



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA MARIA DE SOUZA

**Estudo comparativo de diferentes campos eletromagnéticos
na proliferação, viabilidade, quantificação de proteínas e
diferenciação de osteoblastos**

SÃO PAULO
2016

ANA MARIA DE SOUZA

**Estudo comparativo de diferentes campos eletromagnéticos
na proliferação, viabilidade, quantificação de proteínas e
diferenciação de osteoblastos**

Defesa de tese, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biofotônica Aplicada às Ciências
da Saúde da Universidade Nove
de Julho.

Área de Concentração: Saúde

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Melo Deana

Coorientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes

Souza, Ana Maria de.

Estudo comparativo de diferentes campos eletromagnéticos na proliferação, viabilidade, quantificação de proteínas e diferenciação de osteoblastos. / Ana Maria de Souza, 2016.

65 f.

Tese (doutorado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof. Dr. Alessandro Melo Deana.

1. Fototerapia. 2. LLLT. 3. LED. 4. Magneto. 5. Osteoblastos.

I. Deana, Alessandro Melo. II. Título

CDU

615.831

CDU 615.831

Sao Paulo, 07 de dezembro de 2016

TERMO DE APROVA/O

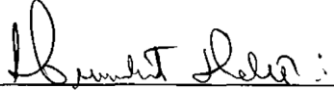
Aluna: Ana Maria de Souza

Titulo da Tese: "Estudo comparativo de diferentes campos eletromagnéticos na viabilidade de osteoblastos"

Presidente: PROF. DR. ALESSANDRO MELO DE ANA  _____

Membro: PROF^a. DR^o. RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI  _____

Membro: PROF. DR RODRIGO LABAT MARCOS  _____

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE  _____

Membro: PROF. DR. RICARDO SCARPARO NAVARRO  _____

Agradecimentos

À Deus,

Por direcionar meus caminhos sempre para o bem e me dar perseverança para continuar. Por permitir o encontro de pessoas maravilhosas durante este período e em todos os momentos da minha vida.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Alessandro Melo Deana, sempre disposto à ajudar e abrindo portas para novos conhecimentos e oportunidades. Sua generosidade e profissionalismo tornaram meus dias de trabalho mais confortáveis. Obrigada por me acolher, por sua dedicação e confiança.

À Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes uma diretora sem igual. Sempre disposta a ajudar, sanando minhas dúvidas e contribuindo para o meu crescimento profissional. Sua competência me inspira cada dia. Obrigada por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Labat por sempre me orientar nos momentos de dificuldades, por me enviar artigos relevantes para enriquecer o trabalho e por todo seu carinho e compreensão.

À Professora Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari por toda a ajuda e colaboração para a realização dos meus experimentos no laboratório.

À minha coordenadora do curso de Biomedicina Profa. Dra Andresa Zamboni por toda ajuda, colaboração e compreensão.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo e principalmente pela paciência durante estes anos de estudo.

Aos meus amigos de laboratório Romildo Torres “**BEBÊ**”, Vinicius que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e força.

À UNINOVE pela oportunidade de fazer parte desta instituição tão renomada e por acreditar no meu potencial.

Lista de abreviaturas e siglas

ANOVA - Análise de variância

cm – Centímetro

cm² – Centímetros quadrados

CO₂ – Dióxido de carbono

DEPC - Dietilpirocarboneto

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

DV – Desvio padrão

FA – Fosfatase alcalina

Ga-Al-As – Arseneto de gálio-alumínio

Ga-As – Arseneto de gálio

He-Ne – Hélio-neônio

In-Ga-Al-P - Índio-gálio-alumínio-fosforeto

J – Joule

J/cm² – Joules por centímetro quadrado

LBI – Laser em baixa intensidade

min - Minuto

mJ - Milijoules

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm² – Milímetros quadrados

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5,-difeniltetrazólio

mW - Miliwatt

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

OC – Osteocalcina

OSTEO I – Linhagem celular de osteoblastos derivados da calvária de ratos

PBS – Phosphate-buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)

pH – Potencial hidrogênico

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

s – Segundo

SFB – Soro fetal bovino

TRAP – Fosfatase ácido tártaro resistente

UNINOVE – Universidade Nove de Julho

USP – Universidade de São Paulo

W – Watt

°C – Graus Celsius

> - Maior

≤ - Menor ou igual

% - Porcentagem

λ – Comprimento de onda

μg – Micrograma

μl - Microlitro

Lista de ilustrações

Figura 1: Caracterização do campo magnético utilizado	12
Figura 2: Grupos experimentais do projeto de pesquisa (22 grupos cultivados a 10% SFB e 22 grupos estressados a 5% SFB	18
Figura 3: Preparo das placas de 96 poços para a irradiação com o equipamento magneto	21
Figura 4: Irradiação das placas de 96 poços com células osteoblásticas a 0, 9 e 18 Hertz.....	21
Figura 5: Leitor de ELISA com absorvância de 620 nm. (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria).....	22
Figura 6: Imagem ilustrativa da placa de ensaio de viabilidade de cristal violeta após adição do corante	23
Figura 7: Espectrofotômetro 700 Plus- Fosfatase Alcalina	24
Figura 8: Kit ALP 405 líquido AA	24
Figura 9: Efeitos de diferentes espectros Laser e LED (vermelho) na viabilidade de OSTEO-1.....	26
Figura 10: Efeitos de Laser e LED (infravermelho) na viabilidade de osteo	27
Figura 11: Efeitos do magneto na viabilidade de OSTEO-1	27
Figura 12: Análise de variância com dois fatores dos espectros (LED e Laser) na quantificação de proteína	28

Figura 13: Efeitos de Laser e LED (infravermelho) na quantidade de proteína total	29
Figura 14: Efeitos Laser e LED (vermelho) na quantidade de proteína total	29
Figura 15: Efeitos do magneto na na quantidade de proteína total	30
Figura 16: Análise de variância com dois fatores dos espectros (Vermelho e infravermelho) na quantidade de proteína total	31
Figura 17: Efeitos do magneto na viabilidade de OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos	32
Figura 18: Efeitos do Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na viabilidade de OSTE0-1.....	33
Figura 19: Efeitos Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na viabilidade de OSTE0-1.....	33
Figura 20: Análise de variância de dois fatores, LED e Laser (vermelho /infravermelho)	34
Figura 21. Efeitos do magneto na viabilidade de OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18).....	35
Figura 22. Figura 22. Efeitos do Laser 660 nm e LED 660nm (vermelho) na viabilidade de OSTE0-1	35
Figura 23. Efeitos Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na viabilidade de OSTE0-1. Sendo um grupo irradiado por 25, 125 e 250 segundos	36

Figura 24. Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na viabilidade de células OSTEO-1	37
Figura 25. Efeitos do magneto na quantificação de proteína. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz).....	38
Figura 26. Efeitos Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na quantificação de proteína	38
Figura 27. Efeitos do Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na quantificação de proteína	39
Figura 28: Efeitos do magneto na na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTEO-1.....	40
Figura 29: Efeitos do Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTEO-1.....	40
Figura 30: Efeitos Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTEO-1.....	41
Figura 31: Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTEO-1	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros espectroscópicos e dosimétricos das fontes de luz para irradiação.....	19
Tabela 2. Frequência de rotação do campo magnético em Hertz	20
Tabela 3. Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na atividade de fosfatase alcalina celular	42

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
2. CONTEXTUALIZAÇÃO	03
2.1 O tecido ósseo	05
2.2 Epidemiologia das Fraturas e/ou Defeitos Ósseos	05
2.3 Fototerapia na formação óssea	06
2.4 Influência de campos eletromagnéticos Laser e LED nos tecidos	07
2.5 Influência do Magneto	11
3. JUSTIFICATIVA	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivos específicos	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1 Cultivo de osteoblastos	15
5.2 Grupos Experimentais	16
5.3 Grupos suplementados a 5 e 10% de Soro Fetal Bovino	16
5.4 Fototerapia	19
5.5 Ensaios de viabilidade celular (método MTT)	21
5.6 Ensaios de viabilidade Cristal Violeta	22
5.7 Ensaio de diferenciação celular (dosagem de fosfatase alcalina)	23
5.8 Dosagem de proteína total	25
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSSÃO	43
9. CONCLUSÃO	48
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
11. REFERÊNCIAS	50
12. ANEXO I	55
13. ANEXO II	56

RESUMO

A fototerapia tem sido muito utilizada no tratamento de doenças osteo-degenerativas, com o objetivo de avaliar seus efeitos no metabolismo ósseo. Observações clínicas têm sugerido que a terapia com luz de baixa intensidade tenha efeitos benéficos no processo de consolidação óssea. Embora ainda não tenham sido estabelecidos protocolos clínicos específicos, vários autores têm reportado os efeitos fotobiomoduladores nos processos de cicatrização em modelos animais e em meios de cultura tecidual. Pouco se sabe sobre os efeitos de diferentes campos eletromagnéticos na viabilidade e diferenciação de osteoblastos de calvárias de rato (ÓSTEO 1). Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar de forma comparativa a influência da fototerapia com LBI, LED's e Magneto na viabilidade e diferenciação de osteoblastos de calvária de ratos (òsteo 1). Para este estudo os osteoblastos foram cultivados a em meio de cultura DMEM a 10% e 5% de soro fetal bovino (SFB) e encubados em estufa de CO₂. As células foram irradiadas pontualmente com os lasers 660 nm (vermelho), 808 nm (infravermelho), LED's 660nm (vermelho), 850 nm (infravermelho) na potência de 40 mW nas doses de 1,5, e10 J/cm². Após a adesão celular, utilizamos o equipamento magneto com frequência de 0, 9 e 18 Hertz, nos tempos de exposição de 25, 125 e 250 segundos. 24 horas após a irradiação foi realizada a análise de viabilidade por meio de ensaio de MTT e Cristal Violeta nos quais os resultados sugerem aumento parcial de células viáveis quando estimuladas por diferentes campos. Para os ensaios de diferenciação celular foi realizada a atividade de fosfatase alcalina onde houve aumento com Magneto a 9 hertz (250 segundos), Laser vermelho a 250 segundos e LED infravermelho a 125 segundos em relação ao grupo controle. Após o efeito da fototerapia foi realizada a análise da concentração de proteínas totais onde não foram observadas diferenças para nenhum dos grupos estudados. Dessa forma a fototerapia Laser, LED e aplicação do Magneto, observou-se a modulação parcial dos osteoblastos em relação à viabilidade, porém no processo de diferenciação da atividade de fostase alcalina houve poucas alterações.

Palavras-Chave: Fototerapia. LLLT. LED. Magneto. Osteoblastos.

ABSTRACT

Phototherapy has been widely used in the treatment of osteo-degenerative diseases, with the objective of evaluating its effects on bone metabolism. Clinical observations have suggested that low intensity light therapy has beneficial effects on the bone healing process. Although specific clinical protocols have not yet been established, several authors have reported photobiomodulatory effects on healing processes in animal models and tissue culture media. Little is known about the effects of different spectra on the viability and differentiation of rat calvarial osteoblasts (ÓSTEO 1). Therefore, the objective of this work was to compare the influence of phototherapy with LBI, LED's and Magneto on the viability and differentiation of osteoblasts from calvaria of rats (ostreat 1). For this study the osteoblasts were cultured in 10% DMEM and 5% fetal bovine serum (FBS) culture and incubated in a CO₂ oven. The cells were irradiated with 660 nm (red), 808 nm (infrared), 660 nm (red) LEDs, 850 nm (infrared) at 40 mW at 1.5 and 10 J / cm² . After cell adhesion, we used the magneto equipment with frequency of 0, 9 and 18 Hertz, at exposure times of 25, 125 and 250 seconds. 24 hours after irradiation, the viability analysis was performed by MTT and Violet Crystal assay in which the results suggest a partial increase of viable cells when stimulated by different spectra. For the cell differentiation assays, the activity of alkaline phosphatase was increased with Magneto at 9 hertz (250 seconds), Red Laser at 250 seconds and Infrared at 125 seconds in relation to the control group. After the phototherapy effect, the total protein activation analysis was performed, in which no differences were observed for any of the groups studied. In this way the Laser phototherapy, LED and Magneto application, the partial modulation of the osteoblasts was observed in relation to the viability, But in the process of differentiation of alkaline phos- phase activity there were few alterations.

Keywords: Phototherapy. LLLT. LED. Magneto. Osteoblasts

2. CONTEXTUALIZAÇÃO

O sistema esquelético atua como suporte e proteção para o corpo, além de ser um importante reservatório de cálcio e potássio e produção de células hematopoiéticas. O osso é formado por camadas de hidroxiapatitas e proteínas que constituem a matriz óssea, além de células como osteoblastos e osteoclastos que secretam a matriz proteica¹. Os osteoblastos sintetizam a matriz orgânica e participam da mineralização desta, e quando aprisionado na matriz recém-formada passa a se chamar osteócito. O osteócitos se comunicam uns com os outros por meio de canalículos². Os osteoblastos são responsáveis pela formação do novo osso e os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea³.

Muito utilizada na área de saúde, principalmente para promover a regeneração tecidual, a laserterapia e tem como vantagens: o controle da dor pós-operatória; a estimulação da cicatrização, redução da inflamação e a diminuição da dor. O aumento na produção de fibroblastos e colágeno, o aumento da circulação sanguínea dentro do tecido regenerado bem como o efeito supressivo nas reações imunes são também alcançados⁴.

A laserterapia em baixa intensidade tem sido associada com uma variedade de efeitos biológicos, como o aumento da proliferação celular, estímulo à produção de colágeno e atividade fagocitária, bem como à produção de endorfinas⁶, tendo por consequência a produção de efeitos terapêuticos analgésicos, antiinflamatórios e reparador tecidual^{5,6}.

A ação analgésica da luz é observada particularmente sobre as formas de dor crônica de diversas etiopatogenias, desde os receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. A terapia a Laser de LLLT quando utilizada nos tecidos e nas células não está baseada no aquecimento, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e ou fotobiológicos⁷.

Sabe-se que a luz utilizada em terapias de baixa intensidade (seja Laser ou LED), possui várias características (comprimento de onda, largura espectral, polarização e etc.). Cada uma destas propriedades, em separado ou em conjunto, possibilita aplicações específicas e de grandes resultados na área

biológica. Dentre estas destacamos que a monocromaticidade denota que a fonte de luz é composta por um único comprimento de onda⁸.

A interação entre Lasers e tecidos é determinada pelo comprimento de onda da luz Laser e pelas características ópticas de cada tecido. Quando a luz Laser incide em um tecido biológico, uma parte da luz é refletida e uma parte da luz remanescente que foi transmitida é espalhada dentro do tecido; a parte da luz remanescente é absorvida, tanto pela água do tecido ou por algum outro cromóforo absorvedor, como a hemoglobina e a melanina. Finalmente, uma parte da luz pode ser transmitida ao longo de toda a espessura do tecido⁹.

A interação entre luz e os tecidos biológicos, baseia-se principalmente no entendimento das reações que podem ser induzidas nestes tecidos pela luz. Cada fonte com um comprimento de onda específico pode modular de maneira diferente cada tecido¹⁰.

A luz pode ser entendida como uma onda eletromagnética na qual uma onda elétrica e outra magnética (perpendicular à primeira) geram-se mutuamente. Nota-se, portanto, que uma onda eletromagnética possui um campo elétrico e outro magnético, ambos oscilantes. A natureza da luz é uma das principais fontes de dúvidas nos mecanismos de interação com tecidos biológicos, pois ainda não se determinou se os efeitos causados são de origem magnética, elétrica ou ambas¹¹.

Observações clínicas têm sugerido que a terapia com luz de baixa intensidade tenha efeitos benéficos no processo de cicatrização tecidual. Embora ainda não tenham sido estabelecidos protocolos clínicos específicos, vários autores têm reportado os efeitos fotobiomoduladores nos processos de cicatrização em modelos animais e em meios de cultura tecidual. A terapia com Laser em baixa intensidade é caracterizada por promover a estimulação no crescimento celular, revascularização e redução dos sinais inflamatórios em processos de cicatrização de feridas¹².

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo produz uma propriedade específica que a distingue de outros tecidos que é a capacidade de responder aos estímulos fisiológicos e patológicos por meio da indução da reabsorção e formação do novo osso¹³.

A estrutura de um osso é mantida por interação de células osteoblastos (deposição de matriz óssea e formação óssea), e os osteoclastos (responsáveis pela reabsorção óssea). A compreensão do metabolismo ósseo envolve interações de fatores locais e sistêmicos, células ósseas e matriz óssea¹⁴.

A formação inadequada do osso em resposta à reabsorção óssea durante a fase de remodelação são fatores determinantes de várias doenças ósseas¹⁵.

O remodelamento ósseo possui três fases: fase de absorção e reversão (ambas de período curto), terceira fase é a produção de matriz celular com deposição de camadas finas de osteoblastos.

2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS FRATURAS E/OU DEFEITOS ÓSSEOS

Nos Estados Unidos, mais de 6,2 milhões de fraturas ósseas ocorrem a cada ano. Aproximadamente 10% evoluem para complicações na sua reparação óssea, por diversos motivos¹⁶. As fraturas, de acordo com o banco de dados Sistema de Internações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS), foram responsáveis por quase 280.000 internações ocorridas no ano 2.000. Em 2014, mais de 14 mil cirurgias ósteomusculares foram realizadas pelo Sistema Único de Saúde no Brasil, sendo que mais de 2 mil destas, foram realizadas por retardo na consolidação ou perda óssea. No período que compreende os anos de 2012 a 2014, mais de R\$ 370 milhões de reais foram gastos com procedimentos cirúrgicos de ordem ortopédica¹⁷. Embora a maioria das fraturas evoluam para um reparo adequado, muitos dias de trabalho são perdidos ao ano devido à incapacidade do paciente de realizar suas atividades diárias, levando a uma enorme perda de produtividade e renda¹⁸.

A intervenção de agentes externos para acelerar o reparo ósseo torna-se bastante importante pela possibilidade de antecipação da reabilitação

destes pacientes e de seu retorno às atividades cotidianas. Para alcançar essa otimização, no entanto, é essencial expandir a compreensão sobre as etapas do reparo de fraturas e de como cada uma delas contribui para a funcionalidade biomecânica do osso¹⁹.

2.3 FOTOTERAPIA NA FORMAÇÃO ÓSSEA

Ao irradiar tecidos vivos com a luz Laser de baixa intensidade, esta é absorvida por cromóforos fotorreceptores localizados nas células, promovendo modulações bioquímicas importantes, estimulação de respiração mitocondrial através da produção de oxigênio molecular e síntese de ATP. Os achados indicam ação do Laser em estágios precoces da neoformação óssea, atuando em estímulo e indução do processo de reparo e criando assim, uma série de condições ambientais para melhora do reparo ósseo. Estudos sugerem a modulação de diversos fatores de crescimento, como o IGF, PDGF e TGF- β , fatores osteogênicos como RANKL, RUNX2 e OPG e ainda diversas citocinas, como IL-1 β , COX2 e TNF- α , no período mais inicial da reparação óssea. Observou-se ainda que após utilização do LBI, fatores teciduais como a deposição de colágeno tipo I e II também apresentaram aumento considerável^{20,21,22}.

Observaram¹⁰ que a irradiação de culturas de células com Laser de baixa intensidade provocou aumento da proliferação de osteoblastos linhagem MC3T3 e MG63 e acelerou o processo de reparo. Estudo recente do mesmo grupo aponta para efeitos regulatórios do ciclo celular, neste caso, o Laser atuaria modulando a resposta bioquímica da célula no que diz respeito às atividades mitocondrial e gênica, e ainda de síntese de proteínas regulatórias melhorando, com isso, a proliferação celular e o processo de consolidação da fratura. Estudos anteriores já evidenciavam as diversas capacidades modulatórias do Laser e os resultados vão desde a constatação de maior formação de tecido osteóide trabecular, promoção de rápida formação de matriz óssea, maior deposição óssea até o favorecimento da diferenciação de osteoblastos²³.

Apesar dos resultados encontrados no uso isolado da LBI e de biomateriais no reparo ósseo, há ainda um número reduzido de publicações

que investigam os benefícios do uso de biomateriais associados à irradiação Laser no reparo ósseo^{24,25}, sendo um objeto de estudo importante, visto que podem existir modulações no reparo ósseo em ambas as condições de tratamento.

2.4 INFLUÊNCIA DE CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS LASER E LED NOS TECIDOS

Trabalhos mais controlados e passíveis de reprodução trouxeram maior credibilidade à terapia. Estudos recentes do Food and Drug Administration (FDA) com Lasers de baixa intensidade estão atraindo bastante interesse para a fototerapia²⁶.

Em seu estudo²⁷, tentaram identificar as células-alvo responsáveis por acelerar a regeneração óssea durante a laserterapia. Utilizaram células da calvária de ratos (OSTEO-I) que foram irradiadas com Laser GaAlAs pulsado, com comprimento de onda de 830 nm, 500 mW de potência radiante e exposição radiante de 3,87 J/cm², durante 10 minutos de aplicação. O mesmo procedimento foi repetido no 1º, 6º, 12º e 15º dia, após o subcultivo celular. Nos estágios iniciais, o Laser parece ter estimulado significativamente a proliferação celular, a atividade ALP e a expressão gênica da osteocalcina. Após 21 dias, houve um aumento (1,7 vezes) no número de células e (3,4 vezes) de nódulos ósseos. Os resultados sugerem que esse instrumento pode estimular a multiplicação celular por meio do aumento das células formadoras dos nódulos ósseos, os osteoblastos, e também mostram que ele estimula a diferenciação celular, resultando num aumento de células diferenciadas que aumentam a quantidade de osso formado.

Em outro estudo “in vitro”²⁸, investigaram o efeito da irradiação do Laser de Baixa Intensidade (LBI) sobre a proliferação e formação óssea em células derivadas de osteoblastos humanos. Foram realizados experimentos com tempo de irradiação 670 nm, 780 nm e 830 nm, sobre osteoblastos (MC3T3) de 5 min a cada 24 horas, totalizando quatro dias de tratamento. Observou-se que o número de células aumentou a partir do segundo dia de tratamento. Esses resultados sugerem que repetidas irradiações com o LBI estimulam a formação

dos osteoblastos e aumenta a quantidade de proteínas essenciais para a formação óssea.

Em seu estudo avaliaram os efeitos do Laser de baixa potência em três diferentes comprimentos de onda, 670 nm, 780 nm e 830 nm, sobre osteoblastos (MC3T3) e células de proliferação do osteosarcoma (MG 63), *in vitro*²⁸. Notou-se que cada linhagem de célula reagiu de forma diferente, ou seja, na submetida a 830 nm, os osteoblastos tiveram um aumento de 9%, e o osteosarcoma não apresentou acréscimo significativo; na que recebeu 780 nm, houve diminuição da proliferação dos osteoblastos e aumento da multiplicação das células provenientes de osteosarcoma. Já na linhagem em que se usou 670 nm, observou-se um menor aumento estatístico da proliferação dos osteoblastos e das células de osteosarcoma.

No estudo realizado²⁹, investigou-se o efeito da irradiação do LBP sobre a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Osteo I) In Vitro, usando o Laser He-Ne de 632 nm, 10 mW. Verificou-se que o Laser utilizado foi capaz de promover um importante aumento (31% - 58%) da proliferação e maturação dos osteoblastos e que esses resultados podem ter implicações clínicas.

Em outro estudo realizado com LBP, tendo como diferencial a análise da frequência sobre osteoblastos derivados de calvária de rato "*in vitro*", estimulou-se intensamente a formação óssea que posteriormente era comparada com outra submetida a irradiação contínua. Entretanto, para definir melhor o modo de irradiação, concluiu-se que era necessário realizar novos estudos, avaliando diferentes pulsos e seus efeitos na formação óssea³⁰.

Investigou-se³¹ a clonagem do gene MCM3, responsável pela replicação do DNA de células de ratos (MC3T3-E1), designado como MCL-140, para tentar entender o efeito da bioestimulação e da proliferação celular em células irradiadas. Utilizaram um Laser de baixa potência GaAIs, no comprimento de onda de 830 nm, com potência de 500 mW, exposição radiante de 7,64 J/cm², durante 20 min. Após análise, concluíram que os níveis mais altos de RNAm foram observados nas células irradiadas⁵¹. O clone MCL-14 apresentou 96,2% de homologia com o MCM3. Os resultados sugerem que o Laser de baixa

potência pode aumentar a replicação do DNA, estimulando assim a proliferação dos osteoblastos por meio do aumento da expressão do gene MCM3.

Em seu estudo³² comprovou que houve aumento da proliferação de osteoblastos humanos “in vitro” que colocados sobre vidro bioativo (Bioglass), estimularam o aumento da formação óssea, o que mostra que o Bioglass associado à laserterapia pode ser uma ótima alternativa para reconstruções ósseas extensas.

Tentando recriar os sucessos encontrados nos estudos in vitro para experimentos in vivo, outro trabalho foi realizado³³, por meio da irradiação em fêmures de ratos com Laser Nd:YAG, utilizando a 10 Hz de taxa de repeição, tempo de pulso de 7-9 ns, 500 mW/cm² irradiância média, por 10 minutos, com comprimento de onda de 1064 nm, observados após o 1º, 3º, 5º e 7º dias, depois da irradiação por intermédio da análise histológica e imunohistoquímica. Nessa pesquisa, avaliaram o volume ósseo, a quantidade de osso trabecular e a taxa de deposição mineral. As análises histológicas revelaram que a taxa de ação dos osteoclastos estava diminuída no terceiro dia após irradiação, e a atividade dos osteoblastos foi melhor no primeiro e terceiro dias. O autor concluiu que, após a Laserterapia, houve um aumento no número de osteoblastos e uma diminuição no número de osteoclastos.

Outro efeito do LBP a 100 mW, 690 nm, 1 min, 6 J irradiado in vivo, em locais com reabsorção óssea e com a instalação de implantes de titânio, foi o aumento de osteócitos do grupo irradiado que se mostrava 3% maior que o do controle, sendo essa uma diferença estatisticamente significativa.

Concluiu-se³⁴ que o LPS advindo de E. coli, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL, não altera a proliferação celular de osteoblastos da linhagem OSTEO-1 (em 1, 3 e 5 dias de cultivo), e a expressão gênica de Runx2 após 24 h de cultivo. A adesão celular se mostrou diminuída, após 20, 40 e 60 minutos, somente nos grupos cultivados na presença de LPS na concentração de 10 µg/mL. O uso do LBI, por sua vez, não alterou a resposta dos osteoblastos ao LPS no que se refere à proliferação, adesão ou diferenciação celular (avaliada pela expressão de Runx2).

Ilustrou³⁵ o aumento na proliferação celular em células MG63 cultivadas durante 24 horas após a irradiação com Laser de diodo a irradiâncias de 0,5, 1, e 1,5 W/cm² com as exposições radiantes de 1 - 5 J/cm² em relação à cultura do grupo controle, a qual não foi irradiado. Observou-se aumento da proliferação em irradiâncias de 0,5, 1 e 1,5 W/cm² e fluências de 2 - 5 J. Em todos os casos, observou-se uma correlação positiva entre densidade de energia e crescimento celular, com o crescimento de células de pico ocorrendo em 3 J/cm². A irradiação com o Laser de diodo ajustado a uma irradiância de 1,5 W/cm² e uma exposição radiante de 3 J/cm² produziu o maior efeito sobre a proliferação celular ($p < 0,001$), com um aumento de 30 % comparada com a cultura do grupo controle. Irradiação com a mesma irradiância e as exposições radiantes de 4 J/cm² e 5 J/cm² produziram aumentos semelhantes no crescimento celular ($p < 0,001$). Enquanto a irradiação com o Laser de diodo com uma irradiância de 2 W/cm² aumentou a proliferação de células versus o grupo controle em todas as fluências após 24 horas de cultura, e concluiu que não houve diferença significativa.

Concluíram³⁶ em seu estudo que não foi possível determinar qualquer efeito anabólico do CEMP a taxa de proliferação de osteoblastos, quando comparado com o grupo controle, embora o grupo 0,2 mT teve maior proliferação celular que o grupo de 0,06 mT. No final de 96 horas o grupo 0,2 mT apresentaram taxas mais elevadas do que os grupos proliferação LBI e 0,06 mT. Estes resultados não revelaram um efeito indutivo dependente do tempo de 0,2 mT PEMF em osteoblastos, como resultado entre os dois intervalos de tempo não foi estatisticamente significativa.

Em seu estudo³⁷, examinou os efeitos da luz LED na proliferação e diferenciação de osteoblastos como células MC3T3-E1 cultivadas em meio de diferenciação osteogênica (ODM), no longo prazo. As células foram irradiadas com luz LED vermelha de 630 nm em três exposições radiantes: 0,5 J/cm², 1,5 J/cm² ou 3,0 J/cm². Para a atividade de proliferação celular e constatou-se que a expressão de mRNA no grupo de irradiação foi significativamente aumentada em comparação com a do grupo não irradiado no dia 16. Considerando os resultados de coloração de ALP, foi sugerido que a irradiação de células com o LED aumentou a diferenciação de osteoblastos.

Analisou³⁸ os aspectos de diferentes fontes de luz e afirmou que não se pode concluir que os Lasers têm maior potencial que os LEDs. Em experimentos realizados com células observou-se que a luz não coerente com o mesmo tempo de exposição, comprimento de onda e intensidade promoveram o mesmo efeito biológico.

Relata³⁹ aumento significativo de células osteoblásticas da calota craniana de ratos cultivados em superfícies de implantantes que foram irradiados com LED (660 nm) por uma ou três vezes.

Sabemos da eficiência e eficácia das fontes de luz (Laser, LED) já descritos na literatura, porém referente a influência do magneto e interação em tecidos biológicos e células, com frequência de 0, 9 e 18 Hertz, não foram encontrados estudos descritos na literatura.

2.5 INFLUÊNCIA DO MAGNETO

A luz é formada por campos eletromagnéticos, porém, como ambos são indissociáveis, um grupo experimental será submetido a um campo puramente magnético, cuja caracterização pode ser observada na figura 1.

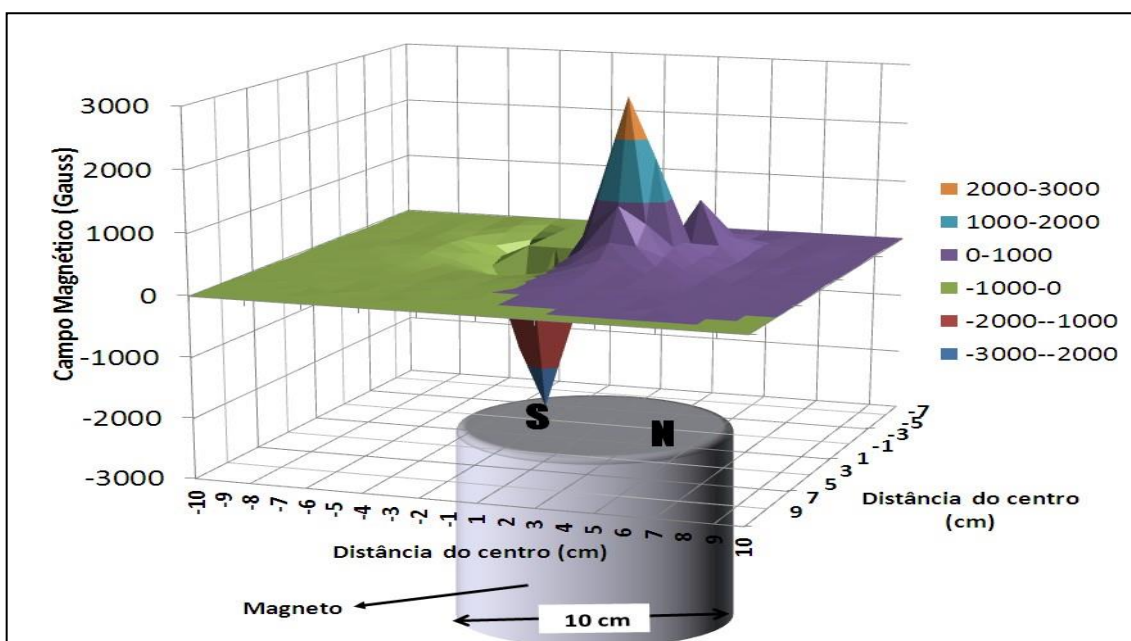


Figura 1. Caracterização do campo magnético utilizado.

O magneto em si é um ímã permanente cujo campo pode ser observado na figura 1. Este equipamento está encapsulado dentro de um cilindro metálico com diâmetro de 10 cm.

O equipamento produz um campo puramente magnético, quando parado, sem alterarmos as frequências, entretanto o mesmo está acoplado a um motor, o que possibilita a sua rotação com frequência controlável variando de 0 a 22 Hz. Quando em movimento, o campo magnético irá produzir um campo elétrico, formando, portanto, uma região com campos eletromagnéticos cuja natureza é a mesma dos campos das fontes de luz.

Apesar de ambos serem campos eletromagnéticos, não há sentido em quantificar o campo magnético em tempos de potência ou energia, entretanto as suas linhas de campo podem ser observadas na figura 1.

Em relação aos campos tradicionalmente utilizados (luz) um campo eletromagnético oriundo de um ímã em rotação possui uma profundidade de penetração em tecidos biológicos da ordem de dezenas de centímetros, em comparação com poucos centímetros de penetração de fontes de luz na região da janela terapêutica (vermelho – infravermelho).

Pouco se sabe sobre a influência do espectro do magneto sobre as células osteoblásticas.

3. JUSTIFICATIVA

Alguns estudos têm sugerido que a terapia com luz, tem efeitos benéficos no processo de reparo ósseo. Embora ainda não tenham sido estabelecidos protocolos clínicos específicos. Vários autores têm reportado os efeitos fotobiomoduladores nos processos de cicatrização em modelos de cultura celular e em modelos animais.

Na literatura, embora seja descrito o efeito positivo da fototerapia na osteogênese, alguns parâmetros como dose, tempo de exposição, tipo de campos eletromagnéticos e o regime de aplicação ainda não foram muito bem esclarecidos.

A eficiência e eficácia das fontes de luz (Laser, LED) já estão descritos na literatura, porém o efeito comparativo destas fontes de luz e a influência do magneto e sua interação em tecidos biológicos e celulares, com frequência de 0, 9 e 18 Hertz, não foram encontrados estudos descritos na literatura.

O equipamento “magneto”, utilizado neste estudo possui profundidade de penetração em tecidos biológicos de ordem de 10 centímetros, em comparação com os poucos centímetros de penetração de fontes de luz na região da janela terapêutica (vermelho-infravermelho).

4. OBJETIVOS

Comparar o efeito de diferentes campos eletromagnéticos, Laser, LED e Magneto na proliferação, viabilidade, quantidade de proteínas totais e diferenciação de células osteoblásticas.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Analisar a influência da luz coerente (Laser) vermelha e infravermelha em diferentes comprimentos de onda na viabilidade de células osteoblásticas.
- b) Analisar a influência da luz não - coerente (LED) vermelha e infravermelha em diferentes comprimentos de onda na viabilidade de células osteoblásticas
- c) Avaliar a influência do magneto nas frequências de 0,9 e 18 Hertz, nos tempos de exposição de 25, 125 e 250 segundos.
- d) Avaliar a quantidade de proteínas totais em cultura OSTEO-1, pelo método de Bradford, dos grupos irradiados.
- e) Quantificar os efeitos de diferentes espectros na diferencial osteogênica por meio da atividade enzimática da fosfatase alcalina.

5. MATERIAIS E METODOS

Este estudo foi realizado no laboratório de Pesquisa do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, Campus Vergueiro, São Paulo-SP.

5.1 Cultivo de osteoblastos

As células utilizadas foram osteoblastos da linhagem OSTEO-1, cultivadas em meio MEM modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil).

Os osteoblastos foram mantidos em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando a monocamada celular tornava-se subconfluente para a perpetuação da linhagem celular. Para o replique, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,25%/EDTA durante 4 minutos a 37°C. Após incubação foi realizada a neutralização com meio DMEM, centrifugação a 10°C por 5 minutos e posteriormente ressuspensão em 1 mL de meio DMEM.

Para o cultivo do OSTEO-1, houve diferença na suplementação sendo todos os grupos analisados em meio nutricional regular e meio de deficiência nutricional.

As células foram avaliadas em 22 diferentes grupos experimentais, sendo 22 grupos suplementados DMEM 10 % SFB e 22 grupos suplementados DMEM a 5% SFB.

Para os experimentos de viabilidade (MTT) e dosagem de proteína, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24h em estufa a 37°C. Trascorrido este período, as células foram desaderidas com solução de tripsina 0,25%/EDTA, contadas em câmara de Neubauer utilizando corante Azul de Trypan (0,4%) e semeadas em placa de 96 poços

(TPP, Suíça), sendo 2×10^5 células/poço. Após o tratamento, as culturas foram incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 24hs.

Para promover o estresse celular, a cultura foi mantida em meio DMEM suplementado com 5% de SFB por 24h em estufa a 37°C. Transcorrido este período, as células foram desaderidas com solução de tripsina 0,25%/EDTA, contadas em câmara de Neubauer utilizando corante Azul de Trypan (0,4%) e semeadas em placa de 96 poços (TPP, Suíça), sendo 2×10^5 células/poço. Após o tratamento, as culturas foram incubadas em um ambiente úmido com 5% de CO₂ por 24hs.

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Para tanto, o MMT foi adicionado às culturas celulares numa concentração de 0.5 mg/mL e as células foram incubadas num ambiente úmido, contendo 5% CO₂, a 37° por 3 h. Depois deste período, 100 µl de isopropanol foi adicionado em cada poço para dissolver os cristais formazan. A absorbância foi medida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e os dados de densidade óptica (DO) medidos como absorbância (correspondente à proliferação celular) serão obtidos em quadruplicata e representados como médias e desvio padrão (DV).

5.2 Grupos Experimentais

As células foram avaliadas em 22 diferentes grupos experimentais, sendo:

5.3 Grupos suplementados a 10% de Soro Fetal Bovino

G1 – Controle: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB;

G2 - LED 660nm, 25s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 660nm, 40 mW por 25 segundos;

G3 - LED 660nm, 125s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 660nm, 40 mW por 125 segundos;

- G4 - LED 660nm, 250s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 660nm, 40 mW por 250 segundos;
- G5 - LED 850nm, 25s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 850nm, 40 mW por 25 segundos;
- G6 - LED 850nm, 125s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 850nm, 40 mW por 125 segundos;
- G7 - LED 850nm, 250s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com LED 850nm, 40 mW por 250 segundos;
- G8 - Laser 660nm, 25s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 660nm, 40 mW por 25 segundos;
- G9 - Laser 660nm, 125s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 660nm, 40 mW por 125 segundos;
- G10 - Laser 660nm, 250s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 660nm, 40 mW por 250 segundos;
- G11 - Laser 808nm, 25s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 808nm, 40 mW por 25 segundos;
- G12 - Laser 808nm, 125s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 808nm, 40 mW por 125 segundos;
- G13 - Laser 808nm, 250s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com Laser 808nm, 40 mW por 250 segundos;
- G14 – Magneto 0Hz, 25s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 0Hz por 25 segundos;
- G15 – Magneto 0Hz, 125s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 0Hz por 125 segundos;
- G16 – Magneto 0Hz, 250s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 0Hz por 250 segundos;
- G17 – Magneto 9Hz, 25s:** células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 9Hz por 25 segundos;

G18 – Magneto 9Hz, 125s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 9Hz por 125 segundos;

G19 – Magneto 9Hz, 250s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 9Hz por 250 segundos;

G20 – Magneto 18Hz, 25s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 18Hz por 25 segundos;

G21 – Magneto 18Hz, 125s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 18Hz por 125 segundos;

G22 – Magneto 18Hz, 250s: células de osteoblastos cultivadas em meio DMEM + 10% SFB e irradiadas com campo eletromagnético na frequência de 18Hz por 250 segundos;

Foram repetidos os 22 grupos com os mesmos parâmetros suplementados a 5% de SFB.

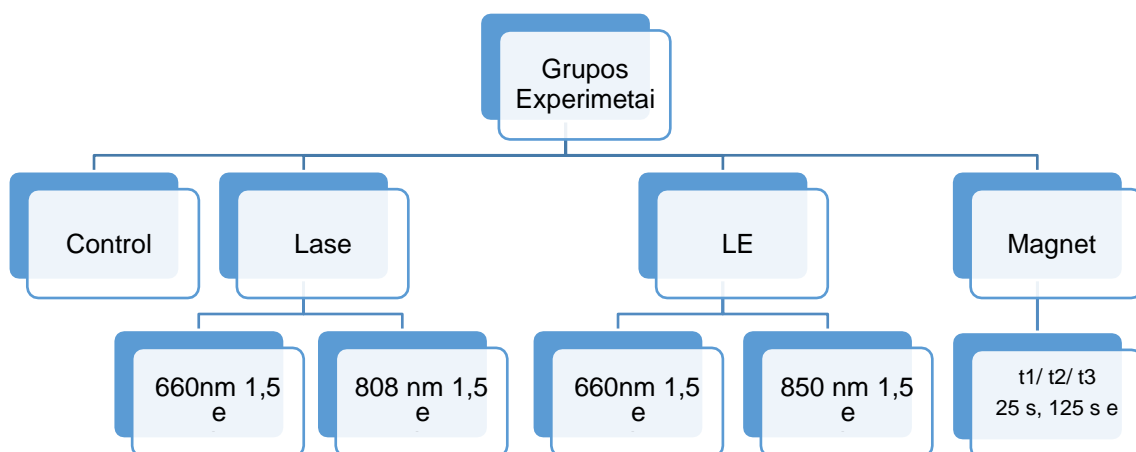


Figura 2. Grupos experimentais do projeto de pesquisa (22 grupos cultivados a 10% SFB e 22 grupos estressados (suplementados) a 5% SFB).

5.4 Fototerapia

Após semeadas em placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça), as células (2×10^5 /poço) foram estimuladas com Laser em baixa intensidade (LBI, 660 nm e 808 nm, 40 mW/cm^2 por 25, 125 e 250 segundos) e LED (660 nm e 850 nm, 40 mW/cm^2 por 25, 125 e 250 segundos), de acordo com o grupo experimental, seguindo os parâmetros dosimétricos descritos na tabela 1. As irradiações ocorreram em um ambiente com obscuridade parcial e imediatamente após o plaqueamento da cultura de osteoblastos de forma pontual e perpendicular ao fundo do poço. Para evitar a interferência da luz Laser ou LED nos demais grupos, a placa foi envolvida em uma máscara de fundo preto e cada réplica de cada grupo experimental foi semeada a 3 centímetros de distância da outra. O grupo controle sofreu a mesma manipulação sem receber a irradiação dos recursos fototerápicos.

Tabela 1. Parâmetros espectroscópicos e dosimétricos das fontes de luz para irradiação com Laser e LED (vermelho/infravermelho).

Parâmetro	Laser						LED						
	Comprimento de onda central (nm)	660,52			808			660		850			
Largura espectral (FWHM) (nm)	0,71												
Modo de operação	Contínuo												
Potência radiante média (mW)	40			40			40		40				
Polarização	Aleatório												
Tamanho do feixe no tecido alvo (cm^2)	0.3												
Irradiância no tecido alvo (mW/cm^2)	40												
Tempo de exposição (s)	25	125	250	25	125	250	25	125	250	25	125	250	
Exposição radiante (J/cm^2)	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	
Energia radiante (J)	0,3	1,5	3	0,3	1,5	3	0,3	1,5	3	0,3	1,5	3	
Técnica de aplicação	Sobre a placa												
Número de sessões	1 Após 24 hs												

No presente estudo, as células de osteoblastos (2×10^5 /poço) foram semeadas em placa de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça) e, imediatamente após a manipulação, as células foram estimuladas utilizando o recurso eletromagnético posicionando os poços na extremidade do cilindro metálico que contém o imã. O efeito da aplicação deste recurso foi testado utilizando a frequência de 0Hz (campo eletromagnético em modo estático) e com o campo eletromagnético em movimento (9Hz e 18Hz), de acordo com o grupo experimental, conforme descrito na tabela 2:

Tabela 2. Frequência de rotação do campo magnético em Hertz.

Grupos Magnetos		
Frequência de rotação (Hz)	Tempo de exposição (s)	Grupo experimental
0	25	G14
	125	G15
	250	G16
9	25	G17
	125	G18
	250	G19
18	25	G20
	125	G21
	250	G22

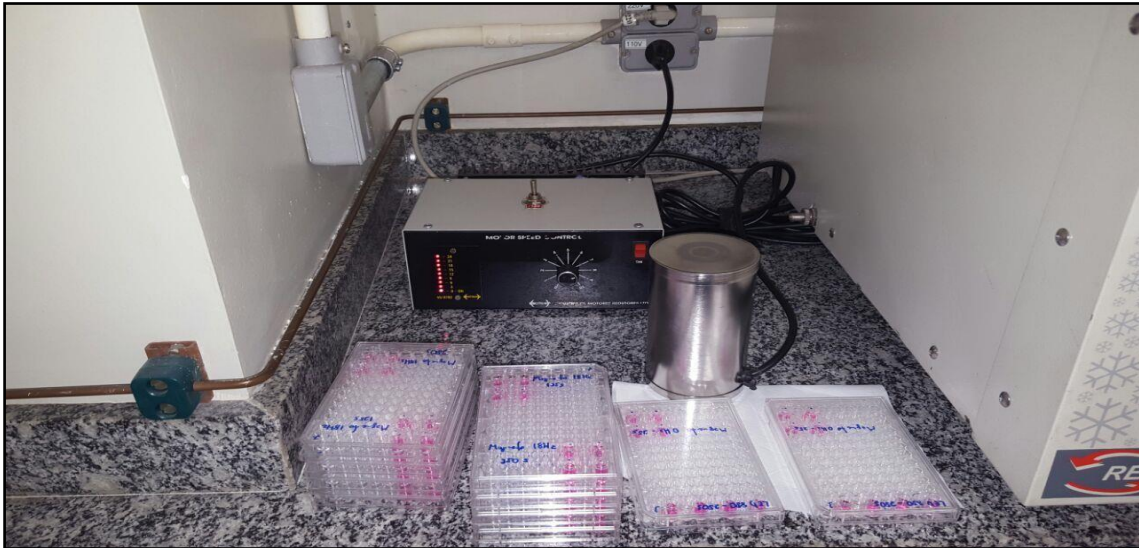


Figura 3. Preparo das placas de 96 poços para a irradiação com o equipamento magneto.



Figura 4. Irradiação das placas de 96 poços com células osteoblásticas a 0, 9 e 18 Hertz.

5.5 Ensaio de atividade mitocondrial (método MTT)

A quantificação da viabilidade celular também foi realizada pela técnica MTT⁴⁰. A metodologia MTT se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do sal MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das

células viáveis. A posterior lise celular, utilizando um solvente como o isopropanol, faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados. A coloração resultante no meio de cultura é então mensurada por meio de um leitor de espectrofotometria. Após o cultivo, foi realizada a retirada do meio de cultura por inversão da placa e lavagem com 100 µl de PBS 1x. Então foi adicionado 50 µl de MTT (0,5 mg/mL em tampão) (Thiazolyl blue – Sigma, St. Louis, MO, EUA) e realizada uma incubação de 3 h a 37°C.



Figura 5. Leitor de ELISA com absorvância de 620 nm. (Anthos2020, Anthos Labtec instruments, Wals, Austria).

5.6 Ensaio de viabilidade Cristal Violeta

O teste de cristal violeta é muito utilizado para determinação da proliferação por corar o DNA das células⁴¹. Após 24 horas o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado 40 µl de solução com Cristal Violeta e incubado por 15 minutos. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com água destilada e acrescentado 100 µl de metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) para promover a lise celular e a solubilização dos cristais. As leituras das placas foram realizadas no Leitor de ELISA com absorvância de 620 nm. (Anthos 2020, Anthos Labtec Instruments, Wals,Austria).

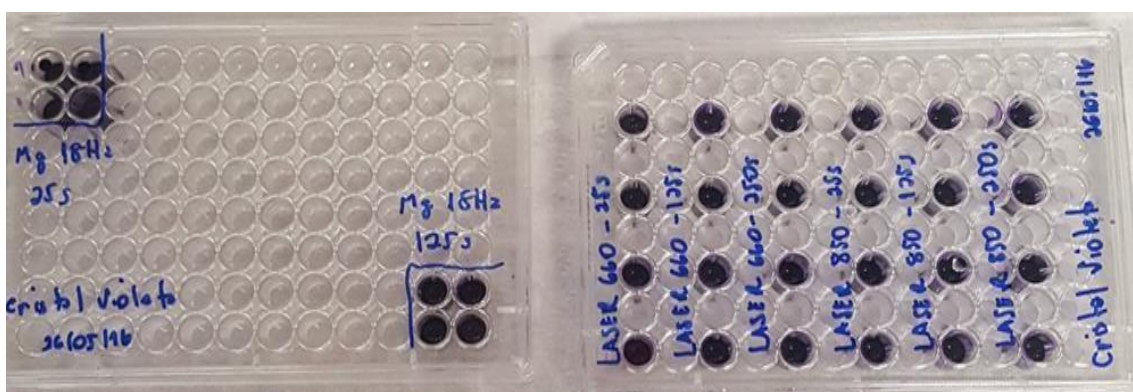


Figura 6. Imagem ilustrativa da placa de ensaio de viabilidade de cristal violeta após adição do corante.

5.7 Ensaio de diferenciação celular (dosagem de fosfatase alcalina)

Para analisarmos a atividade de ALP, os osteoblastos foram plaqueados em placas de 96 poços 2×10^5 células por poço. Em meio DMEM a 5% de SFB.

A determinação da concentração da fosfatase alcalina nos lisados celulares indica a diferenciação de osteoblastos. De forma a permitir esta avaliação, após a contagem celular, os osteoblastos foram incubados em placas de cultura 96 poços (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland) (2×10^5 células por poço) e mantidos em DMEM (10% de soro fetal bovino). A concentração da enzima fosfatase alcalina foi determinada utilizando kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina), as amostras foram colocadas em cubetas de 1 cm^2 e lidas em espectrofotômetro a 405 nm (FEMTO 700 Plus, SP, Brasil) a 37°C . Cada grupo experimental foi feito em quadruplicata gerando apenas uma leitura a partir do homogeneizado dos quatro poços. O experimento foi repetido 3 vezes de forma independente.



Figura 7. Espectrofotômetro 700 Plus- Fosfatase Alcalina.



Figura 8. Kit ALP 405 líquido AA.

5.8 Dosagem de proteína total

Após a contagem celular, os osteoblastos foram incubados 2×10^5 células em placas de cultura 96 poços (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland) (2×10^5 células por poço) e mantidos em DMEM (10% de soro fetal bovino). A dosagem de proteína total de cada grupo experimental foi obtida a partir do sobrenadante das amostras preparadas. A quantificação Total da proteína foi calculada pelo método de Bradford²⁰.

Para tanto, foi utilizado o método descrito¹² transferindo 10µL do sobrenadante para placa de 96 poços (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland) e adicionado 200 µL da solução de reagente de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA) na concentração final de 1:5. A absorbância foi mensurada utilizando leitor de microplacas (Anthos2020®, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria) operando a 595 nm.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi obtida a razão entre dados de cada grupo experimental e seu respectivo controle. Os dados relativos foram avaliados quanto à sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilks. Como todos os dados apresentaram distribuição aproximadamente normal, estes serão apresentados através de média \pm erro padrão. A análise inferencial será feita através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey quando necessário. O nível de significância será adotado em $\alpha = 0,05$.

7. RESULTADOS

ARTIGO 1:

Deana, A. M., Souza, A. M., Mesquita-Ferrari, R. A., Fernandes, K. P. S. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. Lasers in Medical Science. Submetido.

7.1 GRUPOS SUPLEMENTADOS A 10% SFB

Os resultados serão descritos comparando as fontes de luz Laser (vermelha) e LED vermelha nos tempos de exposição e doses de: 25 segundos ($1\text{J}/\text{cm}^2$), 125 segundos ($5\text{J}/\text{cm}^2$) e 250 segundos ($10\text{J}/\text{cm}^2$).

As figuras 9 a 10 mostram as médias \pm erro padrão da análise da viabilidade relativa dos grupos experimentais.

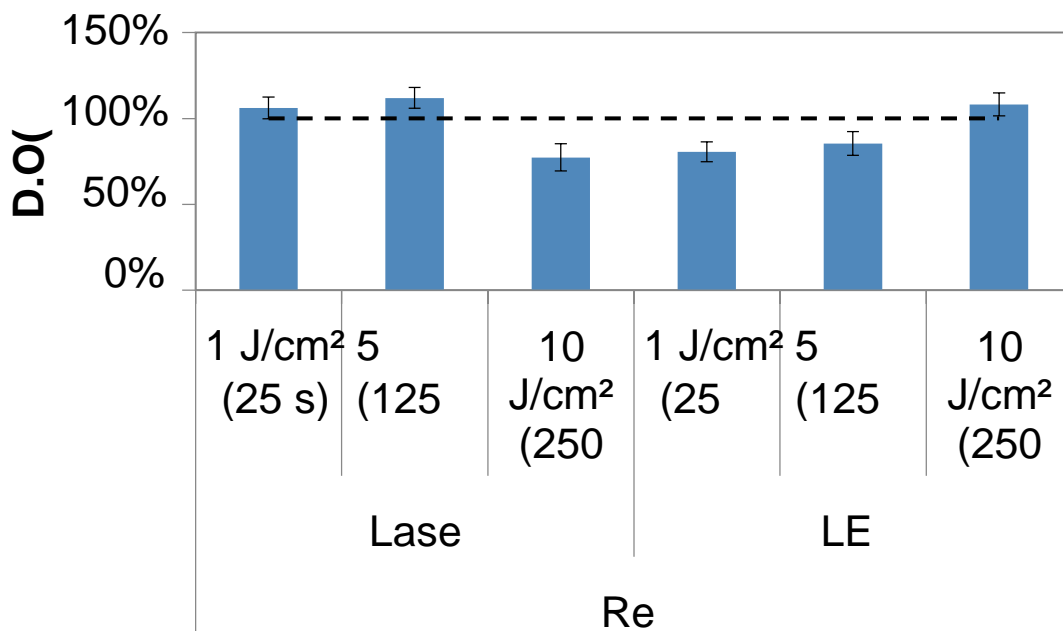


Figura 9. Efeitos do Laser e LED (vermelho) na viabilidade de OSTEO-1.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético em função do tempo de exposição não mostrou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos grupos estudados (ANOVA, $p > 0,05$).

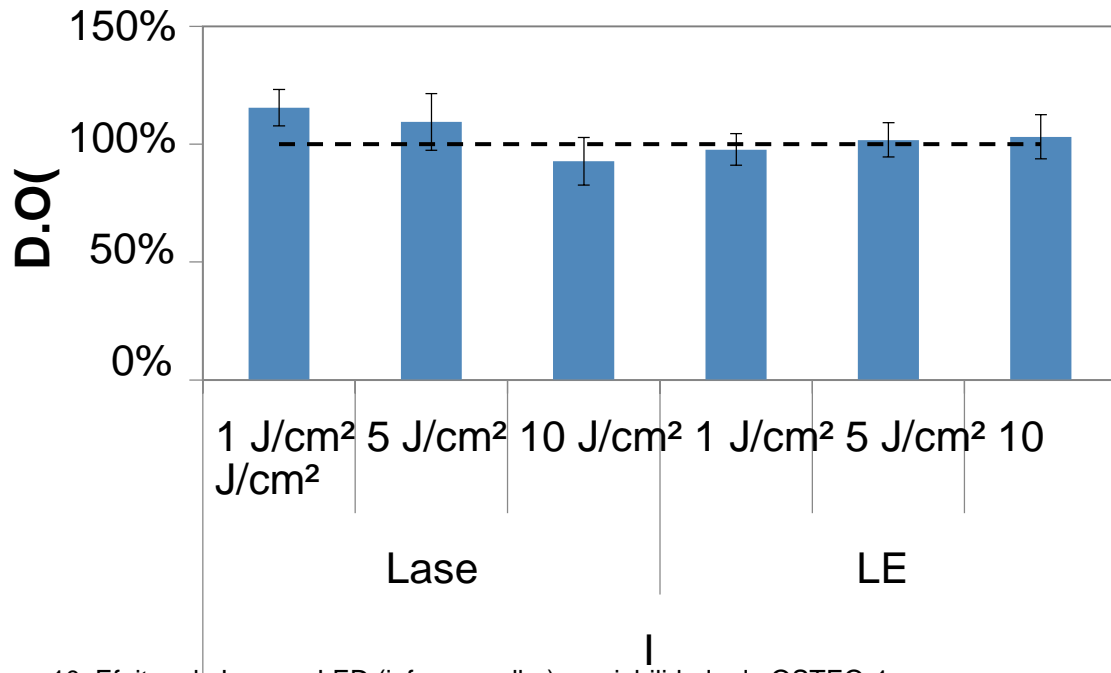


Figura 10. Efeitos do Laser e LED (infravermelho) na viabilidade de OSTEO-1.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, conforme pode ser observado na figura 12.

O campo eletromagnético também não produziu nenhum efeito na medida de MTT para os parâmetros estudados (ANOVA, $p > 0,05$).

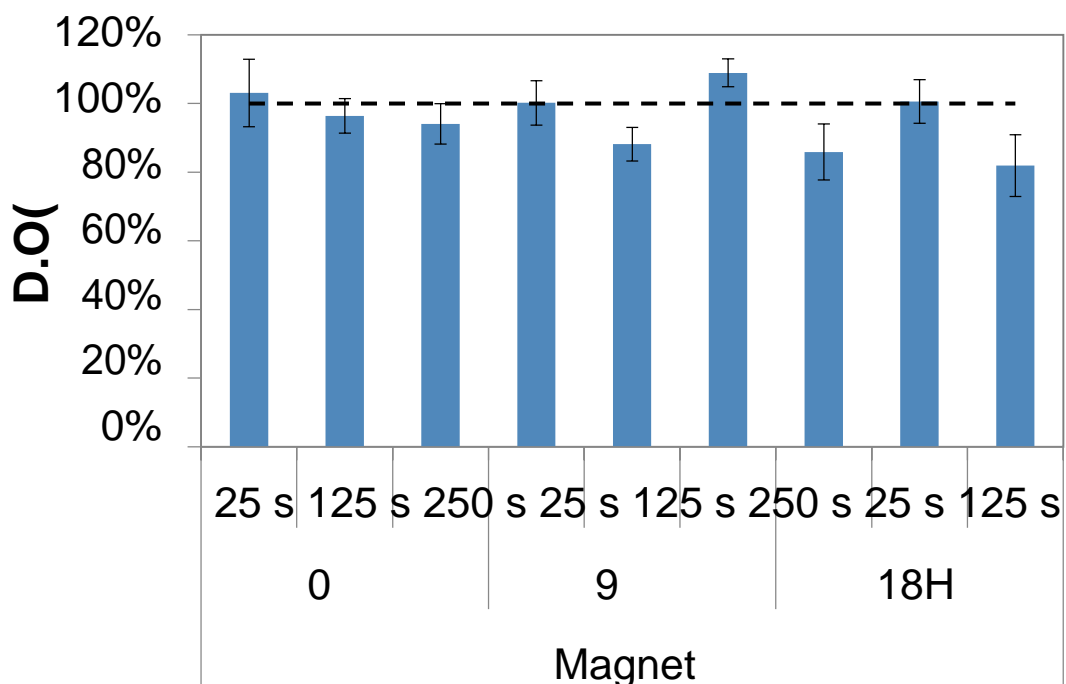


Figura 11. Efeitos do magneto na viabilidade de OSTEO-1. O campo eletromagnético não produziu nenhum efeito na viabilidade de MTT para os parâmetros estudados (ANOVA, $p > 0,05$).

A análise de variância de dois fatores mostrou que há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de fonte de luz (Laser/LED, $p < 0,0001$, two-way ANOVA) mas não há entre as regiões espectrais (vermelho/infravermelho, $p = 0,05$, two-way ANOVA). Também não foi encontrado nenhum tipo de interação entre o comprimento de onda e a fonte de luz ($p = 0.1859$, two-way ANOVA).

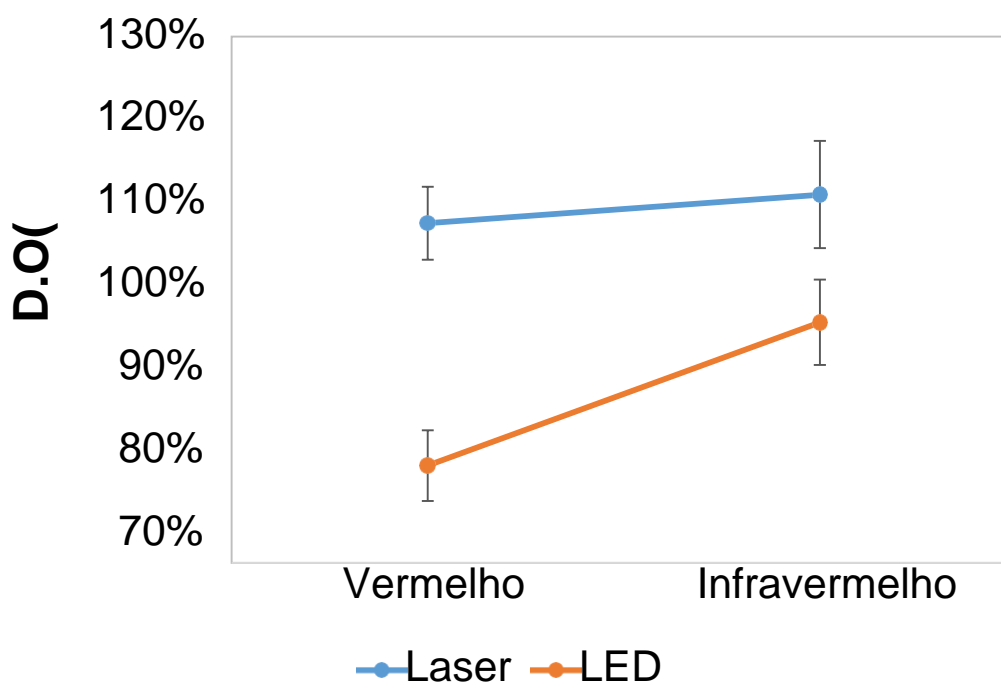


Figura 12. Análise de variância com dois fatores dos espectros (LED e Laser) na quantificação de proteína total.

As figuras 13 a 14 mostram as médias \pm erro padrão da análise da proteína total relativa dos grupos experimentais.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético em função do tempo de exposição não mostrou diferença estatisticamente significativa para nenhum dos grupos estudados (ANOVA, $p > 0,05$).

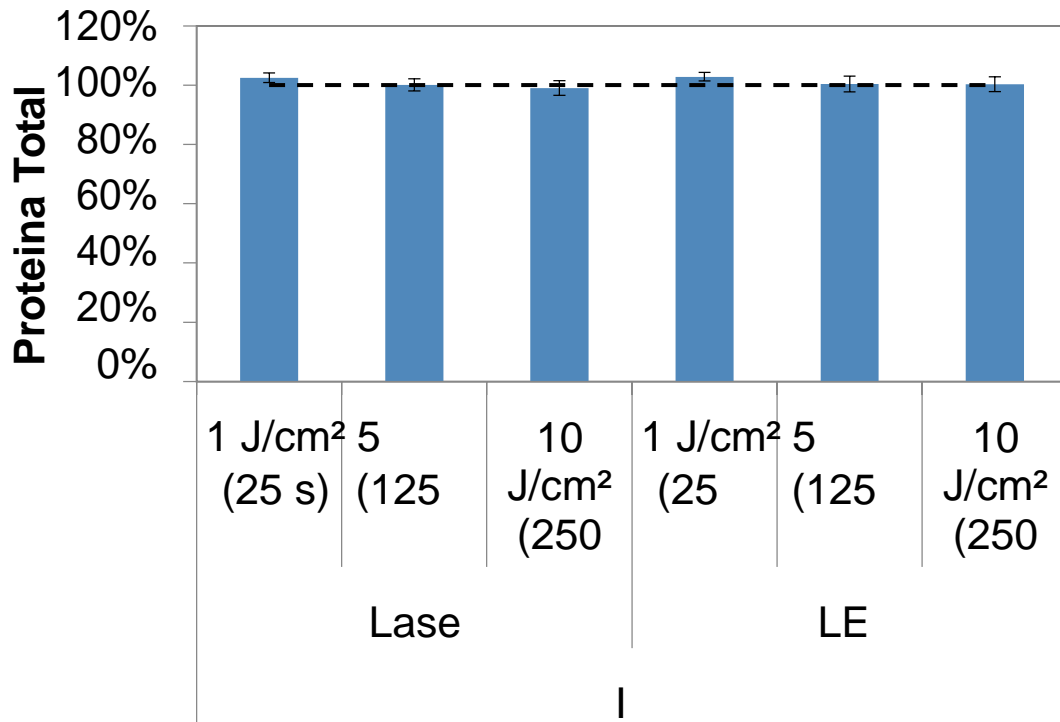


Figura 13. Efeitos de (Laser e LED infravermelho) na quantificação de proteína total.

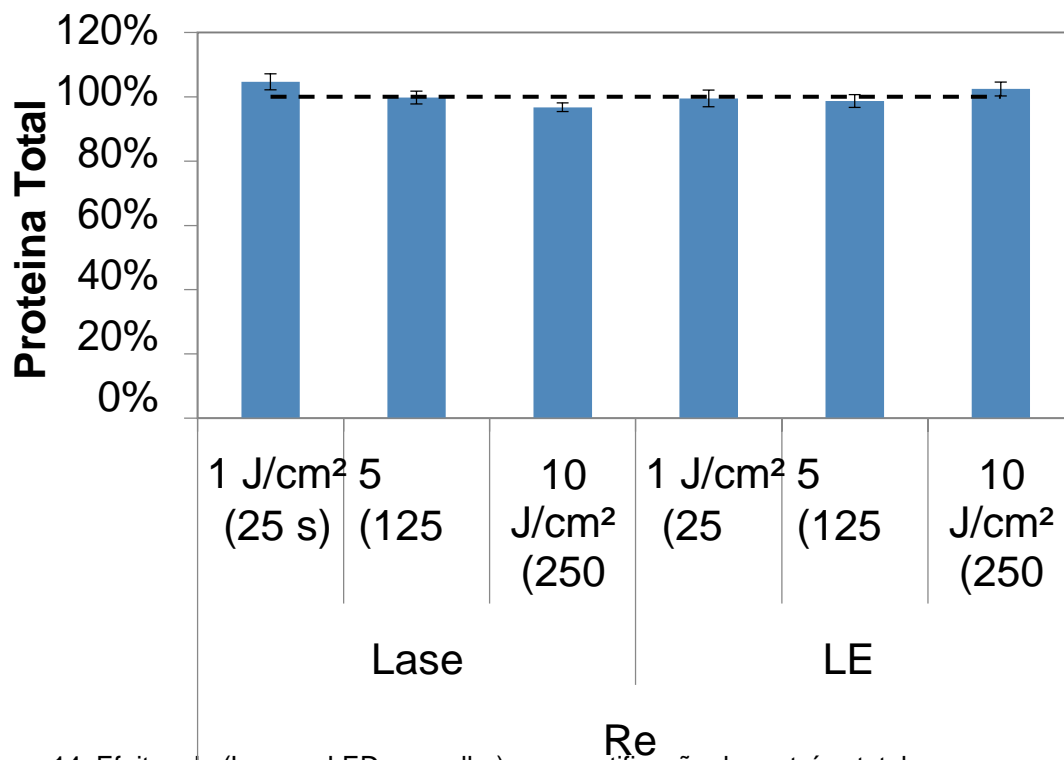


Figura 14. Efeitos de (Laser e LED vermelho) na quantificação de proteína total.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, conforme pode ser observado na figura 12.

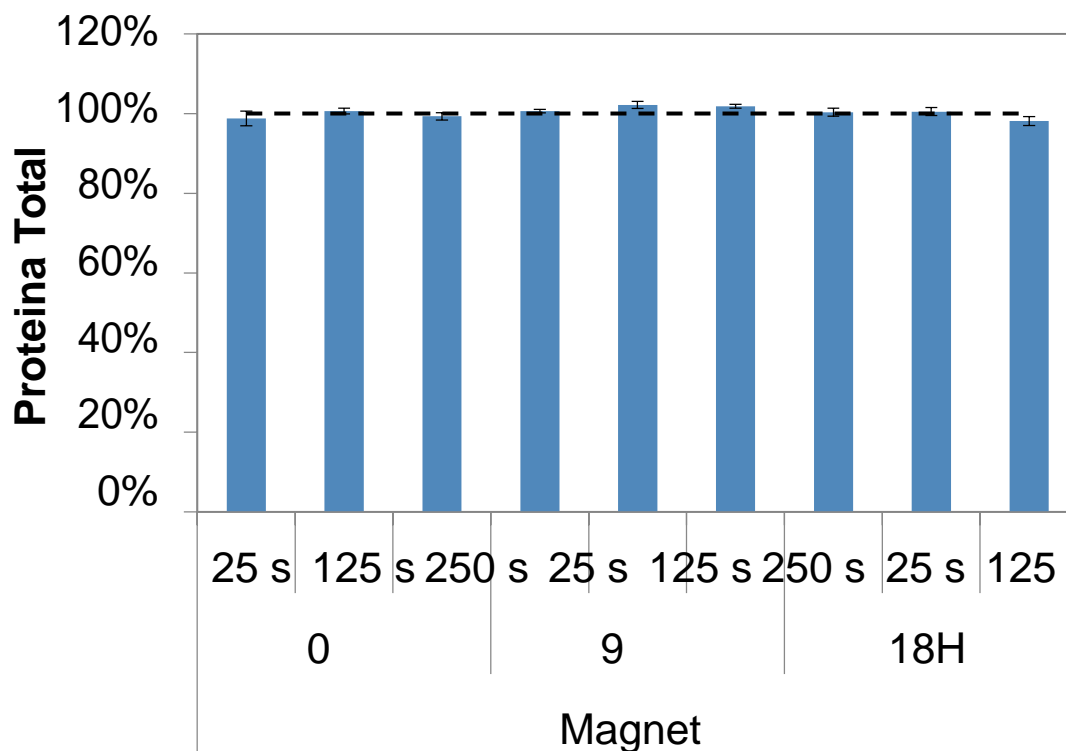


Figura 15. Efeitos do magneto na quantificação de proteína total.

O campo eletromagnético também não produziu nenhum efeito na medida de proteína total para os parâmetros estudados (ANOVA, $p > 0,05$).

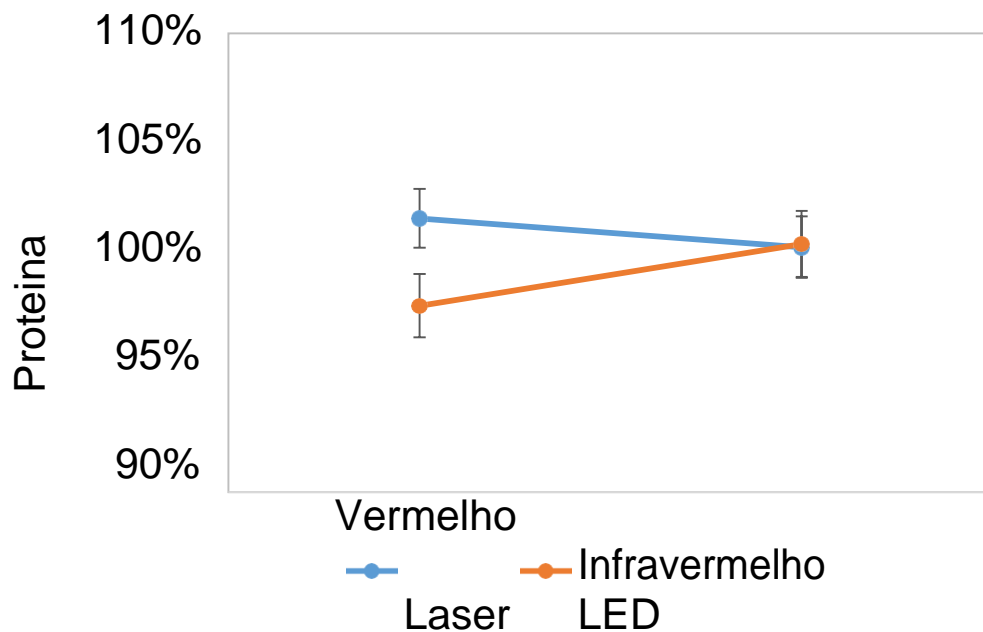


Figura 16. Análise de variância com dois fatores dos espectros (Vermelho/infravermelho) na quantificação de proteína total.

A análise de variância de dois fatores mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de fonte de luz (Laser/LED, $p = 0,5932$, two-way ANOVA) nem entre as regiões espectrais (vermelho/infravermelho, $p = 0,1756$, two-way ANOVA). Também não foi encontrado nenhum tipo de interação entre o comprimento de onda e a fonte de luz ($p = 0,1449$, two-way ANOVA).

7.2 Grupos suplementados a 5% SFB por 24 horas tratados com recurso fototerápicos e eletromagnéticos.

7.2.1 Grupo MTT

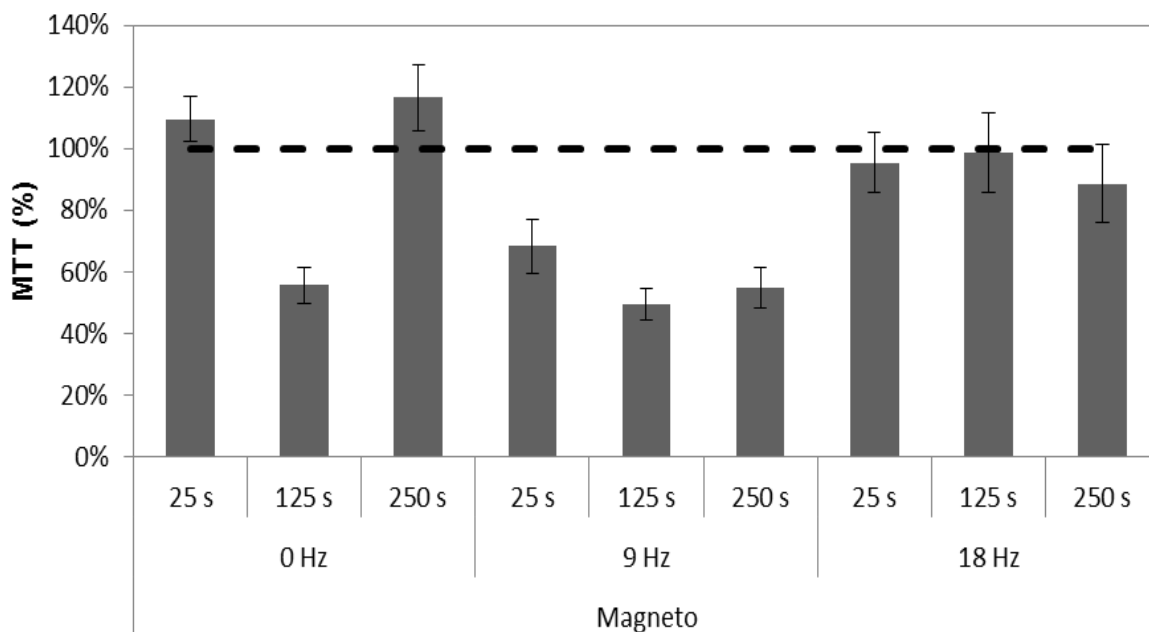


Figura 17. Efeitos do magneto na viabilidade de OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na proliferação celular (ANOVA $p < 0.0001$). A análise post hoc comprovou que o grupo controle difere significativamente dos grupos com os parâmetros: 0 Hz a 125 s; 9 Hz a 125s e 250 (stukey $p < 0.01$). Para os grupos de 18 Hz não houve diferença significativa com o controle.

Para os tempos de irradiância do grupo magneto a 0 Hz a 125 s; 9 Hz com 25, 1125 e 250 segundos houve uma diminuição na viabilidade das células em relação ao grupo controle.

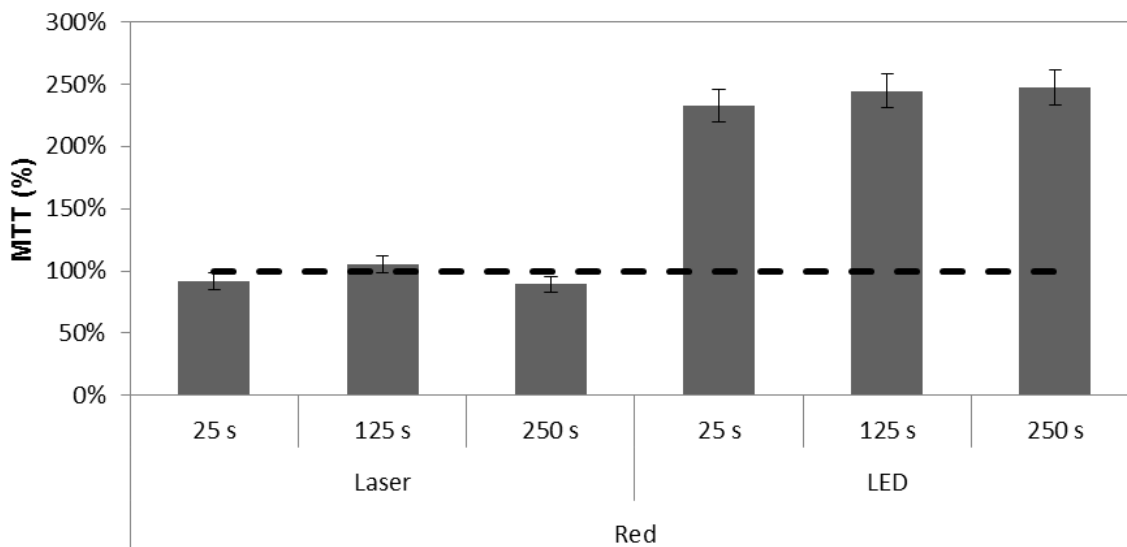


Figura 18. Efeitos de laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na viabilidade de OSTEO-1. Sendo um grupo irradiado por 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos LED (vermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

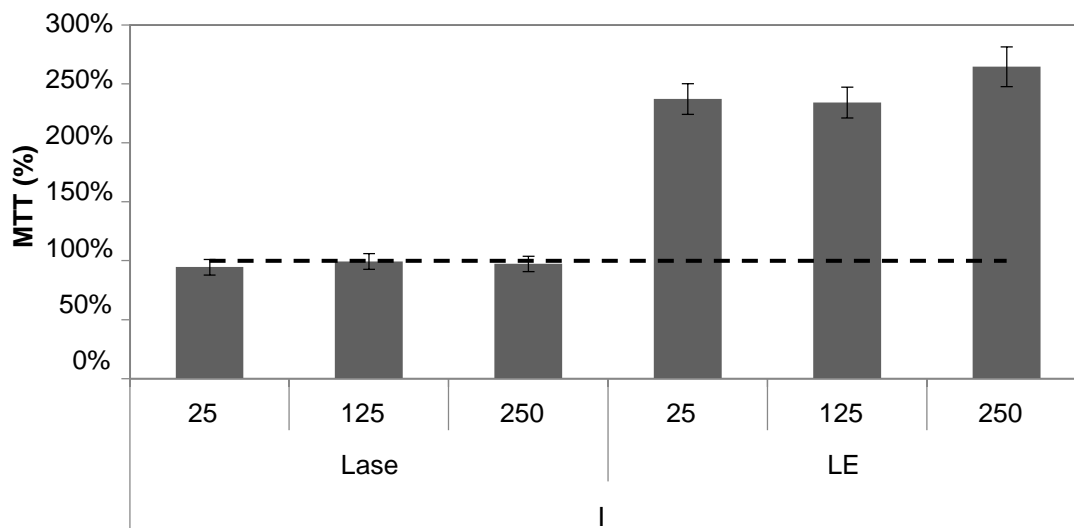


Figura 19. Efeitos de Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na viabilidade de OSTEO-1. Sendo um grupo irradiado por 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos LED (infravermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

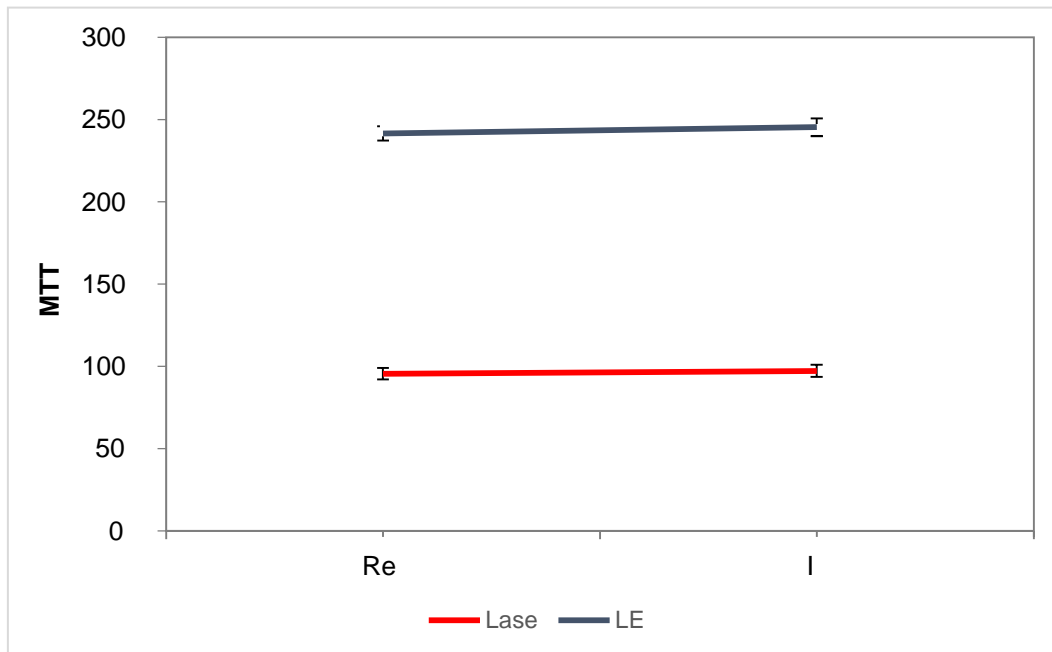


Figura 20. Análise de variância de dois fatores, LED e Laser (vermelho /infravermelho).

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, onde o LED (vermelho/infravermelho) tiveram aumento significativo em todos os parâmetros estudados ($p < 0,0001$, two-way ANOVA), Conforme mostra a figura 15 e 16, entretanto não observou-se diferença estatisticamente significativa entre as regiões espectrais estudadas ($p = 0,3970$, two-way ANOVA) e não há indícios de interação entre os fatores ($p = 0,7480$, two-way ANOVA).

7.3 Grupo Análise Cristal Violeta

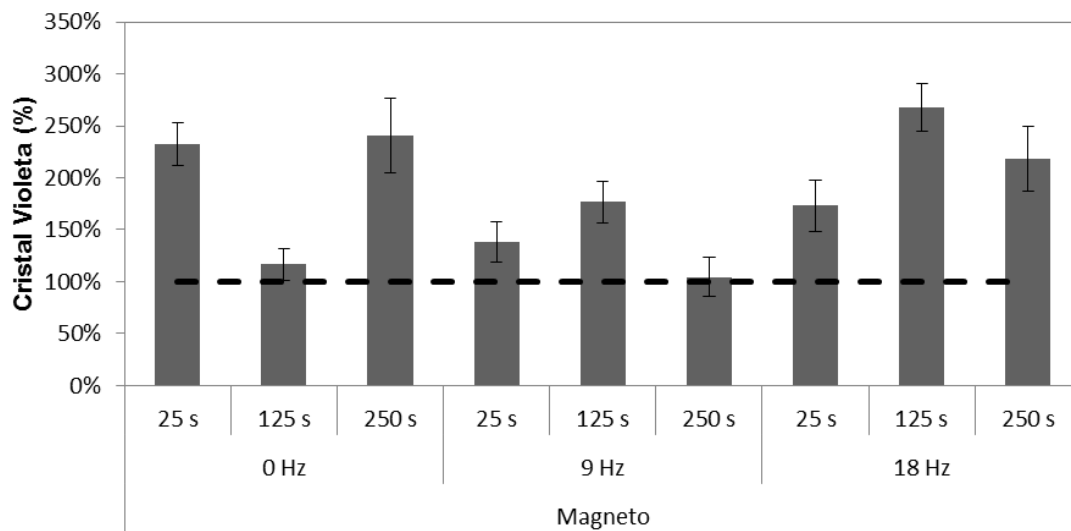


Figura 21. Efeitos do magneto na viabilidade de OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou aumento significativo ($p < 0,0001$, ANOVA) na viabilidade e com os parâmetros: 0 Hz a 125 s e a 250 s e para o grupo 18 Hz, 125 s (Tukey $p < 0,01$).

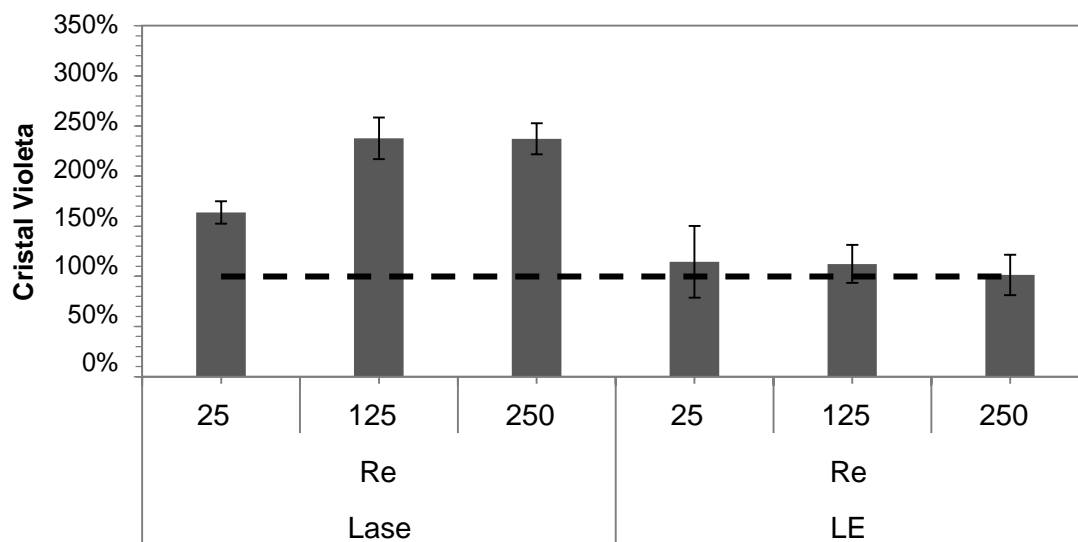


Figura 22. Efeitos do Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na viabilidade de OSTE0-1. Sendo um grupo irradiado por 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos Laser (vermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

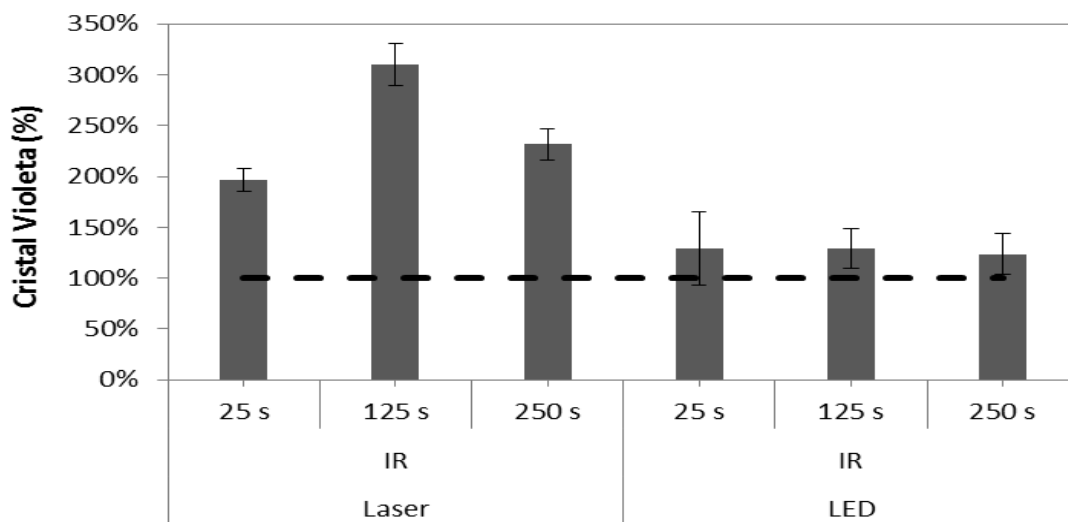


Figura 23. Efeitos do Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na viabilidade de OSTE0-1. Sendo um grupo irradiado por 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do infravermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos Laser (infravermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

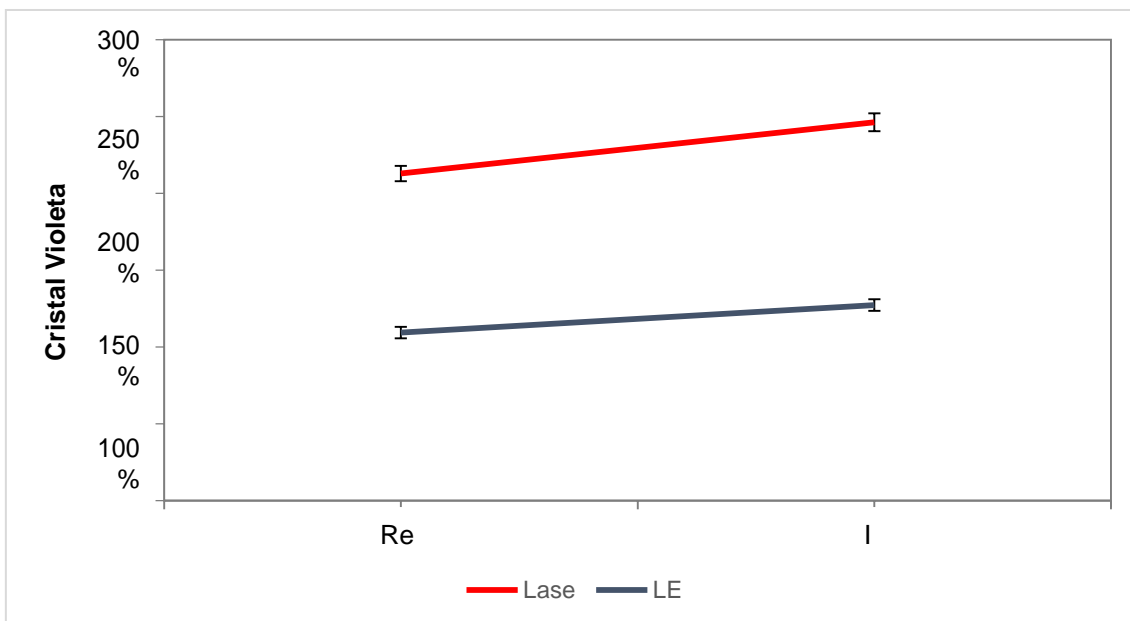


Figura 24. Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na viabilidade de células OSTE0-1.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, onde o LED (vermelho/infravermelho) tiveram aumento significativo em todos os parâmetros estudados ($p < 0,0001$, two-way ANOVA), Conforme mostra a figura 18 e 19, entretanto observou-se também diferença estatisticamente significativa entre as regiões espectrais estudadas ($p = 0,0011$, two-way ANOVA) e não há indícios de interação entre os fatores ($p = 0,3134$, two-way ANOVA).

7.4 Grupo Proteína Total

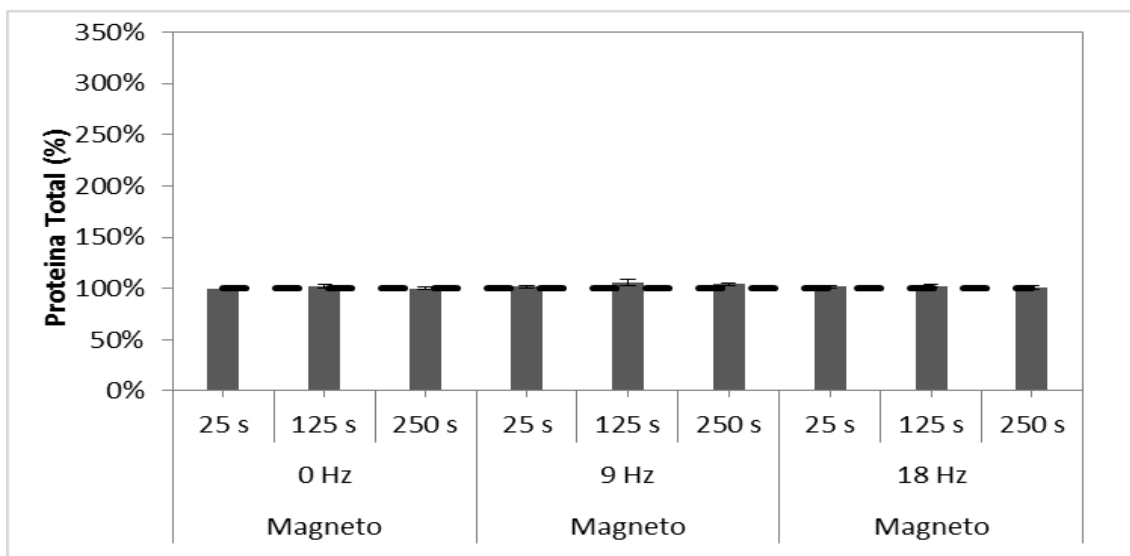


Figura 25. Efeitos de do magneto na quantificação de proteína total. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas totais com os parâmetros: 0 Hz a 125 segundos, 9 Hz a 25, 125 e 250 segundos.

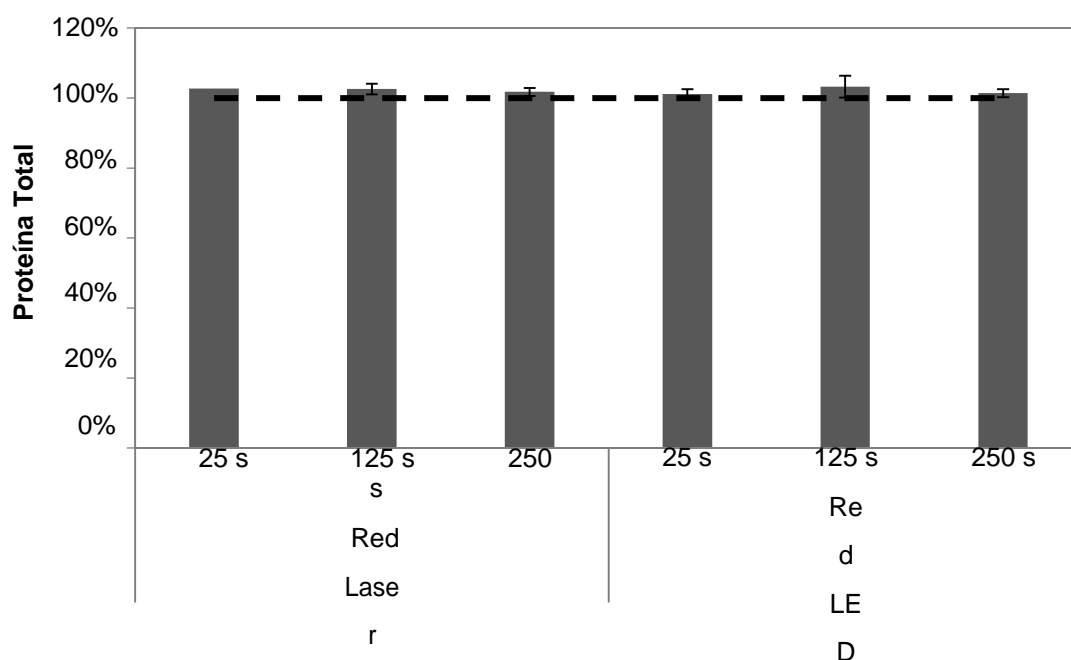


Figura 26. Efeitos de Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) quantificação de proteína total

A análise de variância dos dados relativos aos grupos Laser e LED (vermelho), em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas celular com os parâmetros 25, 125 e 250 segundos.

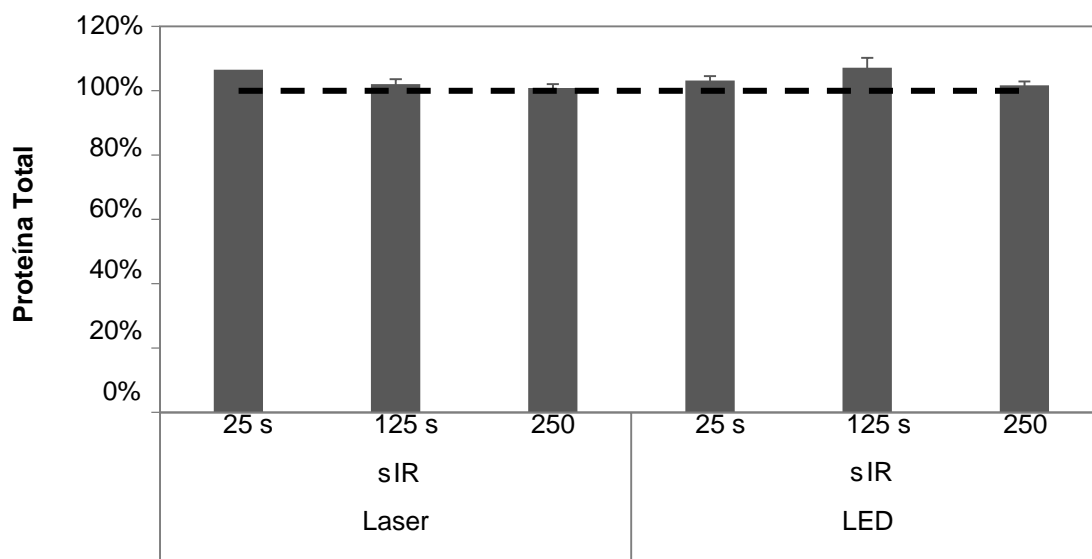


Figura 27. Efeitos de Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na quantificação de proteína total .

A análise de variância dos dados relativos aos grupos Laser e LED (infravermelho), em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas totais com os parâmetros 25, 125 e 250 segundos.

7.5 Análise da atividade de fosfatase alcalina

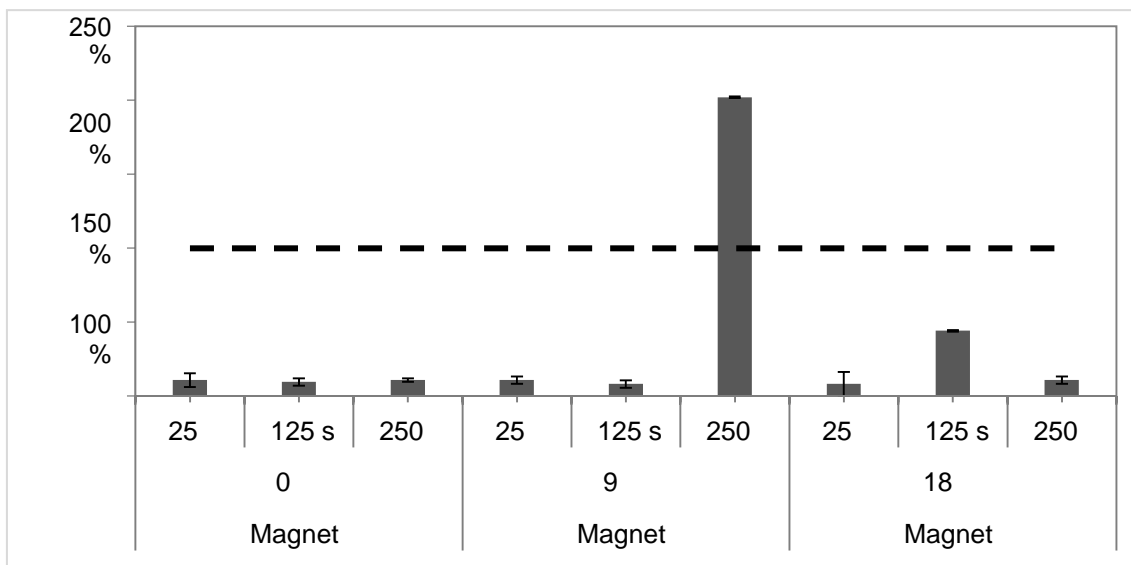


Figura 28. Efeitos do magneto na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 9 e 18 Hz, por 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou aumento significativo na diferenciação celular com os parâmetros: 9 Hz a 250 segundos.

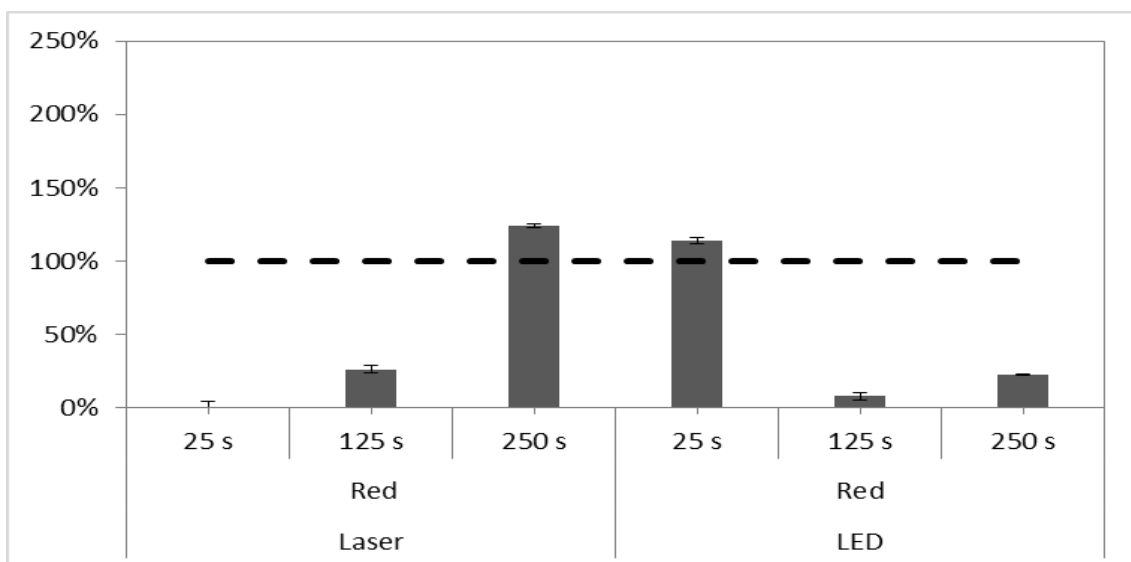


Figura 29. Efeitos do Laser 660 nm e LED 660 nm (vermelho) na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTE0-1.

Para os grupos Laser e LED (vermelho), houve diferença significativa para os grupos Laser250 segundos e LED com os parâmetros de 25 segundos.

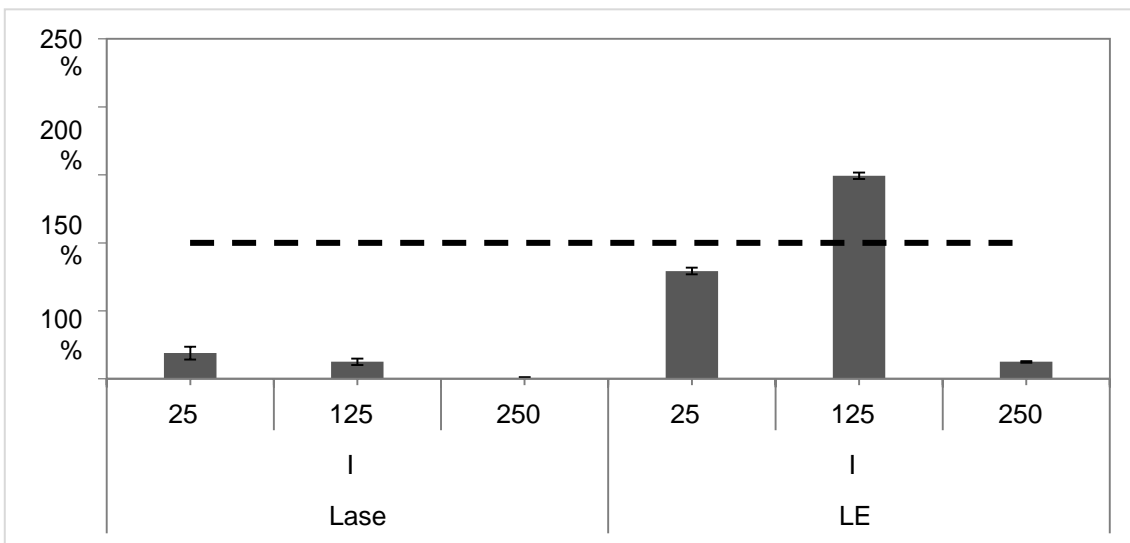


Figura 30. Efeitos de Laser 808 nm e LED 850nm (infravermelho) na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTE0-1.

Para os grupos Laser e LED (infravermelho), não houve diferença significativa para os grupos Laser e para os grupos Ld a 125 segundos houve diferença significativa.

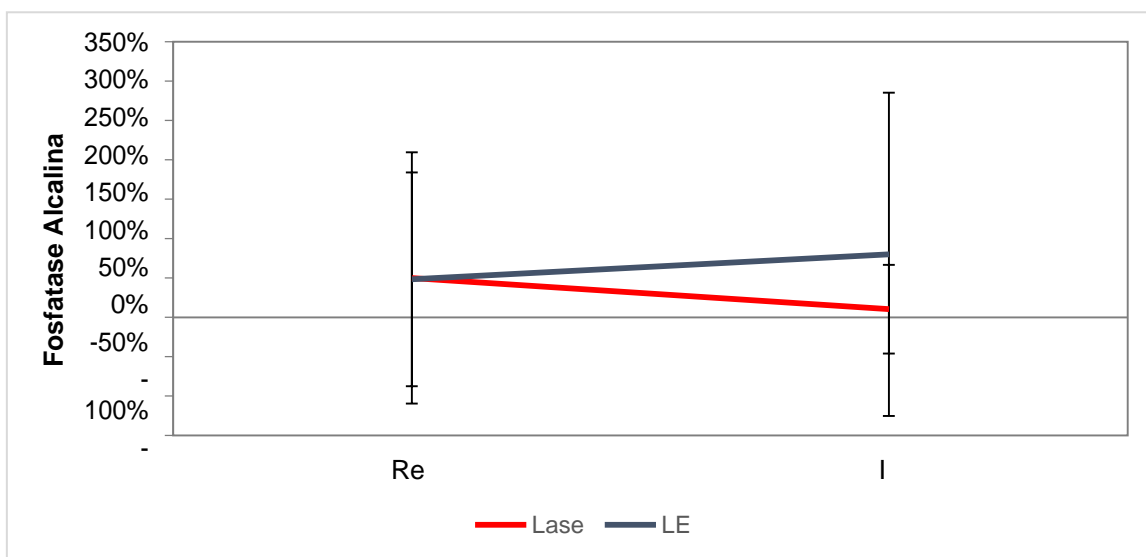


Figura 31. Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na atividade de fosfatase alcalina celular dos OSTE0-1. Não houve diferença significativa para os diferentes espectros.

RESULTADOS FINAIS

Grupos suplementados a 5% de SFB /

= Não houve diferença em relação ao grupo controle

	Laser Red	Laser IR	LED Red	LED IR	MAGNETO
MTT	=	=	↑	↑	0 Hz – 125 s 9 Hz- 125 e 250s ↓
Cristal Violeta	↑	↑	=	=	0Hz (125 e 250) s 9 Hz (125) s 18 Hz (25, 125 e 250) ↑
Proteína Total	=	=	=	=	=
Atividade de fosfatase alcalina	250 s ↑	=	25 s ↑	125 s ↑	9 Hz (250) s ↑

Tabela 3. Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na atividade de fosfatase alcalina celular

8. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas a terapia com luz de baixa intensidade tem sido estudada como um acelerador nos processos de cicatrização por possuir efeitos bioestimuladores sobre diferentes tipos celulares, por sua ausência de potencial fototérmico e, na região do vermelho e infravermelho, a energia de seus fótons energia são inferiores as ligações das moléculas biológicas e de DNA, assim não são capazes de quebrar ligações químicas, induzir mutações ou carcinogêneses⁴².

O mecanismo pelo qual o Laser promove a aceleração nos processos cicatriciais é estabelecido através de um estímulo no metabolismo intracelular e na produção de colágeno pelos fibroblastos, os quais produzem uma maior organização e entrelaçamento das fibras colágenas¹¹. No entanto, os mecanismos biológicos relacionados aos efeitos bioestimulantes do Laser não foram ainda esclarecidos na literatura. Alguns estudos têm sido realizados para melhor compreensão dos efeitos da irradiação com Laser em células osteogênicas aumentando sua proliferação⁴³.

Este trabalho avaliou o efeito de diferentes campos eletromagnéticos (LLTT, LED e campo magnético puro), na viabilidade, diferenciação e quantificação de proteínas de osteoblastos (OSTEO-1). Em relação à viabilidade (grupos com 10% de suplemento de SFB), os diferentes campos eletromagnéticos, com diferentes doses de energia não influenciaram na viabilidade celular, quando comparado ao grupo controle.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho), análise de variância de dois fatores mostrou que há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de fonte de luz (Laser/LED, $p < 0,0001$, two-way ANOVA) mas não há entre as regiões espectrais (vermelho/infravermelho, $p = 0,05$, two-way ANOVA). Também não foi encontrado nenhum tipo de interação entre o comprimento de onda e a fonte de luz ($p = 0,1859$, two-way ANOVA).

Para a análise de proteínas totais, a variância de dois fatores mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de fonte de luz (Laser/LED, $p = 0.5932$, two-way ANOVA) nem entre as regiões espectrais

(vermelho/infravermelho, $p = 0,1756$, two-way ANOVA). Também não foi encontrado nenhum tipo de interação entre o comprimento de onda e a fonte de luz ($p = 0,1449$, two-way ANOVA).

Neste estudo não houve aumento significativo de células após 24 horas, com apenas uma aplicação de diferentes campos eletromagnéticos, nas energias radiantes de 1, 5 e 10 J/cm².

A divergência nos resultados dos estudos se deve, dentre outros fatores metodológicos, a grande variação nos parâmetros de irradiação e a linhagem celular avaliada⁴⁴.

Os resultados deste estudo sugerem que nestas condições experimentais, os diferentes campos eletromagnéticos não alteram a proliferação celular de osteoblastos da linhagem OSTEO-1 com 10 % de suplemento de SFB, (24 horas de cultivo), O uso de diferentes campos eletromagnéticos, com diferentes doses, por sua vez, não alterou a resposta dos osteoblastos no que se refere à viabilidade.

Os grupos suplementados a 5% de SFB por 24 horas foram tratados com recursos fototerápicos e eletromagnéticos, também foram avaliados quanto à sua proliferação, viabilidade, diferenciação e quantificação de proteínas.

Para os grupos do MTT, referente aos efeitos do magneto na viabilidade de OSTEO-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos, a análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). A análise post hoc comprovou que o grupo controle difere significativamente dos grupos com os parâmetros: 0 Hz a 125 s; 9 Hz a 125s e 250 s (tukey $p < 0,01$). Para os grupos de 18 Hz não houve diferença significativa com o controle.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho (660 nm) e LED (660 nm) na proliferação de osteo em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos LED

(vermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

A análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do infravermelho Laser (808 nm) e LED (850nm) em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos LED (vermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, onde os LED's (vermelho/infravermelho) tiveram aumento significativo em todos os parâmetros estudados ($p < 0,0001$, two-way ANOVA), Conforme mostra a figura 14 e 15, entretanto não observou-se diferença estatisticamente significativa entre as regiões espectrais estudadas ($p = 0,3970$, two-way ANOVA) e não há indícios de interação entre os fatores ($p = 0,7480$, two-way ANOVA).

Para a análise dos grupos Cristal violeta, os efeitos do espectro do magneto na viabilidade de OSTE0-1. A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou aumento significativo ($p < 0.0001$, ANOVA) na viabilidade e com os parâmetros: 0 Hz a 125 s e a 250 s e para o grupo 18 Hz, 125 s (Tukey $p < 0,01$).

Efeitos de diferentes campos eletromagnéticos vermelho Laser (660 nm) e LED (660 nm) na viabilidade de OSTE0-1, a análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos Laser (vermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Efeitos de diferentes campos eletromagnéticos infravermelho Laser (808 nm) e LED (850nm) na viabilidade de OSTE0-1, a análise de variância dos dados relativos a irradiação na região do vermelho em função do tempo de exposição mostrou alteração significativa na viabilidade celular (ANOVA $p < 0,0001$). Houve um aumento significativo para os grupos Laser

(infravermelho) nos tempos de 25, 125 e 250 s (tukey $p < 0,01$) em relação ao grupo controle.

Separando os grupos irradiados em função do tipo de fonte (Laser/LED) e região do espectro (vermelho/infravermelho) foi realizada uma análise de variância de dois fatores, onde o LED (vermelho/infravermelho) tiveram aumento significativo em todos os parâmetros estudados ($p < 0,0001$, two-way ANOVA), observou-se também diferença estatisticamente significativa entre as regiões espectrais estudadas.

Para os grupos de Proteína Total os efeitos do magneto na quantificação de proteína. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos. A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas celular com os parâmetros: 0 Hz a 125 segundos, 9 Hz a 25, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos aos grupos Laser (660 nm) e LED (660 nm) na quantificação de proteína totais, em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas celular com os parâmetros 12, 125 e 250 segundos.

A análise de variância dos dados relativos aos grupos infravermelhos, Laser (808 nm) e LED (850nm) na quantificação de proteína totais, em função do tempo de exposição não houve diferença significativa na quantificação de proteínas celular com os parâmetros 12, 125 e 250 segundos.

A análise dos grupos de atividade de fosfatase alcalina em relação aos efeitos do magneto na diferenciação celular dos OSTE0-1. Irradiação eletromagnética (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz), sendo cada frequência irradiada por 0, 15, 125 e 250 segundos. A análise de variância dos dados relativos a cada tipo de campo eletromagnético (0 Hz, 9 Hz e 18 Hz) em função do tempo de exposição mostrou aumento significativo na diferenciação celular com os parâmetros: 9 Hz a 250 segundos.

Para os grupos Laser vermelho (660 nm) e LED vermelho (660 nm) na diferenciação de ósteo 1, houve diferença significativa para os grupos Laser 250 segundos e LED com os parâmetros de 25 segundos.

Efeitos de diferentes campos eletromagnéticos infravermelho, Laser (808 nm) e LED (850nm) na diferenciação celular dos OSTE0-1. Para os grupos Laser e LED (infravermelho), não houve diferença significativa para os grupos Laser e para os grupos LED a 125 segundos houve diferença significativa.

Análise de variância com dois fatores dos espectros vermelho e infravermelho na diferenciação de células OSTE0-1. Não houve diferença significativa para os diferentes espectros.

Este trabalho avaliou o efeito de diferentes fototerapias, Laser vermelho e infravermelho, LED vermelho e infravermelho e campo magnético puro na viabilidade, quantificação de proteínas e diferenciação de células osteoblastos de linhagem OSTE0-1.

Em relação à viabilidade (MTT), os grupos que sofreram estresse nutricional (5% de SFB) vinte e quatro horas antes da irradiação, independente da fonte de luz tiveram aumento significativo na viabilidade das células, com exceção do magneto a 18 Hz que não houve aumento.

Quanto à proliferação celular, por meio de ensaio de Cristal violeta, as fototerapias Laser vermelho e infravermelho e magneto, evidenciou-se um aumento na viabilidade celular. Para as fontes de LED vermelho e infravermelho, não observou-se aumento.

Os ensaios de MTT e Cristal violeta embora sejam métodos complementares para avaliar a proliferação celular, nossos resultados sugerem que diferentes fototerapias, associadas ao tempo de exposição, potência e estresse nutricional, aumentem a viabilidade celular, que é o primeiro indício de diferenciação osteogênica.

Células humanas e células de calvárias de ratos ao serem estimuladas por Laser de baixa potência no modo pulsado aumentam a síntese de proteína na matriz óssea⁴⁵.

Estudos mostraram que os marcadores de formação óssea evidenciam a atividade osteoblástica em vários estágios de diferenciação. A fosfatase alcalina óssea é produzida pelas células osteoblastos, é de extrema importância para a mineralização óssea⁴⁶.

Para evidenciarmos a diferenciação das células ósteo 1 foi realizado o ensaio de atividade da fosfatase alcalina. No presente estudo o potencial de diferenciação celular só ocorreu aumento com estímulo do Laser vermelho a 250 segundos, LED vermelho a 25 s e infravermelho a 125 s e para o equipamento magneto com 9 Hz a 250 segundos.

9. Conclusão

A diferença na suplementação interfere nos resultados obtidos. Os grupos suplementados a 10 % SFB diferem dos resultados dos grupos suplementados a 5% de SFB.

Os resultados deste estudo sugerem que nestas condições experimentais, os diferentes campos eletromagnéticos não alteram a viabilidade celular de osteoblastos da linhagem OSTEO-1 suplementados a 10 % de SFB (24 horas de cultivo). O uso de diferentes campos eletromagnéticos, com diferentes doses, por sua vez, não alterou a resposta dos osteoblastos no que se refere à viabilidade.

Porém quando submetemos as células ao estresse nutricional a 5% SFB, a resposta dos osteoblastos quanto ao estímulo de diferentes fontes de luz (LED e Laser), alteram a viabilidade e diferenciação, dependendo do tempo de exposição e dose.

10. Considerações finais

As células osteoblásticas são susceptíveis à fotobiomodulação. A maioria dos parâmetros de irradiância (pulsados ou contínuos), reportado por diversos autores tem pouca ou nenhuma influência no que se refere à proliferação.

Diferentes exposições radiantes e comprimentos de onda - mesmo o incomum Laser de erbio de 2700 nm - obtiveram resultados positivos na proliferação e/ou fosfatase alcalina.

Irradiâncias muito altas têm demonstrado efeitos deletérios na proliferação, destacando o efeito bifásico da fotobiomodulação. Os mesmos parâmetros foram incapazes de diminuir significativamente a atividade da fosfatase alcalina tornando-o menos susceptível aos efeitos deletérios da irradiação de luz.

11. REFERÊNCIAS

1. Kato H, Nishiguchi S, Furukawa T, Neo M, Kawanabe K, Saito K, Nakamura T. Bone bonding in sintered hydroxyapatite combined with a new synthesized agent, TAK-778. J Biomed Mater Res. 2001.
2. Zouani OF;, Rami L; Lei Y; Durrieu MC. Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. Biol Open. 2013 Jul 3;2(9):872-81. doi: 10.1242/bio.20134986. eCollection 2013.
3. Watrous DA; Andrews BS. The metabolism and immunology of bone. Semin Arthritis Rheum. 1989 Aug;19(1):45-65
4. Pinheiro, A. L. B.; Gerbi, M. E. Photoengineering of bone repair processes. Photomedicine and Laser Surgery, v.21, n.2, p.169-178, 2006.

5. Brugnera JR. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003.
6. Mester, E. Stimulation of wound healing by means of Laser rays. Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae, v.14, n.4, p.347-356, 1973.
7. Catão, M.H.C.V. A laserterapia no tratamento da radiomucosite em paciente com carcinoma espinocelular no palato mole: relato de caso. Laser Dental Show, p.8-9, 2003.
8. Brugnera JR. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Santos, 2003.
9. Zezell, D. M. Effect of low-intensity polarized visible Laser radiation on skin burns: a light microscopy study. J Clin Laser Med Surg, Feb 2004.
10. Renno, A.C.M.; McDonnell, P.A.; Parizotto, N.A.; Laakso, E-L. The effects of Laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. Photomed. Laser Surg., v.25, n.4, p.275-280, 2007.
11. Martinasso G, Mozzati M, Pol R, Canuto Ra, Muzio G. Effect of superpulsed Laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line. Minerva Stomatol. 2007;56(1-2):27-30.
12. Basford JR. Low level Laser therapy: Controversies and new findings. Lasers Surj Med 9:1-5.
13. Canhão H; Fonseca Je. Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port. 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
14. Watrous DA; Andrews BS. The metabolism and immunology of bone. Semin Arthritis Rheum. 1989 Aug;19(1):45-65.
15. Parfftt A.M, Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: Implications for the understanding of osteoporosis. In Marcus M, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, eds. Osteoporosis. San Diego: Elsevier Academic Press; 2008, p.71-89.
16. Oliveira, P.; Fernandes, K.R.; Sperandio, E.F.; Pastor, F.A.; Nonakas, K.O.; Parizotto, N.A.; Renno, A.C.M. Comparative study of the effects of low-level Laser and low-intensity ultrasound associated with biosilicate® on the process of bone repair in the rat tibia. Rev. Bras. Ortop., v.47, n.1, p.102-107, 2012.

17. Datasus. Sistema de Internações Hospitalares (SIHSUS). Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde, Disponível em: < <http://datasus.saude.gov.br/> > Acesso em: 29/02/2016.
18. Fávaro-Pipi, E.; Bossini, P.; De Oliveira, P.; Ribeiro, J.U.; Tim, C.; Parizotto, N.; Alves, J.M.; Ribeiro, D.A.; Selistre de Araújo, H.S.; Renno, A.C. Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med. Biol.*, v.36, n.12, p.2057-2064, 2010.
19. Hadjiargyrou, M.; Lombardo, F.; Zhao, S.; Ahrens, W.; Joo, J.; Ahn, H.; Jurman, M.; White, D.W.; Rubin, C.T. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. *J. Biol. Chem.*, v.277, n.33, p.30177-30182, 2002.
20. Blaya, D.S.; Guimarães, M.B.; Pozza, D.H.; Weber, J.B.; de Oliveira, M.G. Histologic study of the effect of Laser therapy on bone repair. *J. Contemp. Dent. Pract.*, v.9, n.6, p.41-48, 2008.
21. Kazem, S.S.; Soleimanpour, J.; Salekzamani, Y.; Oskuie, M.R. Effect of low-level Laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med. Sci.*, 2009.
22. 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.112-117, 2008.
23. Tim, C.R.; Zamboni-Pinto, K.N.; Rossi, B.R.O.; Fernandes, K.; Matsumoto, M.A.; Parizotto, N.A.; Rennó, A.C.M.; Low-level Laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. ***Lasers Med Sci.***, v.29, p.147-156, 2014.
24. Bossini, P.S.; Renno, A.C.M.; Ribeiro, D.A.; Fangel, R.; Ribeiro, A.C.; Lahos, M.A.; Parizotto, N.A. Low level Laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: Similar outcomes at two different dosages. *Exp. Gerontol.*, v.47, p.136-142, 2012.
25. Granito, R.N., Ribeiro, D.A., Renno, A.C.M., Ravagnani, C., Bossini, P.S., Peitl-Filho, O., Zanotto, E.D., Parizotto, N.A., Oishi, J. Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.20, p.2521-2526, 2009.

26. Schindl, A. Low Intensity Laser Therapy: a review *J Invest Med* 48:312-326.
27. Moore P, Ridgway T.D, Higbee R.G, Roward E.W, Lucroy M.D. Effect of wavelenght on low-intensity Laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005;36:8-12.
28. Martinasso G, Mozzati M, Pol R, Canuto Ra, Muzio G. Effect of superpulsed Laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line. *Minerva Stomatol.* 2007;56(1-2):27-30.
29. 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.112-117, 2008.
30. 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(5):271-7.
31. Yamamoto M; Tamura K; Hiratsuka K; Abiko Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level Laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2001;16(3):213-7.
32. Von Wilmowsky C; Vairaktaris E; Pohle D; Rechtenwald T; Lutz R; Münstedt H; Koller G; Schmidt M; Neukam Fw; Schlegel Ka; Nkenke E. Effects of bioactive glass and beta- TCP containing three-dimensional Laser sintered polyetheretherketone composites on osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2008;87(4):896-902.
33. 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(1):140-8. Epub 2006 Sep 15.

34. Teixeira LN¹, Crippa GE, Gimenes R, Zaghete MA, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Jan;22(1):151-8. doi: 10.1007/s10856-010-4189-z. Epub 2010 Nov 24.
35. Huertas, MR. Effect and Clinical Implications of the Low-Energy Diode Laser on Bone Cell Proliferation. *Biological Research for Nursing* 00(0) 1-6; 2013.
36. Yusuf Emes et al. Low-level Laser therapy vs. pulsed electromagnetic field on neonatal rat calvarial osteoblast-like cells. *Lasers Med Sci* (2013) 28:901–909.
37. Assay T; Suzuki H; Kitayama M; Matsumoto K; Kimoto A; Shigeoka M; Komori T. The long-term effects of red light-emitting diode irradiation on the proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells *Kobe J Med Sci*. 2014 Jun 18;60(1):E12-8
38. Karu, T. Photobiology of low-power Laser effects. *Health Physics Baltimore* rev. 56, n.5, p.691-704, May 1989.
39. Cankaya AB, Erdem MA, Erdem AP, Erguven M, Aybar B, Kasaboglu C, Et Al. Evaluation off lighth-emitting diode (LED 660 nm) application over primay osteoblast like cellson titanium surfaces: an in vitru study. *Int J Med Sci*. 2011; 8(7):584-93.
40. Da Silva, T.D. Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na proliferação, adesão e diferenciação de osteoblastos. *Dissertação; Mestrado em Ciências da Reabilitação – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2010.*
41. Kueng W, Silber E, Eppenberger U. ;Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Ana Biochem*. 1989;182(1):16-9.
42. Moore P, Ridgway T.D, Higbee R.G, Roward E.W, Lucroy M.D. Effect of wavelenght on low-intensity Laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005;36:8-12.
43. Granito, R.N., Ribeiro, D.A., Renno, A.C.M., Ravagnani, C., Bossini, P.S., Peitl-Filho, O., Zanotto, E.D., Parizotto, N.A., Oishi, J. Effects of biosilicate

- and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, v.20, p.2521-2526, 2009.
44. Pinheiro, A. L. B.; Gerbi, M. E. Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.21, n.2, p.169-178, 2006.
45. Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed Laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg.* 2009 Apr;27(2):309-15. doi: 10.1089/pho.2008.2283.
46. 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.112-117, 2008.
47. Victor Perez Teixeira. Efeito do Laser em baixa intensidade sobre a proliferação, adesão e expressão de RUNX2 em osteoblastos cultivados na presença de LPS. Dissertação de Tese. São Paulo. Universidade Nove de Julho, 2011.

5 ANEXO1: The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review

Deana, A. M., **Souza, A. M.**, Mesquita-Ferrari, R. A., Fernandes, K. P. S. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. *Lasers in Medical Science*. Submetido.

6 ANEXO2: The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review

Deana, A. M., **Souza, A. M.**, Mesquita-Ferrari, R. A., Fernandes, K. P. S. The impact of photobiomodulation on osteoblast-like cell: a review. *Lasers in Medical Science*. Submetido.