



**unopar**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**NAYARA TAHIANA CATENACE PEREIRA**

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA  
EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS  
(OFCOLII) SUBMETIDAS À TERAPIA LASER DE BAIXA  
POTÊNCIA**

---

Londrina  
2016

**NAYARA TAHIANA CATENACE PEREIRA**

**ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA  
EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS  
(OFCOLII) SUBMETIDAS À TERAPIA LASER DE BAIXA  
POTÊNCIA**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação (Programa Associado entre Universidade Estadual de Londrina - UEL e Universidade Norte do Paraná – UNOPAR).

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deise A. A. Pires Oliveira

Londrina

2016

NAYARA TAHANA CATENACE PEREIRA

ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS (OFCOLII) SUBMETIDAS À TERAPIA LASER  
DE BAIXA POTÊNCIA

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Programa de Pós-Graduação  
Mestrado em Ciências da Reabilitação (Programa Associado entre  
Universidade Estadual de Londrina [UEL] e Universidade Norte do Paraná  
[UNOPAR]), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre  
conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

---

Prof. Dra. Deise A. A. Pires Oliveira  
(Orientadora)  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof. Dr. Rodrigo Franco de Oliveira  
(Membro Interno)  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Prof. Dra. Luciana Prado Maia  
(Membro Externo)  
Universidade do Oeste Paulista - UNIOESTE

Londrina, 05 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a minha família que sempre está ao meu lado em todos os momentos e decisões da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por iluminar meus passos e guiar meu caminho até a conclusão dessa etapa tão almejada.

A Professora Deise Aparecida de Almeida Pires Oliveira, minha orientadora, por toda confiança, dedicação e paciência na execução deste trabalho.

Ao Professor Rodrigo Franco de Oliveira e Professora Regina Célia Poli Frederico, por todo auxílio e incentivo durante esta trajetória, muito obrigada pelos ensinamentos.

A Professora Cristina Pacheco Soares, que se disponibilizou prontamente em uma parte muito importante da pesquisa, apesar de todos os contratemplos.

A Juliana Serpeloni, Stheace Szezerbaty e Priscila Daniele de Oliveira, companheiras de mestrado, sem vocês não teria conseguido, muito obrigada pelo apoio, pois só vocês sabem o quanto foi difícil para nós, chegarmos até aqui, mas nossa amizade facilitou toda a trajetória tornando-a mais prazerosa, muito obrigada por toda ajuda dentro e fora do laboratório, seja nas atividades ou pelas palavras de conforto e incentivo durante as crises. Vou levá-las eternamente em meu coração.

Ao meu marido João Rodrigues Júnior, obrigada por me apoiar incondicionalmente e me ajudar a torna esse sonho possível, e pela paciência que teve comigo durante esses anos.

Aos meus pais, Elisabete e José Alcione Pereira, vocês são tudo para mim, meus exemplos de garra e dedicação, muito obrigada por tudo que já fizeram e fazem por mim, por todo incentivo nas horas mais difíceis e por tornar minha caminhada mais leve. Sei todo o esforço que fizeram para nos educar, esse trabalho é apenas uma forma de recompensar todo o esforço que fizeram. E ao meu irmão Harrison Pereira, por nunca me deixar desistir ou abater por qualquer obstáculo.

E as meninas do LACCEL, nossa convivência foi extremamente prazerosa, desejo todo sucesso do mundo a todas.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

CATENACE-PEREIRA TAHIANA, NAYARA. **Análise da Proliferação Celular e da Expressão Gênica em Células Osteoblásticas (OFCOLII) submetidas à Terapia Laser de Baixa Potência**, 2015, 70. Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação (programa associado entre a Universidade Estadual de Londrina [UEL] e a Universidade Norte do Paraná [UNOPAR] – Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

## RESUMO

**Introdução:** Uma das formas mais estudadas para a estimulação de células osteoblásticas, tem sido a utilização da Terapia Laser de Baixa Potência (TLPB), porém seus mecanismos ainda permanecem com algumas lacunas. Vários autores relatam que há uma diversidade nos parâmetros em relação ao laser esperando que, uma dose baixa de irradiação apresente resposta estimulatória e em altas dosagens efeito inibitório, havendo divergências nestas respostas. **Objetivo:** O estudo tem como objetivo analisar os efeitos do laser de baixa potência ( $\lambda=904\text{nm}$ ) em diferentes densidades de energia nas células osteoblásticas, avaliando a proliferação celular através do ensaio MTT, função celular em relação às estruturas (núcleo celular e citoesqueleto) pela microscopia de fluorescência e expressão relativa dos genes FA e BMP2. **Métodos:** Foram utilizadas células osteoblásticas OFCOLII, cultivadas em meio DMEM, nas quais foram irradiadas com o laser Arseneto de Gálio  $\lambda=904\text{nm}$ , e subdivididas da seguinte forma: Grupo 1: controle (não recebeu irradiação), Grupo 2:  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , Grupo 3:  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e Grupo 4:  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . Após a irradiação a proliferação celular foi avaliada pelo método MTT, a expressão relativa dos genes FA e BMP2, pela PCR em tempo real, utilizando TaqMan® específicos para cada gene e a microscopia de fluorescência para análise do núcleo e citoesqueleto. **Resultados:** O grupo irradiado com  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentou o melhor resultado no tempo 24 horas ( $p < 0.005$ ) e 48 horas ( $p < 0.001$ ), em relação ao controle e entre os irradiados o grupo  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentou significância no tempo 48 horas ( $p < 0.001$ ). Em relação ao efeito do tempo o grupo  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentou diferença significativa, em comparação dos tempos 24 horas e 48 horas ( $p < 0.011$ ) e 48 horas para 72 horas ( $p < 0.001$ ). Na expressão gênica as células irradiadas apresentaram um aumento de 1,7 nos transcritos do gene BMP2 e diminuição de 5,08 nos transcritos do gene FA quando comparados com o gene endógeno  $\beta$ -actina, já a microscopia de fluorescência observou-se a evolução apresentada nas células irradiadas em comparação com o controle, onde células irradiadas apresentaram crescimento ao longo do tempo, citoesqueleto bem evidenciado e aumento de micronúcleos, caracterizando o início da proliferação celular. **Conclusão:** A Terapia Laser de Baixa Potência mostrou-se eficaz na estimulação de células osteoblásticas nas dosagens utilizadas, obtendo o melhor resultado em relação à proliferação celular e estimulação das organelas com  $5\text{J}/\text{cm}^2$  no tempo de 48 horas. As células OFCOLII modularam positivamente a BMP2, sendo que a FA modulou negativamente no tempo de clivagem da PCR, quando comparados com o grupo controle (não-irradiado).

**Palavras-chave:** Laser de Baixa Potência, osteoblastos, proliferação celular

CATENACE-PEREIRA TAHIANA, NAYARA. **Analysis of Cellular Proliferation and Genic Expression in Osteoblastic Cells (OFCOLII) Subjected to Low-Level Laser Therapy**, 2015, 70. Dissertation for the Post-graduate Program of Sciences for Rehabilitation (associate program between Universidade Estadual de Londrina [UEL] and Universidade Norte do Paraná [UNOPAR] - Universidade Norte do Paraná, 2015.

### Abstract

**Introduction:** One of the most studied forms for stimulation of osteoblastic cells has been the utilization of Low-Level Laser Therapy (LLLT), however its mechanisms still maintain some blanks. Various authors report that there is a diversity in the parameters related to the laser, expecting a low dose of radiation to present a stimulatory response and high dosages, inhibitory effect, nevertheless discrepancies in these responses occur. **Objectives:** The study aims to analyse the effects of the low-level laser ( $\lambda$  904nm) in different densities of energy in osteoblastic cells, evaluating the cellular proliferation by means of the MTT study, cellular function related to structures (cell nucleus and cytoskeleton) through fluorescence microscopy and relative expression of the genes AF and BMP2. **Methods:** OFCOLII osteoblastic cells were utilized, cultivated in DMEM medium, which were irradiated with gallium arsenide laser  $\lambda=904\text{nm}$ , and subdivided the following way: Group 1: control (non-irradiated), Group 2:  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , Group 3:  $4\text{J}/\text{cm}^2$  and Group 4 :  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . After irradiation, the cellular proliferation was evaluated by MTT method, the relative expression of the AF and BMP2 genes, by PCR in real time, using TaqMan® specific for each gene and fluorescence photomicrography to analyse the nucleus and the cytoskeleton. **Results:** The group irradiated with  $5\text{J}/\text{cm}^2$  presented the best result in a 24-hour time period ( $p<0.005$ ) and 48-hour ( $p<0.001$ ), related to the control group, and among the irradiated, the  $5\text{J}/\text{cm}^2$  group presented significance in the 48-hour time period ( $p<0.001$ ). In relation to the time effect, the group  $5\text{J}/\text{cm}^2$  presented significant difference in the comparison between the 24 and 48-hour time period ( $p<0.011$ ) and between 48 and 72-hour time period ( $p<0.001$ ). In the genic expression, the irradiated cells presented a 1.7 increase in the transcription of the BMP2 gene and a 5.8 decrease in the transcription of the AF gene when compared to the endogenous  $\beta$ -actin gene. Concerning the fluorescence microscopy, the irradiated cells presented an evolution compared to the control, when the irradiated cells exhibited subsequent growth, well-evidenced cytoskeleton, and enlargement of the micronucleus, characterizing the beginning of cellular proliferation. **Conclusion:** The Low-Level Laser Therapy has shown to be effective in the stimulation of osteoblastic cells in the dosages utilized, obtaining the best result concerning the cellular proliferation and organelles stimulation, with  $5\text{J}/\text{cm}^2$  in a 48-hour time period. The OFCOLLI cells modulated the BMP2 positively, while the AF modulated negatively at the time of the PCR cleavage, when compared to the control group (non-irradiated).

**Key-words:** Low-Level Laser, osteoblasts, cellular proliferation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células que compõe o tecido ósseo.....	15
Figura 2 - Característica da luz laser - Monocromaticidade.....	16
Figura 3 - Característica da luz laser - Coerência.....	17
Figura 4 - Característica da Luz Laser - Colimação.....	17
Figura 5 - Espectro eletromagnético para comprimento de onda.....	18
Figura 6 - Interações da luz com a matéria.....	19
Figura 7 - Profundidade de penetração dos diversos comprimentos de.....	20
onda.	

## LISTA DE ABREVIATURA OU SIGLAS

AB - Alamar Blue

AsGa – Laser Arseneto de Gálio

AsGaAl – Laser Arseneto de Gálio e Alumínio

ATP – Adenosina – trifosfato

BMP's – Proteínas Morfogenéticas Ósseas

CB - Commassie Azul

De – Densidade de Energia

ELISA – Leitor de Microplaca

FA – Fosfatase Alcalina

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

HeNe – Hélio Neônio

IGF – Fator de crescimento de insulina

J – Joules

LASER - Light Amplification By Stimulated Emission of Radiation

LDH - Enzimas Lactato Desidrogenase

MTT - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide]

nm – Nanômetros

NR - Vermelho Neutro

PCR – Reação da Cadeia em Polimerase

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

TLBP – Terapia Laser de Baixa Potência

TGF- $\beta$ 1–Fator de Crescimento Beta 1

## **SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Tecido Ósseo	14
3.2 Características Básicas do Laser	15
3.3 Laser de Baixa Potência	20
3.3.1 Efeitos do Laser de Baixa Potência	22
3.4 Laser de Baixa Potência e seus Efeitos na Osteogênese	22
3.5 Instrumentos de Avaliação	26
3.5.1 Avaliação do Crescimento em Cultura	26
3.5.2 Microscopia de Fluorescência	27
3.5.3 Expressão Gênica	27
4 ARTIGO	29
5 CONCLUSÃO GERAL	50
6 REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	56
ANEXO A	57
ANEXO B	60

## 1 INTRODUÇÃO

As células osteoblásticas, responsáveis pela formação de matriz óssea consiste num espectro de células osteoprogenitoras derivadas de células estaminais mesenquimais que se diferenciam para a formação de osso maduro, porém sua função não fica restritiva apenas a formação óssea, estas células são responsáveis pela manutenção de outros sistemas fisiológicos como a eritropoiese e modulação das funções endócrinas do osso, entre outras. Portanto este sistema se torna alvo de inúmeras pesquisas, contribuindo no tratamento de diversas patologias. (PAGIN, et al, 2014, CALABRESE, et al, 2012)

Essas células são responsáveis pela remodelação óssea, atividade fisiológica constante em seres humanos em qualquer fase da vida, porém, este processo está suscetível a agressões externas diversas, que podem influenciar no equilíbrio dessa atividade, alterando o processo de remodelação. (CALABRESE, et al, 2012)

O processo de remodelação óssea é mediado por diferentes ações enzimáticas e macronutrientes como o cálcio e o fósforo em condições normais. A Terapia Laser de Baixa Potência (TLBP) potencializa essas ações por ser considerado um fotoativador, podendo assim haver aumento significativo dessas reações enzimáticas e a formação de matriz óssea por elevação da atividade osteoblástica. (SILVA, ANDRADE, 2012).

Uma das formas mais estudadas para a estimulação de células osteoblásticas, tem sido a utilização da fototerapia com TLPB, porém seus mecanismos ainda permanecem com algumas lacunas. Vários autores relatam que há uma diversidade nos parâmetros em relação ao laser esperando que, uma dose baixa de irradiação apresente resposta estimulatória e em altas dosagens efeito inibitória, havendo divergências nestas respostas, porém é de consenso que a TLBP possui grande valor na área da saúde (medicina, odontologia e fisioterapia) principalmente, pelo seu efeito de estimulação da proliferação e diferenciação das células ósseas. (WALTER, et al, 2015; PARENTI, et al, 2014; PACHECO, et al, 2013; PAGIN, 2012)

Khadra, et al, (2005) realizaram estudo utilizando a TLBP, 830 nm, dose 1,5 e 3 J/cm<sup>2</sup> na proliferação e diferenciação de células

osteoblásticas humanas cultivadas (célula HOB), e observaram que as células cultivadas em material de implante de titânio apresentaram uma tendência para o aumento da ligação celular, a proliferação, diferenciação e a produção do gene transformador do fator de crescimento - TGF-  $\beta$ 1 (peptídeo multifuncional que controla a proliferação), indicando que, em estudos - *in vitro* a TLBP pode modular a atividade de células e tecidos circundantes do material de implante.

De acordo com Khadra, et al, (2005), Saraiva e Castro, (2002), a correlação nos achados clínicos (aumento da adesão celular, proliferação, diferenciação e a produção de TGF-  $\beta$ 1) após a utilização da TLBP em osteoblastos, é decorrente dos efeitos bioestimulatórios na cicatrização, mineralização e aumento da síntese de colágeno *in vivo* quanto *in vitro*.

Atualmente, atenção tem sido focada nos efeitos da irradiação no tecido ósseo, sendo esta terapia reportada nos efeitos bioestimulatórios nas diferentes células e organelas, apresentando efetividade na estimulação e proliferação celular óssea, aumentando a atividade osteoblástica no local da fratura e contribuindo para a aceleração da consolidação das mesmas. A proliferação de células osteoblásticas, em particular, é de grande interesse clínico e na regeneração da perda óssea. (OLIVEIRA, et al, 2010)

Mediante este fato, observa-se que o laser é um recurso físico bastante utilizado. Entretanto há diversidade em relação a parâmetros e respostas celulares, assim sendo qual a ação da TLBP em células osteoblásticas? Portanto, avaliar os recursos físicos e aplicabilidade de técnicas que aumentem a atividade osteogênica faz-se necessária, pois apresentam grande efeito sobre patologias que agridem e afetam diretamente o sistema esquelético, possibilitando assim um menor tempo de recuperação, e a onerosidade causada pelo tratamento convencional.

Diante do exposto, os resultados dessa pesquisa nortearão para o incremento do processo de estimulação e proliferação de células osteoblásticas a partir da TLBP, avaliando o efeito do Laser 904 nm nas diferentes densidades de energia, observando a modulação na expressão dos genes Proteína Morfogenética Óssea 2 (BMP2) e Fosfatase Alcalina (FA), correlacionando assim com reparo ósseo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos do laser de baixa potência (904nm) em diferentes densidades de energia na proliferação celular, na função celular e a expressão gênica em cultura celular de osteoblastos.

### 2.2 Objetivos Específicos

Comparar o efeito das diferentes densidades de energia (dE) em cultura osteoblástica, avaliando a proliferação celular;

Avaliar o efeito do Laser 904 nm na função celular em relação à organela e estrutura (núcleo e citoesqueleto);

Analisar o efeito do laser 904nm na expressão gênica da Proteína Morfogenética Óssea 2 (BMP2) e Fosfatase Alcalina (FA);

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

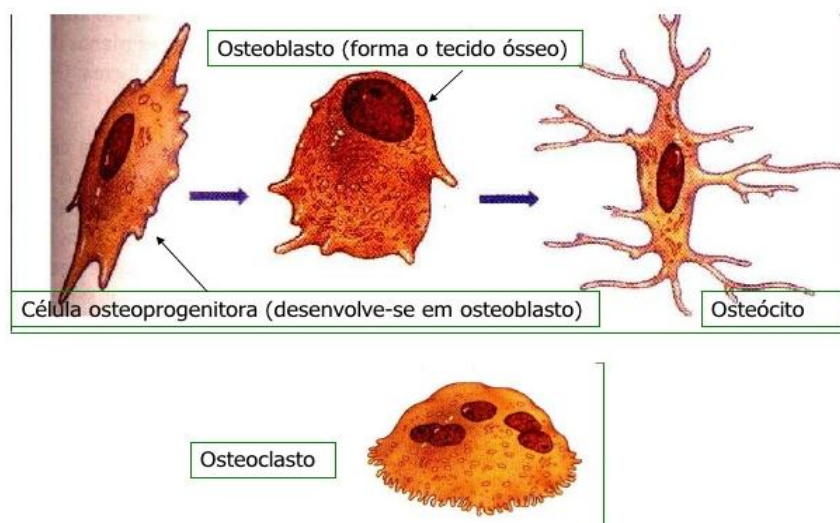
#### 3.1 Tecido Ósseo

O osso é um tecido mineralizado que confere múltiplas funções mecânicas e metabólicas ao esqueleto, este tecido sofre intensas modificações, porém caracteriza-se por ser rígido e resistente. Possui dois tipos de células distintas, os osteoblastos, ou células formadoras de matriz óssea, consideradas células jovens, e os osteoclastos, células polinucleares, localizadas nas superfícies das trabéculas ósseas e participam do processo de reabsorção do tecido ósseo. (DUCY, 2000)

As células osteoblásticas são células responsáveis pela formação do tecido ósseo. Caracterizam-se por possuir grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, sendo assim, sintetizam os componentes de matriz orgânica e controlam a mineralização dessa matriz. (ANDRADE, 2007)

Já os osteoclastos, são células encarregadas de realizar a reabsorção da matriz óssea e originam-se de monócitos hematopoiéticos e macrófagos. São células multinucleadas que contêm alta concentração de mitocôndrias. (AMADEI, et al, 2006)

Figura 1: Células que compõe o tecido ósseo



Fonte: <http://pt.slideshare.net/arvoredenoz/histologia-animal-9012496> Acesso em

10/12/2015.

Os avanços nas pesquisas contribuíram para o melhor entendimento sobre a regulação no processo de remodelação, já que a estrutura óssea é um tecido extremamente ativo, onde essa atividade é primariamente voltada para o crescimento e a modelação óssea, até atingir sua forma e seu tamanho, onde no adulto, a atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação. (VIEIRA, et al, 1999)

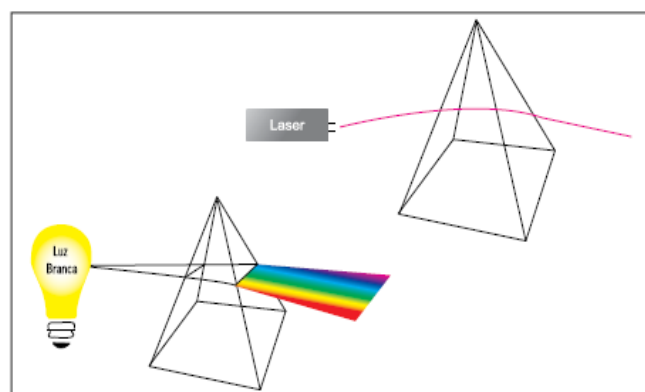
### 3.2 Características Básicas do Laser

O laser é uma luz amplificada produzida por radiação eletromagnética que se manifesta como luz monocromática além de apresentar ondas no mesmo comprimento e nas mesmas fases ondulatórias, portanto, somam energia. E para atingir determinadas camadas ocorrerá uma variação de intensidade e tempo de aplicação do laser diferentemente a luz branca (policromática) emitida pelas lâmpadas comuns (incandescentes), que não possui características específicas. (ROCHA, 2004)

Conforme Kushibiki (2013) e Genovese (2000), a radiação eletromagnética que é relativamente uniforme no comprimento de onda, fase e polarização, apresenta características importantes, que a diferenciam de outras fontes luminosas, que são elas:

A - Monocromaticidade: que significa cor pura produzida por um único comprimento de onda e feixe de luz, sendo a luz laser, composta por fótons, devida a absorção seletiva do tecido humano. (NEVES, et al, 2005, GENOVESE, 2000)

Figura 2: Característica da luz laser - Monocromaticidade

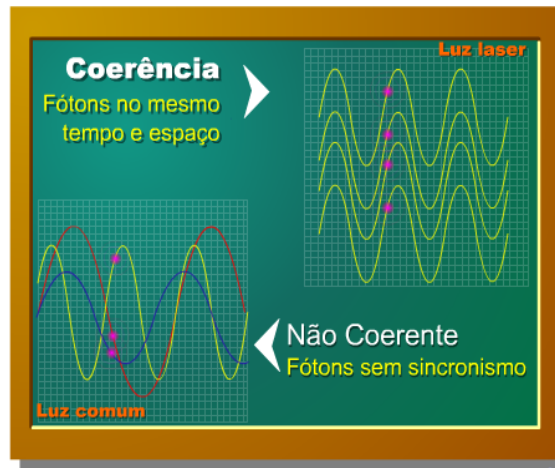


(NEVES, et al, 2005)



B - Coerência: ondas ordenadas e de mesma amplitude, mantido ao longo do tempo e espaço. (NEVES, et al, 2005)

Figura 3 – Característica da Luz Laser - Coerência



O laser possui comprimentos e ondas coerentes no tempo e espaço, diferentemente da luz comum que possui comprimentos de ondas incoerentes no tempo e espaço

Fonte: [http://www.nupen.com.br/Revista\\_port/fund\\_fisicos1.php](http://www.nupen.com.br/Revista_port/fund_fisicos1.php) Acesso em 10/12/2015.

C - Colimação: ondas unidirecionais que não sofrem atenuação ao se propagar no espaço. A luz laser possui uma pequena divergência angular, porém a energia concentra-se precisamente em um ponto focal. (NEVES, et al, 2005)

Figura 4: Característica da Luz Laser - Colimação

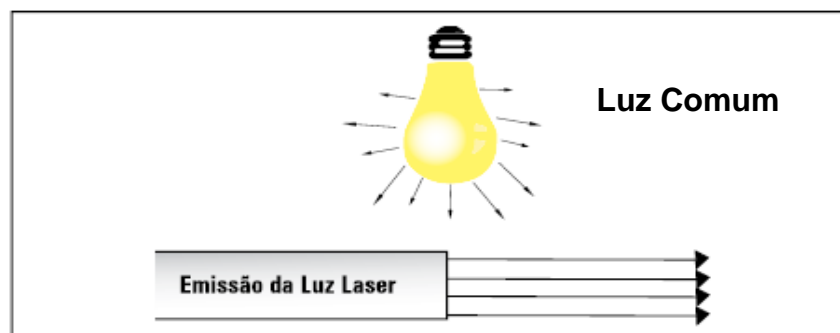
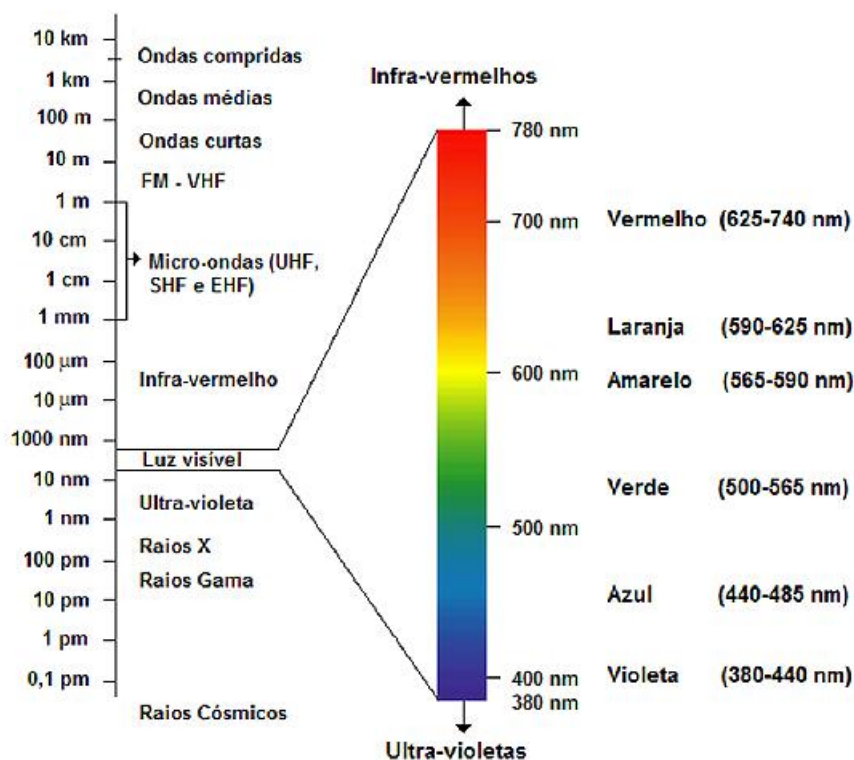


Figura 3: Luz natural não-colimada (divergente), luz laser de unidirecionalidade ou colimação, paralela ao tubo onde é produzida (NEVES, et al, 2005)

A diferença entre os vários tipos de *lasers* é dada pelo espectro eletromagnético para o comprimento de onda, ou seja, cada laser possui um comprimento de onda específico, que é dada pela cor do feixe, onde na faixa de 340 a 780 nm são considerados visíveis (vermelho), e acima de 790 nm, invisíveis (infra-vermelho). (ROCHA, 2004)

Figura 5: Espectro eletromagnético para comprimento de onda



FONTE: [http://ctborracha.com/?page\\_id=1646](http://ctborracha.com/?page_id=1646) acesso em 20/10/2015

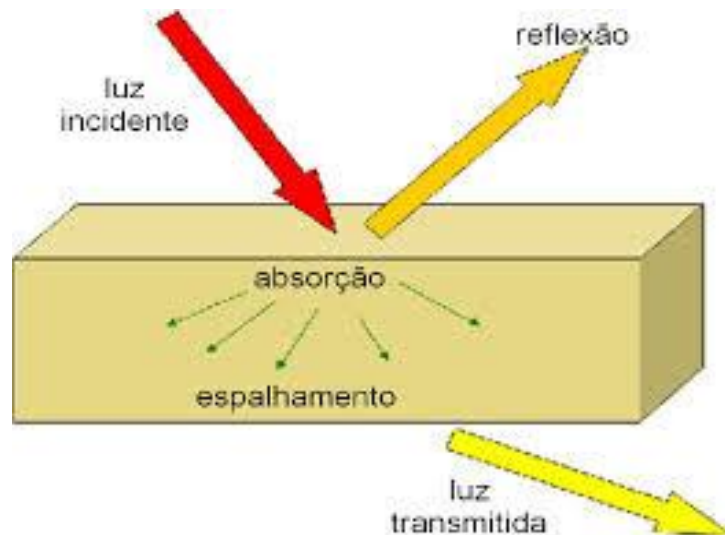
Porém para que ocorram os efeitos do laser no tecido biológico a radiação eletromagnética, ao incidir sobre um tecido, essa energia pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada. (ROCHA, 2004)

Dessa forma, a reflexão ocorre quando a irradiação atinge a superfície do tecido, fazendo com que parte desta irradiação retorne na direção da fonte de excitação sem interagir com o tecido. (CAVALCANTI, et al, 2011)

Assim, a energia transmitida é definida como sendo aquela que atravessa o tecido, sem sofrer atenuação, quando absorvida essa irradiação pelos tecidos biológicos, os mesmos transformam em outras fontes de energia (calor, química, etc.), provocando por sua vez seus efeitos sobre o tecido, porém estes são propagados para as estruturas ao redor. O espalhamento em

tecidos biológicos é máximo, quando o tamanho da partícula é da mesma ordem de grandeza do comprimento de onda da radiação incidente. (CAVALCANTI, et al, 2011, GENOVESE,2000)

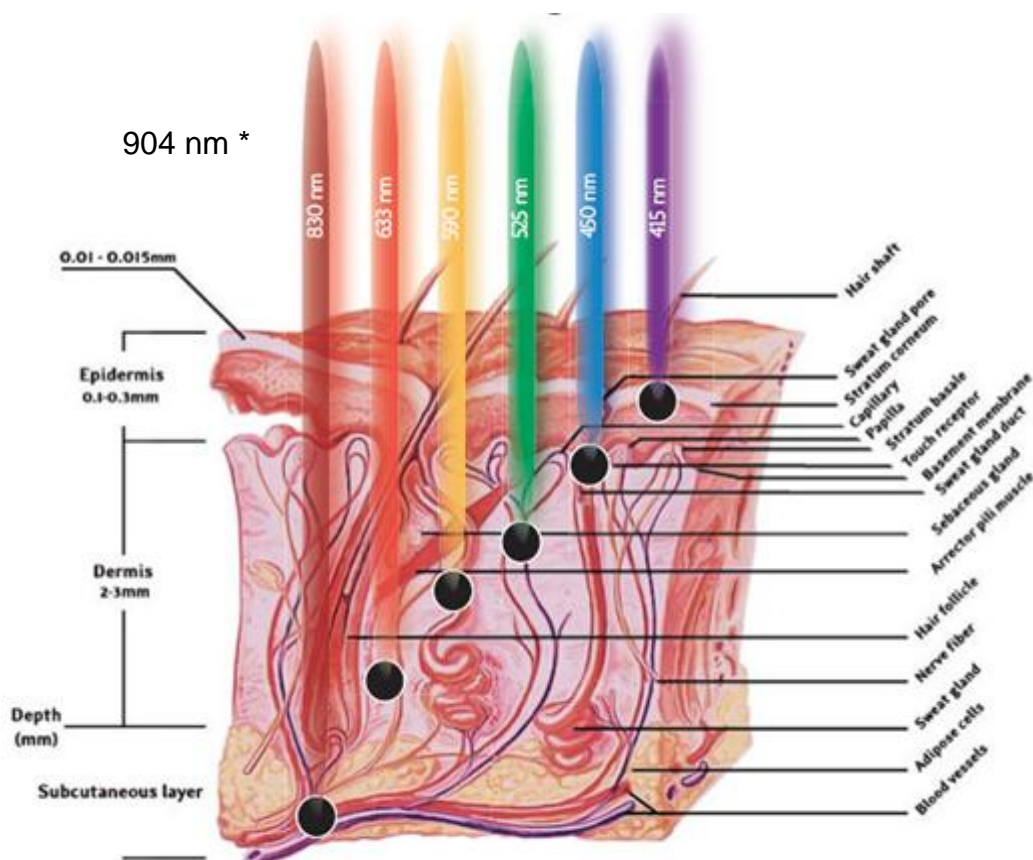
Figura 6 - Interações da luz com a matéria



Fonte: Genovese (2000)

Em relação à profundidade de penetração da energia do laser nos tecidos este depende da absorção e da dispersão. Quanto maior o comprimento de onda, mais profunda será sua absorção, pois a dispersão das ondas é inversamente proporcional ao comprimento de onda. (CAVALCANTI, et al, 2011)

Figura 7: Profundidade de penetração dos diversos comprimentos de onda



Fonte: disponível em: <http://www.brightenyourmood.com/how-does-led-light-therapy-work/> em 11/10/15.

Os *lasers* terapêuticos são atérmicos, fazendo com que a energia fotônica seja transferida diretamente nas células alvos, sem que ocorram danos causados pela temperatura. Os efeitos da fototerapia, observada na “janela terapêutica” que utiliza o comprimento de onda entre 630 a 905 nm, são classificados em primários, que são os efeitos induzidos pela luz (absorção dos fótons), já os secundários, ocorrem em resposta aos efeitos primários (mas dependem da sensibilidade das células), e por último os efeitos terciários, menos previsíveis uma vez que a resposta é influenciada pelo ambiente interno e externo e pela interação intracelular. (HAWKINS, ABRAHAMSE, 2007)

Esse recurso tem baixa energia, ausência de potencial fototérmico e seus fótons de energia é inferior as ligações das moléculas biológicas e do ácido desoxirribonucléico (DNA) (NOGUEIRA, et al, 2009).

Dessa maneira os efeitos iniciais da interação entre o laser e o tecido biológico podem provocar a liberação de substâncias pré-formadoras, como a histamina, serotonina, bradicinina, e modificar reações enzimáticas normais, acelerando ou retardando estas reações. (PIVA, et al, 2011)

### 3.3 Laser de Baixa Potência

Os processos de reparação dos tecidos estão sendo estudados há alguns anos, os quais avaliam os efeitos dos mais variados recursos, como o próprio laser, ultrassom terapêutico, que podem ser utilizados para auxiliar ou acelerar este processo que decorrem por traumas ou doenças, por estimulação de suas células auxiliando a reparação. (ANDRADE, CLARK e FERREIRA, 2014)

A duração deste processo varia de organismo para organismo, porém o Laser de Baixa Potência vem auxiliando na aceleração do processo de reparação nos mais variados tecidos, sendo este recurso primeiramente descrito por Albert Einstein, em 1917, o qual relatou os princípios físicos da radiação do laser e classifica-os como “alta potência” (potencial destrutivo), “baixa potência” (sem potencial destrutivo). (JUNIOR, et al, 2006)

Einstein descreveu o laser, como a amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, originando o acrônimo de **L**ight **A**mplification **B**y **S**timulated **E**mission of **R**adiation- LASER (Pais, 2005). Sendo uma forma de energia que se transforma em energia luminosa visível (vermelho) ou não (infravermelho), dependendo da matéria que produz este tipo de radiação. (GENOVESE, 2000)

Essa terapia foi utilizada primeiramente por Mester, que usou o laser de Argônio de 488 nm e 515 nm. Subsequente foi introduzido o Hélio-Neônio (HeNe), laser que emite luz vermelha com comprimento de onda de 632,8 nm, substituído por um aparelho de preço mais reduzido, mais potente, o laser de diodo, com comprimento de onda de 660-950 nm. (LUCA, et al, 2000)

De acordo com Karu (1988), os mecanismos de ação do laser na região do vermelho e infravermelho diferem em relação às células, porém na clínica os resultados são similares. Desde sua criação o laser vem sofrendo várias modificações e adaptações, para que seu uso possa ser expandido para

as mais diversas áreas como na medicina, odontologia e fisioterapia (HUERTAS, et al, 2014).

Nissan et al, (2006) relatam que o uso do laser Arseneto de Gálio  $\lambda=904\text{nm}$  (AsGa) na faixa do infravermelho o qual apresenta um maior poder de penetração, e tem aumentado nos últimos 10 anos, quando comparado com outros tipos de *lasers*, tornando-se assim um recurso indispensável na terapia de reabilitação.

Diferentes tipos de lasers têm sido utilizados para obter diferentes efeitos bioestimulatórios: Rubi, Hélio Neônio (He-Ne), Arseneto de Gálio e Alumínio e Arseneto de Gálio (AsGaAl, AsGa) entre outros; administrados como contínuos e pulsados. Entretanto o efeito biológico da irradiação laser dependerá de suas especificações como: comprimento de onda, potência e densidade energia. (PEPLOW et al, 2011, NINOMIYA et al, 2007, SATO et al, 2001)

Dentre a gama de recursos utilizados pela fisioterapia a TLBP é considerada um recurso eletrofísico de fundamental importância em diversos tratamentos, principalmente em lesões do sistema músculo-esquelético, cessando o processo inflamatório, auxiliando na neoangiogênese, proliferação epitelial, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração da ferida. (SILVA; ANDRADE, 2012, MARZULLO, et al, 2006)

Estudos experimentais e clínicos utilizando o laser de baixa potência têm mostrado a eficácia no tratamento de inflamação e no alívio da dor, além disso, modula processos metabólicos celulares, reforçando assim o potencial biológico regenerativo dos tecidos. (NOGUEIRA, 2009)

Os *lasers* são classificados em duas categorias: alta potência, considerados cirúrgicos, são aplicados para a remoção, corte e coagulação de tecidos, enquanto que os *lasers* de baixa potência são mais comumente aplicados em processos de reparação tecidual, tais como traumatismos musculares, articulares, nervosos, ósseos e cutâneos e baixa potência, reduzindo a dor, prevenindo o edema e preservando estruturas adjacentes a lesão. (ANDRADE; CLARK e FERREIRA, 2014, HECKLER; BARBERINI e AMORIM, 2014)

### 3.3.1 Efeitos do Laser de Baixa Potência

Genovese (2000) relata que para a radiação emitida pelo laser cause algum efeito sobre o tecido, é necessário que o mesmo consiga penetrar e causar reações específicas nas células e suas estruturas. Após a aplicação e a absorção dessa energia pelo corpo humano a mesma se transforma em outro tipo de energia ou efeito biológico que são os efeitos primários e classificados em:

Efeito bioquímico: o laser é capaz de controlar a liberação de substâncias ligadas a dor e inflamação, como as prostaglandinas, prostaciclina, histaminas, etc. Além de modificar reações enzimáticas normais, excitando ou inibindo-as. A radiação ainda exerce estímulo na produção de adenosina trifosfato (ATP) no interior das células, aceleração da assim o processo de mitose.

Efeito bioelétrico: a radiação ajuda a normalizar o potencial da membrana, atuando como reequilibrante e normalizador da atividade funcional da célula, pois de forma direta, o laser atua na mobilidade iônica, e de forma indireta, aumentando a quantidade de ATP produzida pela célula.

Efeito bioenergético: o laser proporciona as células, tecidos e organismos, uma energia válida que estimula, em todos os níveis, o trofismo, normalizando as deficiências e equilibrando as desigualdades.

### 3.4 Laser de Baixa Potência e seus Efeitos na Osteogênese

O tecido ósseo tem por principal função a estruturação e sustentação do corpo como um todo, além disso, é responsável pela inserção do sistema muscular, promovendo dessa forma o movimento humano e a produção de células específicas. O mesmo está sujeito a diversas alterações na sua estrutura, que dependendo do agente agressor pode causar patologias específicas do sistema esquelético ou fraturas consideradas como as principais complicações, que resultam de um trauma de alta intensidade colapsando este tecido. (SARAIVA e CASTRO, 2002)

Carvalho, et al, (2002), relatam que terapias que estimulem a osteogênese, a fim de diminuir o tempo da consolidação óssea total, são de

fundamental importância, neste caso, o laser é um recurso que vem demonstrando efeitos positivos na proliferação de células ósseas e no processo de consolidação de fraturas em animais, mas apresenta efeitos nos mais diversos tecidos corporais, como tecido neural, muscular, tendões e cartilagens, aumentando a síntese e remodelação de colágeno e fibroblastos necessários para a recuperação dessas lesões (FEITOSA, et al, 2007)

A remodelação é um fenômeno que nos acompanha ao longo da vida, sendo fundamental para renovação do esqueleto e preservação de sua qualidade, ocorre através de ciclos onde apresentam células específicas que incluem osteócitos, osteoclastos e osteoblastos que possuem uma atividade constante e independente, qualquer alteração nesse ciclo acarretará em dano estrutural ao tecido ósseo (DUCY, 2000). Em relação à TLBP, o autor relata que a elevação da atividade mitótica, diminuindo assim o tempo de recuperação de uma fratura.

Os efeitos fotobiomoduladores da TLBP (Karu, 2004) são investigados desde 1971, no qual verificaram os benefícios no tratamento de problemas inflamatórios, pois a absorção da luz laser, age em diferentes organelas, estimulando várias respostas celulares criando mudanças anti-inflamatórias e regenerativas. (ALTAN, et al, 2015)

Brondon, et al, (2005) relatam que estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado que a TLBP exerce influência significativa sobre a função celular (organização do citoesqueleto, atividade mitocondrial e estimulação da membrana plasmática).

Huertas, et al (2014), utilizaram o laser  $\lambda=904\text{nm}$  em células MG-63 (linhagem osteoblástica humana) e observaram que a irradiação laser tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*, demonstraram efeito biomodulador em diferentes intensidades. A TLBP pode exercer uma bioestimulação no metabolismo celular dessas células em diferentes níveis, sendo clinicamente útil para a regeneração do tecido ósseo.

Oliveira, et al, 2008, sugerem que nas células osteoblásticas irradiadas com o laser na faixa do infravermelho (830nm), as mesmas apresentaram uma alta atividade mitocondrial, indicando a necessidade de energia para a síntese de proteínas e a duplicação do material genético, demonstrando que o laser foi capaz de biomodular estas células.



Todavia, Silva (2009) relata que a irradiação do laser é absorvida pela célula através dos citocromos na mitocôndria, atuando na síntese de proteína e a aceleração ou a estimulação da proliferação celular. E mesmo irradiando numa densidade de energia baixa, este apresenta resposta de biomodulação diretamente nas células alvo, com força suficiente para a estimulação da membrana e suas organelas. Porém, a magnitude do efeito biomodulatório do laser depende do estado fisiológico da célula e dos parâmetros utilizados do laser, dessa forma explica porque este efeito nem sempre é detectado e há variações de respostas encontradas na literatura. (KARU 1988)

A estimulação causada pelo laser é resultante de diversos mecanismos já citados, provocando nas células, respostas específicas como o aumento de fatores de crescimento dentro das células, aumento da síntese de proteínas e de ATP, conseqüentemente estimulado a proliferação celular. (PEOPLOW, et al, 2011)

Pyo, et al, (2013) e Andrade (2007) atribuem o efeito biomodulador do laser sobre os osteoblastos no aumento da expressão da proteína morfogenética óssea (BMP2) e a transformação do fator de crescimento (TGF- $\beta$ 1), fatores que regulam a proliferação e diferenciação de osteoblastos, entre outros fatores.

As BMP's são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação, essa atividade osteoindutiva das proteínas somada à sua presença no tecido ósseo sugere que elas são importantes reguladoras no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos. (SANTOS, et al, 2005)

As células osteoblásticas, apresentam alta capacidade de proliferação e diferenciação, essas células consideradas osteogênicas estão presentes na medula, endóstio e perióstio, e para que ocorra sua estimulação as mesmas são dependentes da liberação de proteínas morfogenéticas, além de fatores de crescimento específicos, como fator de crescimento de semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). (ANDRADE, et al, 2007)

Fujimoto, et al(2005), realizaram um estudo utilizando o laser Arseneto de Gálio e Alumínio - GaAlAs ( 0,96 e 3,82 J/cm<sup>2</sup>) em células MC3T3-E1, e avaliaram a expressão das proteínas morfogenéticas e fatores de transcrição. Após a irradiação observaram o aumento significativo na expressão das BMPs e seus fatores, concluindo que a terapia com laser (na faixa do infravermelho) foi capaz de aumentar a mineralização *in vitro* e o teor de cálcio na cultura dessas células, pela estimulação das BMP's associadas a diferenciação osteoblástica.

Da mesma forma Wu, et al (2012), avaliaram a ocorrência de proliferação e diferenciação de células tronco-mesenquimais (D1) após a irradiação com laser GaAlAs (doses 0,1, 2 e 4 J/cm<sup>2</sup>), por meio de fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1) e proteína morfogenética 2 (BMP2), onde independente da dose foi observado aumento na expressão dos marcadores osteogênicos, portanto a TLBP é capaz de promover a melhora da diferenciação osteogênica pela estimulação desses marcadores.

Estudos investigam como a TLBP, atua em células osteoblásticas, efeitos como a proliferação, amadurecimento dessas células como também o aumento da mineralização, possivelmente causados pelo aumento de fatores de crescimento, aumento na expressão de proteínas morfogenéticas (PYO, et al, 2003), fosfatase alcalina (SOLEIMANI, et al, 2012), osteocalcina (PETRI, et al, 2013), dentre outros.

Sendo assim a TLBP apresenta diversas possibilidades de aplicação em traumatologia-ortopedia, pois se sabe que a osteogênese trata-se de um processo complexo e que depende de diversos fatores, a integridade e estimulação desses processos, onde através da TLBP acarretará em reações específicas estimulando o processo de recuperação tecidual, sendo capazes de estimular células específicas que induzem a diferenciação celular, reparando o tecido ósseo e estimulando a neoformação óssea, indicadas para grandes perdas de massa óssea, traumas ou doenças inflamatórias e infecciosas. (OLIVEIRA, et al, 2008, SANTOS, et al, 2005, CARVALHO, 2002)

Portanto terapias que auxiliem o processo regenerativo tornam-se ferramentas úteis na prática clínica, o laser de baixa potência vem apresentando efeitos positivos em células ósseas, promovendo o crescimento

e maturação de osteoblastos, podendo interferir no tratamento de patologias ósseas. (HUERTAS, et al, 2014<sub>a</sub>, HUERTAS, et al, 2014<sub>b</sub>)

### 3.5 Instrumentos de Avaliação

#### 3.5.1 Avaliação do Crescimento em Cultura

A maioria dos ensaios de viabilidade celular *in vitro* é utilizada para avaliar a citotoxicidade, proliferação de células determinando o número de células viáveis, entre outros, ensaios estes que utilizam reagentes colorimétricos como, ensaio de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide], Vermelho Neutro (NR), Commassie Azul (CB), Alamar Blue (AB) e das Enzimas Lactato Desidrogenase (LDH) (SNIADOCKI, et al, 2005).

Estes ensaios são baseados na absorção óptica e avaliam a função celular por uma redução detectável de um produto por enzimas específicas (ELISA – Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay), determinando assim atividades fisiológicas vitais. (RISS, et al, 2015)

Há uma variedade de compostos de tetrazólio que têm sido utilizadas para detectar células viáveis. O MTT é carregado positivamente e penetra prontamente nas células eucarióticas viáveis. O ensaio de MTT quantifica, portanto, a taxa de proliferação celular. (RISS 2015, TAKANASHI, 2002)

O ensaio colorimétrico quantitativo mede sobrevivência e proliferação, pois o anel de tetrazólio é clivado na mitocôndria ativa, por conseguinte, é utilizado para medir citotoxicidade, proliferação ou ativação, os resultados podem ser lidos num espectrofotómetro de varrimento com múltiplas cavidades (Leitor de ELISA) e apresenta um elevado grau de precisão. (MOSMANN, 1983)

As células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT num produto formazana roxo. Quando as células morrem, perdem a capacidade de converter MTT em cristais de formazana, portanto, a cor serve como um marcador útil apenas as células viáveis. (RISS, 2015)

### 3.5.2 Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência, técnica frequentemente utilizada pela sua especificidade e fácil manipulação, baseia-se nos mesmos princípios da microscopia óptica comum, com diferenças na gestão e concepção relacionadas com a geração e comprimentos de onda de transmissão adequado os fluorocromos, corantes utilizados para fazer ligações com células vivas. (MOREIRA e LINS, 2010)

O processamento de imagem por fluorescência usa iluminação de alta intensidade para excitar as moléculas fluorescentes na amostra, sendo que a evolução da microscopia passou a utilizar *lasers* potentes e ópticos estáveis, além de novas moléculas fluorescentes capaz de marcar processos celulares específicos. Estes procedimentos permitem obter imagens tridimensionais e processo de distribuição de moléculas específicas em células vivas através da utilização de técnicas não invasivas. (CARDOZA, 2005)

Esta técnica mostra ser uma ferramenta versátil, para um vasto campo de aplicações, podendo ser utilizada no estudo de interações moleculares, em biologia celular, em bioquímica, entre outras. É uma técnica não invasiva que apresenta vantagem em relação a outros métodos de investigação, pois sua sensibilidade, rapidez e segurança para a obtenção dos resultados não afetam as amostras durante o processo. (REICHAM, et al, 2000)

### 3.5.3 Expressão Gênica

A expressão gênica é o processo pelo qual a informação a partir de um gene é usada na síntese de um produto funcional, geralmente proteínas. Ao analisar a expressão gênica, através da técnica baseada no princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual multiplica ácidos nucléicos e quantifica o DNA obtido, investigamos as mudanças na expressão de um gene ou conjunto de genes medindo a quantidade específica do gene de transcrição. (PYO, et al, 2003; PETRI, et al, 213)

Abordagens genéticas, bioquímicas e moleculares têm sido utilizadas na última década para identificar muitos dos genes que são necessários para proliferação, diferenciação e apoptose das células, entre elas os osteoblastos. Em muitos casos, o conhecimento adquirido sobre como os genes interagem em redes vai além do que pode ser aprendido sobre um processo utilizando apenas as abordagens tradicionais. (CALABRESE, et al, 2012)

Sabe-se que a utilização de *lasers* específicos, causam respostas na atividade celular, como sinalizadores das células expostas a radiação, possibilitando a avaliação dessas respostas, auxiliando no desenvolvimento e resolucioando os mecanismos nos quais essa terapia auxilia o processo de remodelação, podendo assim afirmar definitivamente que a TLBP auxilia no tratamento de patologias ósseas. (KUSHIBIKI, 2013)

#### 4 ARTIGO

### **ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS (OFCOL II) SUBMETIDAS À TERAPIA LASER DE BAIXA POTÊNCIA**

### **ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION AND GENE EXPRESSION IN OSTEOLASTIC CELLS (OFCOL II) SUBMITTED TO LOW POWER LASER THERAPY**

(Será submetido à revista Osteoporosis International)

Nayara Tahiana Catenace Pereira<sup>1</sup>, Rodrigo Franco de Oliveira<sup>2</sup>, Regina Célia Poli Frederico<sup>4</sup>, Juliana Serpeloni de Almeida<sup>1</sup>, Stheace Kelly Fernandes Szezerbaty<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>3</sup>, Deise Aparecida de Almeida Pires Oliveira<sup>2</sup>

1 – Fisioterapeuta, especialista e mestranda em Ciências da Reabilitação pela Universidade Estadual de Londrina (UEL) / Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) – Londrina – PR.

2 – Fisioterapeuta, Prof(a). Dr.(a). Titular do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação – UEL/UNOPAR – Londrina – PR.

3 – Bióloga, Profa. Dra. Integral da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) no Departamento de Biologia Celular e Tecidual – São José dos Campos – SP.

4 – Bióloga, Profa. Dra. Titular do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências da Reabilitação – UEL/UNOPAR – Londrina – PR.

\* Autor Correspondente: Deise Aparecida de Almeida Pires-Oliveira. Centro de Pesquisa em Ciências da Saúde, Rua Marselha 591, Bairro Jardim Piza, CEP: 86.041-140, Londrina, PR, e-mail: [deisepyres@gmail.com](mailto:deisepyres@gmail.com)

Fonte de Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); e Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (Funadesp)

Instituição sede do estudo: UNOPAR – Universidade Norte do Paraná. Centro de Pesquisa em Ciências da Reabilitação – Lab. de Cultura Celular. Av. Marselha, 591. Jd. Piza. CEP: 86041-140. Londrina – PR.

**Resumo.** O objetivo do estudo foi analisar os efeitos do laser de baixa potência (904nm) em diferentes densidades de energia nas células osteoblásticas (OFCOLII), avaliando proliferação celular, função celular e a expressão dos genes proteína morfogenética óssea 2 (BMP2) e fosfatase alcalina (FA). Método: As células foram irradiadas utilizando o laser AsGa, divididas em Grupo 1: controle (sem irradiação), Grupo 2: 3 J/cm<sup>2</sup>, Grupo 3: 4 J/cm<sup>2</sup> e Grupo 4: 5 J/cm<sup>2</sup>. Após a irradiação a proliferação celular foi avaliada pelo MTT, o melhor resultado analisado por microscopia de fluorescência (núcleo e citoesqueleto) e expressão gênica através da PCR. Resultados: O grupo irradiado com 5 J/cm<sup>2</sup>, apresentou o melhor resultado no tempo 24 (p <0.005) e 48 horas (p <0.001), em relação ao controle, entre os irradiados o grupo 5 J/cm<sup>2</sup>, apresentou significância no tempo 48 horas (p<0.001). Já o efeito do tempo o grupo 5 J/cm<sup>2</sup>, apresentou significância, em comparação dos tempos 24/48 horas (p< 0.011) e 48/72 horas (p<0.001). Na microscopia de fluorescência observou-se evolução nas células irradiadas em comparação com o controle, onde apresentaram crescimento celular ao longo do tempo com citoesqueleto bem evidenciado, a expressão gênica apresentou aumento de 1,7 nos transcritos do gene BMP2 e diminuição de 5,08 nos transcritos do gene FA. Conclusão: O laser mostrou-se eficaz na estimulação de células OFCOLII, obtendo o melhor resultado em relação à proliferação celular, estimulação celular e modulação do gene BMP2 utilizando 5 J/cm<sup>2</sup> no tempo de 48 horas, quando comparado com o grupo controle.

**Palavras-chave:** Terapia Laser de Baixa Potência, Osteoblastos, Proliferação Celular

**Summary.** The aim of the presente study was to analyse the effects of the low-level laser (904nm) in different energy densities in osteoblastic cells(OFCOLII), evaluating cellular proliferation, cellular function and the genic expression of the bone morphogenetic protein 2 (BMP2) and alkaline phosphatase (AF). Method : The cells were irradiated utilizing the laserAsGa and divided in Group 1: control (non-irradiated), Group 2: 3J/cm<sup>2</sup>, Group 3: 4J/cm<sup>2</sup> and Group 4: 5J/cm<sup>2</sup>. After the irradiation, the cellular proliferation was evaluated by MTT, the best result analysed by fluorescence microscopy (nucleus and cytoskeleton) and the genic expression by the PCR. Results: the group irradiated with 5J/cm<sup>2</sup> presented the best result in a 24-hour time period (p<0.005) and 48-hour (p<0.001), in relation to the control, among the irradiated the group 5J/cm<sup>2</sup> presented significancy in the 48-hourn time period (p<0.001). Concerning the time effect, the group 5J/cm<sup>2</sup> presented significancy in comparison to the 24/48-hour time period (p<0.011) and 48/72-hour time period (p<0.001). In the fluorescense microscopy the evolution in the irradiated cells could be observed in comparison to the control, when they presented subsequent cellular growth, with well-evidenced cytoskeleton, a 1.7 increase in the genic expression of the transcription of the BMP2 and a 5.08 decrease of the transcription of the AF gene. Conclusion: The laser has shown effectiveness in the stimulation of the OFCOLII cells, obtaining the best result related to the cellular proliferation, cellular stimulation and modulation of the BMP2 gene utilizing 5J/cm<sup>2</sup> in a 48-hour time period, when compared to the control group.

**Key-words:** Low-Level Laser Therapy, Osteoblasts, Cellular Proliferation.

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma patologia que afeta diretamente o sistema ósseo, caracterizado por uma perda da densidade mineral óssea e deteriorização estrutural, conseqüentemente fragilizando este tecido, acarretando em casos graves como as fraturas. Trata-se de uma patologia silenciosa que acomete na sua grande maioria mulheres, com idade mais avançada, e com o passar do tempo tornou-se um problema de saúde pública considerando-se o envelhecimento populacional. [1,2]

Atualmente, existe uma grande opção de tratamentos utilizados na prevenção de perda óssea e estimulação da formação óssea em pacientes com osteoporose, incluindo substituição de alguns hormônios como estrógenos e bisfosfonatos por programas de atividade física. O efeito do laser de baixa potência na regeneração óssea tem sido foco de estudos e vem sendo empregado nesses casos com o propósito de melhora da densidade mineral óssea pelo efeito estimulante no tecido ósseo, permitindo um aumento na proliferação celular e redução no tempo de reparo em fraturas. [2,3,4,5]

A remodelação óssea é uma atividade fisiológica constante em seres humanos em qualquer fase da vida e são de responsabilidade das células osteoblásticas, porém este processo está suscetível a diversas agressões externas, que podem influenciar no equilíbrio dessa atividade, alterando o processo de remodelação, portanto este sistema torna-se alvo de inúmeras pesquisas, pois avaliam os efeitos dos mais variados recursos que podem ser utilizados para auxiliar ou acelerar a biomodulação óssea, contribuindo no tratamento de diversas patologias. [6,7,8]

Uma das formas mais estudadas para a estimulação de células osteoblásticas, tem sido a utilização da Terapia Laser de Baixa Potência (TLPB) [3], porém seus efeitos biomoduladores ainda permanecem com algumas lacunas [5]. Diversos autores relatam que há uma diversidade nos parâmetros tais como, comprimento de onda, potência e densidade energia, em relação ao laser, e há muita divergência nas respostas, porém é consenso que a TLBP possui grande valor na área da saúde (medicina, odontologia e fisioterapia) principalmente, pelo seu efeito na estimulação da proliferação e diferenciação das células ósseas, acarretando reações específicas como a



liberação de fatores de crescimento, proteínas morfogenéticas, osteocalcina, fosfatase alcalina, dentre outros, no qual estimula o processo de recuperação tecidual. [9,10,11,12,13]

Os efeitos fotobiomoduladores da TLBP [7] são resultantes da absorção da luz laser, que age em diferentes organelas, estimulando várias respostas celulares [14], uma vez que, a osteogênese é um processo complexo. A integridade e estimulação desse processo acarretarão em estímulo ao processo de recuperação tecidual, reparando o tecido ósseo, podendo ser indicada no tratamento de perda de massa óssea, traumas ou doenças inflamatórias e infecciosas. [13,15]

Estudos investigam como a TLBP, bem como seus efeitos bioestimulatórios influenciam células osteoblásticas e organelas [16,17]. No entanto, estima-se que a terapia estimula a proliferação e amadurecimento dessas células, aumentando a atividade osteoblástica e a mineralização no local [18] da fratura e contribuindo para a aceleração e consolidação das mesmas. A proliferação de células osteoblásticas, em particular, é de grande interesse clínico, no entanto, os mecanismos que atuam sobre o tecido ósseo não são totalmente elucidados, há uma escassez de literatura científica analisando a ação do laser 904nm na expressão gênica, bem como parâmetros de dosimetria em cultura celular osteoblástica. [2,18,19]

Nossa hipótese é de que a TLBP influencia no processo de remodelação óssea, porém, é necessário identificar a melhor dosimetria capaz de estimular as células ósseas identificando a modulação de determinados genes envolvidos no mecanismo ósseo.

Diante disto, o estudo tem como objetivo analisar os efeitos do laser de baixa potência (904nm) na proliferação celular, função celular e na expressão da proteína morfogenética óssea (BMP2) e fosfatase alcalina (FA), em cultura osteoblástica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultura Celular

Células osteoblásticas OFCOL II, Mus Musculus (Mouse, Balb/C), obtidas de Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ - Brasil) cultivadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (TPP, Switzerland, Europe) com DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium – Gibco BRL, GrandIsland, NY), contendo 5% (vol/vol) soro fetal bovino (SFB – Gibco BRL), 100 U/mL penicilina, 100 mM/mL streptomomicina e 0.25 µg/mL fungicida (Gibco BRL), mantidas em uma estufa de CO<sub>2</sub> em atmosfera 5% a 37°C. O estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), sob o protocolo nº 462.478/2013.

### Irradiação

Um diodo laser Arseneto Galium (AsGa) (Endophoton - KLD<sup>®</sup>, Biosistemas Equipamentos Eletrônicos Ltda, São Paulo, modelo LLTO 0107, Brasil) emitindo radiação a  $\lambda = 904\text{nm}$ , com uma taxa de repetição de 10KHz, potencia de saída de 50 mW; largura de pulso de 100 ns, potência de pico de 50 W; área do feixe de 0,01 cm<sup>2</sup>, divergência de 8° x 25°, e 0,1% de ciclo ativo foi usado para irradiar três grupos de células osteoblásticas sub cultivadas em placas 96 poços TPP (Switzerland, Europe), em uma densidade de 5x10<sup>4</sup> células/mL. Em seguida ao plaqueamento, as células ficaram por 24 horas *overnight* para a sedimentação. A distância do feixe a partir da cultura celular foi de 1,5 cm. Quatro grupos foram estabelecidos, Grupo 1: não irradiado (controle), Grupo 2: irradiado a 3J/cm<sup>2</sup> (18 segundos), Grupo 3: irradiado a 4J/ cm<sup>2</sup> (25 segundos) e Grupo 4: irradiado a 5J/ cm<sup>2</sup> (32 segundos). As células foram cultivadas em um poço com 0,3 cm<sup>2</sup> de secção transversal que receberam radiação perpendicularmente à placa a 24h, 48h, e 72h de intervalos. As células controle (não irradiado) foram submetidas à mesma condição como as células irradiadas com laser. Antes da irradiação, o laser foi calibrado de acordo com o fabricante das instruções, usando um osciloscópio Agilent (Agilent Technologies, Inc., Colorado Springs, CO). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

## Teste de MTT

Os experimentos de citotoxicidade foram avaliados pelo método de MTT Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)- 2,5-difeniltetrazólio]. As culturas de células OFCOL II receberam irradiação laser nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, sendo que após 24 horas de cada irradiação realizou-se o teste de MTT de acordo com ensaio a seguir: retirou-se o meio de cultura de cada poço, adicionado 50  $\mu$ l MTT e incubado por 01 hora a 37°C em atmosfera de 5% em estufa de CO<sub>2</sub>. Em seguida, retirou-se o MTT e adicionou-se 50  $\mu$ l de DMSO (Dimetil Sulfóxido) em cada poço, em seguida as placas foram mantidas em agitação por 20 minutos para solubilização dos cristais de formazana e sua concentração quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas (Leitor ELISA – Spectra Count – Packards Instrument, Offeburg – Alemanha), em comprimento de onda de 546 nm.

## Microscopia de Fluorescência

As células OFCOL II foram subcultivadas sobre lamínulas à densidade de  $5 \times 10^5$  células/ml, em placas TPP (Switzerland, Europe) de 12 poços. Vinte e quatro horas após a irradiação as lamínulas foram analisadas ao microscópio de fluorescência, equipado com sistema fotográfico Leica MPS-30. As células foram marcadas com corantes fluorescentes: Rodamina Faloidina para citoesqueleto (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA), DAPI (4',6 – diamidino-2-fenil-indol) – Fluoreshild para núcleo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), DIOC<sub>6</sub> (3,3'- dihexyloxacarbocyanine iodide) (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA) para o retículo endoplasmático. As células foram fixadas em PA 4% em PBS (Molecular Probes Eugene, Oregon, USA). Todas as lamínulas foram marcadas com DAPI e DIOC<sub>6</sub>, porém uma parte recebeu a marcação com Rodamina Faloidina. Sendo que apenas para as lamínulas marcadas com Rodamina Faloidina foi necessário a utilização de um fixador especial – Triton X100 a 0,1%.

## Extração de RNA e Conversão para cDNA

Para a extração do RNA total foi utilizado o PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Após sua extração, o RNA foi quantificado em o espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg do RNA total extraído. O volume final da reação foi de 20 µL, composto por 10% de tampão de reação (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl – Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen), 80 pmol de Oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen), 100 pmol de Random Primers (Invitrogen), 10 unidades da enzima SuperScript III (Invitrogen) e 2 unidades da enzima RNase Out (Invitrogen).

Para minimizar variações de desempenho da transcriptase reversa e a possibilidade do efeito Monte Carlo, três reações distintas de síntese de cDNA foram realizadas para cada experimento, cujos produtos foram incorporados para obtenção de uma única mistura referente a cada amostra em sua respectiva condição de cultivo. Os cDNA's sintetizados também foram quantificados para identificação de possíveis variações da eficiência de reação da transcriptase reversa entre as diferentes condições de tratamento, e também verificados quanto à sua qualidade por espectrofotometria. A concentração final de todas as amostras foi ajustada para 50 ng/µL.

## PCR em Tempo Real

As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizadas em um termociclador StepOne Plus System (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C seguido pela curva de melting nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e para finalizar 95°C por 15 segundos. A reação final de 20 µL continha 10 µL do TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems), 1 µL do TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems), 8 µL de água ultrapura e 1 µL do cDNA.

Para determinação da expressão relativa dos genes de interesse (BMP2 e FA) nas diferentes condições avaliadas foi utilizado o programa REST – versão 2009 (Relative expression software tool) (QIAGEN), desenvolvido por

Pfaffl, et al (2002) [20] baseado em seu próprio modelo matemático de quantificação relativa de dados obtidos por PCR em tempo real, com correção de eficiência. Os valores obtidos na situação controle (ausência de tratamento) foram utilizados como referência para comparação, e os cálculos foram normalizados a partir do gene de referência  $\beta$ -Actina. Foram considerados apenas valores de Cq (quantification cycle) com uma variação de  $\pm 0,5$  entre as triplicatas de reação.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos em valores de média e desvio padrão, com avaliação da normalidade verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação e verificação das diferenças estatisticamente significante entre os grupos, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste post hoc de Tukey para verificar os efeitos entre as diferentes intensidades e em relação ao tempo. Foi utilizado o GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Para análise da expressão gênica, os dados foram expressos segundo o método Pfaffl, 2003 [21] e calculados com auxílio do Software Rest 2009 [20], considerando valores de desvio padrão para o teste estatístico "Pair wise fixed reallocation". Foram considerados diferencialmente expressos quando comparados à situação controle os genes cuja alteração foi significativamente diferente considerando o valor de  $p \leq 0,001$  ou alterações maiores que 1,5 vezes considerando valor de  $p < 0,05$ . O intervalo de confiança adotado foi de 95% e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Na análise estatística utilizou-se o programa SPSS versão 20.0

## **RESULTADOS**

Os efeitos induzidos nas células OFCOLII irradiadas pelo laser nas densidades de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  foram determinadas com o auxílio do teste de MTT e marcação de fluorescência nos grupos 2, 3 e 4 respectivamente. Todos foram acompanhados a cada 24 horas de intervalo. O grupo 1 (controle não irradiado), foi submetido as mesmas condições e

análises.

O valor de crescimento celular baseado em cada intensidade está apresentado na Tabela 1, onde foi possível constatar que as células irradiadas com 5J/cm<sup>2</sup> apresentaram o melhor índice de crescimento no tempo 48 horas.

Tabela 1 – Crescimento Celular em relação ao tempo

<b>Intensidade</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
Controle	0,99 (±0,07)	1,00 (±0,03)	0,99 (± 0,04)
3 J/cm <sup>2</sup>	1,06 (± 0,04)	0,98 (± 0,04)	1,07 (0,02)
4 J/cm <sup>2</sup>	1,11 (± 0,02)	1,07 (± 0,02)	1,10 (0,02)
5 J/cm <sup>2</sup>	1,13 (± 0,04)	1,26 (± 0,05)	1,09 (0,02)

Valores apresentados em média e desvio-padrão (±).

Foi observada na realização do teste Anova de dois fatores significância estatística (F=28.62; P<0,001), e na análise do pós-teste constatou-se diferenças significantes entre os valores das intensidades e do tempo, estando os dados detalhados nas tabelas 02 e 03, e figura 1.

Tabela 2 – Comparação das Diferentes Intensidades

Tempo (h)	Controle vs. 3 J/cm <sup>2</sup>	Controle vs. 4 J/cm <sup>2</sup>	Controle vs. 5 J/cm <sup>2</sup>	3 J/cm <sup>2</sup> vs. 4 J/cm <sup>2</sup>	3 J/cm <sup>2</sup> vs. 5 J/cm <sup>2</sup>	4 J/cm <sup>2</sup> vs. 5 J/cm <sup>2</sup>
24	0.503	0.023*	0.005*	0.876	0.503	0.999
48	0.999	0.503	<0.001*	0.183	<0.001*	<0.001*
72	0.318	<0.001*	0.097	0.183	0.999	0.503

Nível de significância da Anova de dois fatores, pós-teste de Tukey. \* estatisticamente significativo.

Em relação às intensidades o grupo irradiado com 5J/cm<sup>2</sup>, manteve o melhor resultado em comparação com os outros grupos, sendo que em relação ao grupo controle o mesmo apresentou significância estatística no tempo 24 horas (p<0.005) e 48 horas (p<0.001), e entre os grupos 3 J/cm<sup>2</sup> e 4 J/cm<sup>2</sup> o grupo 5 J/cm<sup>2</sup>, apresentou significância no tempo 48 horas (p<0.001).

O grupo 4 J/cm<sup>2</sup>, apresentou significância estatística apenas quando comparado com o grupo controle no tempo 24 horas (p<0.023) e no tempo 48 horas (p<0.001).

Tabela 3 – Comparação do Efeito do Tempo

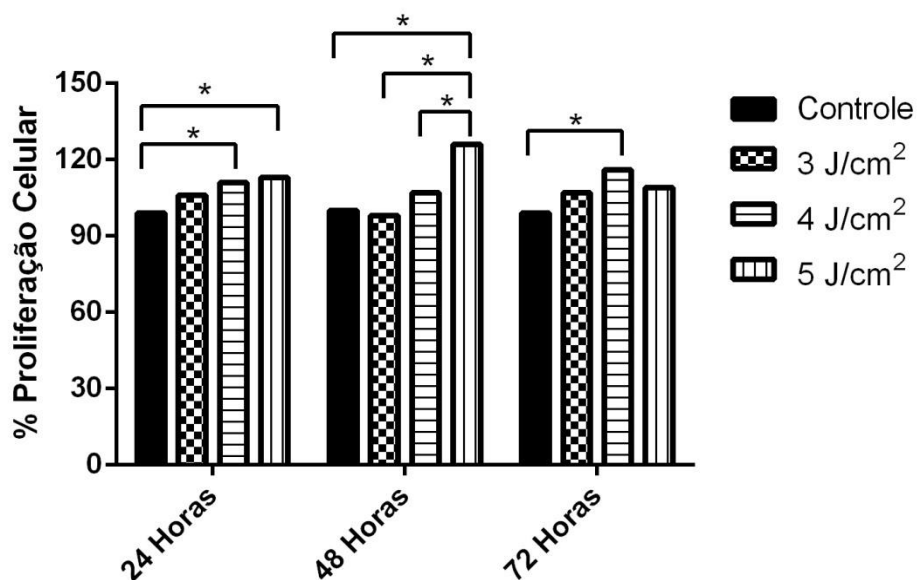
Intensidade	24 h vs. 48 h	24 h vs. 72 h	48 h vs. 72 h
Controle	0.999	0.999	0.999
3 J/cm <sup>2</sup>	0.318	0.999	0.183
4 J/cm <sup>2</sup>	0.969	0.876	0.183
5 J/cm <sup>2</sup>	0.011*	0.969	<0.001*

Nível de significância da anova de dois fatores, pós-teste de Tukey.

\*estatisticamente significativa.

O grupo 5 J/cm<sup>2</sup>, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao efeito do tempo, em comparação dos tempos 24 horas e 48 horas ( $p= 0.011$ ) e 48 horas para 72 horas ( $p<0.001$ ).

Figura 1 – Crescimento celular em relação ao tempo e intensidade.

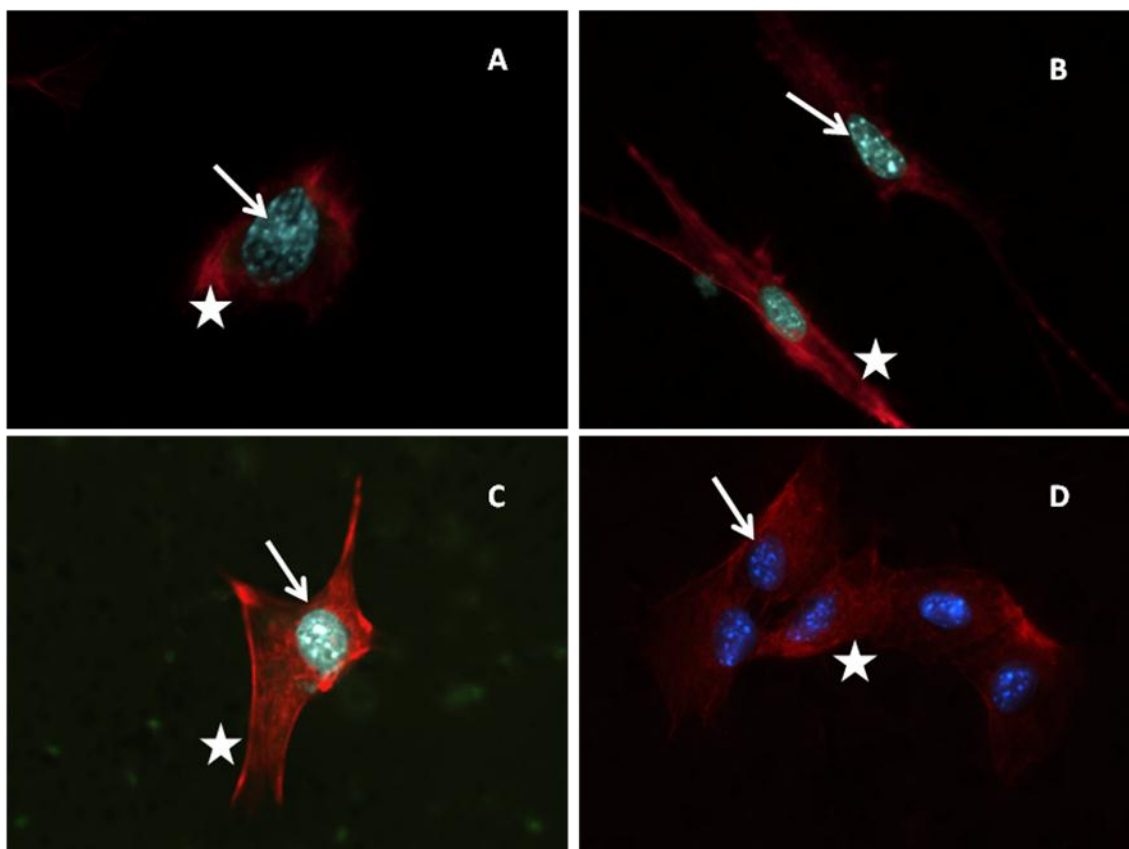


\* Diferença estatisticamente significativa,  $P < 0.05$

Os resultados revelam uma boa correlação entre os tempos e as doses, após irradiação laser marcadas com o MTT, analisando a proliferação celular. Aumento significativo foi observado em comparação com o grupo controle após 32 segundos (5J/cm<sup>2</sup>) da emissão laser ( $p=0.011$ ), principalmente 24 e 48 horas, observando um declínio em 72 horas seguido da primeira irradiação.

Após serem analisados os resultados da viabilidade celular pelo do MTT, o melhor resultado obtido, 5J/cm<sup>2</sup>, foi avaliado através da microscopia de fluorescência.

Figura 2 – Microscopia de Fluorescência



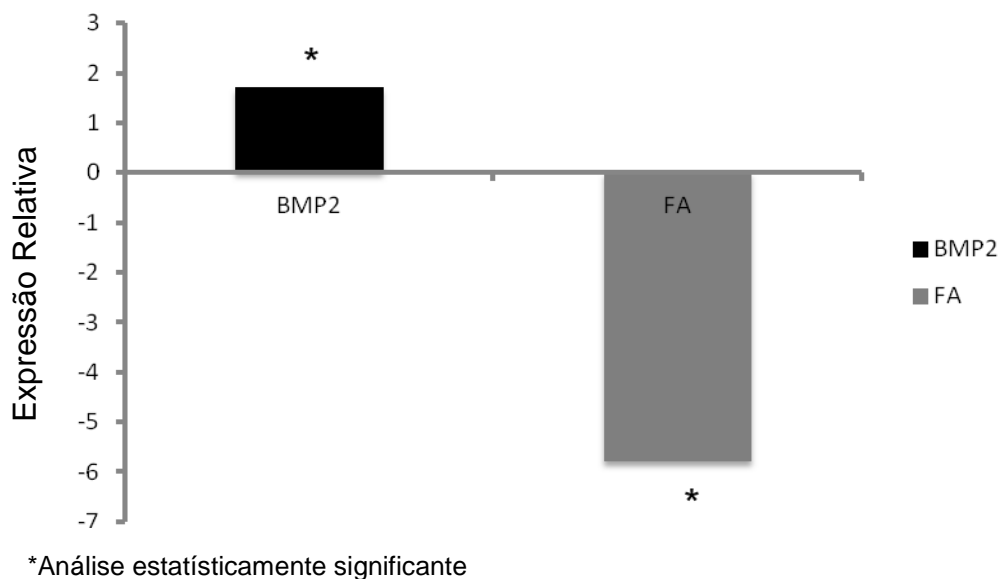
Resultado: Microscopia de fluorescência em células OFCOLII utilizando DAPI (núcleos - seta), Rodamina Faloidina (citoesqueleto - estrela) utilizando técnica de sobreposição de imagens (*overlay*): (A) Controle, (B)  $5\text{J}/\text{cm}^2$ - 24 horas, (C)  $5\text{J}/\text{cm}^2$ - 48 horas, (D)  $5\text{J}/\text{cm}^2$ - 72 horas.

Em relação às marcações analisadas por Microscopia de Fluorescência, observa-se uma evolução nas células irradiadas, quando comparadas ao grupo-controle, (A - não irradiado). Em relação ao citoesqueleto, as células irradiadas (B, C e D), observa-se um evidente efeito biomodulatório do laser, a partir do grupo irradiado 24 horas (B) visto que essas células apresentaram maior distribuição e organização dos filamentos de actina, caracterizando o início da proliferação celular, em comparação ao grupo controle não irradiado (A), onde nota-se uma discreta retração dos filamentos de actina, já no tempo 48 horas (C), essas células, apresentaram-se mais volumosas, a rede de citoesqueleto bem evidenciada e com aumento de micronúcleos, persistindo até a avaliação final, no tempo 72 horas (D).

A análise da modulação dos genes BMP2 e FA apresentaram variações significativas na expressão dos genes estudados entre os grupos avaliados.



Figura 3: Expressão Gênica



As células irradiadas apresentaram um aumento de 1,7 nos transcritos do gene BMP2 e diminuição de 5,08 nos transcritos do gene FA quando comparados com o gene endógeno, podendo inferir que após o tratamento utilizando laser na dose de 5J/cm<sup>2</sup> no tempo de 48 horas, as células OFCOLII modularam positivamente a BMP2, sendo que a FA modulou negativamente no tempo de clivagem da PCR, quando comparados com o grupo controle (não-irradiado).

## DISCUSSÃO

Vários efeitos fotobiomodulatórios do laser de baixa potência têm sido relatados tais como, proliferação celular, síntese de colágeno e aumento de fator de crescimento das células, principalmente se utilizados na faixa entre 632,8 a 1000 nm, nos quais apresentam os melhores resultados na biomodulação celular. Porém, esses efeitos são dependentes de vários fatores, incluindo densidade de energia, fase de irradiação, comprimento de onda, tempo de exposição à irradiação e densidade de potência, portanto o estudo analisou dentre as dosimetrias mais utilizadas na literatura a melhor resposta em células OFCOLII. [22,23]

Assim sendo, Huang, et al, 2009, [24] relatam que os resultados mais eficazes para a regeneração, utilizam doses entre 3 a  $6\text{J}/\text{cm}^2$ , sendo doses acima de  $10\text{J}/\text{cm}^2$  associadas a efeitos deletéricos como a apoptose celular, pois os efeitos da terapia são dependentes de vários parâmetros já descritos, podendo assim qualquer erro na escolha dos mesmos trazer respostas negativas ao tratamento.

Os efeitos da TLBP no tecido ósseo são bastante controversos, as pesquisas mostram resultados diferentes e conflitantes, e é possível que o efeito do laser na regeneração óssea depende não só da dose total da irradiação, mas também do tempo e modo da irradiação. [24]

A radiação laser emitida próxima na região do infravermelho utilizada nesta pesquisa foi  $904\text{nm}$ , por apresentar um baixo coeficiente de absorção e conseqüentemente maior potencial de penetração no tecido, aumentando a resistência e volume, dessa forma, promovendo a mineralização do osso. Em decorrência disso a escolha para o uso do laser infravermelho neste comprimento de onda sobre o tecido ósseo, tornando-se um recurso indispensável para a terapia na reabilitação óssea. [2,25,26,27]

No entanto, alguns autores consideram que o comprimento de onda é o fator determinante para os efeitos fisiológicos produzidos pela TLBP. Pois, a especificidade de absorção para um determinado comprimento de onda determina quais os tipos de tecido que irão absorver preferencialmente a radiação incidente, e por sua vez a profundidade de penetração da mesma. [28,29]

Evidências sugerem que a TLBP estimula vários estágios do processo de cicatrização: acelera o processo inflamatório, promove proliferação de células, regula a síntese de pró-colágeno tipo I e III, acelera reparo e remodelação óssea, estimula revascularização tecidual, além de acelerar o reparo tecidual. Resultados estes que corroboram com a pesquisa, onde após a utilização da TLBP, as células osteoblásticas proliferam-se nas dosimetrias utilizadas, porém com um poder de estimulação maior quando utilizado  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . [30,31,32,33,34]

Hou, et al, em 2008, [35] investigaram o efeito do laser em células-tronco, e observaram que em uma densidade de energia igual ao presente estudo, o melhor resultado,  $5\text{J}/\text{cm}^2$  estimulou consideravelmente a proliferação,

além de aumentar a liberação de fatores de crescimento e diferenciação miogênica das células, reforçando os resultados obtidos na pesquisa, onde comparou-se diferentes doses ( $3\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$ ) e a densidade  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentando uma melhor viabilidade celular.

A TLBP tem sido utilizada por apresentar resultados satisfatórios em processos de reparação tecidual, analgesia, diminuição de edema e neoangiogênese, pela liberação de fator de crescimento endotelial [10], estimulando assim a proliferação epitelial, síntese e deposição de colágeno além de, preservar estruturas adjacentes ao local da lesão. [6,36]

Segundo Soleimani, et al, 2012, [19] estes relatam os efeitos da TLBP, na proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos (BMSCs), utilizando diodo laser GaAIs (810nm), nas densidades de energia de 2 e 4  $\text{J}/\text{cm}^2$ , onde indiferentemente da densidade, houve a proliferação dessas células em comparação com o grupo controle (não irradiado), confirmando o crescimento celular nas demais doses utilizadas, ou seja, baixas doses de irradiação são capazes de estimular a diferenciação e proliferação celular, pois estimula processos fisiológicos dessas células, sendo que comprimento de onda maiores possuem um melhor poder de penetração, podendo inferir que o laser 904 nm, em doses mais baixas causará efeitos benéficos em tecido mais profundos, como por exemplo o tecido ósseo avaliado na pesquisa através das células OFCOLII.

Da mesma forma, Silva, et al, em 2011, [37] utilizando também um diodo laser (GaAIs – 830 nm) em células osteoblásticas, evidenciaram a proliferação e diferenciação celular após a TLBP, em 24 e 48 horas, conforme observado em nosso estudo para  $5\text{J}/\text{cm}^2$ . Sendo considerado o aumento da proliferação resultante da elevação da atividade da fosfatase alcalina óssea e a presença de marcadores ósseos que aumentam a mineralização, tais como, a própria fosfatase, Runx<sub>2</sub> (fator de transcrição específico do osteoblasto), osteocalcina (OC), colágeno I, sialoproteína e BMP2.

Fujimoto, et al (2005), [38] realizaram um estudo utilizando também um diodo laser GaAIs ( $0,96$  e  $3,82 \text{ J}/\text{cm}^2$ ) em células MC3T3-E1, e avaliaram a expressão das proteínas morfogenéticas e fatores de transcrição. Após a irradiação observaram o aumento significativo na expressão das BMP's e seus fatores, concluindo que a TLBP é capaz de aumentar a mineralização *in vitro* e

o teor de cálcio na cultura dessas células, pela estimulação das BMP's associadas a diferenciação osteoblástica.

A BMP2 exerce influência fundamental na formação e remodelação óssea, bem como na proliferação e diferenciação de osteoblastos [39], sendo que Pyo, et al (2013), [18] utilizando laser 808 nm em osteoblastos fetal humano, hipoxicultivados, observou que a TLBP exerceu uma resposta positiva na expressão da BMP2, OC e colágeno tipo I, podendo inferir que a terapia estimulou a modulação desses genes, mesmo em condição de cultivo sob estresse de oxigênio, sendo que as células tratadas do estudo (OFCOLII) obtiveram aumento considerável na expressão de BMP2 após a aplicação do laser, podendo afirmar dessa forma que o crescimento apresentado por essas células após a avaliação com o MTT, deve-se ao efeito estimulatório do laser, pois o mesmo foi capaz de modular a expressão do gene BMP2.

Wu, et al (2012), [1] utilizando laser na faixa do vermelho (660nm) em células tronco-mesenquimais derivadas de medula de rato, nas doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , observaram uma resposta contraditória aos demais estudos, pois o mesmo relata, que a expressão dos marcadores osteogênicos, BMP2, OC, FA e RUNX<sub>2</sub>, não foi significativa após a terapia com TLBP, sendo que a expressão de FA aumentou significativamente após o quinto dia, quando avaliada por quimioluminescência (Alizarin Red). Porém o autor conclui que a TLBP pode induzir a expressão BMP2 principalmente, para melhorar a diferenciação osteogênica.

Robubi, et al (2014), [40] avaliaram o perfil de expressão gênica induzida por fatores de crescimento no cultivo de osteoblastos *in vitro*, sendo que os fatores de crescimento BMP2 e FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos 2), diminuíram a expressão da FA, indicando que a diferenciação é suprimida por estes fatores, porém quando avaliado o crescimento de osteoblastos pela indução de IGF1 (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1), o mesmo aumentou todos os genes avaliados, principalmente a FA. Outra hipótese levantada pelo autor é de que essa alteração pode ser causada devido a maioria dos experimentos utilizam células de ratos, podendo assim ser uma resposta específica dessas células.

Desta forma Wu, et al (2012), [1] corrobora com a resposta observada no estudo, onde após 48 horas de aplicação do laser  $5\text{J}/\text{cm}^2$ , FA não

apresentou modulação positiva na expressão gênica, sendo necessária uma avaliação tardia dessa resposta, sendo que Robubi, et al (2014), [40] analisando as respostas osteoblásticas mediadas por fatores de crescimento específicos, relatam que alguns fatores inibem a modulação da FA, podendo ainda ser uma resposta característica dessas células derivadas de ratos.

As células dos grupos irradiados foram também analisadas com imagens pela técnica de microscopia de fluorescência, evidenciando mudanças na morfologia das células, o que explica o fato da irradiação laser intervir na reorganização dinâmica do citoesqueleto, que é composta por filamentos de actina, miosina e microtúbulos, formando uma rede tridimensional que possui células com funções específicas no processo de diferenciação, e determina o tamanho e organização das organelas, fluxo intracelular e a mitose. [41]

Segundo Rodríguez, et al (2004), [41] o citoesqueleto é uma importante estrutura, que exerce função importante na morfologia celular, adesão, crescimento, e sinalização podendo afirmar que esta estrutura interfere diretamente na diferenciação celular, o que foi evidenciado em nosso estudo, pois após a aplicação da TLBP, houve a biomodulação celular, observada pela influência do crescimento do citoesqueleto nessa resposta.

Sendo que Yourek, et al (2007), [42] relatam que a polimerização de actina e organização de microfilamentos do citoesqueleto, possuem papel importante nos processos fisiológicos dos osteoblastos.

Por conseguinte, terapias que auxiliem o processo regenerativo tornam-se ferramentas úteis na prática clínica, o laser de baixa potência vem apresentando efeitos positivos em células ósseas, sendo capaz de estimular a diferenciação celular promovendo o crescimento e maturação de osteoblastos, indicada para grandes perdas de massa óssea, traumas ou doenças inflamatórias e infecciosas. [13,15,16,17]

## **CONCLUSÃO**

Pode-se concluir que o diodo laser  $\lambda = 904\text{nm}$ , promoveu resposta significativa sobre a proliferação celular osteoblástica OFCOL II, destacando a dose  $5 \text{ J/cm}^2$  a 48 horas, produzindo alterações nas organelas celulares do citoesqueleto e modulação dos genes fosfatase alcalina e proteína

morfogenética óssea 2, importantes na proliferação e diferenciação celular, estimulando assim o processo de remodelação óssea, auxiliando portanto no tratamento de patologias como a osteoporose.

## REFERÊNCIAS

1. Wu JY, Wang YH, Wang GJ, Ho ML, Wang CZ, Yeh ML, Chen CH. Low-Power GaAlAs Laser Irradiation Promotes the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells via IGF1 and BMP2. *PLoS ONE* (2012) 7(9): 1-10.
2. Oliveira DAAP, Oliveira RF, Amadei SU, Soares CP, Rocha RF. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis, *Osteoporos Int*, 2010, 1-6.
3. Khadra M, Lyngstadaasb SP, Haanæsa HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 26 (2005) 3503–3509.
4. Diniz JS, Nicolau RA, Ocarino NM, Magalhães FC, Pereira RDO, Serakides R. Effect of low-power gallium-aluminum-arsenium laser therapy (830 nm) in combination with bisphosphonate treatment on osteopenic bone structure: an experimental animal study. *Lasers Méd Sci*, 2008, 1-5.
5. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation in Vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2007, 25(4):275–280.
6. Andrade FSSD, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas, *Rev. Col. Bras. Cir.* 2014; 41(2): 129-133.
7. Karu, T. Cellular Mechanisms of Low-Power Laser Therapy; *Lasers Surg Med.*; 2004; 34(4), 298-9.
8. Calabrese G, Bennett BJ, Orozco L, Kang HM, Eskin E, Dombret C, Backer O, Lusic AJ, Farber CR. Systems Genetic Analysis of Osteoblast-Lineage Cells. *PLoS Genet*; 2012; 8(12); 1 – 18.

9. Pacheco OS, Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'Ana ACP, Rezende MLR, Greggi SLA, Damante CA. Laser Phototherapy at High Energy Densities Do Not Stimulate Pre-osteoblast Growth and Differentiation, *Photomedicine and Laser Surgery*; 2013; 31(5): 225-9.
10. Parenti SI, Checchi L, Fini M, Tschon MI. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells, *J. Biomed. Opt*; 2014; 19(10): 1-14.
11. Walter C, Pabst AM, Ziebart T. Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: An in vitro study, *BIOMEDICAL REPORTS*; 2015; 3:14-18.
12. Pagin MT, Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'Ana ACP, Rezende MLR, Greggi SLA, Damante CA. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation, *Lasers Med Sci*; 2014; 29:55–59.
13. Oliveira DAAP, Oliveira RF, Soares, CP. Evolution of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2008; 26 (4): 401-404
14. Altan AB, Bıcakcı AA, Mutaf HI, Ozku MT, Inan VS. The effects of low-level laser therapy on orthodontically induced root resorption. *Lasers Med Sci*, 2015, 1-10.
15. Santos AA, Miranda CDO, Alves MTS, Faloppa F, O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras*, 2005, 13(4) – 194-195.
16. Huertas RM, Moreno FJM, Bertos EL, Torrecillas JR, Martínez OG, Ruiz C. The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63), *Lasers Med Sci*, 2014, 1-6
17. Huertas RM, Bertos EL, Torrecillas JR, Leyva FM, Ruiz C, Martínez OG. Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation; *Biological Research for Nursing*; 2014; 16(2) 191-196
18. Pyo SJ, Song WW, Kim IR, Park BS, Kim CH, Shin SH, Chung IK, Kim YD. Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- $\beta$ 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts. *Lasers Med Sci*, 2013, 28:543–550

19. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts—an in vitro study. *Lasers Med Sci* ,2012, 27:423–430.
20. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. 2002, *Nucleic Acids Res.* 30(9):01-10.
21. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. 2001, *Nucleic Acids Res.* 29(9): 2003-07
22. Altan BC, Bıcakcı AA, Mustafa AC, Esen H. The effect of dosage on the efficiency of LLLT in new bone formation at the expanded suture in rats. *Lasers Med Sci*, 2015, 30:255–262.
23. Ueda Y, Shimizu N. Effects of Pulse Frequency of Low-Level Therapy (LLLT) on Bone Nodule Formation in Rat Calvarial Cells. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 2003, 21(5), 271-7.
24. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic Dose Response In Low Level Light Therapy. *Dose-Response*, 2009, 7:358–383.
25. Martines NS, Machado AHA, Silva NS, Tedesco AC, Zângaro RA, Soares CP. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, 2007, 36 (1): 59-64.
26. Pinheiro, A.L., Pozza, D.H., Oliveira, M.G., Weeissmann, R., and Ramalho, L.M. Polarized light (400-2000nm) and non-ablative laser (685nm): a description of the wound healing process using immuno histochemical analysis. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2005, 23, 485-492
27. Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone*, v.40, p.140-148, 2007
28. Nissan J, Assif D, Gross MD, Yaffe A, Binderman I. Effect of Low Intensity Laser Irradiation on Surgically Created Bone Defects in Rats, *Journal of Oral Rehabilitation* 2006 33; 619–624.
29. Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation, *Lasers Life Sciences*, 1988, 2:53-74.



30. Karu TI, Pyatibrat LV, Ryabykh TP. Melatonin Modulates the Action of Near Infrared Radiation on Cells Adhesion, *J. Pineal Res.* 2003; 34:167–172.
31. Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* , 2003, 18, 89-94.
32. Freitas IGF, Baranauskas V, Ho"Fling MAC. Laser effects on osteogenesis. *Appl Surf Sci*, 2000, 154-155, 548-54.
33. Enwemeka CS. Low Level Laser Therapy Is Not Low, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2005, 23(6): 529-530.
34. Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, Oliveira PT, Rosa AL. Effects of Low-Level Laser Therapy on Human Osteoblastic Cells Grown on Titanium, *Braz Dent J*, 2010, 21(6): 491-498.
35. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation for Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Proliferation, Growth Factors Secretion and Myogenic Differentiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2008, 40:726–733.
36. Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn AR, Heidari M, Nokhbatolfoghahaie H, Fekrazad R. The Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Bone Healing. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, 2012; 9(4), 238-48.
37. Silva JQ, Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Junior IL, Matos AP. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009; 00(00): 1-5.
38. Fujimoto K, Kiyosaki T, Mitsue N, Mayahara K, Omasa S, Suzuki N, Shimizu S. Low-Intensity Laser Irradiation Stimulates Mineralization Via Increased BMPs in MC3T3-E1 Cells. *Lasers Surg. Med.* 2010, 42, 519–526.
39. Li X, Cao X. BMP signaling and skeletogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1068(2006):26–40.
40. Robubi A, Berger C, Schmid M, Huber KR, Engel A, Krugluger W. Gene expression profiles induced by growth factors in *in vitro* cultured osteoblasts. *Bone & Joint Research* (2014)3(7): 236-240.
41. Rodríguez JP, González M, Ríos S, Cambiazo V. Cytoskeletal Organization of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) Changes During

Their Osteogenic Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, 93:721–731.

42. Yourek G, Hussain MA, Mao JJ. Cytoskeletal Changes of Mesenchymal Stem Cells During Differentiation. *ASAIO Journal*, 2007, 1-10.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A TLBP influencia positivamente as células osteoblásticas, fazendo com que aumente a proliferação dessas células após a irradiação, podendo afirmar que este recurso, é um grande aliado no tratamento de patologias ósseas que necessitam da estimulação da osteogênese.

Na pesquisa foi possível observar que os parâmetros utilizados do laser, no comprimento de onda (904nm) e densidade de energia 5 J/cm<sup>2</sup>, tornam-se importantes na resposta apresentada pelas células, sendo que em números absolutos (média e desvio-padrão) todas as dosagens obtiveram resposta na proliferação celular, porém, sobressaiu-se 5 J/cm<sup>2</sup>, pois apresentou a melhor proliferação celular e estrutura celular em relação as organelas, modulação dos genes fosfatase alcalina óssea (FA) e proteína morfogenética óssea 2 (BMP2), importantes na proliferação e diferenciação celular, estimulando assim o processo de remodelação óssea, auxiliando portanto no tratamento de patologias como a osteoporose, confirmando assim o efeito bioestimulatório do laser de baixa potência em cultura celular de osteoblastos.

## 6 REFERÊNCIAS

ALTAN, A.B.; BICAKCI, A.A.; MUTAF, H.I.; OZKU, M.T.; INAN, V.S. The effects of low-level laser therapy on orthodontically induced root resorption, *Lasers Med Sci*, 2015, 1-10.

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea, *J Bras Patol Med Lab*, 2006, 42(1), 5-12.

ANDRADE, F.S.S.D.; CLARK, R. M. O.; FERREIRA, M.L. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas, *Rev. Col. Bras. Cir.* 2014; 41(2): 129-133.

ANDRADE, A.D.; MARINHO, C.F.; BARCELOS, M.; ZORZAL, M.B.; CONZ, M.B.; JUNIOR, G.M.V. Biologia óssea: uma revisão da literature, *Revista Implant News*, 2007;4(6):659-62.

BRONDON, P.; STADLER, I.; LANZAFAME, R.J. A study of the effects of phototherapy dose interval on photophotobiomodulation of cell cultures, *Laser in Surgery and Medicine*, (2005) 36, 409-413.

CALABRESE, G.; BENNETT, B.J.; OROZCO, L.; KANG, H.M.; ESKIN, E.; DOMBRET, C.; BACKER, O.; LUSIS, A.J.; FARBER, C.R. Systems Genetic Analysis of Osteoblast-Lineage Cells. *PLoS Genet*; 2012; 8(12); 1 – 18.

CARDOZA, Y.F. La Microscopía de Fluorescencia y su Aplicación en el Diagnóstico de Bacterias Fitopatógenas, *FITOSANIDAD*; 2005, 9 (3): 65-68

CARVALHO, D.C.L.; ROSIMB, G.C.; GAMAB, L.O.R.; TAVARES, M.R.; TRIBIOLIB, R.A.; SANTOS, I.R.; JUNIOR, A.C. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese, *Rev Saúde Pública*, 2002; 36(5):647-54.

CAVALCANTI, T.M.; BARROS, R.Q.A.; CATÃO, M.H.C.V.; FEITOSA, A.P.A.; LINS, R.D.A.U. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia, *An Bras Dermatol.* 2011; 86(5):955-60.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTYET, G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance; *Science*; 2000; vol 289; 1501-1504.

FEITOSA, S.M.; TOMAL, R.L.; RENNO, A.C.M. Os Efeitos Osteogênicos do Ultra-som e do Laser Terapêutico de Baixa Intensidade no Processo de Consolidação de Fraturas: Uma revisão bibliográfica, *Fisioterapia Especialidades*; 2007; 1(1).

FUJIMOTO, K.; KIYOSAKI, T.; MITSUE, N.; MAYAHARA, K.; OMASA, S.; SUZUKI, N.; SHIMIZU, S. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased bmps in MC3T3-E1 cells. *Lasers Surg. Med.* 2010,

42, 519–526

GENOVESE, W.J. Laser de baixa intensidade. Aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo Santos, 2007, 175p.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Phototherapy — a treatment modality for wound healing and pain relief, *African Journal of Biomedical Research*; 2007; (10); 99 - 109

HECKLER, M.C.T.; BARBERINI, D.J.; AMORIM, R.M.; Laserterapia de baixa potência em cultivos celulares, *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*, 2014, 7 (14): 541-565.

HUERTAS<sub>a</sub>, R.M.; et al, The effects of low-level diode laser irradiation on differentiation, antigenic profile, and phagocytic capacity of osteoblast-like cells (MG-63), *Lasers Med Sci*, 2014,1-6.

HUERTAS<sub>b</sub>, R.M.; BERTOS, E.L.; TORRECILLAS, J.R.; LEYVA, F.M.; RUIZ, C.; MARTÍNEZ, O.G. Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation; *Biological Research for Nursing*; 2014; 16(2) 191-196.

JUNIOR, A.M.R.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.F. AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual; *An Bras Dermatol.*; 2006; 81(2):150-6.

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation, *Lasers Life Sciences*, 1988, 2, 53-74.

KARU, T.I. Cellular Mechanisms of Low-Power Laser Therapy; *Lasers Surg Med.*; 2004; 34(4), 298-9.

KHADRA, M, LYGSTADAASB, SP.; HAANAES, H.R.; MUSTAFA, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material, *Biomaterials*; 2005, 26; 3503–3509.

KUSHIBIKI, T.; HIRASAWA, T.; OKAWA, S.; ISHIHARA, M. Regulation of miRNA Expression by Low-Level Laser Therapy (LLLT) and Photodynamic Therapy (PDT), *Int. J. Mol. Sci*; 2013, 14, 13542-13558.

LUCAS, C.; STANBOROUGH, R. W.; FREEMAN, C. L.; HAAN, R. J. Efficacy of low level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. *Lasers Med Sci*; 2000; 15:81-93.

MARZULLO, C.F.; PERES, A.C.P.; SHAH, M.L.; NICOLAU, R.A. Atualidades do efeito analgésico após aplicação do laser de baixa potência, *Revista UNIVAP*; 2006; 3 (24): 2520-2523.

MOREIRA, D.S.; LINS, U.G.C. Técnicas de Microscopia para Quantificação e Identificação de Microrganismo, Saúde & Amb. Rev. 2010, 5(2):01-11

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, Journal of Immunological Methods, 1983; 65: 55-63

NEVES, L.S.; SILVA, C.M.S.; HENRIQUES, J.F.C.; CANÇADO, R.H.; HENRIQUES, R.P.; JANSON, G. A utilização do laser em Ortodontia, R Dental Press Ortodon Ortop Facial, 2005; 10(5):149-156.

NINOMIYA, T.; HOSOYA, A.; NAKAMURA, H.; SANO, K.; NISHISAKA, T.; OZAWA, H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts, Bone, 2007, 40, 140-148.

NISSAN, J.; ASSIF, D.; GROSS, M.D.; YAFFE, A.; BINDERMAN, I. Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats. Journal of Oral Rehabilitation, 2006, 33, 619-624.

NOGUEIRA, G.T.; FERRARI, R.A.M., MARTINS, M.D.; BUSSADORI, S.K.; SILVA, T.D.; FERNANDES, K.P.S. Efeito da laserterapia de baixa potência sobre o tecido ósseo - Revisão de literatura, ConScientiae Saúde, 2009, 8(4), 671-676.

OLIVEIRA, D.A.A.P.; OLIVEIRA, R.F.; ZANGARO, R.A.; SOARES, C.P. Evaluation of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells, Photomedicine and Laser Surgery, 2008; 26 (4): 401-404

OLIVEIRA, D.A.A.P.; OLIVEIRA, R.F.; AMADEI, S.U.; SOARES, C.P.; ROCHA, R.F. Laser 904 nm action on bone repair in rats with osteoporosis, Osteoporos Int, 2010, 1-6.

PACHECO, O.S.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.; SANT'ANA, A.C.P.; REZENDE, M.L.R.; GREGHI, S.L.A.; DAMANTE, C.A. Laser Phototherapy at High Energy Densities Do Not Stimulate Pre-osteoblast Growth and Differentiation, Photomedicine and Laser Surgery; 2013; 31(5): 225-229.

PAIS, A. Subtle is the Lord: The science and art to life of Albert Einstein, Oxford University Press 1982, Foreword © Roger Penrose 2005.

PAGIN, M.T.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R.C.; SANT'ANA, A.C.P.; REZENDE, M.L.R.; GREGHI, S.L.A.; DAMANTE, C.A. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation, Lasers Med Sci; 2014; 29:55-59

PARENTI, S.I.; CHECCHI, L.; FINI, M.; TSCHON, M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells, J. Biomed. Opt; 2014; 19(10).

PEPLOW, P.V.; CHUNG, T.Y.; RYAN, B.A.; BAXTER, G.D. Laser

Photobiomodulation of Gene Expression and Release of Growth Factors and Cytokines from Cells in Culture: A Review of Human and Animal Studies, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2011, 29(5): 285–304.

PETRI, A.D.; TEIXEIRA, L.N.; CRIPPA, G.E.; BELOTI, M.M.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. Effects of Low-Level Laser Therapy on Human Osteoblastic Cells Grown on Titanium, *Braz Dent J*, 2010, 21(6): 491-498.

PIVA, J.A.A.C.; ABREU, E.M.C.; SILVA, V.S.; NICOLAU, R.A. Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: Princípios Básicos, *An Bras Dermatol*. 2011; 86 (5): 947-54.

PYO, S.J.; Low-level laser therapy induces the expressions of BMP-2, osteocalcin, and TGF- $\beta$ 1 in hypoxic-cultured human osteoblasts, *Lasers Med Sci*; 2013; 28:543–550

REICHMAN, J.; Handbook of optical filters for fluorescence microscopy, Chroma Technology Corp, 2000, 1-37.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; et al. Cell Viability Assays; Assay Guidance Manual; 2015; 1-23.

ROCHA, J.C.T.; Terapia Laser: Cicatrização Tecidual e Angiogênese, *RBPS* 2004; 17 (1): 44-48

SANTOS, A.A.; MIRANDA, C.D.O.; ALVES, M.T.S.; FALOPPA, F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras*, 2005, 13(4) – 194-195.

SATO, S.; OGURA, M.; ISHIHARA, M.; KAWAUCHI, S.; ARAI, T.; MATSUI, T.; KURITA, A.; OBARA, M.; KIKUCHI, M.; ASHIDA, H. Nanosecond high-intensity pulsed laser ablation of myocardium tissue at the ultraviolet, visible, and near-infrared wavelengths: in vitro study. *Lasers Surg. Med*; 2001, 29, 464-473.

SARAIVA, G.L.; CASTRO, M.L. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica, *Arq Bras Endocrinol Metab*; 2002; 46(1):72-78.

SILVA, J.Q.; SILVA, M.A.; ALMEIDA, A.P.F.; JUNIOR, I.L.; MATOS, A.P. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review, *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009; 00(00): 1-5.

SILVA, R.M.; ANDRADE, P.R. A Laserterapia na Osteogênese: Uma Revisão de Literatura, *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 2012; 10(34): 56-62

SOLEIMANI, M.; ABBASNIA, E.; FATHI, M.; SAHRAEI, H.; FATHI, Y.; KAKA, G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts— an in vitro study. *Lasers Med Sci*, 2012, 27:423–430.

SNIADECKI, N. J.; CHEN, C.S. Instrumentation for cells mechanics, *Medical*

Devices and Systems, 2005, 65/1-10.

TAKANASHI, S.; ABEB, T.; GOTOH, J.; FUKUUCHI, Y. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons, *Neurochemistry International*; 2002 ; 40: 441–448.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *J. Clin. Laser. Med. Surg.*, 2003, 21, 271–277.

VIEIRA, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática, *Arq Bras Endocrinol Metab*, 1999, 43(6), 415-422.

WALTER, C.; PABST, A.M.; ZIEBART, T. Effects of a low-level diode laser on oral keratinocytes, oral fibroblasts, endothelial cells and osteoblasts incubated with bisphosphonates: An in vitro study, *BIOMEDICAL REPORTS*; 2015; 3:14-18.

WU, J. Y; WANG, Y.H.; WANG, G.J.; HO, M.L.; WANG, C.Z.; YEH, M.L.; CHEN, C.H. Low-Power GaAlAs Laser Irradiation Promotes the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells via IGF1 and BMP2; *PLoS ONE* 7(9): e44027.



## **ANEXOS**

## ANEXO A



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Influência dos meios físicos em cultura celular.

**Pesquisador:** Rodrigo Franco de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 21458013.4.0000.0108

**Instituição Proponente:** Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

**Patrocinador Principal:** Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 462.478

**Data da Relatoria:** 30/09/2013

**Apresentação do Projeto:**

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a Terapia Laser de Baixa Potência e Ultrassom Pulsado de Baixa Intensidade exercem uma influência significativa sobre função celular e expressão gênica dos genes do colágeno e receptor de crescimento endotelial vascular. A proposta do projeto é comparar a expressão gênica, juntamente com a viabilidade celular, sob ação do laser e do ultrassom em cultura celular fibroblástica. As culturas fibroblásticas humanas serão submetidas à irradiação laser de baixa potência e ultrassom pulsado de baixa intensidade. As análises serão realizadas através de microscopia óptica, MTT método 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide, avaliação da expressão gênica do colágeno e neovascularização por meio da qRT-PCR, 24 horas após cada irradiação, respeitando os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. Será observada a morfologia celular juntamente com suas organelas e atividade celular correspondente a cada tempo de irradiação. Os resultados desse projeto nortearão para o incremento do processo de estimulação e proliferação de células fibroblásticas a partir da terapia laser e irradiação ultra-sônica, correlacionando com o processo de cicatrização, neovascularização e reparo, através de um modelo simples e informativo sob os aspectos significativos do uso da terapia física no sistema *in vivo*.

Endereço: Av. Paris 675

Bairro: Jardim Piza

CEP: 86.041-140

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-7834

E-mail: pesquisa@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Continuação do Parecer: 462.478

**Objetivo da Pesquisa:**

Analisar a influência da irradiação ultra-sônica de baixa intensidade, da terapia laser de baixa potência em cultura celular fibroblástica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: não se aplica uma vez que será utilizado sistema in vitro.

Benefícios: mediante a aplicação dos recursos físicos, torna-se necessário conhecer os seus efeitos quando aplicados aos diversos tecidos, bem como definir uma dosimetria adequada para gerar efeitos benéficos ao tecido.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante ao propor a análise in vitro de recursos utilizados para estimular a reparação celular in vivo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A autorização institucional está adequada.

O projeto propõe uma pesquisa in vitro, não havendo sujeitos envolvidos, sendo dispensado o TCLE.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Endereço: Av. Parife 675

Bairro: Jardim Piza

CEP: 86.041-140

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-7834

E-mail: pesquisa@unopar.br



UNIVERSIDADE NORTE DO  
PARANÁ - UNOPAR



Continuação do Processo: 462.478

LONDRINA, 20 de Novembro de 2013

---

Assinado por:  
Hélio Hiroshi Sugimoto  
(Coordenador)

Endereço: Av. Paris 675

Bairro: Jardim Piza

CEP: 86.041-140

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-7834

E-mail: [pesquisa@unopar.br](mailto:pesquisa@unopar.br)

## ANEXO B

### Normas de formatação da Revista Osteoporosis International

#### ARTICLE TYPES

- Editorial:

Please note that systematic review articles should be submitted as a Reviews and meta-analyses should be submitted as Original Articles.

- Original articles:

word limit 5000 words, 45 references, no more than 6 figures/tables

- Short communications: 2500 words, 20 references, no more than 2 figures/tables.

- Reviews: word limit 10000 words, 100 references, no more than 10 figures

- Position Papers

- Opinion Papers

- Consensus Statements

- Case Reports: 1500 words, 1-2 figures/tables, 20 references

- Letters: 500 words

- Editorial

Invited Review Articles must also be submitted online.

- Reviews articles invited by Felicia Cosman are managed by the editorial office in New York: authors must select "R. Lindsay" in the manuscript routing section of Manuscript Central.

- Reviews articles invited by Rene Rizzoli are managed by the editorial office in Europe: authors must select "J. Kanis" in the manuscript routing section of Manuscript Central.

These articles will then follow the standard peer review procedure.

Please note:

All word counts listed below refer to restrictions to the main body of the article only, and are exclusive of title page, abstract, references, tables and figures.

#### REVIEW PROCEDURE

All manuscripts undergo strict peer review, including Reviews, Consensus Statements and Supplements.

Manuscripts are initially considered by the managing Editor-in-Chief. Any manuscript that does not meet the general certain criteria of the journal, e.g.

- relevance to the aims of the journal with the topic being of overall general interest

- sufficiently original and contributing to the advancement of the field,

- clearly written with appropriate study methods, well-supported data and conclusions which are supported by the data

will be reviewed and discussed with the local Associate Editor(s) prior to the submission being returned to the author without acceptance.

All other submitted manuscripts are assigned to an editor who will manage the external peer review process and editorial decision. The Journal encourages authors to recommend individuals who could be considered as reviewers, providing the editorial office with full names and contact details. Authors are also given the opportunity to request the exclusion of a specific reviewer. In this case, authors should provide justification for their request.

Each manuscript is reviewed by a minimum of two expert referees who will provide unbiased, critical and independent assessment of the submission. The (corresponding) author is notified by email of the editorial decision, which will include any applicable criticisms and comments from the reviewers and managing editor. The decision to accept with/without revision or otherwise, will be made by the managing editor based on the critical assessments of the experts.

Manuscripts which are returned to the authors for minor or major modifications should be resubmitted

online within one or three months, respectively; otherwise, they will be considered withdrawn. Normally, revised manuscripts are reassessed by the same reviewers to determine if the authors have satisfactorily addressed their criticisms and comments. Depending upon this evaluation, the manuscript may be accepted or rejected. Any questions or concerns regarding the editorial decision on a manuscript must be submitted directly to the managing editorial office within 3 months.

#### Confidentiality

All manuscripts are treated by the assigned reviewers as privileged and confidential information. Reviewers may request advice from another party, subject to the general principles of confidentiality and permission of the managing editor. Reviewers' comments are not published or made available publicly except with the prior written permission of the reviewer, author and editor. However, reviewers' comments are shared with the other reviewers of the same paper, and reviewers will be notified of the editor's decision. The reviewers' identity remains anonymous. All reviewers are asked to disclose any potential conflict that could influence their opinions of manuscripts, prior to review of manuscript.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

We urge authors to follow the guidelines for authors to speed up the review and publication process.

All manuscripts are subject to copyediting upon acceptance; however, authors are asked to ensure that manuscripts from non-native English language speakers should have the language and grammar checked by a native speaker or a professional agency. Poorly written articles cannot be reviewed and will be returned to the authors.

- Authorship Criteria and Contributions

All listed authors should have seen and approved the final version of the manuscript.

All authors of accepted articles must sign an authorship form affirming that they have met all three of the following criteria for authorship, thereby accepting public responsibility for appropriate portions of the content:

1. substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. drafting the article or revising it critically for important intellectual content;
3. approval of the version to be published and all subsequent versions.

If authorship is attributed to a group (such as for multi-center trials), the group must designate one or more individuals as authors or members of a writing group who meet full authorship criteria and who accepts direct responsibility for the manuscript.

Other group members who are not authors should be listed in the Acknowledgment section of the manuscript as participating investigators.

Individuals who do not meet the criteria for authorship but who have made substantial, direct contributions to the work (e.g., purely technical help, writing assistance, general or financial or material support) should be acknowledged in the Acknowledgments section of the manuscript, with a brief description of their contributions. Authors should obtain written permission from anyone they wish to list in the Acknowledgments section.

- Redundant, Duplicate or Fraudulent Publication

Authors must not simultaneously submit their manuscripts to another publication if that manuscript is under consideration by Osteoporosis International.

Redundant or duplicate publication is a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media. At the time of manuscript submission, authors must inform the editor about all submissions and previous publications that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work. Any such publication must be referred to and referenced in the new paper.

Copies of such material should be included with the submitted paper as a supplemental file.

Authors must not:

- Willfully and knowingly submit false data
- Submit data from source not the authors' own

- Submit previously published material (with the exception of abstracts) without correct and proper citation
- Omit reference to the works of other investigators which established a priority
- Falsely certify that the submitted work is original
- Use material previously published elsewhere without prior written approval of the copyright holder

#### MANUSCRIPT SUBMISSION

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

#### TITLE PAGE

##### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

##### Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusions

##### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

##### Conflict of Interest

Every manuscript must be accompanied by the “Authorship & Disclosure Form”, which can be found in the tabs along the right-hand side of this page. ALL authors are required to sign and complete the form and it must then be submitted, alongside the manuscript, as a supplemental file not for review. Manuscripts without a fully complete Authorship & Disclosure form will not be considered for review.

## SPECIFIC REMARKS

## Mini Abstract

50 words or less. Describe the rationale, main result and significance. Use language that can be understood by persons outside the field. Avoid details.

## TEXT

## Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## TEXT FORMATTING

- Introduction: Develop the study rationale and avoid a literature review. Literature should be cited only to the extent that it helps the reader understand why the question is asked. End the introduction with a stated aim or question, preferably expressed as a testable hypothesis. For example, if the study is aimed at identifying the color of apples, or asks what color are apples, state “we hypothesized that apples will be green rather than red”. The reason for this hypothesis should be contained in the rationale.
- Methods: The methods section should describe the procedures used and provide sufficient information (subjects, measurements, statistical analyses) so that a reader can evaluate the credibility of results and interpretation in the light of possible methodological limitations.



Findings should be quantified when possible, and presented with appropriate indicators of measurement error or uncertainty, e.g. confidence intervals.

The source or manufacturer name of all products used should be stated.

Authors should always consider clarity for other workers about how and why a study was in a particular way.

- **Results:** Results concerning the primary testable hypothesis should be presented first. Do not save the "best" for last. For example, if the main aim is to assess anti-fracture efficacy, present these data first and surrogates (BMD or biochemical markers) later. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate, in the form of tables and/or graphs, although very large tables should be avoided. If authors wish to present the full data of the study and any technical details, these can be included as Electronic Supplementary Material.
- **Discussion:** The following paragraph structure is recommended:
  - A summary of the main findings from most to least important including a statement whether the results are consistent with the stated hypothesis.
  - Discuss how these results confirm or contrast with the published literature.
  - If the results differ, discuss the possible reasons for this. Details of methodology and results of published literature may be appropriate here. Avoid reviewing the literature outside the scope of the study.
  - Discuss the significance and implications of this new data. Having developed the rationale to define the limits of current knowledge, how does this new information advance understanding?
  - Write a paragraph concerning the limitations of the study. This is critical. The inferences made throughout the Discussion must be written bearing in mind the constraints of the methodological limitations of the work. Papers written without this section will not be considered for publication.
  - Summarize and Conclude: The conclusion is an inference. Within the constraints of the limitations of the study, the authors may boldly speculate regarding the significance of the findings and future research.

#### TERMINOLOGY

Please refer to the below Terminology guidelines and include as appropriate in your submission. All abbreviations in the abstract and text must be defined immediately at first mention and used consistently thereafter.

- **Bone histomorphometry:** Articles on bone histomorphometry should conform to the recommendations of the American Society for Bone and Mineral Research (Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al (2013) Standardized Nomenclature, Symbols and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013;28:2-17).
- **Tumor necrosis factor (TNF) family members:** Articles on TNF family members should conform to the recommendations of the American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR President's Committee on Nomenclature (2000) Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 15:2293-2296).
- **Bone markers:** Articles on bone markers should conform to the recommendations of the International Osteoporosis Foundation (Delmas PD, Eastell R, Garnero P, et al. (2000) The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int Suppl* 6:S2-S17).
- **Proprietary substances and materials, and instruments:** The correct designation and the manufacturer's name should be given. Where the manufacturer is not well known, the city and country should also be included.
- **Units of measure:** SI units should be used throughout, except where non-SI units are more common.

- Drug names: When drugs are mentioned, the international (generic) name should be used. The proprietary name, chemical composition, and manufacturer should be stated in full in the Materials and Methods section. The source of any new and experimental preparation should also be given.
- Papers describing the descriptive epidemiology of osteoporosis using BMD at the femoral neck should include T-scores derived from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III reference database for femoral neck measurements in Caucasian women aged 20–29 years as described in:  
Kanis JA, Adachi JD, Cooper C, Clark P, Cummings SR, Diaz-Curiel M, Harvey N, Hiligsmann M, Papaioannou A, D Pierroz D, Silverman SL, Szulc P, and the Epidemiology and Quality of Life Working Group of IOF (2013). Standardising the descriptive epidemiology of osteoporosis: recommendations from the Epidemiology and Quality of Life Working Group of IOF. *Osteoporos Int.* doi: 10.1007/s00198-013-2413-7  
Available from this:  
Link

## REFERENCES

### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8  
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:  
Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329
- Article by DOI  
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086
- Book  
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- Book chapter  
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document  
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation  
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

#### TABLES

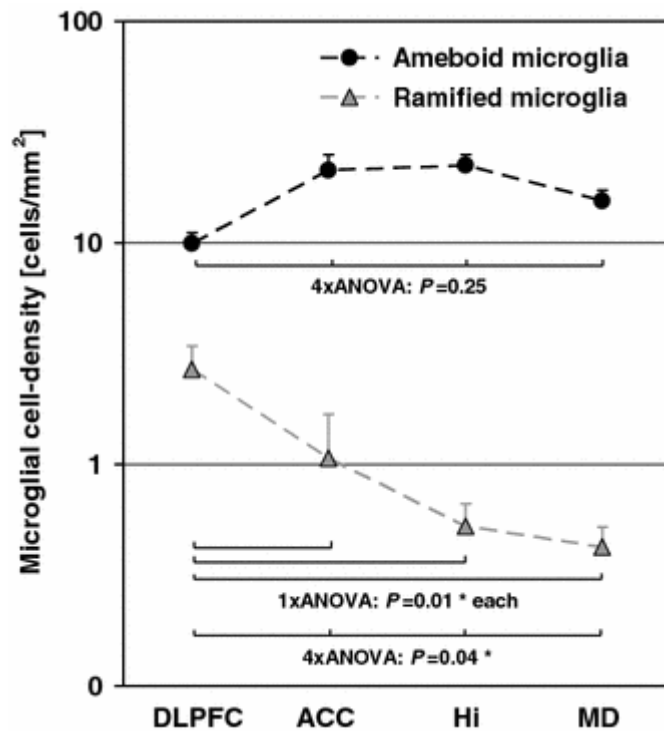
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

##### Electronic Figure Submission

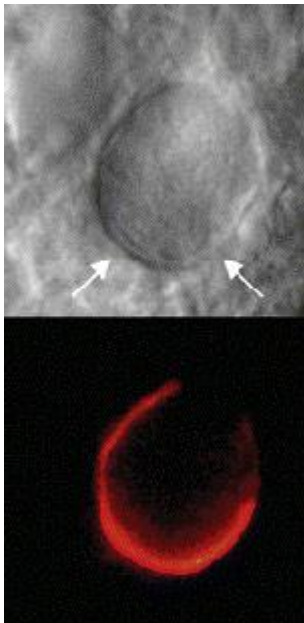
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

##### Line Art



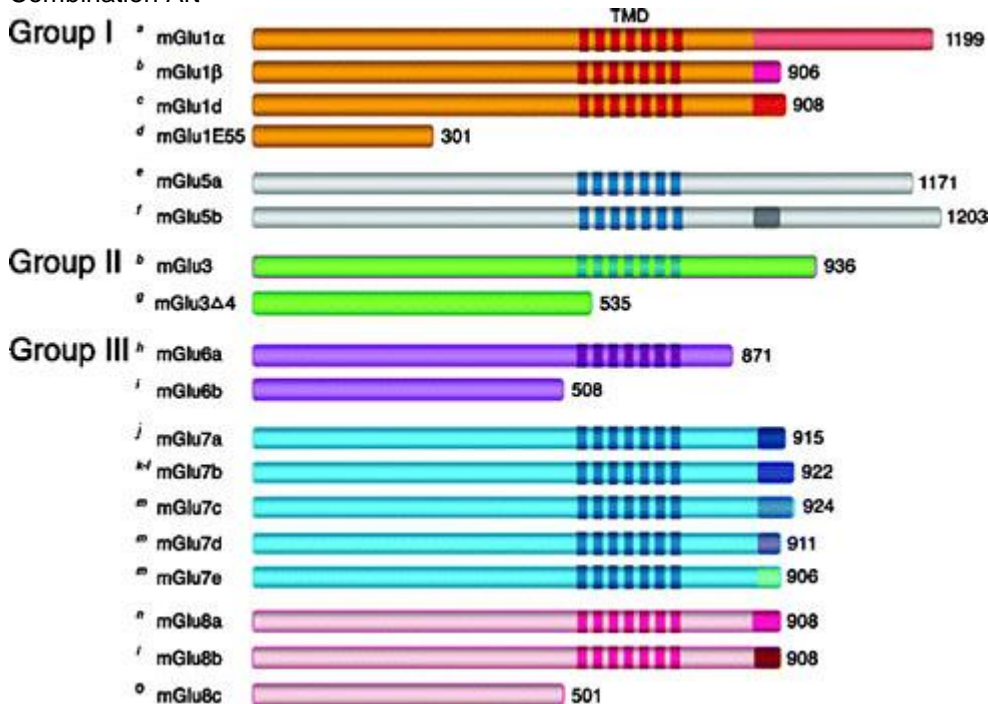
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

### Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1