation to Reduce Orthodontic Treatment Time in Adults: A Historical Prospective Study. *Applied Sciences*, 2022.
- [5] ALMEIDA, L. DE F. D. DE et al. "Metabolism of Odontoblast-like cells submitted to transdermal irradiation with blue and red LED". *Archives of Oral Biology*, v. 83, p. 258–264, 2017.
- [6] DAVOUDI, A.; AMROLAHI, M.; KHAKI, H. Effects of laser therapy on patients who underwent rapid maxillary expansion; a systematic review. *Lasers in Medical Science*, v. 33, n. 6, p. 1387–1395, 2018.
- [7] ROSA, C. B. et al. Laser and LED phototherapy on midpalatal suture after rapid maxilla expansion: Raman and histological analysis. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n. 2, p. 263–274, 2017.
- [8] ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 33, n. 4, p. 183–184, 2015.
- [9] RAHMATI, A. et al. Effect of diode low level laser and red light emitting diode irradiation on cell proliferation and osteogenic/odontogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *BMC oral health*, v. 22, n. 1, p. 543, 2022.
- [10] HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level lighththerapy. *Dose-Response*, v. 7, n. 4, p. 358–383, 2009.
- [11] PANSANI, T. N. et al. Characterization of titanium surface coated with epidermal growth factor and its effect on human gingival fibroblasts. *Archives of Oral Biology*, v. 102, p. 48–54, 2019.
- [12] GREGORY, C. A. et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 329, n. 1, p. 77–84, 2004.
- [13] OLIVEIRA, C. F. et al. In vitro effect of low-level laser on odontoblast-like cells. *Laser Physics Letters*, v. 8, n. 2, p. 155–163, 2011.
- [14] MILHAN, N. V. M. et al. Analysis of indicators of osteogenesis, cytotoxicity and genotoxicity of an experimental β -TCP compared to other bone substitutes. *Acta Scientiarum - Health Sciences*, v. 39, n. 1, p. 97–105, 2017.
- [15] PANSANI, T. N. et al. Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. *Lasers in Medical Science*, v. 32, n. 1, p. 45–52, 2017.

- [16] PANSANI, T. N. Efeito da laserterapia de baixa potência e do fator de crescimento epidérmico sobre a indução do metabolismo celular em superfícies de titânio e zircônia. (F. de O. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Ed.) Araraquara, Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia, Araraquara, 2019.
- [17] PIERFELICE, T. V. et al. Effect of a 5-aminolevulinic acid gel and 660 nm red LED light on human oral osteoblasts: a preliminary in vitro study. *Lasers in medical science*, v. 37, n. 9, p. 3671–3679, 2022.
- [18] BÖLÜKBAŞI ATEŞ, G.; AK CAN, A.; GÜLSOY, M. Investigation of photobiomodulation potentiality by 635 and 809 nm lasers on human osteoblasts. *Lasers in medical science*, v. 32, n. 3, p. 591–599, 2017.
- [19] RENNO, A. C. et al. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomedicine and laser surgery*, v. 25, n. 4, p. 275–280, 2007.
- [20] ATEŞ, G. B. et al. Indocyanine green-mediated photobiomodulation on human osteoblast cells. *Lasers in medical science*, v. 33, n. 7, p. 1591–1599, 2018.
- [21] LI, W.-T.; LEU, Y.-C.; WU, J.-L. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomedicine and laser surgery*, v. 28 Suppl 1, p. S157-65, 2010.
- [22] CARDOSO, M. V. et al. Laser and LED photobiomodulation effects in osteogenic or regular medium on rat calvaria osteoblasts obtained by newly forming bone technique. *Lasers in medical science*, v. 36, n. 3, p. 541–553, 2021.
- [23] HAMBLIN, M. R. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-Response*, v. 9, n. 4, p. 602–618, 2011.
- [24] HAMBLIN, M. R. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS biophysics*, v. 4, n. 3, p. 337–361, 2017.
- [25] DE ARAÚJO, P. P. B. et al. Effects of photobiomodulation on different phases of in vitro osteogenesis. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, v. 23, n. 8, p. 1565–1571, 2024.
- [26] VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, v. 754, p. 144855, 2020.
- [27] NIZET, A. et al. Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease – mineral and bone disorder. *Clinica Chimica Acta*, v. 501, p. 198–206, 2020.
- [28] VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 43, n. 6, p. 415–422, 1999.
- [29] CHINTAVALAKORN, R. et al. In vitro effects of mechanical stimulation and photobiomodulation on osteoblastic cell function: A proof of concept study. *Pediatric Dental Journal*, v. 27, n. 1, p. 29–41, 2017.
- [30] HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and*

Laser Surgery, v. 23, n. 3, p. 251–259, 2005.

- [31] KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. Photochemistry and Photobiology, v. 84, n. 5, p. 1091–1099, 2008.