

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ALICE DIAS PETRI

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS CULTIVADAS SOBRE TITÂNIO.**

Ribeirão Preto

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALICE DIAS PETRI

**EFEITOS DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM CÉLULAS
OSTEOBLÁSTICAS HUMANAS CULTIVADAS SOBRE TITÂNIO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Faciais

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Petri, Alice Dias

Efeitos da radiação laser de baixa intensidade em células osteoblásticas humanas cultivadas sobre titânio.

Ribeirão Preto, 2008.

63 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz.

1. Laser de baixa intensidade. 2. Cultura de células. 3. Osteogênese. 4. Titânio.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alice Dias Petri

Efeitos da radiação laser de baixa intensidade em células osteoblásticas humanas cultivadas sobre titânio.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e bolsa do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

A Deus, que permite todas as coisas e que me permitiu chegar até aqui.

Aos meus pais, Adalberto e Maria José, pelo amor incondicional, paciência e incentivo incansável.

Aos meus irmãos, Ricardo, Taciana, Laura, Mariana, Marcos e Gabriel, pelas tantas coisas das quais abdicaram para que eu pudesse chegar até aqui.

Dedico também aos amigos Professor Adalberto, Lucas, Larissa e Grasiéle, grandes responsáveis por essa fase ter sido vencida!

AGRADECIMENTOS

Agradeco

Ao Professor Adalberto Luiz Rosa, por ter me orientado com tanta paciência, carinho e amizade. Sua confiança e seu incentivo foram o que me encorajaram a chegar até o fim.

Ao Professor Cássio Edvard Sverzut, esse grande amigo que sempre está disponível, de longe ou de perto, sempre presente em minha formação. É um dos grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Fico feliz por ter a certeza de que sempre poderei contar com você.

Ao Professor Valdemar Mallet da Rocha Barros, amigo, mestre, conselheiro, por tantas vezes foi meu “Porto Seguro” sempre que precisei. A admiração que tenho por você desde a minha graduação guiou meus passos para os caminhos da Cirurgia.

Ao Professor Alexandre Elias Trivellato, com certeza um dos primeiros a acreditar em mim, sempre amigo, esteve presente nos momentos mais difíceis. A você devo também grande parte da minha formação.

Ao Professor Márcio Mateus Beloti, pela disponibilidade, paciência e amizade.

Ao Professor Luiz Antonio Salata, meu primeiro orientador na área da cirurgia.

Aos demais professores do Departamento, Samuel Porfírio Xavier, Arthur Belém Novaes Júnior, Sérgio Luís Scombatti de Souza, Daniela Bazan Palíoto, Márcio Fernando de Moraes Grisi, Mário Taba Júnior.

Aos amigos do Departamento Dulce, Tati, Rô, Gledson e demais funcionários, sua ajuda foi de extrema importância durante todos esses anos.

Aos meus amigos de laboratório Roger, Júnia, Larissa Sverzut, Larissa de Castro, Luciana Batista, Luciana Sicchieri, Fabíola, Lucas, Grasiêfe, Maidy, Alex, Professora Karina e Professor Paulo. Todos vocês tornaram este mestrado mais fácil e fazem minha vida mais feliz.

Ao Roger em especial, que me recebeu tão bem no laboratório e tantas vezes parou pra me escutar, rindo ou chorando. Você vai sempre morar no meu coração.

A Alexander Tadeu Sverzut, pelo socorro no computador e as figuras lindas do Photoshop.

Aos meus amigos do mestrado Adriano, Marcos, Maya, Roberto, e Wagner.

A Roberto de Oliveira Jabur. Com você aprendi, vivi, chorei, senti e sonhei. A vida nos prepara surpresas e você foi uma das grandes. Que bom. Devo a você, em grande parte, ter me tornado a profissional e a pessoa que eu sou.

Aos meus companheiros do CAEDO (Centro de Atendimento Especializado em Diagnóstico Oral) Professor Luiz, Professora Suzie, Professora Alessandra, Jorge, Rander e Marcelo, pela paciência, amizade e incentivo.

A Eduardo O. de Souza, pela ajuda com os textos em inglês e por me fazer sentir que sempre estive aqui.

A Fernando José Dias, pela disponibilidade para ceder e responder as dúvidas sobre o uso do aparelho de Laser.

Aos meus amigos Ana Paula e família, Michelle e família, Flávia, Patrícia, Lúcia, Carolina, Bianca, Suzeidi, Fábio, Michel e Gabriela, por me fazerem sentir em casa mesmo estando longe.

A minha irmãzinha Mariana, o membro mais próximo da minha família, que há anos acompanha minha caminhada. Por agüentar os momentos de estresse e bagunça, e por tantas vezes facilitar minha vida longe de casa.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

"Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes." [Isaac Newton]

ΕΠΪΓΡΑΦΕ

*"A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original." [Albert Einstein]*

RESUMO

RESUMO

PETRI, A. D. **Efeitos da radiação laser de baixa intensidade em células osteoblásticas humanas cultivadas sobre titânio.** 2008. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O sucesso do tratamento com implantes osseointegráveis depende do processo de reparo da ferida e do potencial osteogênico das células. Com o objetivo de aumentar a formação óssea na superfície dos implantes, vários tratamentos têm sido propostos, entre eles, a terapia com laser de baixa intensidade. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do laser diodo de Arseneto-Gálio-Alumínio (AsGaAl) em culturas osteogênicas humanas crescidas sobre titânio. Após exposição das culturas, aos 3 e 7 dias, a uma dose de 3 J/cm^2 , foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) proliferação celular aos 10 e 14 dias; 2) atividade de fosfatase alcalina (ALP) em 10, 14 e 17 dias; 3) formação de matriz mineralizada em 17 dias; 4) imunolocalização de proteínas não-colágenas e do antígeno nuclear Ki-67 por fluorescência indireta em 8, 10, 14 e 17 dias; 5) expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do fenótipo osteoblástico aos 14 dias. Os resultados dos ensaios de proliferação celular mostraram que a radiação laser aumentou a proliferação de 10 para 14 dias, mas tanto a atividade de ALP como a formação de matriz mineralizada aparentemente não foram afetadas. A análise das culturas por epifluorescência mostrou que as culturas controle e irradiadas apresentaram comportamento distintos. Aos 14 dias, foi demonstrado que a exposição à radiação laser, na dose utilizada, promoveu aumento na expressão relativa dos genes ALP, OC, BSP, BMP-7 e OPG e redução dos níveis de expressão de Runx2 e osteopontina, mas não afetou a expressão gênica de COL I, RANK-L e ICAM. As culturas irradiadas apresentaram áreas sem células após 24 h da última irradiação, que posteriormente foram repovoadas por células mais proliferativas e menos diferenciadas. Em conclusão, os resultados indicam que a radiação do laser diodo de AsGaAl estimula a expressão do fenótipo osteoblástico de culturas osteogênicas humanas crescidas sobre titânio.

Palavras-chave: laser de baixa intensidade, cultura de células, osteogênese, titânio.

ABSTRACT

ABSTRACT

PETRI, A. D. **Effects of low-level laser radiation on human osteoblastic cells grown on titanium.** 2008. 63 p. Thesis (Master Degree) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The success of treatment with osseointegrated implants depends on wound healing and the osteogenic potential of cells. Aimed at increasing bone formation onto implant surfaces, several treatments have been proposed and low-intensity laser therapy is one of them. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of the Gallium-Aluminum-Arsenic (GaAlAr) diode laser on human osteogenic cultures grown on titanium. After irradiation of osteogenic cultures with 3 J/cm^2 of GaAlAr laser at the days 3 and 7, the following parameters were evaluated: 1) cell proliferation at 10 and 14 days; 2) alkaline phosphatase activity (ALP) at 10 days; 3) mineralized matrix formation at day 17, 4) non-collagenous bone proteins and nuclear antigen Ki-67 immunolocalization by indirect fluorescence at 8, 10, 14 and 17 days; and 5) Expressions of a panel of genes related to osteoblastic phenotype at day 14. Apparently cell proliferation, ALP activity and mineralized matrix formation were not significantly different between irradiated and control cultures in any period. Epifluorescence revealed that control and irradiated cultures had presented different behaviors. At 24 h after irradiation procedures, irradiated cultures displayed areas with no cells, which were repopulated later on by proliferative and apparently less-differentiated cells. Laser radiation increased relative gene expression of ALP, OC, BSP, BMP-7, and OPG; reduced the gene expression of Runx2 and OPN; and did not affect the expression of COL-1, RANK-L and ICAM. Altogether these results indicated that the GaAlAr laser stimulates the expression of osteoblastic phenotype of human osteogenic culture cells grown on titanium.

Key-words: low level laser, cell culture, osteogenesis, titanium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 PROPOSIÇÃO	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Cultura de células	27
3.2 Radiação laser.....	28
3.3 Avaliação das respostas celulares.....	32
3.3.1 Proliferação celular.....	32
3.3.2 Atividade de ALP	33
3.3.3 Formação de matriz mineralizada.....	34
3.3.4 Imunolocalização de proteínas por fluorescência indireta	35
3.3.5 Expressão gênica	36
3.4 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os implantes osseointegráveis têm sido uma alternativa efetiva para reabilitação da função mastigatória, fonação e estética em casos de perda dentária. O sucesso desses implantes depende de uma adequada osseointegração que se caracteriza por aposição íntima de osso neoformado na superfície do implante observada ao microscópio óptico e que é mantida quando esse implante é submetido a cargas funcionais (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). O processo de reparo da ferida e o potencial osteogênico das células para induzir a formação óssea em torno do implante são fundamentais para o processo de osseointegração. Esses fenômenos envolvem uma seqüência de eventos tais como: recrutamento, proliferação e diferenciação celular, seguidos pela deposição e mineralização de matriz óssea (CANALIS, 1996). Nos leitos ósseos onde não se obtém adequada estabilidade primária dos implantes, um período de cerca de 4 a 6 meses é necessário para que ocorra o processo de osseointegração e o implante seja capaz de suportar cargas mastigatórias (BRANEMARK et al., 1977). Com o objetivo de acelerar e/ou aumentar a formação óssea na superfície dos implantes tem sido proposto vários tratamentos, entre eles a terapia com laser de baixa intensidade.

O laser é uma fonte de radiação não ionizante, altamente concentrada, que em contato com diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo de radiação, em efeitos térmicos, fotoquímicos (PINHEIRO, 1998). A radiação laser pode ser classificada de acordo com a potência de emissão em: 1) laser de alta intensidade ou laser cirúrgico - sistemas que emitem radiações de alta potência com poder destrutivo associado aos efeitos fototérmicos que, na dependência do coeficiente de absorção do tecido, pode levar à incisão, vaporização, coagulação e esterilização e 2) laser de baixa intensidade ou laser não cirúrgico - sistemas que emitem radiações de baixa potência, sem poder destrutivo e que possuem ações fotoquímica e

fotobiológica, como analgésica, antiinflamatória e de bioestimulação (ALMEIDA-LOPES, 1999; GENOVESE, 2000; LOW; REED, 2001; PINHEIRO, 1998). O uso do laser de baixa intensidade como terapia é distinto do uso do laser em cirurgia, onde os efeitos terapêuticos aparentemente surgem direta ou indiretamente da interação eletromagnética da luz com o tecido e não dos efeitos térmicos ou fotoquímicos (ROSENSHEIN, 1997). Os lasers de baixa potência utilizados na terapia estão situados na porção visível do espectro eletromagnético e no infravermelho próximo sendo os de Hélio-Neônio (He-Ne) ($\lambda=632$ nm, onde λ é o comprimento de onda), e os de diodo representados pelos lasers de Arseneto de Gálio (AsGa), Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) e Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) ($\lambda=600-1000$ nm) (KARU, 1998). Acredita-se que a energia emitida pelo laser é absorvida por cromóforos intracelulares e convertida em energia metabólica (KARU, 1989). Esse mecanismo de fotoestimulação celular tem sido atribuído à ativação da cadeia respiratória mitocondrial resultando no início de uma cascata que promove a sinalização celular e aumento de produção de ATP (KARU, 1989; WONG-RILEY et al., 2001). Entretanto, para se obter resultados satisfatórios, tanto os fatores inerentes a radiação laser quanto as propriedades de cada tecido merecem igual atenção.

Os parâmetros relevantes ao laser são: comprimento de onda, potência, densidade de potência, densidade de energia, dose ou fluência, tipo de regime de operação (pulsado ou não pulsado) e frequência de pulso. Em relação ao tecido, é importante observar: os tipos de reações moleculares e bioquímicas, os cromóforos, a concentração de água, a irrigação sanguínea local e a localização da área alvo (KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004; PARKER, 2007). Para que ocorra uma transferência de energia é necessário que ocorra absorção do feixe de luz pelo tecido. Quando as camadas superficiais apresentam alto coeficiente de absorção, a capacidade da radiação laser em penetrar o tecido se reduz. O coeficiente de absorção é dado pela concentração de constituintes com capacidade de absorver a radiação no comprimento de

onda empregado, os chamados cromóforos. Seus principais representantes são: água, hemoglobina e melanina, dentre outras proteínas, componentes que têm a capacidade de transformar a radiação em outra forma de energia, produzindo efeitos fotoquímicos, fototérmicos, fotomecânicos e fotoelétricos, conforme a quantidade e intensidade da energia absorvida.

Na Odontologia, o laser de baixa intensidade tem sido clinicamente usado com eficácia na recuperação de estomatite aftosa recorrente, úlceras traumáticas, lesões herpéticas, pericoronarite, gengivite, gengivoestomatites herpéticas primária e secundária (Herpes Simples), queilite angular, pericementite, síndrome da ardência bucal, alveolite, mucosite (COLVARD; KUO, 1991; CONVISSAR; MASSOUMI-SOURNEY, 1992) e tratamento das desordens temporomandibulares (MAZZETTO et al., 2007). Além disso, pelo seu efeito analgésico e capacidade de acelerar a reparação óssea, em casos de expansão rápida da maxila (HONMURA, 1992; SAITO; SHIMIZU, 1997).

Em relação ao reparo ósseo, o laser de baixa intensidade vem sendo usado em diversas condições como em alvéolos após extração dentária, em fraturas ósseas, durante tratamentos ortodônticos e no pós-operatório de implantes dentários (DAVID; NISSAN; COHEN, 1996; KAWASAKI; SHIMIZU, 2000; LUGER; ROCHKIND; WOLLMAN, 1998; TAKEDA, 1988; YAAKOBI, MALTZ; ORON, 1996), além de acelerar a reparação óssea após a expansão rápida da maxila, como acima citado. Isso tem sido atribuído ao fato de que a terapia com laser de baixa intensidade aumenta a quantidade de cálcio, fósforo, e colágeno do osso neoformado e também acelera a revascularização da região afetada promovendo assim a formação e maturação óssea, efeito esse transitório e dependente dos parâmetros de aplicação do laser (CHEN; ZHOU, 1989; TRELLES; MAYAYO 1987).

Embora reconhecendo que o efeito da radiação laser sobre um determinado tecido resulte da sua ação sobre diferentes níveis, tais como, íons, proteínas e outras macromoléculas

e sobre tipos celulares distintos, o estudo de alguns deles isoladamente pode fornecer informações importantes a respeito da estimulação do tecido como um todo. Nesse sentido, diversos estudos *in vitro* foram desenvolvidos para analisar os efeitos da radiação laser de baixa intensidade sobre diferentes tipos celulares, tendo sido observado aumento na atividade proliferativa de fibroblastos do ligamento periodontal (KREISLER et al., 2003), favorecimento da síntese protéica de fibroblastos humanos embrionários (SKINNER et al., 1996) e aumento da proliferação de células mononucleares do sangue (GULSOY et al., 2006). Em relação ao tecido ósseo, os estudos são predominantemente dirigidos aos efeitos da radiação laser sobre os osteoblastos.

Em osteoblastos, vários estudos mostraram alguns efeitos da radiação laser de baixa intensidade. Xu et al. (2008) mostraram que o laser pulsado de baixa intensidade aplicado às culturas de osteoblastos de calvária de ratos promove proliferação, diferenciação e altera a relação RANKL/OPG, o que sugere inibição da diferenciação osteoclástica. Em culturas de células humanas da linhagem de osteossarcoma SAOS-2, Stein et al. (2008) demonstraram redução de viabilidade celular e da atividade de fosfatase alcalina (ALP do inglês *alkaline phosphatase*) nas células irradiadas com 2 J/cm^2 nas primeiras 24 horas, porém maior expressão de osteopontina e RNAm de colágeno tipo I após 72 horas. Fukuhara et al. (2006) irradiando culturas de células obtidas de calvária de ratos encontraram maior número de células no ciclo celular após 12 horas e maior número de células após 3 dias. Khadra et al. (2005) observaram um aumento na adesão, proliferação, diferenciação e produção de TGF-beta em células osteoblásticas derivadas de osso mandibular humano após a irradiação com laser de baixa intensidade. Stein et al. (2005) demonstraram maior número de células, maior atividade de ALP e maior expressão de osteopontina e sialoproteína óssea seguindo a irradiação de osteoblastos derivados de osso humano. Hamajima et al. (2003) irradiaram células de rato da linhagem MC3T3-E1 e mostraram um aumento da expressão de

osteoglicina nessas células. Coombe et al. (2001) mostraram em culturas de células humanas da linhagem de osteossarcoma SAOS-2 que a radiação laser de baixa intensidade não afeta a viabilidade, a proliferação celular a atividade de ALP e a quantidade de cálcio intracelular. Dortbudak et al (2000) mostraram uma maior deposição óssea ao final de 16 dias em culturas de células de medula óssea de ratos. Ozawa (1998) relatou em seu estudo em culturas de células de linhagem osteoblástica isoladas da calvária de fetos de ratos que a radiação laser acelera a proliferação celular apenas na fase de crescimento quando as células são consideradas indiferenciadas. Além disso, ele relatou que a radiação laser de baixa intensidade pode afetar a produção de mediadores que estimulam células osteoblásticas em função do tempo, frequência e dose aplicada. Os resultados controversos encontrados na literatura se devem, ao menos em parte, ao uso de modelos diferentes de cultura de células osteoblásticas. Os estudos acima sugerem que os efeitos da radiação laser são notados sobre células osteoblásticas de ratos, mas não são tão evidentes sobre células humanas, principalmente quando são utilizadas linhagens imortalizadas derivadas de osteossarcoma. Células osteoblásticas humanas derivadas de sítios ósseos distintos do mesmo indivíduo apresentam comportamento diferente como recentemente demonstrado pelo nosso grupo (DEFINO et al. 2008). Com relação ao laser, como apontado por Coombe et al. (2001) os efeitos do comprimento de onda, tipo de feixe, energia e tempo de exposição não foram totalmente elucidados até o presente momento. Além disso, o único estudo que avaliou o efeito da radiação laser sobre osteoblastos humanos cultivados sobre discos de titânio (Ti) (KHADRA et al., 2005), que mimetizaria *in vitro* a formação óssea sobre superfícies de implantes, não avaliou todas as fases da osteogênese em culturas de células como preconizado por Beck em 2003.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da radiação laser de baixa intensidade sobre células derivadas de fragmentos de osso do processo alveolar de humanos cultivadas sobre discos de Ti.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

As células foram obtidas de fragmentos de osso do processo alveolar de humanos (explantes), descartados durante procedimentos cirúrgicos em doadores saudáveis, sob aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. As células foram isoladas e cultivadas como descrito previamente (BELOTI et al., 2006; BELOTI et al., 2008). Os explantes foram fragmentados e submetidos a seis digestões enzimáticas seqüenciais em tubos de centrífuga estéreis contendo solução de colagenase tipo II (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) a 1 mg/ml, por períodos de 30 minutos a 37°C, sob agitação constante. Os sobrenadantes das duas primeiras digestões foram desprezados e aqueles das quatro últimas digestões, agrupados, transferidos para tubo de centrífuga contendo meio de cultura e centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. O *pellet* formado por células isoladas e os fragmentos ósseos remanescentes foram cultivados em MEM, modificação alfa (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 µg/ml de vancomicina (Acros Organics, Gell, Bélgica), 20 µg/ml de ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA), 0,3 µg/ml de fungizona (Gibco), 5 µg/ml de ácido ascórbico (Gibco), 7 mM de β-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e dexametasona 10⁻⁷ M (Sigma) em frascos de cultura de 75 cm² (Corning Incorporated, Costar, Corning, NY, EUA). Na subconfluência da cultura primária, o meio de cultura foi removido e foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Essas foram subcultivadas na concentração de 2x10⁴ células/poço em placas de 24 poços (Corning Incorporated), diretamente sobre discos de Ti e, posteriormente, irradiadas com laser.

3.2 Radiação laser

A emissão da radiação laser foi realizada por um aparelho MM Optics Twin Laser de diodo AsGaAl operando na faixa de 660 nm do espectro eletromagnético vermelho e na faixa 780 nm do infravermelho próximo, com potência de 10 mW a 70 mW, com emissão não pulsada. De acordo com as instruções do fabricante, o feixe do laser apresenta uma divergência de 17° e uma área de irradiação inicial de 0,04 cm². As células foram plaqueadas nos 4 poços centrais da placa para que a radiação laser atingisse todas as células dos quatro poços concomitantemente. Dessa forma, calculamos a área total formada pelos 4 poços por meio da fórmula utilizada para cálculo da área do círculo:

$$A = \pi.r^2$$

Onde A é a área, $\pi=3,14$ e r é o raio da circunferência.

O diâmetro da circunferência formada pelos 4 poços é igual a 4 cm. Dessa forma, para que as células dos 4 poços recebessem a radiação a laser ao mesmo tempo, foi necessário irradiar uma área correspondente a 12,60 cm², conforme esquematizado abaixo (Figura 1):

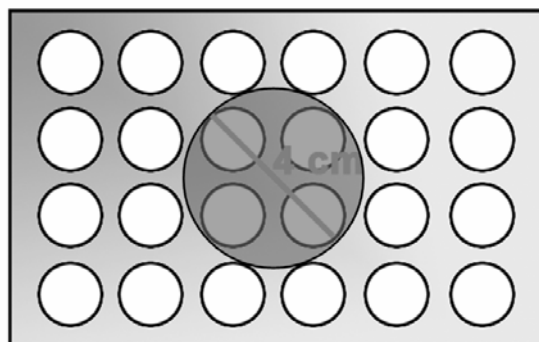


Figura 1. Representação da área circular formada pelos quatro poços da placa nos quais as células foram cultivadas e irradiadas pelo laser.

Para que a radiação atingisse concomitantemente uma área circular de $12,60 \text{ cm}^2$, foi calculada a distância necessária entre a ponta ativa do aparelho e a superfície dos poços da placa de cultura. Inicialmente, foi calculada a distância real entre a fonte de luz e a ponta ativa do aparelho por onde a radiação é emitida. Considerando a abertura do feixe de luz em forma de cone e a área do feixe de luz na saída da ponta ativa do aparelho de $0,04 \text{ cm}^2$, conforme informado pelo fabricante, aplicamos o cálculo da tangente para um triângulo retângulo conforme o esquema a seguir:

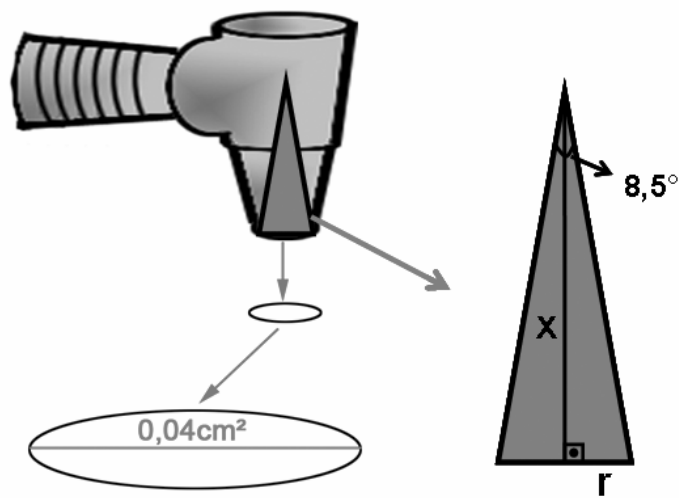


Figura 2. Representação dos fatores considerados no cálculo da distância entre a fonte de luz e a ponta ativa do aparelho. O triângulo representa dois triângulos retângulos utilizados para calcular tal distância por meio da tangente.

Dessa forma, tratando-se de um feixe circular foi aplicada a fórmula da área da circulo, onde a área corresponde a $0,04 \text{ cm}^2$ e consideramos a base do triângulo-retângulo como o raio da circunferência:

Área = $\pi \times r^2$, temos que

$$0,04 = 3,14 \times r^2$$

$$r = 0,1128 \text{ cm.}$$

A altura do triângulo retângulo (x) foi calculada pela fórmula da tangente do ângulo:

$$\text{Tg } 8,5^\circ = \frac{\text{cateto oposto}}{\text{cateto adjacente}}$$

Então: $0,1494 = \frac{0,1128}{x}$

$x = 0,755 \text{ cm.}$

Dessa forma, calculamos a distância até a superfície do poço (X) aplicando a regra de semelhança entre triângulos conforme representado abaixo:

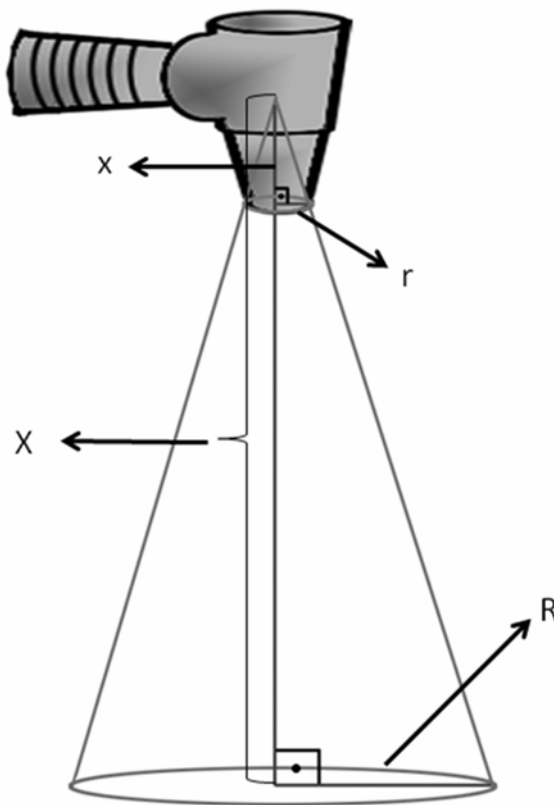


Figura 3. Representação dos fatores considerados no cálculo da distância entre a fonte de luz e a superfície dos poços da placa de cultura, utilizando a regra de semelhança dos triângulos.

$$\text{Onde: } \frac{x}{X} = \frac{r}{R}$$

$$\text{Então } \frac{0,1128}{2} = \frac{0,755}{X}$$

$$X = 13,386 \text{ cm}$$

A distância final entre a ponta ativa e a superfície dos poços da placa de cultura foi calculada subtraindo-se a distância entre a fonte de luz e a ponta ativa do aparelho de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.

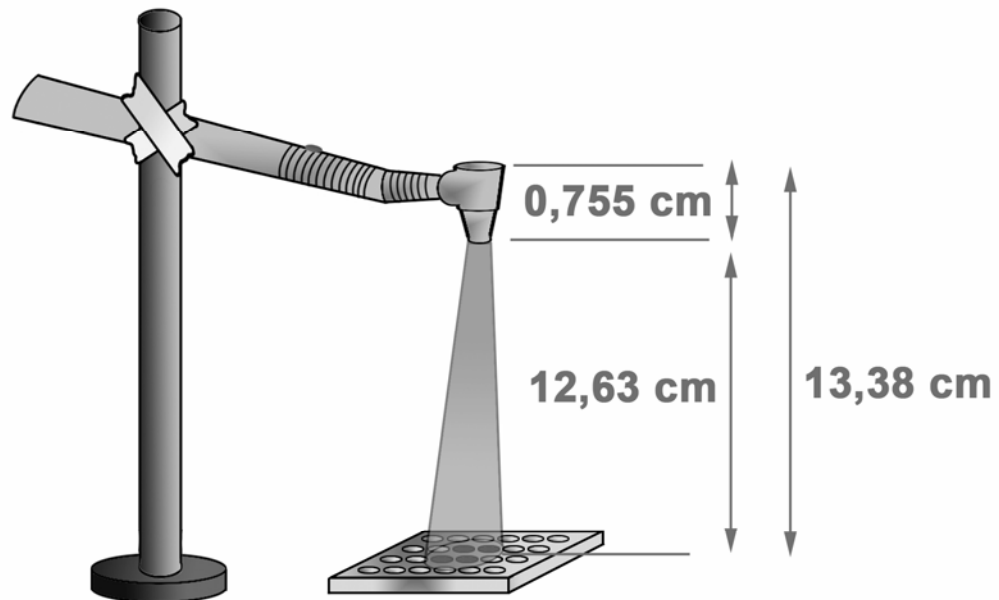


Figura 4. Representação dos fatores considerados no cálculo da distância entre a ponta ativa do aparelho e a superfície dos poços da placa de cultura, descontando-se a distância entre a fonte de luz e a ponta ativa do aparelho de 0,755cm.

A ponta ativa foi então fixada em um suporte a uma altura de 12,63 cm distante da superfície dos poços da placa de cultura onde se encontravam as células a serem expostas. A densidade de energia e o tempo de exposição foram calculados de acordo com a fórmula:

$$Dose = \frac{Potência \times Tempo}{Área}$$

As irradiações foram realizadas no interior do fluxo laminar. A incidência da radiação foi orientada diretamente sobre as células, sem a interferência da tampa da placa de cultura e do meio de cultura, de cor avermelhada, na absorção da energia do laser. As canetas foram devidamente desinfetadas pela aplicação de álcool 70% antes do uso.

A fim de avaliar o efeito da radiação laser nas culturas desenvolvidas sobre Ti, as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/poço sobre discos de Ti usinados posicionados em placas de 24 poços. Essas subculturas foram irradiadas no terceiro e sétimo dia após o plaqueamento com uma dose de 3,00 J/cm². Células não irradiadas foram utilizadas como controle. As subculturas foram mantidas por períodos de até 17 dias nas mesmas condições descritas acima e seu desenvolvimento foi avaliado em poços sem a presença de discos de Ti em microscópio de fase invertido.

3.3 Avaliação das respostas celulares

A proliferação celular foi avaliada aos 10 e 14 dias. A atividade de ALP foi avaliada aos 10, 14 e 17 dias. A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 dias. A imunolocalização de proteínas não-colágenas da matriz extracelular e do antígeno nuclear Ki-67 por fluorescência indireta, foi realizada aos 8, 10, 14 e 17 dias. A expressão gênica foi avaliada aos 14 dias.

3.3.1 Proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular foi utilizado o método MTT. Esse ensaio é dependente da redução do MTT (brometo de 3-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolium) pela deidrogenase mitocondrial de células viáveis em um produto azul em forma de cristais

(formazan) (MOSMANN, 1983). A quantidade desses cristais é diretamente proporcional à coloração azul, que avaliada por um espectrofotômetro permite uma estimativa do número de mitocôndrias, proporcional ao número de células viáveis da cultura.

Os poços foram lavados com PBS aquecida a 37°C, preenchidos com 100 µl de MTT (5 mg/ml) em PBS e incubados a 37°C por 4 horas. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 ml de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 100 µl de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. A proliferação celular foi expressa como absorbância.

3.3.2 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, usando um kit comercial (Labtest, MG, Brasil). O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C. A seguir, os poços foram preenchidos com 2 ml de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choques térmicos, que consistiram na exposição da placa em ambiente a -20°C por 20 minutos, seguida de 15 minutos a 37°C. Isso resulta na lise das células e liberação do seu conteúdo na solução de água destilada. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 500 µL de tampão. No tubo padrão foi acrescentado 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 50 µl dos lisados celulares e os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado em todos os tubos, branco, padrão e testes 2 ml do reagente de cor e em seguida a absorbância foi avaliada

em um espectrofotômetro CE3021 utilizando o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, expressa em μmol de timoftaleína/h/ml, foi calculada a partir da medida do tubo padrão. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total e expressos como μmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.3.3 Formação de matriz mineralizada

Para a coloração da matriz mineralizada foi utilizado o corante vermelho de alizarina (Sigma). Os poços foram lavados com PBS e as células fixadas com solução de formalina 10% por 24 horas e, após esse período, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (30, 50, 70, 90, 96%), mantendo cada solução em contato com as células por 1 hora. Após a última hora, a solução foi removida e as placas mantidas semi-abertas até a secagem total. Uma vez secos, os poços foram preenchidos com uma solução de vermelho de alizarina a 2% pH 4,2 (SIGMA), mantida durante 8 minutos. Após esse período, o excesso de corante foi removido pela lavagem abundante do material com água bidestilada e as placas novamente foram mantidas semi-abertas até a secagem.

A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico de acordo com Gregory et al. (2004). Foram adicionados 280 μl de ácido acético a 10% a cada poço previamente corado com vermelho de alizarina, e a placa foi levada ao agitador por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo eppendorf, e então aquecidos a 85°C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram levados para centrifuga a 20.000g por 15 minutos, e 100 μl do sobrenadante de cada tubo foi transferido para um novo tubo. Então 40 μl de hidróxido de amônia a 10% foram adicionados a cada tubo para neutralizar o ácido, e todo o conteúdo (140 μl) foi transferido para uma placa de 96 poços. A absorbância foi medida em

espectrofotômetro μ Quant (BioTek Instruments, Inc.) no comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como absorbância.

3.3.4 Imunolocalização de proteínas por fluorescência indireta

Foi feita a imunolocalização das proteínas não-colágenas osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e ALP, que são marcadoras da diferenciação osteoblástica. Também foi feita imunolocalização do antígeno nuclear Ki-67, expresso somente durante o ciclo celular que permite identificar as células em proliferação.

Para a imunolocalização de OPN e BSP, as culturas crescidas sobre discos de Ti por 14 e 17 dias, irradiadas ou não, foram fixadas em metanol p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos a -20° C. Para detecção da ALP e Ki-67, as culturas foram fixadas aos 10 e 17 dias em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram rotineiramente processadas para imunofluorescência, como descrito detalhadamente por de Oliveira et al. (2003) e de Oliveira e Nanci (2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 0,5% em PB, por 15 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB, durante 30 minutos. Foram utilizados os anticorpos anti-OPN (policlonal LF166, 1:1000, gentilmente cedido pelo Dr. Larry Fischer, NIH), anti-BSP (policlonal LF100, 1:1000, Larry Fischer, NIH, Bethesda, MD; Mintz et al. 1993), anti-ALP (monoclonal B4-78, 1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA) e anti-Ki-67 (policlonal, 1:70; Diagnostic BioSystems) seguidos de anticorpo secundário anti-cabra ou anti-camundongo conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes) ou Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes). Para a visualização dos citoesqueleto de actina e núcleos, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes) e 4',6-diamidino-2-

phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) a 300 nM. Após montagem de lamínula de vidro (Fisher Scientific, Suwanee, GA, EUA) sobre os discos de Ti, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram examinadas por epiluminação em microscópio de fluorescência (Leica, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmara fotográfica digital (Leica DC 300F). As imagens adquiridas foram processadas utilizando-se o software Adobe Photoshop.

3.3.5 Expressão gênica

A avaliação da expressão gênica foi feita por meio da reação de polimerase em cadeia em tempo real (real time PCR). Os genes avaliados podem ser agrupados da seguinte forma:

- a) marcadores do fenótipo osteoblástico: ALP, *runt related factor 2* (RUNX2), colágeno tipo 1 (COL I), osteocalcina (OC), OPN e proteína morfogenética óssea tipo 7 (BMP-7).
- b) envolvidos na interação osteoblasto-osteoclasto: osteoprotegerina (OPG), *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL) e *intercellular adhesion molecules* (ICAM1);

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). As seqüências dos *primers* e as características da reação são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* e propriedades das reações.

Gene	Seqüência <i>primer sense</i>	TA(°C)	TD (°C)	Bp
	Seqüência <i>primer anti-sense</i>			
β-Gus	CGTCCCACCTAGAATCTGCTG	60	82	130
	ACATACGGAGCCCCCTTGTC			
ALP	ACGTGGCTAAGAATGTCATC	60	86	475
	CTGGTAGGCGATGTCCTTA			
RUNX2	TATGGCACTTCGTCAGGATCC	61	83	110
	AATAGCGTGCTGCCATTCG			
COL I	TGACGAGACCAAGAACTG	61	84	114
	CCATCAAACCACTGAAACC			
OPN	AGACACATATGATGGCCGAGG	58	79	154
	GGCCTTGATGCACCATTCAA			
OC	CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC	62	85	150
	TCACAGTCCGGATTGAGCTCA			
BSP	AATCTGTGCCACTCACTGCCTT	58	79	201
	CCTCTATTTTACTCTTCGATGCAA			
OPG	AGGCACTTGAGGCTTTCAGT	59	85	120
	ACCCTGTGGCAAATAGTCA			
RANK-L	CAGCCTTTTGCTCATCTCACT	60	85	112
	TTATGGGAACCAGATGGGAT			
ICAM1	TGA AACTTGCTGCCTATTGGG	58	80	94
	GGGCCTTTGTGTTTTGATGC			

* beta-Gus - beta-glucorinidase, ALP - fosfatase alcalina, RUNX2 - *runt related factor 2*, COL I- colágeno tipo 1, OC - osteocalcina, OP – osteopontina, e BMP-7 - proteína morfogenética tipo 7, OPG - osteoprotegerina, RANKL - *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*, ICAM1 – *Intercellular adhesion molecules*; TA – temperatura de anelamento; TD – temperatura de dissociação; bp – número de pares de base do produto.

3.3.5.1 Extração de RNA total para PCR em tempo real

A extração do RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) seguido do tratamento com DNase (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, aos 14 dias da subcultura, as células expostas ou não ao laser foram lisadas com 1 ml de Trizol e os lisados transferidos para um tubo *epENDORF* e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Para cada 1 ml da suspensão foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Sigma) e os tubos centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa

foi transferida para outro tubo e foi acrescentado isopropanol em proporção igual à amostra (v/v). Essa solução foi mantida em freezer -20°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a $12000g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet*, lavado duas vezes com 1 ml de etanol a 75% e eluído em $13\ \mu\text{l}$ de água deionizada e livre de RNase. Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de $3\ \mu\text{l}$ foi diluída em $297\ \mu\text{l}$ de água previamente tratada com DEPC e analisada por espectrofotometria em aparelho Biomate 3 Spectrophotometer Thermospectronic (Rochester). A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260 nm, 280 nm e 230 nm, para obtenção da concentração de RNA/ μl e contaminação por fenol ou proteínas. Para o preparo da água adicionou-se 1 ml de DEPC em 999 ml de água deionizada, sendo essa mistura incubada por 24 horas e autoclavada por 30 minutos a 120 mmHg. Em seguida, $3\ \mu\text{g}$ de RNA foram submetidos ao tratamento com DNase (Invitrogen) conforme recomendação do fabricante. Para isso, foram adicionados à amostra $1\ \mu\text{l}$ de tampão, 1 unidade de DNase livre de RNase, e o volume foi ajustado em $10\ \mu\text{l}$ com água DEPC. A amostra foi submetida a 37°C por 1 hora no termociclador. O RNA foi novamente quantificado e $1\ \mu\text{g}$ foi utilizado para a confecção do cDNA e $2\ \mu\text{g}$ para o gel de agarose para avaliação da integridade da amostra.

3.3.5.2 Confecção da fita de cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir de $1\ \mu\text{g}$ de RNA por reação de transcrição reversa (*High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: $2\ \mu\text{l}$ de do tampão 10x, $0,8\ \mu\text{l}$ do mix de dNTP 100 mM, $2\ \mu\text{l}$ de *random primer*, $1\ \mu\text{l}$ de inibidor de RNase, $1\ \mu\text{l}$ da enzima Transcriptase Reversa e $3,2\ \mu\text{l}$ de água livre de nuclease. Em seguida, a amostra foi incubada a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 segundos e mantida a 4°C . Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA foi estocado em freezer -20°C .

3.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em quadruplicata utilizando células de três diferentes doadores, exceto os experimentos de análise da expressão gênica que foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (Two Way - ANOVA), seguida do teste de Tukey. As análises da expressão gênica e mineralização foram realizadas utilizando teste de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A avaliação da proliferação celular nos diferentes períodos por MTT indicou um aumento no número de células entre 10 e 14 dias ($F=1,12$; $p<0,017$). Entretanto o tratamento com radiação laser não alterou a proliferação celular nos dois períodos avaliados ($F=1,12$; $p<0,51$) (Figura 5).

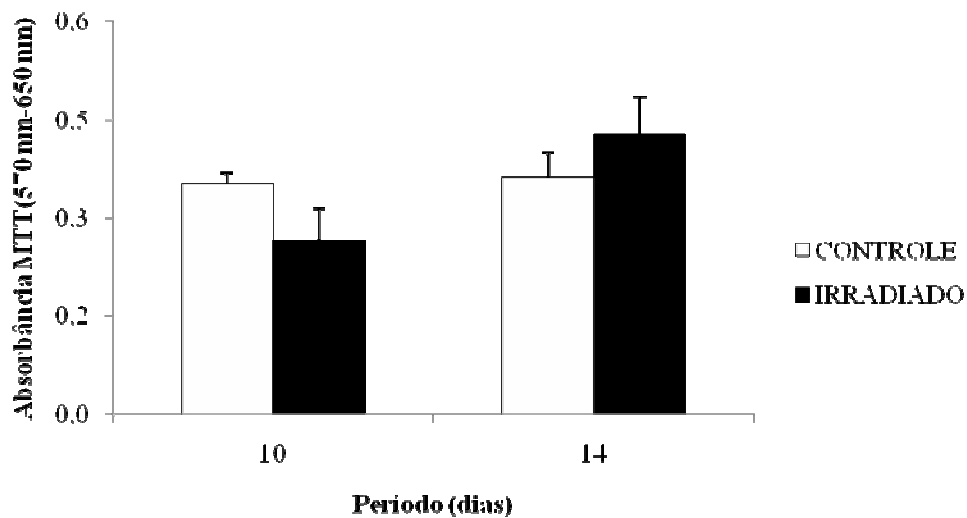


Figura 5. Efeito da radiação laser na dose de 3 J/cm^2 na proliferação de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas por 10 e 14 dias sobre discos de Ti. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

A atividade da ALP avaliada aos 10, 14 e 17 dias independentemente dos tratamentos foi afetada pelo tempo de cultura ($F=37,51$; $p<0,001$), sendo maior aos 10 dias. Entretanto, o tratamento com radiação laser não alterou a atividade de ALP em qualquer dos períodos avaliados ($F=1,54$; $p=0,230$) (Figura 6).

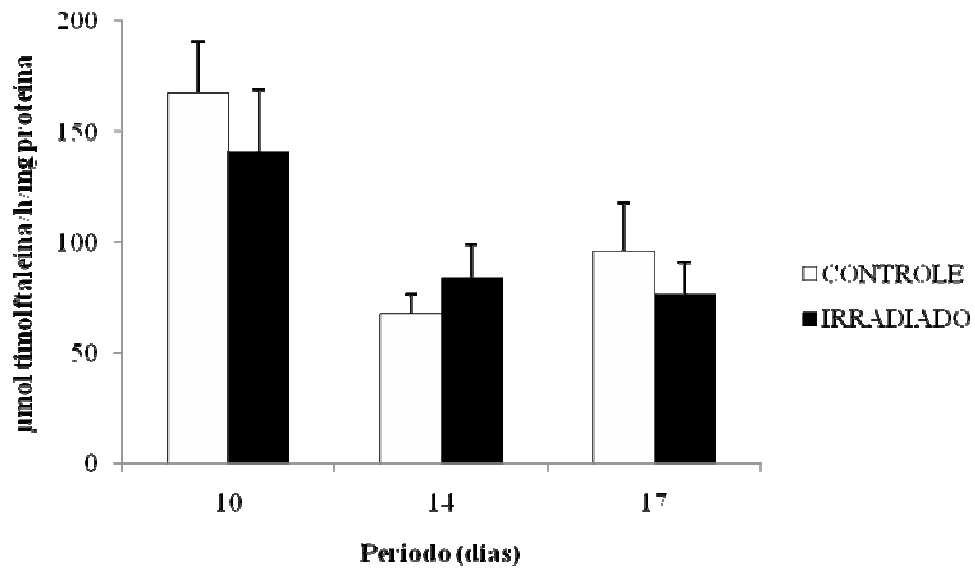


Figura 6. Efeito da radiação laser na dose de 3 J/cm^2 na atividade de ALP de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas por 10, 14 e 17 dias sobre discos de Ti. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

A formação de matriz mineralizada avaliada pela incorporação do vermelho de alizarina aos 17 dias não revelou diferenças entre culturas controle e irradiadas ($p>0,05$) (Figura 7).

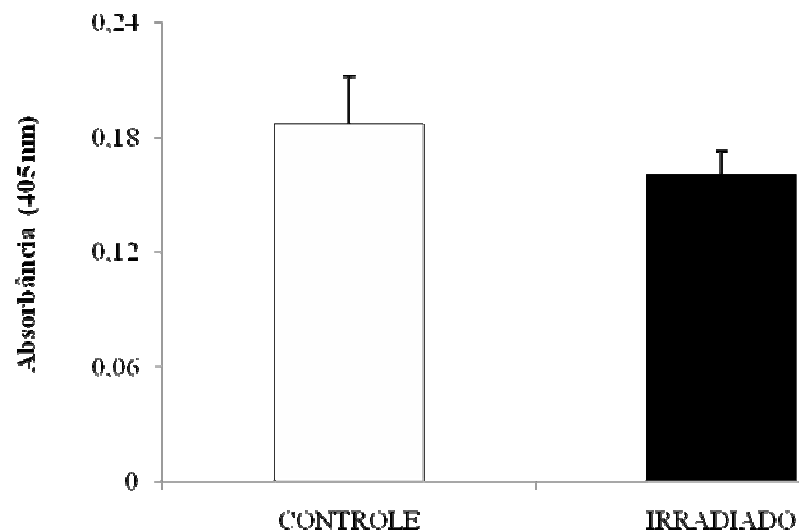


Figura 7. Efeito da radiação laser na dose 3 J/cm^2 na formação da matriz mineralizada de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas por 17 dias sobre discos de Ti. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$).

Aos 8 dias de cultura, correspondente a 24 horas após a segunda irradiação, notou-se nos discos de Ti a presença de uma área desprovida de células (Figura 8B). Nas demais áreas das culturas irradiadas, as células apresentavam-se em confluência, à semelhança do grupo controle (Figura 8A). Aos 10 dias, as culturas controle e irradiadas eram positivas para ALP e Ki-67 (Figura 8C e D). Em ambos os grupos, a ALP apresentava padrão de marcação puntiforme, distribuída por toda periferia da célula. Embora esse padrão tenha se mantido nos dois grupos, no irradiado, a região anteriormente desprovida de células apresentava um número menor de células que não exibiam marcação para ALP. Nesta área, foi observado o início do repovoamento celular, ratificado pela predominância de células no ciclo celular (Ki-67 positivas) (Figura 8E). A expressão de BSP foi semelhante em ambos os grupos avaliados aos 14 dias, sendo esta proteína detectada em acúmulos extracelulares (Figura 8F e G). Culturas controle e irradiadas expressavam OPN aos 14 dias (Figura 8H e I). Contudo, notou-se a presença de algumas áreas mais intensamente marcadas no controle (Figura 8H). Aos 17 dias, áreas de menor densidade celular, presentes em culturas irradiadas, exibiam intensa marcação para OPN (Figura 8J). Aos 17 dias, a marcação para ALP manteve o mesmo padrão puntiforme observado nas culturas controle e irradiada aos 10 dias, o que eventualmente permitia a visualização da morfologia celular (Figura 8K e L). Neste período, células do grupo irradiado distribuíam-se por toda área do disco de Ti, não sendo mais notadas áreas sem células. Contudo, este grupo exibia áreas em que não se observava a expressão de ALP (Figura 8M).

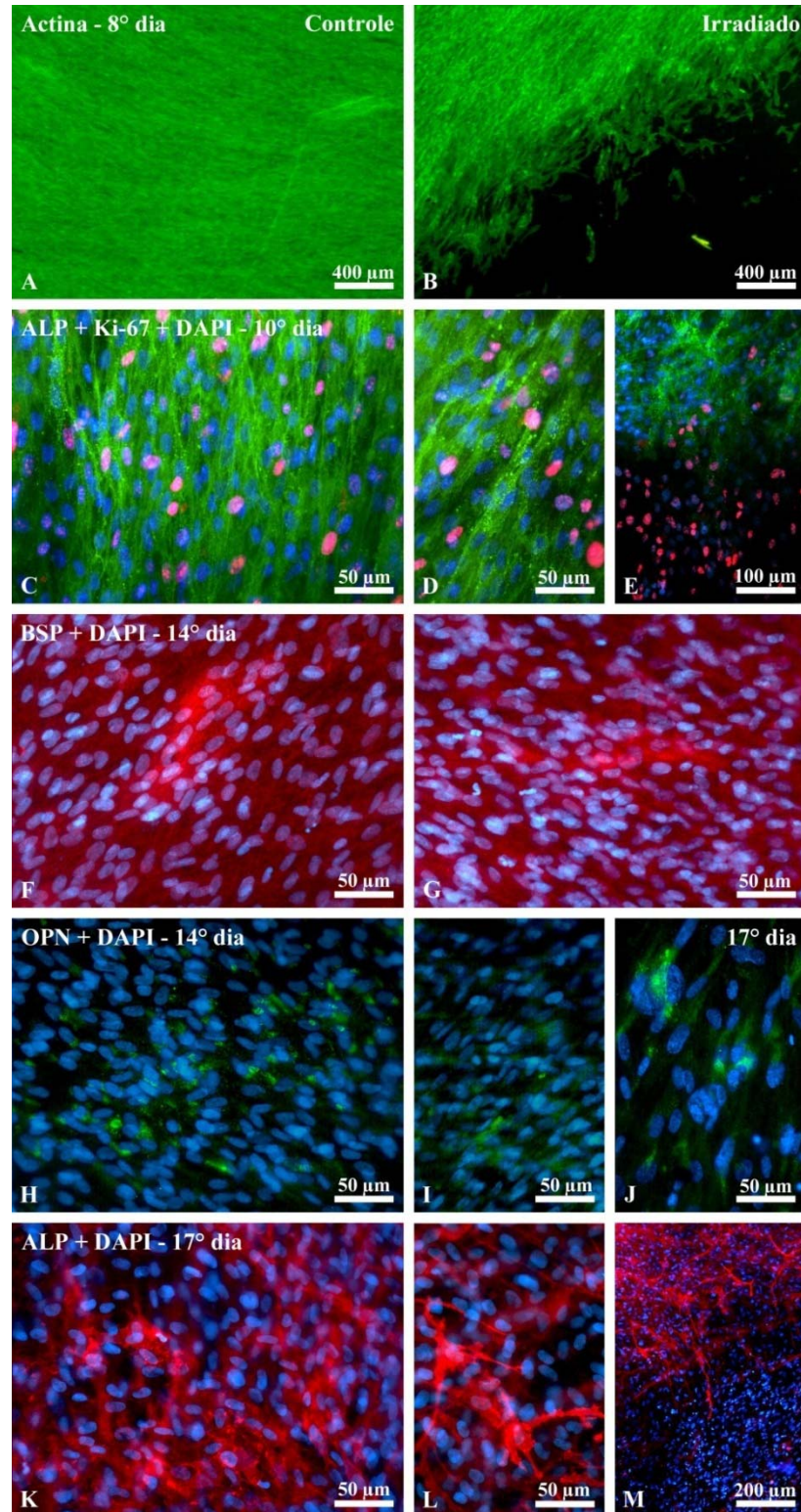


Figura 8. Epifluorescência de células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas sobre discos de Ti. Controle (A, C, F, H e K) ou irradiadas com laser na dose de 3 J/cm^2 (B, D, E, G, I, J, L e M). Fluorescência vermelha indica marcação para Ki-67 (C-E), ALP (K-M) ou BSP (F e G); fluorescência verde indica marcação para actina (A e B), ALP (C-E) ou OPN (H-J) e fluorescência azul, núcleos celulares (C-M). Note-se presença de região desprovida de células 24 h após irradiação (B). Objetiva de 5x em A e B; 40x em C, D, F, G e H-L; 20x em E e 10x em M.

O estudo da expressão gênica dos marcadores do fenótipo osteoblástico em células cultivadas sobre discos de Ti indicou que o laser aumentou a expressão relativa de ALP ($p=0,049$), OC ($p=0,046$), BSP ($p=0,049$) e BMP-7 ($p=0,049$). Entretanto, reduziu a expressão de Runx2 ($p=0,043$) e OPN ($p=0,049$) e não interferiu na expressão relativa de COL I ($p=0,275$) (Figura 9).

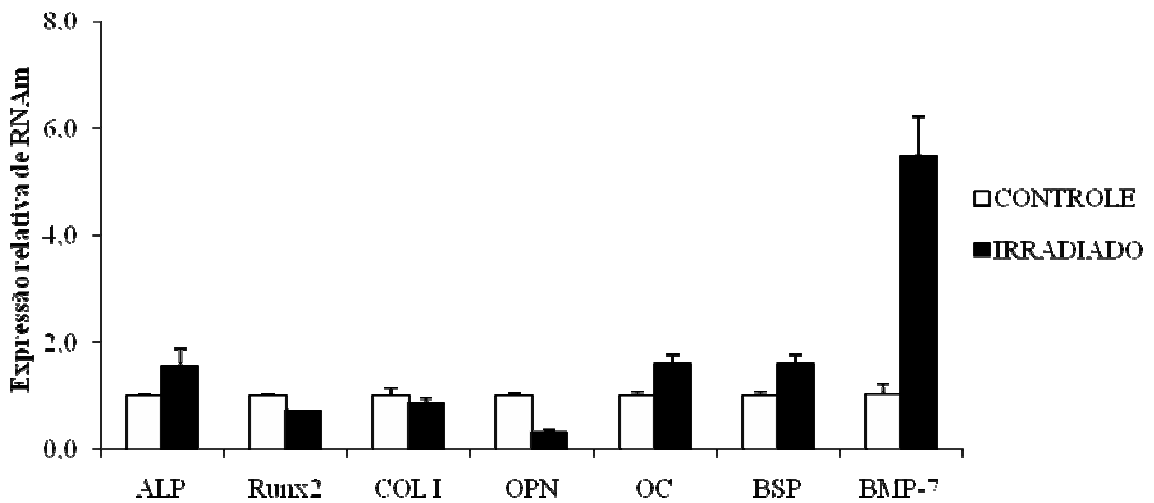


Figura 9. Efeito da radiação laser na dose de 3 J/cm^2 na expressão gênica dos marcadores do fenótipo osteoblástico em células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas por 14 dias sobre discos de Ti. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$).

A expressão gênica de OPG foi significativamente aumentada pelo tratamento com laser ($p=0,049$), porém não se observou alteração significativa na expressão de RANKL ($p=0,126$) e ICAM ($p=0,512$) (Figura 10).

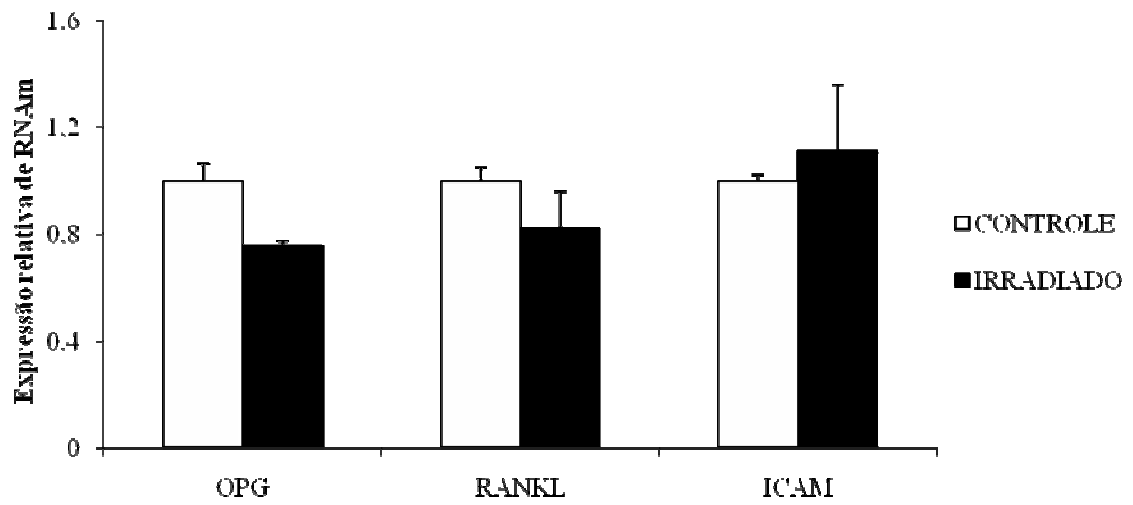


Figura 10. Efeito da radiação laser na dose de 3 J/cm^2 na expressão gênica dos genes envolvidos na interação osteoblasto-osteoclasto em células osteoblásticas derivadas de fragmentos de osso alveolar humano cultivadas por 14 dias sobre discos de Ti. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n=3).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliado o efeito da radiação do laser diodo de AsGaAl em culturas osteogênicas derivadas do osso alveolar humano cultivadas sobre discos de Ti. Essa fonte de laser foi escolhida por tratar-se de equipamento indicado para uso Odontológico e o modelo *in vitro*, para avaliar, em ambiente controlado, a resposta de células constituintes do tecido ósseo. Assim, este estudo contribui com o conhecimento a respeito da estimulação de osteoblastos crescidos sobre superfície de Ti, fenômeno importante para a osseointegração desse biomaterial.

A dose de 3 J/cm² de laser de AsGaAl utilizada foi selecionada a partir de estudos preliminares, com culturas osteogênicas desenvolvidas sobre poliestireno, nos quais foram avaliados os efeitos da exposição a 4 diferentes doses do laser (1-4 J/cm²) descritas em modelos *in vitro* na literatura (KHADRA et al., 2005; DÖRTBUDAK; HAAS; MAILATH-POKORNY, 2000, FUKUHARA et al., 2006). Os períodos de exposição ao laser, 3 e 7 dias, foram escolhidos por representarem períodos de atividade proliferativa mais intensa das células, de acordo com resultados obtidos em nosso laboratório com culturas osteogênicas sobre Ti (ASSIS et al., *in press*; DE OLIVEIRA et al., 2008; SCHWARTZ-FILHO et al., 2007; ROSA; BELOTI, 2003; XAVIER et al., 2003).

Os resultados do presente estudo mostraram que, independentemente do tratamento ao qual foram submetidas, as células derivadas do osso alveolar proliferaram e desenvolveram o fenótipo osteoblástico, uma vez que apresentaram atividade de ALP, formaram matriz mineralizada e expressaram proteínas e genes considerados marcadores do fenótipo osteoblástico (AUBIN et al. 1998; HASSAN et al., 2004; STEIN et al., 1996). No entanto, a radiação laser produziu diferenças significativas no comportamento das culturas. O conjunto das avaliações realizadas sugere que a radiação laser afeta células osteoblásticas de forma

complexa. Nestas culturas foi observado que, em algumas áreas, as células desapareceram após a irradiação e em períodos mais tardios essas áreas foram repovoadas por células aparentemente menos diferenciadas. Em outras regiões, em que as células permaneceram, a expressão do fenótipo osteoblástico pareceu ser estimulada pela radiação laser.

A presença de uma área desprovida de células, observada por epifluorescência 24 horas após a segunda irradiação, sugere a ocorrência de morte celular nesta região. Porém, após 3 dias da irradiação, que corresponde aos 10 dias de cultura, esta área apresentava uma população celular em intensa atividade mitótica (Ki-67 positivas), caracterizando o início do repovoamento celular. De acordo com a avaliação pelo ensaio MTT em 10 dias, o desaparecimento das células naquela região 24 horas após a exposição ao laser não resultou em redução significativa dos valores de absorbância nas culturas irradiadas. Com base nesses achados, pode-se inferir que: ou a redução da população celular causada pelo laser foi de pouca magnitude e não detectável pelo ensaio de MTT, ou que, após três dias da irradiação, o aumento na atividade proliferativa das culturas compensou parcialmente os danos causados pelo laser. Khadra et al., (2005) relataram ausência de efeitos deletérios da radiação laser em culturas de osteoblastos humanos cultivados sobre Ti, entretanto, suas observações foram baseadas exclusivamente em ensaios colorimétricos. Outra hipótese a ser considerada, mas que necessitaria de mais investigações é a de que as paredes dos poços da placa de cultura podem ter refletido a radiação para uma área específica da cultura. Portanto, células localizadas nessa área provavelmente receberam tanto a radiação direta da fonte, como a convergência dos raios refletidos pelas paredes do poço, causando a morte celular.

A avaliação da proliferação celular entre 10 e 14 dias revelou que, enquanto culturas controle apresentaram apenas a manutenção da população celular, culturas irradiadas se encontravam em atividade proliferativa. Estudos anteriores utilizando o mesmo modelo de cultura demonstraram que, entre 7 e 10 dias, ocorre redução na atividade proliferativa de

células cultivadas sobre discos de Ti (ASSIS et al., *in press*; FRANCO et al., *in press*; ROSA et al., *in press*), comportamento similar ao das culturas controle. Isso sugere que, a radiação laser resultou em aumento na atividade proliferativa das células. Esse aumento na proliferação celular após exposição à radiação laser já foi relatado por outros autores, utilizando células de diferentes linhagens (UEDA; SHIMIZU, 2003). No entanto, este fato também pode ser atribuído a mecanismos compensatórios, uma vez que algumas áreas das culturas irradiadas não apresentavam células após a irradiação, mas estavam repovoadas aos 17 dias. Essas áreas exibiram maior quantidade de células no ciclo celular, como evidenciado pela imunomarcagem ao antígeno nuclear Ki-67, sugerindo que elas poderiam ser as responsáveis pelo aumento observado na proliferação celular. Além disso, a OPN, proteína também associada à redução na proliferação celular (HUANG et al., 2004), foi menos expressa em culturas irradiadas, como observado por Stein et al. (2008). Por outro lado, o substrato no qual as células foram cultivadas não contribuiu para esse fenômeno porque o mesmo foi também observado nos experimentos preliminares onde as células foram cultivadas sobre poliestireno.

Evidência adicional de que a radiação laser altera o padrão de comportamento das culturas vem da observação do padrão de imunomarcagem para ALP. Nas culturas irradiadas, células localizadas em áreas de repovoamento não apresentaram marcação positiva para ALP aos 17 dias, indicando que estas ou apresentavam-se em fase bastante inicial da diferenciação osteoblástica ou não desenvolveram este fenótipo, de acordo com o perfil dessas culturas proposto por Beck (2003). Nas demais áreas, o padrão de imunomarcagem para ALP foi similar ao de culturas controle.

Baseado na observação de que culturas irradiadas exibem menor número de células positivas para ALP, sugere-se que a radiação laser estimula a atividade desta enzima. O aumento na atividade de ALP causado pela radiação laser explicaria a manutenção da atividade em níveis similares aos das culturas controle ao longo dos períodos de observação.

Corroborando essa hipótese está o fato de que houve aumento na expressão gênica de ALP nas células irradiadas, havendo correlação entre o nível de atividade e a expressão gênica de ALP em culturas de osso alveolar humano cultivadas sobre Ti (ASSIS et al., *in press*). Esses dados estão em acordo com Ueda e Shimizu (2003) que, utilizando células derivadas de calvária do rato, notaram aumento na expressão gênica e na atividade da ALP, mas são contrários aos resultados relatados por Combe et al., (2001) e Khadra et al., (2005) que utilizando, respectivamente, células humanas derivadas de osteossarcoma e células derivadas de mandíbula, não relataram nenhum efeito significativo.

Interpretação similar pode ser aplicada à formação de matriz mineralizada. A determinação colorimétrica da quantidade de vermelho de alizarina incorporada às culturas, que representa a quantidade de íons cálcio presente, foi semelhante em ambos os grupos. No entanto, se considerarmos que as áreas repovoadas não contribuíram para essa incorporação, então uma área menor nas culturas irradiadas resultaria em formação da mesma quantidade de matriz mineralizada. Essas evidências sugerem que a radiação laser estimula a formação de matriz calcificada.

Embora não tenham sido detectadas diferenças na imunolocalização de BSP em culturas controle e irradiada, o aumento na expressão gênica de BSP e OC, relacionadas ao processo de mineralização, a redução nos níveis de RNA mensageiro para Runx2, associado ao progresso da diferenciação osteoblástica (PREGIZER et al., 2008), e o aumento bastante significativo da expressão de BMP-7, potente indutor da osteogênese (LUU et al., 2007), nas culturas expostas ao laser AsGaAl, corroboram a hipótese de que esta terapia favorece o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico.

O sistema OPG/RANKL/RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa β*) exerce um papel central na regulação parácrina da formação e função de osteoclastos (BLAIR; ZAIDI, 2006). A OPG liga-se ao RANKL, ambos secretados pelos osteoblastos, e previne que

o RANKL ligue-se ao seu receptor RANK presente na membrana dos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea mediada por eles (KHOSLA, 2001). O ICAM (*intercellular adhesion molecule*) é responsável pela adesão osteoblasto-osteoclasto, que permite a ligação RANK/RANKL (MATSUO; IRIE, 2008). Nesse estudo foi observada uma redução na expressão de OPG sem alteração na expressão de RANKL e ICAM, o que sugere que osteoblastos irradiados com laser poderiam aumentar a atividade osteoclástica. No entanto, isso não deve ser interpretado como um possível aumento na reabsorção óssea, porque várias outras citocinas liberadas pelos osteoblastos exercem funções regulatórias sobre os osteoclastos. Uma investigação mais específica sobre o acoplamento osteoblasto-osteoclasto deveria ser realizada antes de se concluir sobre o efeito da radiação laser na remodelação óssea. Além disso, outros pesquisadores mostraram efeito oposto, em que a radiação laser resultou em aumento na expressão de OPG e diminuição na expressão de RANKL (XU et al., 2008).

Nossos resultados indicam que o laser estimula a expressão do fenótipo osteoblástico em células cultivadas sobre Ti, sugerindo possíveis benefícios no processo de osseointegração. Apesar dos efeitos benéficos predominantes não se pode descartar que a radiação laser afetou negativamente as culturas, apontando a necessidade de mais estudos avaliando mais extensivamente seus efeitos antes de se estabelecer sua verdadeira contribuição à Implantodontia.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que a radiação do laser diodo de AsGaAl estimula a expressão do fenótipo osteoblástico em células derivadas do osso alveolar humano cultivadas sobre Ti.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, v.10, p.S96–S101, Oct. 2001.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise in vitro da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com laser de Baixa potência**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, 1999.

ASSIS, A.F.; BELOTI, M.M.; CRIPPA, G.E.; DE OLIVEIRA, P.T.; MORRA, M.; ROSA, A.L. Development of the osteoblastic phenotype in human alveolar bone-derived cells grown on a collagen type I-coated titanium surface. *In press*.

AUBIN, J.E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem Cell Biol**, v.76, n.6, p.889-910, 1998.

BECK, G.R.Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **J Cell Biochem**, v.90, n.2, p.234-243, Oct. 2003.

BELKIN, M.; ZATURUNSKI, B.; SCHWARTZ, M. A critical review of low energy laser bioeffects. **Lasers and Light in Ophthalmology**, v.2, p.63–71, 1988.

BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M.A.; BERTOLINI, M.J.; ROSA, A.L. *In vitro* biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. **J Biomed Mater Res A**, v.79, n.2, p.282-288, Nov. 2006.

BELOTI, M.M.; MARTINS, W. Jr.; XAVIER, S.P.; ROSA, A.L. *In vitro* osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. **Clin Oral Implants Res**, v.19, n.1, p.48-54, 2008.

BLAIR, H.C.; ZAIDI, M. Osteoclastic differentiation and function regulated by old and new pathways. **Rev Endocr Metab Disord**, v.7, n.1-2, p.23-32, Jun. 2006.

BRANEMARK, P.I.; HANSSON, B.O.; ADELL, R.. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year study period. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v.16, p.1–132, 1977.

CANALIS, E. Regulation of bone remodeling. In: FAVUS, M.J., **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 29–34.

CHEN, J.; ZHOU, Y. Effect of low level carbon dioxide laser radiation on biochemical metabolism of rabbit mandibular bone callus. **Laser Therapy**, v.2, p.83-7, 1989.

COLVARD, M.; KUO. P. Managing apthous ulcers: laser treatment applied. **J Am Dent Assoc**, v.122. n.6,, p.51-3, Jun. 1991.

CONVISSAR, R.A.; MASSOUMI-SOURNEY, M. Recurrent aphtous ulcers: Ethiology and laser ablation. **Gen Dent**, v.12, n.6, p.512-15, Nov-Dec. 1992.

COOMBE, A.R.; HO, C-T.G.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C.C.; YUM, L.W.P.; DARENDELILER, M.A.; HUNTER, N. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin. Orthod. Res.**, v.4, n.1, p.3-14, Feb. 2001.

DAVID, R.; NISSAN, M.; COHEN, I. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. **Laser Surg. Med.**, v.19, n.4, p.458–464, 1996.

DE OLIVEIRA P. T, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials**. v. 25, p.403-413, 2004.

DE OLIVEIRA, P.T.; DE OLIVA, M.A.; MAXIMIANO, W.M.; SEBASTIÃO, K;E; CRIPPA, G.E.; CIANCAGLINI, P.; BELOTI, M.M.; NANCI, A.; ROSA, A.L. Effects of a

mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. **J Histochem Cytochem.**, v. 56, n.7, p. 629-38. Jul. 2008.

DE OLIVEIRA, P.T.; ZALZAL, S.F.; IRIE, K.; NANCI, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem.** v. 51, n. 5, p. 633-641, 2003.

DEFINO, H.; HERRERO, C.; CRIPPA, G.; BELLESINI, L.; BELOTI, M.; ROSA, A.L. In Vitro Proliferation and Osteoblastic Phenotype Expression of Cells Derived from Human Vertebral Lamina and Iliac Crest. **Spine**, 2008 (submetido).

DÖRTBUDAK, O.R.; HAAS, G.; MAILATH-POKORNY. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Impl. Res.**, v.11, n.6, p. 540–45, Dec. 2000.

FRANCO, R.D.; CHIESA, R.; BELOTI, M.M., DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. Human osteoblastic cell response to a Ca- and P-enriched titanium surface obtained by anodization. **J Biomed Mater Res.**, Mar , 2008. Epub ahead of print.

FUKUHARA, E.; GOTO, T.; MATAYOSHI, T.; KOBAYASHI, S.; TAKAHASHI, T. Optimal Low-Energy Laser Irradiation Causes Temporal G2/M Arrest on Rat Calvarial Osteoblasts. **Calcif Tissue Int**, v.79, n.6, p.443-50, Dec. 2006.

GENOVESE, W.J. Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia. 1ed. São Paulo: **Lovise**, p.175, 2000.

GREGORY CA, GUNN WG, PEISTER A, PROCKOP DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, 2004 Jun 1;329(1):77-84.

GULSOY, M.; OZER, G.H.; BOZKULAK, O.; TABAKOGLU, H.O.; AKTAS, E.; DENIZ, G.; ERTAN, C. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **J Photochem Photobiol B.**, v.82, n.3, p.199-202, Mar. 2006.

HAMAJIMA, S.; HIRATSUKA, K.; KIYAMA-KISHIKAWA, M.; TAGAWA, T.; KAWAHARA, M.; OHTA, M.; SASAHARA, H.; ABIKO, Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. **Lasers Med Sci**, v.18, n.2, p.78–82, 2003.

HASSAN, M.Q.; JAVED, A.; MORASSO, M.I.; KARLIN, J.; MONTECINO, M.; VAN WIJNEN, A.J.; STEIN, G.S.; STEIN, J.L.; LIAN, J.B. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. **Mol Cell Biol.**, v.24, n.20, p.9248-61, Oct. 2004.

HONMURA, A. Therapeutic effect of GaAlAs diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers Surg Med**, v.12, p.441-49, 1992.

HUANG, W.; CARLSEN, B.; RUDKIN, G.; BERRY, M.; ISHIDA, K.; YAMAGUCHI, D.T.; MILLERA, T.A. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. **Bone**, v.34, n.5, p.799– 808, May. 2004.

KARU, T. Photobiology of low power laser effects. **Health and Physics**, v.56, n.5, p.691–704, May. 1989.

KARU, T. **The Science of Low- Power Laser Therapy**. 3 ed. Amsterdam: Gordon and Breach Science, p.299, cap. 4, 1998.

KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. **Laser Surg. Med.** v26, n.3, p.282–291, 2000.

KHADRA, M.; LYGSTADAAS, S.P.; HAANÆSA, H.R.; MUSTAFAC, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**, v.26, n.17, p.3503–9, Jun. 2005.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology.**, v.142, n.12, p.5050-5, Dec. 2001.

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of Lasers and Biophotonic Effects. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, n.5, p. 411–17, Oct. 2004.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Low-level 809 nm AsGaAl laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers Med Sci.**, v.18, n.2 , p.100-3, 2003.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada- Princípios e Práticas**, 3ed., p. 17- 31; 389-409, São Paulo: Manole, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov. 1951.

LUGER, E.J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y. Effect of lowpower laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Laser Surg. Med.**, v.22, n.2, p.97–102, 1998.

LUU, H.H.; SONG, W.X.; LUO, X.; MANNING, D.; LUO, J.; DENG, Z.L.; SHARFF, K.A.; MONTAG, A.G.; HAYDON, R.C.; HE, T.C. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v.25, n.5, p.65-77, May. 2007.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Arch Biochem Biophys.**, v.15, n.473, p.201-9, May. 2008.

MAZZETTO, M.O.; CARRASCO, T.G.; BIDINELO, E.F.; DE ANDRADE PIZZO, R.C.; MAZZETTO, R.G. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I double-blind study. **Cranio**, v.25, n.3, p.186-92, Jul. 2007.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v.65, n.1-2, p.55-63, Dec. 1983.

OZAWA, Y.; SHIMIZU, N.; KARIYA, G.; ABIKO, Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. **Bone**, v.22, n.4, p.347-54, Apr. 1998.

PARKER, S. Verifiable CPD paper: laser-tissue interaction. **British Dental Journal**, v.202, p. 73-81, Jan. 2007.

PINHEIRO, A.L.B. Evolução Histórica e Classificação dos Lasers. In: BRUGNERA JÚNIOR, A .; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**, São Paulo: Pancast, 1998 p.19-26.

PREGIZER S, BANIWAL SK, YAN X, BOROK Z, FRENKEL B. Progressive recruitment of Runx2 to genomic targets despite decreasing expression during osteoblast differentiation. **J Cell Biochem.**, v.105, n.4, p.965-70, Sep. 2008.

ROSA AL; BELOTI MM.Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cell attachment, proliferation, and differentiation. **Braz Dent J.**, v.14, n.1, p.16-21, Jul. 2003.

ROSA, A.L.; CRIPPA, G.E.; de OLIVEIRA, P.T.; TABA Jr, M.; LEFEBVRE, L.P.; BELOTI, M.M. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. **Clin. Oral Impl. Res.**, doi 10.1111/j.1600-0501.2008.01662.x.

ROSENSHEIN, J.S. Laser Biostimulation: Photobioactivation, a Modulation of Biologic Processes by Low-Intensity Laser Radiation. In: CLAYMAN, L.; KUO, P. **Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry**, New York: Thieme, 1997 p.137-142;165-174.

SAITO, S.; SHIMIZU, N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v.111, n.5, p.525-32, May.1997.

SCHWARTZ FO HO, NOVAES AB JR, DE CASTRO LM, ROSA AL, DE OLIVEIRA PT. In vitro osteogenesis on a microstructured titanium surface with additional submicron-scale topography. **Clin Oral Implants Res.**, v.18, n.3, p.333-44, Jun. 2007.

SKINNER, S.M.; GAGE, J.P.; WILCE, P.A.; SHAW, R.M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust Dent J.**, v.41, n.3, p.188-192, Jun. 1996.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation Promotes Proliferation and Differentiation of Human Osteoblasts in Vitro. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n.2, p.161–66, Apr. 2005.

STEIN, E.; KOEHN, J.; SUTTER, W.; WENDTLANDT, G.; WANSCHITZ, F.; THURNHER, D.; BAGHESTANIAN, M.; TURHANI, D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. **Wien Klin Wochenschr**, v.120, n.3-4, p. 112–7, 2008.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; STEIN, J.L.; VAN WIJNEN, A.J.; MONTECINO, M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. **Physiol Rev.**, v.76, n.2, p.593-629, Apr. 1996.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.17, n.6, p.388–91, Dec. 1988.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med**, v.7, n.1, p.36-45, 1987.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of Pulse Frequency of Low-Level Laser Therapy (LLLT) on Bone Nodule Formation in Rat Calvarial Cells. **Journal of Clinical LaserMedicine & Surgery**, v.21, n.5, p. 271–277, Oct. 2003.

WONG-RILEY, M.T.T.; BAI, X.; BUCHMANN, E.; WHELAN, H.T. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. **NeuroReport**, v.12, n.14, p.3033–7, Oct. 2001.

XAVIER, S.P.; CARVALHO, P.S.; BELOTI, M.M.; ROSA, A.L. Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments. **J Dent.**, v.31, n.3, p. 173-80, Mar. 2003.

XU, M.; TIETAO, D.; FEIZHI, M.; BIN, D.; WINGHO, L.; PINGXIANG, D.; XIAOHUI, Z.; SONGHAO, L. Low-Intensity Pulsed Laser Irradiation Affects RANKL and OPG mRNA Expression in Rat Calvarial Cells. **Photomedicine and Laser Surgery**, DOI: 10.1089/pho.2008.2283.

YAAKOBI, T., MALTZ, L., AND ORON, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. **Calcif. Tissue Int.**, v.59, n.4, p.297–300, Oct. 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)