

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO - UNINOVE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO**

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A ADESÃO,
PROLIFERAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DO RECEPTOR 2
DE VEGF EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM
DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL.**

TÁBATA SANTOS DE OLIVEIRA

São Paulo, SP

2012

TÁBATA SANTOS DE OLIVEIRA

**EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A ADESÃO,
PROLIFERAÇÃO E EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE
CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) E DO RECEPTOR 2
DE VEGF EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM
DEFICIÊNCIA NUTRICIONAL**

Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientador: Profº Drº José Antonio Silva Jr.
Co-Orientador: Profº Drº Andrey Serra

São Paulo, SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Tábata Santos de.

Efeito do laser de baixa potência sobre adesão, proliferação e expressão gênica de VEGF e VEGF-R2 de células-tronco mesenquimais cultivadas na presença de deficiência nutricional. . /Tábata Santos de Oliveira. 2012.

108 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2012.

Orientador (a): Prof. Dr José Antonio Silva Jr..

1. Laserterapia. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. VEGF.

I. Jr Silva, José Antonio. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 07 de dezembro de 2012.

TERMO DE APROVAÇÃO

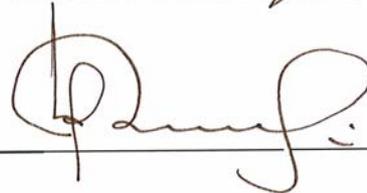
Aluno(a): TABATA SANTOS DE OLIVEIRA

Título da Dissertação: "Análise do efeito do laser de baixa intensidade sobre a adesão, proliferação e expressão gênica de hormônio de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor 2 de VEGF em células-troncos mesenquimais cultivadas em deficiência nutricional"

Presidente PROF. DR. JOSÉ ANTONIO SILVA JUNIOR



Membro: PROF. DR. CARLOS ALBERTO DA SILVA



Membro: PROF. DR. PAULO DE TARSO CAMILO DE CARVALHO



Dedico este trabalho aos meus pais, Zenilda M. Santos e João R. Oliveira,
fonte de minha motivação e inspiração, meu maior tesouro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus** por me sustentar durante todas as dificuldades que encontrei no percurso e por me conceder forças e oportunidades para que a conquista desse sonho fosse possível.

Aos meus **pais** pela conduta de vida sempre integra do qual me espelho e por todo esforço em me proporcionar uma educação de qualidade.

Aos meus dedicados iniciantes científicos, **Deborah Coredoni**, **Rodrigo Seidi** e **Wesley Oliveira** pelo imenso auxílio no cultivo celular e nos experimentos, sem vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Ao **Vinicius Bassaneze** e **Valério Barauna** pela valiosa ajuda com a extração, validação e dúvidas inerentes as MSCs.

Aos meus colegas de trabalho **Keli Dias**, **Denilson Rosalez**, **Ana Carolina Freire** e **Felipe Messias** por toda compreensão e apoio nos momentos aos quais tive que me ausentar.

Ao **Gerson Gualberto**, meu grande companheiro, por toda paciência e por sempre ter um ombro amigo e palavras de motivação e consolo ao meu coração.

Aos meus grandes amigos do laboratório, **Martha Manchini** e **Jean Parpinelle**, por todo incentivo e carinho que tanto me deu força para continuar.

Ao **profº Paulo de Tarso** por todo envolvimento com o trabalho e contribuições inerentes à irradiação.

À **Universidade Nove de Julho** pela concessão da bolsa de estudo e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus queridos orientadores, **profº José Antonio** e **profº Andrey Serra** pela grandiosa ajuda no desenvolvimento desse estudo, por toda paciência, carinho e apoio. Por serem mais que brilhantes professores, mas seres humanos maravilhosos do qual admiro e tenho como modelo.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Apóstolo Paulo, citado na carta aos Filipenses, 4:13

RESUMO

Nas últimas décadas tem sido grande o interesse quanto à utilização de células-tronco mesenquimais na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa como, por exemplo, em quadros pós-infarto. A laserterapia de baixa intensidade tem demonstrado favorecer a proliferação de vários tipos celulares, inclusive células-tronco mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stem cell* - MSCs) em cultura. Entretanto mostra-se necessário o melhor entendimento sobre o uso da laserterapia no pré-condicionamento de MSCs. Neste estudo foram utilizadas MSCs extraídas de tecido adiposo humano (hMSC) e de ratos (rMSC) em cultura. Para as análises do efeito da laserterapia e da deficiência nutricional sobre o comportamento das células foram verificados parâmetros de adesão, proliferação e expressão gênica de VEGF e VEGF-R2. A curva de dose-resposta foi realizada sendo as células tratadas com laser de Ga-Al-As (660nm, 30mW) nas doses de 0.7J, 1.5J, 3J e 9J. Após 20, 40 e 60 minutos e 24, 72 e 120 horas de cultivo foi quantificado sua adesão e proliferação, respectivamente. Também foi verificado a expressão gênica, por RT-PCR após 2 horas da irradiação. A proliferação das MSCs humanas a 5% de soro fetal bovino (SFB) foi estimulada significativamente na dose de 0,7J em 24h após a irradiação. A expressão gênica de VEGF e do receptor 2 de VEGF humano foi maior em condição deficitária de SFB nas doses de 0.7J, 1.5J e 3J. Em condição padrão, apenas a dose de 0,7J resultou em aumento de RNA mensageiro de VEGF e seu receptor. Em rMSC, a expressão de VEGF, aumentou com a dose de 1,5J em condição de 5% de SFB e com a dose de 3J na condição padrão. Em relação ao receptor 2 de VEGF, a expressão gênica foi estimulada na dose de 3J em ambas condições. Neste estudo a proliferação de hMSC mostrou-se aumentada em condição padrão, em dose de 0,7J e após 24h em células humanas. Soma-se a isto, a expressão de VEGF e de seu receptor aumentaram com a laserterapia, especialmente em condições nutricionais deficientes.

PALAVRAS CHAVE: Laserterapia, células-tronco mesenquimais, VEGF, proliferação celular

ABSTRACT

In recent years, mesenchymal stem cells have been largely used in tissue engineering and regenerative medicine, for example, in post-myocardial infarction. Low level lasertherapy has been shown to promote the proliferation of several cell types, including mesenchymal stem cells (MSCs) in culture. However, it appears necessary to better understanding the use of laser therapy in preconditioning of MSCs. In this study, we used MSCs extracted from human adipose tissue (hMSC) and rat (rMSC) in culture. To analyze the effect of the low level lasertherapy and nutritional deficiency on cell behavior were observed parameters such as adhesion, proliferation and gene expression of VEGF and VEGF-R2. A dose-response curve was performed with cells treated with laser Ga-Al-As (660 nm, 30 mW) at doses of 0.7J, 1.5J, 3J and 9J. Cell adhesion and proliferation were quantified after 20, 40 and 60 minutes and 24, 72 and 120 hours of culture. Also the gene expression was verified by RT-PCR after 2 hours of irradiation. Cell proliferation of human stem cells in 5% FBS was stimulated significantly in a dose of 0,7J at 24h after irradiation. The gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 human under 5% FBS condition was higher at doses of 0.7J, 1.5J and 3J. In the default condition, only the dose of 0.7J resulted in an increase in VEGF mRNA and its receptor. In rat cells, the expression of VEGF increased with the dose of 1.5J at condition in 5% FBS, and with the

dose of 3J in standard condition. Regarding to the VEGF receptor, gene expression was stimulated in a dose of 3J in both conditions. In this study proliferation of human stem cells increased in 10% condition at a dose of 0.7J and after 24h. Added to this, the expression of VEGF and its receptor increased with low level lasertherapy, especially in impaired nutritional conditions.

KEYWORDS: Low level lasertherapy, mesenchymal stem cell, VEGF, cell proliferation

ÍNDICE

1. Contextualização	20
1.1. Células-tronco mesenquimais	20
1.1.1. Principais características	20
1.1.2. Isolamento das células-tronco	22
1.1.3. Identificação e características moleculares das MSCs	22
1.1.4. Cultivo <i>In vitro</i>	23
1.2. Laserterapia de baixa intensidade	25
1.2.1. Fundamentos do Laser	25
1.2.2. Características técnicas	27
1.2.3. Ação do Laser	30
1.2.4. Potenciais aplicações terapêuticas das MSC e laserterapia	31
2. Objetivo	34
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivo específico	34
3. Material e métodos	35
3.1. Extração do tecido e células	35
3.1.1. Extração do tecido adiposo de ratos	35

3.1.2. Extração do tecido adiposo de ratos	37
3.2. Cultivo	37
3.2.1. Contagem celular pela técnica de Trypan	38
3.2.2. Descongelamento	39
3.3. Validação por citometria de fluxo	40
3.4. Irradiação Laser	41
3.5. Ensaio de adesão e proliferação celular [método MTT - (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)]	43
3.5.1. Plaqueamento	43
3.6. Extração de RNA	45
3.7. RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR)	45
3.7.1. Tratamento do RNA total	45
3.7.2. Transcrição reversa (RT)	46
3.7.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real (Real-Time PCR)	47
3.7.4. Quantificação de expressão do RNAm de VEGF e VEGFR2	48
3.8. Análise estatística	49
4. Resultados	50
4.1. Validação das rMSC	50
4.2. ADESÃO MSC – Tecido adiposo humano	

4.3.	ADESÃO MSC – Tecido adiposo de ratos	54
4.4.	PROLIFERAÇÃO MSC – Tecido adiposo humano	57
4.5.	PROLIFERAÇÃO MSC – Tecido adiposo de ratos	60
4.6.	Expressão Gênica hMSC	63
4.7.	Expressão Gênica rMSC	64
4.8.	Artigo submetido para publicação	65
5.	Considerações finais	95
6.	Referências	101
7.	Apêndices	108
7.1.	Comprovante de submissão do artigo	108

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Critérios mínimos para caracterização das MSCs	21
Quadro 2. Parâmetros para irradiação	41
Quadro 3. Grupos experimentais	42
Tabela 1. Expressão gênica do hormônio de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor 2 de VEGF em hMSC irradiadas com laser.	65
Tabela 2. Expressão gênica do hormônio de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor 2 de VEGF em rMSC irradiadas com laser.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comprimentos de Ondas.	28
Figura 2: Extração das células	36
Figura 3: Cultivo das células	38
Figura 4: Verificação da viabilidade celular	39
Figura 5: Retirada das linhagens celulares do nitrogênio líquido	40
Figura 6: Realização da irradiação das células com laser de baixa intensidade.	42
Figura 7: Etapas do método de MTT.	44
Figura 8: Análise do perfil de receptores CD90, CD29 e CD45.	50
Figura 9: Adesão hMSC após 20 minutos de cultivo	51
Figura 10: Adesão hMSC após 40 minutos de cultivo	52
Figura 11: Adesão hMSC após 60 minutos de cultivo	53
Figura 12: Adesão rMSC após 20 minutos de cultivo	54
Figura 13: Adesão rMSC após 40 minutos de cultivo	55
Figura 14: Adesão rMSC após 60 minutos de cultivo	56
Figura 15: Proliferação hMSC após 24 horas de cultivo	57
Figura 16: Proliferação hMSC após 72 horas de cultivo	58
Figura 17: Proliferação hMSC após 120 horas de cultivo	59
Figura 18: Proliferação rMSC após 24 horas de cultivo	60
Figura 19: Proliferação rMSC após 72 horas de cultivo	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

ANOVA – Análise de variância

ATP - Adenosina trifosfato

cDNA – Complementar ácido desoxirribonucleico

DE – Densidade de energia

DEPC - Dietilpirocarbonato

DMEM - Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP - Densidade de potência

DTT - Ditioneitol

GAPDH – Desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato

LBI – Laserterapia de Baixa Potência

IR - Infravermelho

MSC – Mesenchymal stem cell

hMSC – Human Mesenchymal stem cell

rMSC – Rat Mesenchymal stem cell

MTT - Ensaio de proliferação celular

PBS - Phosphate Saline Buffer (tampão salina fosfato)

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm - rotações por minuto

RT – Transcrição reversa

RT-PCR – Reação de polimerização em cadeia em tempo real

SFB - Soro fetal bovino

UV – Ultravioleta

VEGF – Hormônio de crescimento endotelial vascular

VEGF-R2 – Receptor 2 do hormônio de crescimento endotelial vascular

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

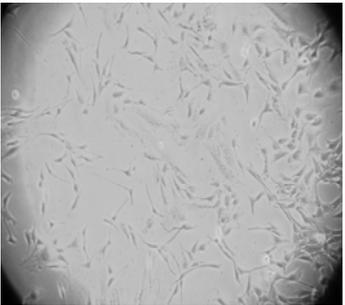
1.1. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSCs) representam um tipo de célula-tronco adulta presente em diferentes tecidos, de fácil isolamento e expansão. Estudos tem demonstrado sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em um ou mais tipos de células especializadas sobre condições controladas *in vitro*¹ e suas possíveis aplicações clínicas. Com isso, nas últimas décadas, tem-se aumentado o interesse e expectativa quanto ao uso das MSC como promissor recurso na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa podendo contribuir, por exemplo, em quadros pós-infarto^{2,3}. Entretanto ainda existe um enorme esforço em se estabelecer critérios sólidos para a caracterização das MSCs sendo atualmente utilizada a associação de fatores físicos, fenotípicos, funcionais e moleculares em sua classificação.

1.1.1. Principais características

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as MSCs devem se enquadrar no mínimo em três critérios básicos^{1,4} conforme descrito no Quadro 1.

Quadro 1. Critérios mínimos para caracterização das MSCs

<u>Características Morfológicas</u>		<u>Características Moleculares</u>	
		2º Marcadores	
	1º Ser plástico aderente	Positivos	Negativos
	3º Capaz de diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos <i>in vitro</i>	• CD90	• CD45
		• CD73	• CD34
		• CD105	• CD14

As células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As células totipotentes são responsáveis pela origem de todas as células embrionárias através da fusão do óvulo e espermatozóide. Derivadas das células totipotentes, as células pluripotentes são capazes de originar células dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma). As células multipotentes possuem poder de diferenciação limitada. As MSCs são consideradas células multipotentes por terem a capacidade de originar células de linhagem mesodermal como osteoblastos, condroblastos, adipócitos^{1,5}, todavia, estudos tem reportado sua capacidade de diferenciação em células de origem não mesodermal como miócitos, cardiomiócitos, hepatócitos e neurônios^{1,6,7,8}. Elas também podem ser didaticamente divididas em embrionárias ou adultas. As embrionárias são células totipotentes ou pluripotentes, entretanto, sua utilização experimental ainda mostra-se mais limitada devido a dificuldade de

controle sobre elas sendo frequente a formação de tumores quando administradas em ratos e as questões éticas envolvidas.

1.1.2. Isolamento das células-tronco

As MSCs possuem fácil isolamento e cultivo podendo ser derivadas de diversos tecidos tais como medula óssea^{5,9}, polpa dental^{10,11}, cordão umbilical¹² e tecido adiposo¹³, sendo este último uma ótima opção em relação aos demais por possuir abundância de MSCs e por ser de fácil obtenção¹⁴. Diferentes protocolos têm sido utilizados com a finalidade de extrair, isolar e cultivar as MSCs, todavia, as diferentes formas e condições adotadas podem ter implicações quanto a seleção e composição das subpopulações extraídas, favorecer a expansão heterogênea das populações celulares e ainda interferir em suas potencialidades e conseqüentemente alterar seu comportamento em longo prazo quando em *in vitro*^{15,16}. Por esse motivo existe uma urgente necessidade quanto à padronização dos protocolos visto que a reprodutibilidade experimental mostra-se necessária nas práticas científicas e clínicas.

1.1.3. Identificação e características moleculares das MSCs

Em decorrência da heterogeneidade de células plástico-aderentes e potencialmente capazes em diferencia-se, como as células progenitoras adultas e as células-tronco hematopoiéticas, a caracterização das MSCs mais aceita é realizada por meio da avaliação de seus marcadores de superfícies¹⁷. Essas células são positivas para diversos antígenos de superfície como CD105, CD73 e CD90, e ausentes na expressão de

antígenos hematopoiéticos como CD45, por exemplo. Decorrente da diversidade de marcadores presente nas MSCs e pela ausência de um marcador peculiar a esse tipo celular usualmente utiliza-se a validação da cultura pela associação de dois ou mais marcadores positivos e um ou mais marcadores negativos as MSCs, assim é possível assegurar-se que a cultura é homogênea.

1.1.4. Cultivo *In vitro*

A padronização de protocolos de isolamento e cultivo mostra-se necessário, pois estes exercem enorme impacto na população das células geradas podendo apresentar-se fenotipicamente semelhante, porém com potenciais funcionais distintos^{15,16}. Essa variedade de protocolos adotados podem ter implicações sobre a seleção celular e o favorecimento de subpopulações bem como na indução de instabilidade genética. Essa heterogeneidade experimental também torna difícil a reprodutibilidade e comparação de resultados.

Além dos impactos resultantes dos protocolos adotados devemos levar em consideração a influência de variáveis como espécie, tecido de origem e condições de cultura sobre o potencial genotípico e fenotípico das MSCs.

Espécie

O isolamento das MSCs pode ocorrer de diferentes espécies como camundongos¹⁸, ratos¹⁹, coelhos²⁰, humanos^{18,21} entre outros.

Isolamento de diferentes tecidos e condições de cultura

Estudos relatam a extração das MSCs em diferentes tecidos^{10,11,12, 21}
^{22,23}. A diferenciação, potencialidades e implicações funcionalidades podem ser alteradas por essas diferentes origens. As condições de cultura em que as MSCs são submetidas também possuem grande impacto sobre seu comportamento. Prévios estudos, por exemplo, utilizam a adição de proteínas como fibronectina, gelatina ou colágeno para favorecer sua adesão^{19,24,25}, citocinas ou hormônios para induzir diferenciação celular²⁶, hipóxia em seu pré-condicionamento²⁷ ou alteração de soro fetal bovino (SFB)¹¹ no aumento ou diminuição de seu metabolismo. O soro fetal bovino possui grande influência no metabolismo das MSCs. Sua concentração varia muito em cada protocolo, porém a concentração mais dotada como condição padrão é a de 10% e com sua redução pela metade o perfil de proliferação e adesão já demonstra ser alterado.

Densidade de passagem, confluência e criopreservação

A passagem pode ser conceitualmente definida pela quantidade de vezes que as células são manipuladas *in vitro* e conseqüentemente sofrem divisão e envelhecimento celular¹. As MSCs possuem número limitado de passagens podendo ser manipuladas até a passagem 4 antes de entrar em senescência. Além do número de passagens outro fator que pode interferir em seu poder de diferenciação é a confluência celular, ou seja, o espaço existente entre as células²⁸. Quando a células mantêm contato célula-célula é iniciado estímulos para que entrem em processo de diferenciação, por esse motivo a cultura deve ser mantida em um ambiente semi-confluyente. A criopreservação também pode ter influência sobre as MSCs, já que no

processo é utilizado dimetilsulfóxido (DMSO), substância importante no impedimento da formação de cristais intra-celulares. Aparentemente esse processo não interfere no potencial funcional porém uma alteração biológica não pode descartada²⁹. #

Variabilidade do doador

Ao trabalharmos com MSCs de origem humana (hMSC), outras variáveis inerentes à condição do doador devem ser consideradas como a condição genética individual e possíveis doenças pré-existentes que podem interferir no potencial terapêutico dessas células.

1.2. LASERTERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE

1.2.1. Fundamentos do Laser

De origem inglesa, a palavra LASER é um acrônimo de “*Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*”, que traduzido ao português significa luz amplificada pela emissão de radiação estimulada.

Essa luz ou radiação é produzida artificialmente a partir da estimulação de elétrons em repouso presentes em alguma fonte de energia³⁰. De propriedades peculiares, o laser se difere da luz comum ou fluorescente. Suas principais características são³⁰;

- Radiação eletromagnética não ionizante,
- Fluxo luminoso de alta intensidade de energia,

- Luz monocromática: único comprimento de onda e mesmas fases ondulatórias somando energia, vital para os efeitos na célula que absorvem comprimentos de onda em estreita faixa do espectro da luz.
- Focalização ou colimação: direcionalidade dos feixes de luz o que permite que uma grande quantidade de energia atinja um alvo preciso.
- Coerência: sincronização das ondas de luz no espaço e no tempo.

Por suas características físicas os lasers de baixa intensidade também são conhecidos como “cold laser”, “soft laser”, “bioestimulação” ou “fotobiomodulação”. O termo bioestimulação é utilizado para designar qualquer estímulo que proporcione um aumento da atividade funcional na resposta fisiológica. Entretanto, esse termo atualmente não tem sido mais utilizado, pois, foi verificado que altas doses de laser podem desencadear um efeito inibitório das atividades celulares. Por esse motivo o termo tem sido substituído por biomodulação³⁰.

Os sistemas de laser se dividem de acordo com seu regime, contínuo ou pulsado, e de acordo com sua intensidade, de baixa potência (terapêutico) ou de alta potência (cirúrgico). Também podem ser divididos de acordo com sua propriedade em gerar ou não calor em térmico e não-térmico, respectivamente³¹.

No tecido biológico, a luz laser não é totalmente transmitida por toda sua extensão, parte dessa luz é refletida, parte espalhada e parte absorvida³¹. A luz efetivamente transmitida ao decorrer do tecido, desde que

respeite seu limiar de sobrevivência, agirá estimulando a membrana e mitocôndrias da célula, induzindo então sua biomodulação (busca de um estado de normalização). Esse fenômeno é denominado laserterapia. A terapia com laser é não-térmica, ou seja, não se baseia em aquecimento, pois os fótons absorvidos têm efeitos fotoquímicos e fotobiológicos nas células não sendo transformados em calor^{31,32}.

Entretanto a lasercirurgia utiliza-se de lasers de alta potência, com efeitos térmicos, para a realização de cortes, vaporização, coagulação e hemostasia do tecido em cirurgias³¹ oferecendo um campo cirúrgico sem sangramento e com certo grau de esterilização³⁰.

1.2.2. Características técnicas

Por meio de estudos³⁴ foi possível verificar que os tecidos possuem diferente grau de absorção para cada comprimento de onda (distância medida entre dois picos consecutivos de uma trajetória ondulatória). Os lasers de baixa potência emitem luz em vários comprimentos de onda. Quanto maior o comprimento de onda, maior será sua penetração no tecido, por sofrerem menor efeito de espalhamento³⁰. Por esse motivo, a escolha do comprimento de onda adequada ao tecido alvo, é de extrema importância já que ela determinará a profundidade de penetração³⁵.

Karu (1989), observou que radiações na região do ultravioleta e região do infravermelho médio, apresentavam alta absorção na superfície, sendo que na região do infravermelho próximo a penetração no tecido era máxima. Os lasers que trabalham com espectro de luz vermelha possuem melhor

óptica” devido à ausência de moléculas específicas que absorvem esses comprimentos de onda^{36, 37}.

Grande tem sido a utilização do laser e seus benefícios terapêuticos, entretanto, para que ocorra o sucesso do tratamento além do comprimento de onda (nm) outros parâmetros também devem ser analisados, como:

- Potência (mW), que é a quantidade de energia (em watt – W) por unidade de tempo (t) e consequente quantidade de fótons;
- Densidade de potência (DP) ou irradiância, que é a potência óptica do laser por área irradiada dada em W/cm^2 ;
- Densidade de energia (DE) ou fluência, sendo a irradiância pelo tempo de exposição (em segundos), ou seja, quantidade de energia em uma superfície determinada (J/cm^2). A escolha da dose de irradiação é de grande importância, pois, se ela for inferior a $0,1 J/cm^2$ não se terá resultados, em contraposição, doses demasiadamente altas podem desencadear resultados negativos, não estimuladores ou até mesmo inibitórios.
- Modo de operação (pulsado ou contínuo);
- Técnica de tratamento;
- Intervalo de tratamento.

1.2.3. Ação do Laser

A luz laser possui propriedades fotoquímicas, onde sua absorção é realizada por cromóforos no tecido alvo. Essa luz então é convertida em energia para a célula já que os citocromos, enzimas da cadeia respiratória presentes nas mitocôndrias, são fotossensíveis. Como a principal função dos citocromos é a conversão de ADP (adenosina difosfato) em ATP (adenosina trifosfato), essencial para todo metabolismo celular como síntese protéica, replicação, tradução e manutenção do potencial da membrana celular, a energia do laser é convertida em energia para as funções vitais da célula. A energia luminosa da laserterapia, depois de transformada em energia vital e depositada no tecido, produz efeitos que podem ser divididos em primários ou diretos e secundários ou indiretos^{34,36,37}.

Efeitos Primários

Karu (1989) foi a primeira a descrever os mecanismos do laser a nível molecular. A energia absorvida, além de contribuir com a liberação de substâncias mediadoras de inflamação como a histamina, nociceptíveis (serotonina e bradicinina), inibir ou excitar reações enzimáticas, também atua nas mitocôndrias celulares favorecendo a maior produção de ATP (adenosina trifosfato). Essa elevação na produção de ATP acelera a divisão mitótica e por consequência o consumo de oxigênio. Em tecidos com inflamação naturalmente se desenvolve processos anaeróbios, aumento da concentração de íons H^+ e então a acidose local. A respiração celular diminui o processo anaeróbio favorecendo a recuperação do tecido. Também é induzida a liberação de fatores de crescimento por macrófagos e aumento

da proliferação, além da degranulação de mastócitos o que auxilia na melhor resposta imunológica contra infecções.

Efeitos indiretos ou secundários

Os efeitos indiretos ou secundários são consequências dos efeitos primários que promovem a elevação do fluxo sanguíneo e da drenagem linfática. Por meio de mediadores químicos o laser pode atuar indiretamente no esfíncter pré-capilar estimulando a microcirculação. O aumento da circulação sanguínea na região tem efeito anti-inflamatório, por aumentar a oferta de nutrientes e oxigênio, células sanguíneas de defesa e aumentar a eliminação de catabólitos nocivos ao tecido³⁴.

1.2.4. Potenciais aplicações terapêuticas das MSCs e laserterapia

Estudos tem demonstrado que a utilização de células-tronco adultas possui importantes aplicações na medicina regenerativa^{38,39}. De acordo com o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (<http://www.ClinicalTrials.gov>), que fornece informações sobre os atuais ensaios clínicos, diversos são os quadros patológicos que as MSCs podem ser utilizadas como tratamento, tais como, diabetes mellitus tipo I, infarto de miocárdio, fraturas distais de tibia, cirrose hepática descompensada, esclerose múltipla, doenças autoimunes, doença de crohn entre outras. O tratamento de regeneração cardíaca tem prosseguido com promissores resultados. Este feito pode ser atribuído não somente a capacidade de diferenciação das células administradas, mas também decorrente da liberação de fatores sinalizadores parácrinos, fusão das células administradas a outras fibras musculares,

estimulação da reparação endógena por seu efeito anti-apoptótico e angiogênico já que há aumento da secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁴⁰ após implantação. As MSCs secretam diversas citocinas e fatores de crescimento com ação parácrina e autócrina. Tal potencial pode justificar os efeitos terapêuticos sem ser observado evidências de transdiferenciação das MSCs.

Embora o uso das células-tronco mostre-se um recurso promissor o sucesso de sua utilização depende de inúmeros fatores, tais como; correta escolha do tipo celular e número de células administradas, vias de administração, desenvolvimento de estratégias para sua melhor retenção e sobrevivência no local administrado e compreensão dos mecanismos envolvidos em seus efeitos. Técnicas têm sido desenvolvidas na tentativa de melhorar sua adesão e sobrevivência no momento da transplantação como sua associação a biomateriais injetáveis representados, por exemplo, pela fibrina ou colágeno¹⁹.

A laserterapia de baixa intensidade (LBI) tem demonstrado capacidade de modular vários processos biológicos³³. Os mecanismos envolvidos na biomodulação celular promovidos pela laserterapia foram bem descrito por Karu, 1989 sendo postulado sua capacidade de elevar a função mitocondrial, síntese de proteínas, concentração de ATP, aumento de cálcio intracelular e consequente aumento na taxa de proliferação celular^{40,41,42,43}.

Estudos demonstraram que a laserterapia é capaz de promover a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em cultura de

células endoteliais⁴⁴ e o aumento de angiogênese em áreas isquêmicas^{2,45}. Também tem sido reportado que a LBI promove significativo crescimento de MSC e células-tronco cardíacas em cultura⁴⁶ e sua maior sobrevivência após implantação em área infartada² além de induzir células-tronco mesenquimais autólogas na atenuação do processo cicatricial após infarto de miocárdio em ratos⁴⁷. Diante desses resultados mostra-se necessário o melhor entendimento sobre o uso da laserterapia no pré-condicionamento de MSCs e a comparação entre o comportamento hMSCs com rMSCs já que muitas vezes resultados obtidos com modelo experimental animal são extrapolados para comparações com humanos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da laserterapia de baixa intensidade sobre o comportamento de células-tronco mesenquimais, provenientes de tecido adiposo humano (hMSC) e de ratos (rMSC), cultivadas em condição de deficiência nutricional.

2.2. Objetivo específico

Avaliar os parâmetros de adesão após 20, 40 e 60 minutos de incubação, proliferação após 24, 72 e 120 horas de cultivo e a modulação da expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do seu receptor R2 de hMSC e rMSC mantidas sobre condição de deficiência nutricional e irradiadas com laser de baixa intensidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de cultivo celular do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). As células utilizadas no estudo foram células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo de ratos isogênicos, linhagem Fisher 344 e provenientes do processo de lipoaspiração de humanos, gentilmente doadas pelo laboratório de genética e biologia molecular do Instituto do coração.

3.1. Extração do tecido e células

3.1.1. Extração do tecido adiposo de ratos

O tecido adiposo subcutâneo foi extraído sob condições estéreis de 2 ratos isogênicos machos, linhagem Fisher 344, e delicadamente lavado com tampão fosfato salino (PBS). O tecido então foi enzimaticamente dissociado por digestão com colagenase IA e centrifugado. As células peletizadas foram recuperadas e plaqueadas em placa de cultura de 10cm². Após 24 horas, a cultura foi lavada com tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4) para remover os eritrócitos contaminantes e outras células não acopladas e realimentadas com meio cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Invitrogen, EUA) com baixa glicose fresco. Este processo foi repetido diariamente. Quando as células atingiram a confluência de 80%, usualmente 5-7 dias após o plaquamento inicial (passagem 0), foram desaderidas com solução de tripsina-EDTA 0,25% e replaqueadas a 1X10⁴ células/cm², de acordo com protocolos previamente

descritos^{18,21,48}.

C

D

A

B



Figura 2: Extração das rMSC: (A) Extração do tecido adiposo. (B) Adição em tampão fosfato (PBS). (C) Incubação em solução de digestão (colagenase 1 A, Sigma EUA) por 1h a 37°C, com agitação. (D) Cultivo em meio de cultura “DMEM baixa glicose” (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/ Streptomina (Invitrogen, EUA)

3.1.2. Extração do tecido adiposo de humanos

As MSCs humanas são provenientes de tecido adiposo obtido em procedimento de lipoaspiração e foram extraídas, cultivadas e validadas no laboratório de genética e biologia molecular do Instituto do coração (Incor/ USP) e posteriormente doadas congeladas para os procedimentos experimentais.

3.2. Cultivo

O cultivo ocorreu em meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Invitrogen, EUA) baixa glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Invitrogen, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (1000UI/ml-1000mg/ml; GIBCO BRL, Gaithersburg). As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A monitorização do crescimento celular foi feita a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

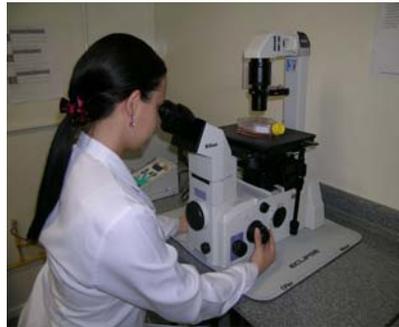
O subcultivo (Figura 3) foi realizado quando a monocamada celular se tornava subconfluenta (até 90% de confluência) para a perpetuação das linhagens celulares, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após incubação com solução de tripsina, cuja função era o desprendimento das células aderidas a garrafa, foi realizada uma nova lavagem com meio para a inativação dessa enzima e

posteriormente sua centrifugação a 1200xg a 20°C por 5 minutos (Centrifuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado celular desfeito e as células ressuspensas em 1ml de meio DMEM a 10% SFB.

A



B



C

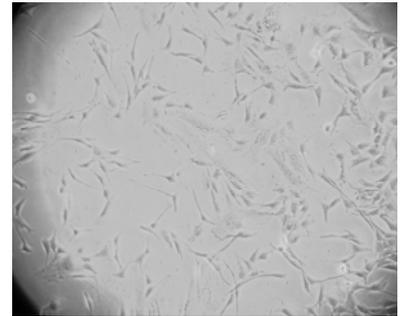


Figura 3: Cultivo das células: (A) Estufa CO². (B) Análise da confluência com auxílio de microscópio invertido. (C) Morfologia das células utilizadas no estudo (MSC).

3.2.1. Viabilidade celular pela técnica de Trypan

A viabilidade das células foi verificada por contagem em câmera de Neubauer com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%. Para contagem 20µL da suspensão celular foi corada na mesma proporção com azul de Trypan (0,4%) e então as células foram contadas em câmera de Neubauer.

A

B

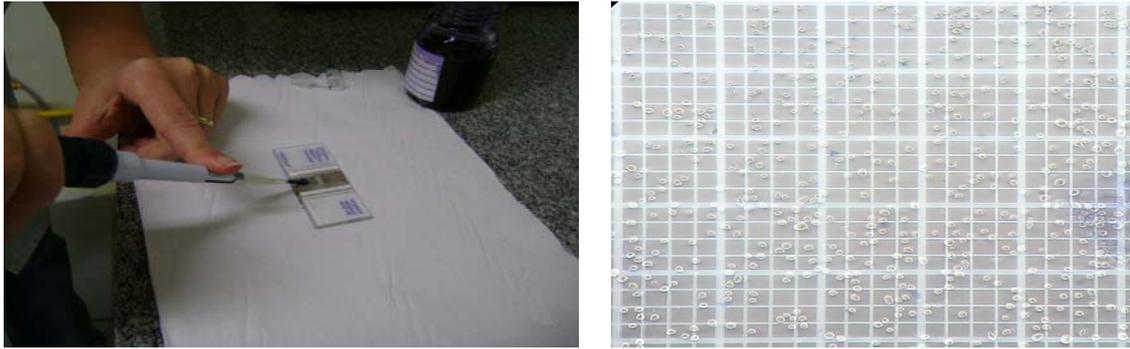


Figura 4: Verificação da viabilidade celular: (A) Adição de Trypan às células. (B) Observação em Câmara de Neubauer.

3.2.2. Descongelamento

A linhagem, antes mantida em nitrogênio líquido (Figura 5), foi descongelada com a adição de meio de cultura, transferida a um tubo cônico contendo 10ml de meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, EUA) e então centrifugada a 1200xg por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado desfeito, as células ressuspensas em 1ml desse meio, transferidas para garrafa de 75cm² (TPP, Suíça) e mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

A

B



Figura 5: Retirada das linhagens celulares do nitrogênio líquido.

3.3. Validação por citometria de fluxo

Após extração das rMSCs as células isoladas foram analisadas pela caracterização de sua superfície celular por citometria de fluxo. As células foram colhidas após serem desaderidas usando tripsina-EDTA 0,25% e 1×10^6 de células por condição (CD90, CD29, CD45 e CD90 mais CD29) foram incubadas com 1mg de isotiocianato de fluoresceína e ficoeritrina (PE) conjugados com anticorpos durante 30min a 7°C e, em seguida, foram lavadas três vezes em PBS contendo 2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida de sódio. Os anticorpos utilizados foram CD90 e CD29 (BD Biociências), como controle positivo já que as MSCs de ratos apresentam esse marcador de superfície em grande quantidade e CD45 (BD Biociências), como controle negativo afim de se averiguar a homogeneidade e possíveis contaminantes celulares, como as células endoteliais^{18,21}. Foi utilizado citometro de fluxo (FACSCalibur; Becton Dickinson) para leitura e

os dados foram analisados utilizando Software Cell Quest (Becton Dickinson).

3.4. Irradiação Laser

A irradiação laser das células foi realizada com o aparelho InGAIP mm optica Photon Laser III DMC (São Carlos, SP, Brasil) A aplicação foi única e os parâmetros utilizados estão listados no quadro abaixo:

Quadro 2. Parâmetros para irradiação

Parâmetros	
Comprimento de onda: 660nm Área do feixe: 0,028cm ² Área irradiada: 1cm ² Potência de saída: 30mW	
Energia Total	Tempo Irradiação
0,75J	25seg.
1,5J	50seg.
3J	100 seg.
9J	300seg.

As células-tronco foram mantidas por 24 horas em meio de cultura suplementado com 10% de SFB (grupo suplementação padrão) ou a 5% de SFB (grupo deficiência nutricional). Após o período de incubação as células foram desaderidas, centrifugadas e então irradiadas conforme grupo experimental (Quadro 2). Posteriormente 1×10^3 e 1×10^4 células/poço foram plaqueadas em placa de 96 poços (TPP, Suíça) para análise da proliferação e adesão, respectivamente. Sabendo-se que a distância entre a fonte do laser e a superfície de aplicação é crítica, a distância entre o feixe laser e as células foi constante sendo aplicado de baixo para cima, para que a irradiação atingisse diretamente as células com o mínimo de interferência do

meio de cultivo em um único ponto do lado de fora do tubo cônico. O ambiente foi mantido com obscuridade parcial para não haver interferência da luz externa³². Os grupos controle não receberam a irradiação laser.

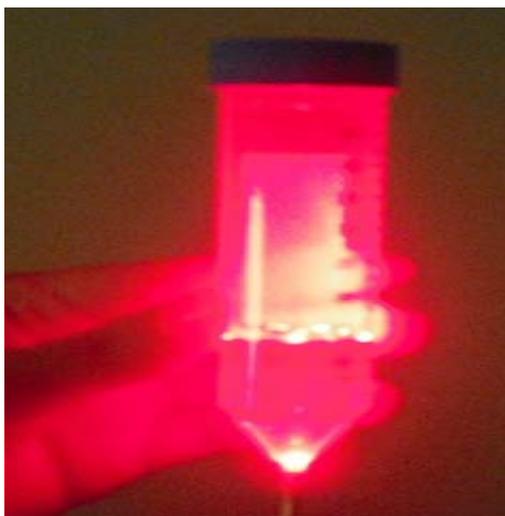


Figura 6: Realização da irradiação das células com laser de baixa intensidade.

Quadro 3. Grupos experimentais

Suplementação Padrão	Privação Nutricional
Controle 10% não irradiado	Controle 5% não irradiado
0,75J	0,75J
1,5J	1,5J
3J	3J
9J	9J

3.5. Ensaio de adesão e proliferação celular [método MTT - (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)]

A metodologia se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis^{49,50}. A posterior lise celular, utilizando 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.

3.5.1. Plaqueamento

Para avaliar o efeito da deficiência nutricional e da irradiação laser sobre a adesão e proliferação das linhagens celulares, após a aplicação da laserterapia nos tubos contendo as células dos grupos experimentais, as MSCs foram incubadas em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP, Suíça) e mantidas em DMEM (10% ou 5% de SFB), conforme grupo experimental). A proliferação foi avaliada após 24, 72 e 120 horas e a adesão após 20, 40 e 60 minutos de cultivo.

Após o respectivo período de cultivo, a retirada do meio de cultura por inversão da placa e sua lavagem com 100µl de PBS 1X foi realizada. Então foram adicionados 50µl de MTT (0,5mg/ml em tampão) e a incubação por 3h a 37°C^{49,50}. Posteriormente foram adicionados 100µl de isopropanol para solubilizar o precipitado e por fim a leitura da placa com auxílio de um leitor de placas (2020, Anthos, Eugendorf, Austria) a uma absorvância de 620nm.

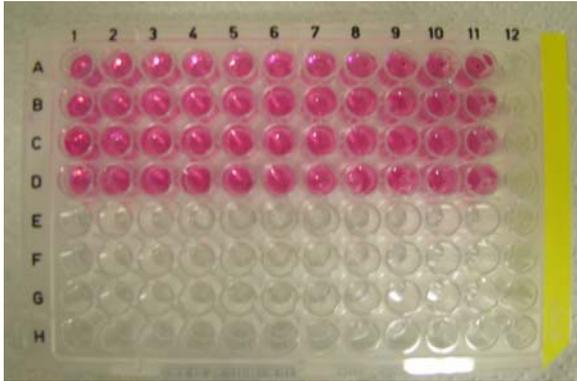
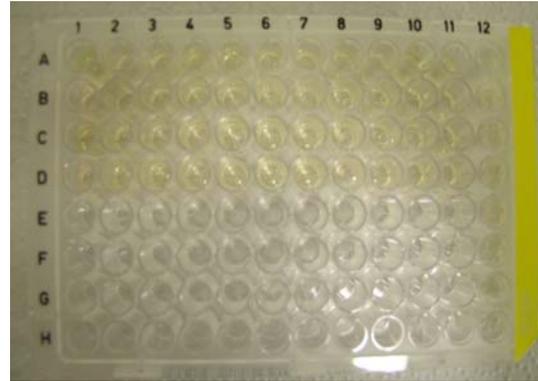
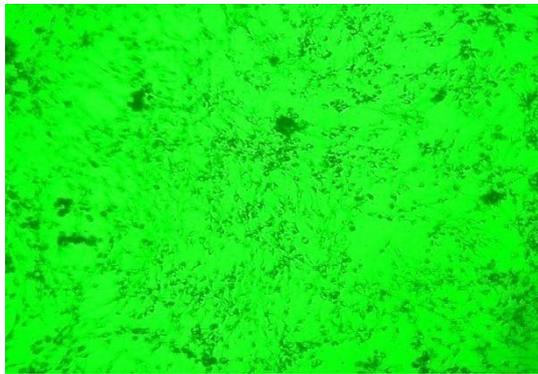
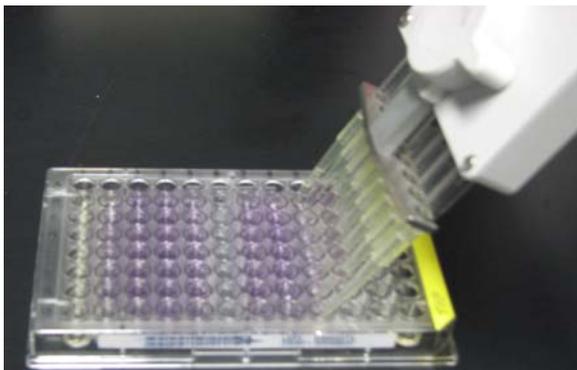
A**B****C****D****E****F**

Figura 7: Etapas do método de MTT: (A) MSC incubadas em placa de cultura de 96 poços (TPP/ Suíça), mantidas em DMEM. (B) Placa após retirada do meio de cultura, lavagem com PBS e aplicação de 50µL do MTT (0,5µL/mL). (C) Visão macroscópica dos cristais formados após a metabolização do MTT. (D) Visão microscópica dos cristais formados. (E) Adição de 100µL de isopropanol por poço para ressuspender e solubilizar o precipitado. (F) Leitura da absorbância a 620nm com leitor de placas (2020,. Anthos, Eugendorf, Austria).

3.6. Extração de RNA

Imediatamente após serem irradiadas, as células foram cultivadas por duas horas e posteriormente misturadas com 1ml de TRIzol Reagent (*Gibco BRL, Gaithersburg, EUA*) para isolamento do RNA total de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, 200µl de clorofórmio foram adicionados ao homogenato, e a mistura foi agitada vigorosamente por 15 seg. Em seguida, a mistura foi mantida em temperatura ambiente por 5min. As amostras foram centrifugadas por 15min, 12000xg a 4°C. A fase aquosa resultante de cada amostra foi transferida para um tubo Eppendorf de 1,5ml estéril, e foram adicionados 500µl de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10min, e foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/10 min). Os sobrenadantes foram retirados, e os *pellets* de RNA foram lavados com 1ml de etanol 75% (preparado com água tratada com dietilpirocarbonato, DEPC, 0,01%). As amostras foram novamente centrifugadas (12000xg/4°C/5 min), e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* secaram ao ar livre, sendo então ressuspensos com 50µl de água DEPC.

3.7. RT-PCR quantitativo em tempo real (Real-Time RT-PCR)

3.7.1. Tratamento do RNA total

Para a quantificação da expressão do RNAm de VEGF e VEGFR2, foram utilizados os RNAs totais extraídos de hMSC e rMSC. Para eliminação da contaminação de DNA genômico das amostras, 1µg de RNA total foi incubado com 1 unidade de *DNase I/RNase Free (Invitrogen, EUA)*, 0,5

unidade de *RNase OUT* (*Invitrogen*, EUA), 0,5µl de MgCl₂ (50 mM) e água DEPC, em uma reação de 13,5µl. As amostras foram incubadas a 37°C por 15min, e a 95°C por 5min, para inativação da DNase I.

3.7.2. Transcrição reversa (RT)

Logo após o tratamento acima descrito, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT), para síntese do cDNA. Ao RNA tratado foram adicionados 2,0µl de tampão de incubação (KCl 50mM, Tris-HCl pH 8,4, 20mM e MgCl₂ 2,5mM), 1,0 unidade de transcriptase reversa MULV-RT (*Invitrogen*, EUA), 0,5 unidade de *RNase-OUT* (*Invitrogen*, EUA), 1,0µl de dideoxynucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP (DNTPs, 10 mM, *Amersham Biosciences*, EUA), 50ng de uma mistura de iniciadores (*Random Hexamer Primer*, RH, *Amersham Biosciences*, EUA) e 1,0µl de ditioneitol (DTT, 10mM, LGC Biotecnologia, Brasil) em uma reação de volume final de 200µl. As amostras foram então submetidas às seguintes incubações: 20°C por 10min, 42°C por 45min, 95°C por 5min. Após reação, as amostras de DNA complementar (cDNA) foram mantidas a -20°C.

Para garantir a efetividade do tratamento com DNaseI, foram realizadas reações de RT sem a enzima transcriptase reversa, como controle negativo, de RNAs tratados como anteriormente descrito. Todas as amostras foram submetidas a este controle.

3.7.3. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) em tempo real (Real-Time PCR)

A reação de polimerização em cadeia em tempo real (Real-Time PCR) combina a amplificação do PCR com detecção fluorescente automatizada, realizada como auxílio do aparelho de detecção de sequência ABI 7000 (*Applied Biosystems*, EUA). O sistema de detecção utilizado para quantificação da expressão de RNAm de VEGF e VEGFR2 foi o SYBR Green (*Applied Biosystems*, EUA). Neste sistema, a molécula de SYBR Green interage com a fita dupla de DNA amplificada pelo PCR, e emite uma fluorescência quando excitada por lâmpada de tungstênio-halogênio, e esta fluorescência é captada pelo sistema de detecção. Este processo de excitação-captação de fluorescência é realizado em cada ciclo de amplificação do PCR, fornecendo uma quantificação em tempo real das sequências dos genes de interesse.

A reação de PCR em tempo real foi realizada da seguinte maneira: a 1,0µl de cDNA, foram adicionados 0,5µl de oligonucleotídeo iniciador senso (10µM), 0,5µl de oligonucleotídeo iniciador antissenso (10µM), 7,5µl de tampão Master Mix 2x (*Applied Biosystems*, EUA) e água suficiente para 15µl de reação. As amostras foram então incubadas a 95°C por 10min, e passaram por 40 ciclos térmicos a 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 90s.

Os oligonucleotídeos utilizados (*Applied Biosystems*, Brasil) para o PCR foram: VEGF rato (acesso nº AF_222779.1, *GenBankTM*) oligonucleotídeo senso 5' - ACAGAAGGGGAGCAGAAAGCCCAT - 3', oligonucleotídeo antissenso 5' - CGCTCTGACCAAGGCTCACAGT - 3'; VEGFR2 rato (acesso nº NM_002253, *GenBankTM*) oligonucleotídeo senso

5' - TGGGGGAGCGTGTGTCAGAAT – 3', oligonucleotídeo antissenso 5' - CCGCTTTAATTGTGTGATTGAC – 3'; VEGF humano (acesso nº NG_008732.1, *GenBank*TM) oligonucleotídeo senso 5'-GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC-3', oligonucleotídeo antissenso 5'-CGA TCG TTC TGT ATC AGT CTT TCC-3'; VEGFR2 humano (acesso nºAF_063658.1, *GenBank*TM) oligonucleotídeo senso 5'-CAC TGA GCA GGA GAG CGT GT-3', oligonucleotídeo antissenso 5'-CTC ACT CTG CGG ATA GTG AGG TT-3'; GAPDH (acesso nºNM 017008, *GenBank*TM) oligonucleotídeo senso 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC -3', oligonucleotídeo antissenso 5'-GCCCCACGGCCATCA -3'.

A detecção de fluorescência se deu automaticamente pelos filtros do aparelho, e foi imediatamente transferida para o software de análise. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Como controles de especificidade de reação foram utilizados dois parâmetros: presença de apenas um pico de fluorescência no protocolo de dissociação; e ausência de qualquer tipo de amplificação nas reações com os controles negativos de transcrição reversa.

3.7.4. Quantificação de expressão do RNAm de VEGF e VEGFR2

A quantificação de RNAm de VEGF e VEGFR2 foi feita como um valor relativo a uma referência interna, o RNAm de GAPDH (Desidrogenase de Gliceraldeído-fosfato), cuja expressão mostrou-se inalterada nas condições experimentais. Os valores quantitativos de expressão do RNAm de VEGF e VEGFR2 e GAPDH foram obtidos de um limiar arbitrário de fluorescência,

analisado na fase exponencial da curva de amplificação, sendo o ciclo limiar (Ct) calculado.

Foram calculados os Cts de cada amostra, em cada reação, para os dois genes. Foi calculado o Ct médio de cada amostra, e o cálculo de expressão relativa foi feito através da subtração deste Ct médio do gene da VEGF e VEGFR2 do Ct médio do gene GAPDH, obtendo-se o ΔCt . Como não é usual a utilização da expressão relativa de um determinado gene em valores de ΔCt , devido às suas características logarítmicas, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para análise de expressão relativa do RNAm de VEGF e VEGFR2.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados foram utilizados a média, o desvio padrão e a análise de variância (ANOVA) com auxílio do software “GraphPad Prism-5”. Nos casos em que foram detectados diferenças estatisticamente significantes, aplicamos o pós-teste Bonferroni. Considero-se diferença estatisticamente significante quando $p \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Validação das rMSC

Conforme apresentado na Figura 8, as células não marcadas com nenhum tipo de anticorpo (Branco) representaram 1%, as positivas ao anticorpo CD29 99,51%, ao CD90 99,52% e ao CD45 1,49%.

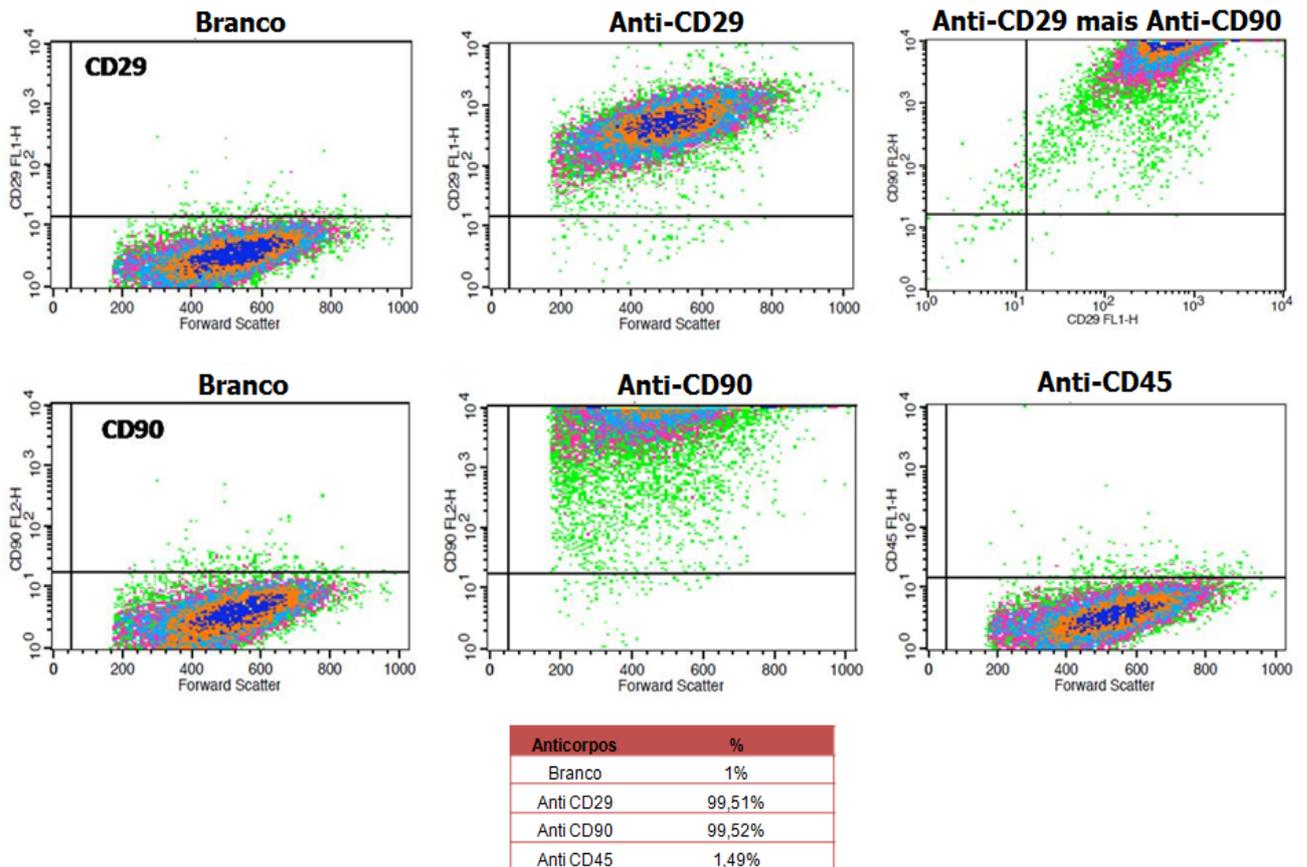


Figura 8: Análise do perfil de receptores CD90, CD29 e CD45.

4.2. ADESÃO hMSC – Tecido adiposo humano

Observamos na Figura 9 que em 20 minutos os grupos com perfil nutricional padrão, porém irradiados com 3J e 9J, tiveram maior adesão

quando comparados ao controle não irradiado na mesma condição nutricional. Já os grupos com privação nutricional tiveram semelhante adesão independente da dose irradiada. Quanto ao efeito da deficiência nutricional sobre o perfil de adesão, o grupo controle e o grupo irradiado com 0,7J, porém mantidos a 5% de SFB, não tiveram diferenças estatisticamente significante aos seus respectivos controles (10% SFB), os demais apresentaram menor adesão.

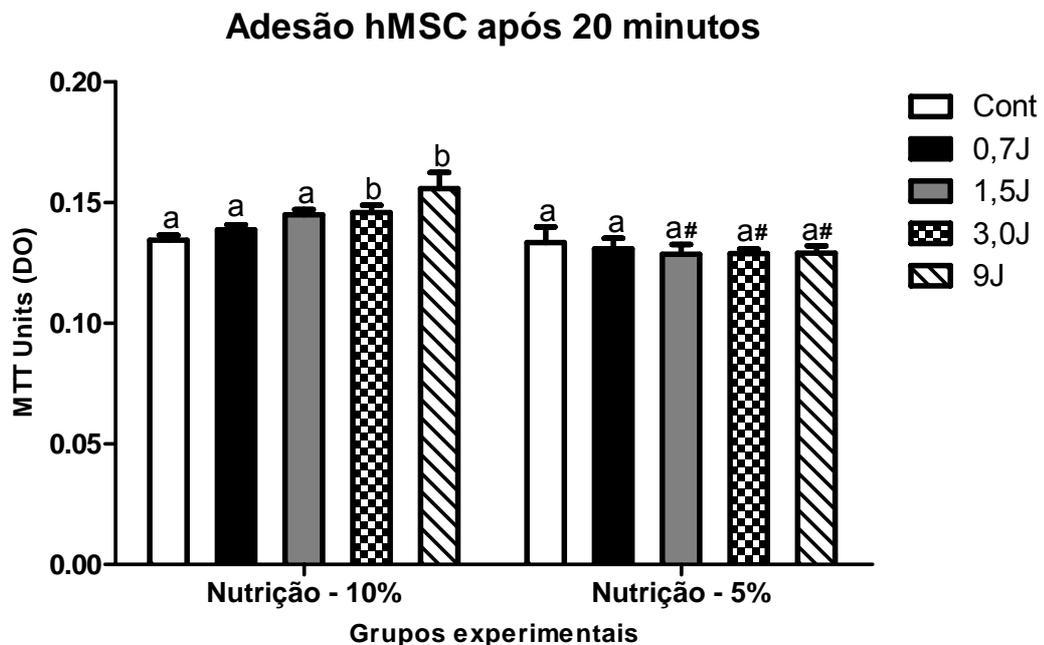


Figura 9. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

De acordo com a Figura 10, a LBI, nas doses de 1,5J e 3J, resultou em menor adesão celular nos grupos com suplementação regular. Já os grupos submetidos à deficiência nutricional apresentaram semelhante adesão frente as diferentes doses de irradiação, porém o controle não

irradiado e o grupo irradiado com 9J tiveram menor adesão que os grupos com suplementação padrão.

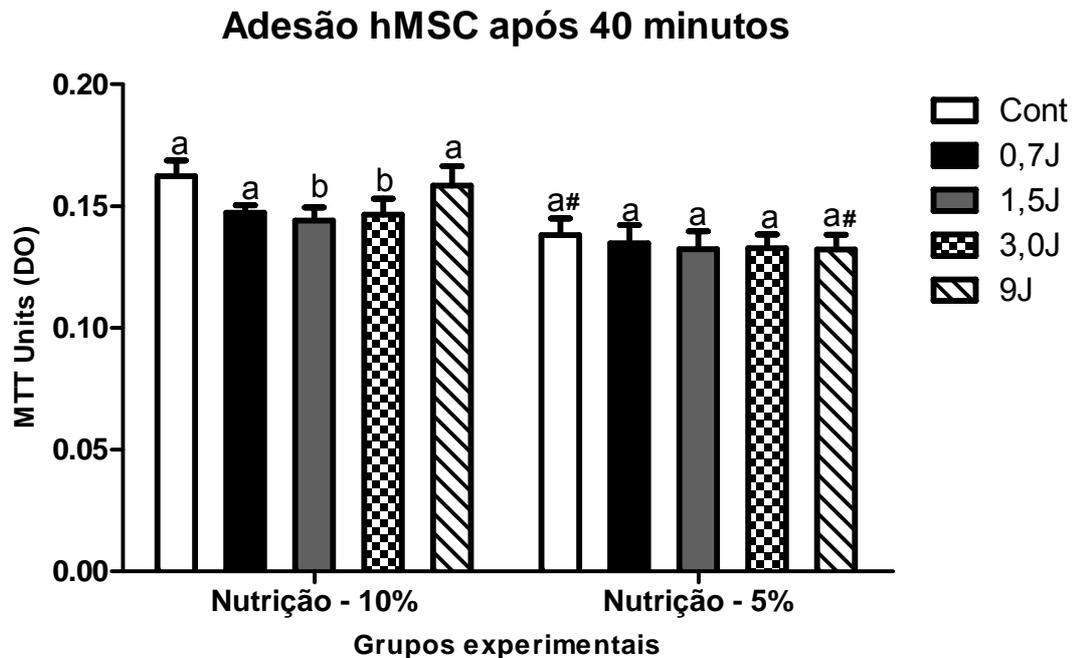


Figura 10. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

Ao final de 60 minutos, as células mantidas em condição regular de suplementação apresentaram menor adesão após irradiadas nas doses de 0.7J, 3J e 9J quando comparadas ao controle não irradiado. Já os grupos mantidos a 5% de SFB se comportaram de maneira semelhante entre si, somente o irradiado a 1.5J apresentou menor proliferação quando comparado ao grupo controle 5%. Também verificou-se que os grupos

controles e 9J na condição de 5% SFB não tiveram diferenças estatisticamente significantes aos seus respectivos grupos com suplementação regular (Figura 11).

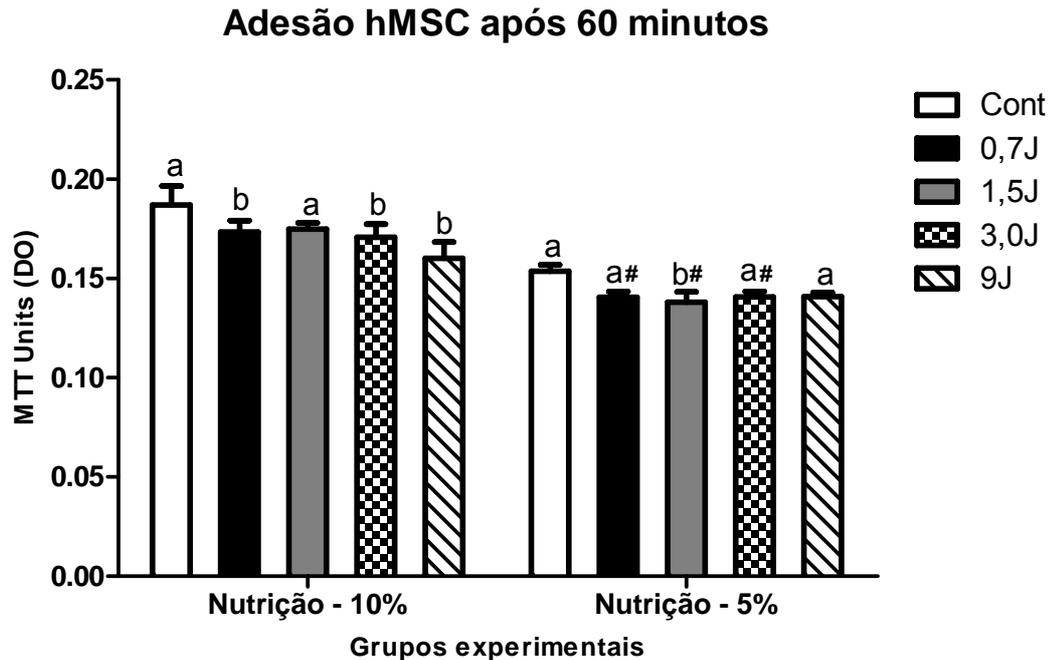


Figura 11. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

4.3. ADESÃO rMSC – Tecido adiposo de ratos

Em 20 minutos de cultivo, os grupos irradiados nas doses de 1.5J, 3J e 9J, condição nutricional padrão, e na dose de 3J e 9J, condição de privação nutricional, apresentaram menor adesão que seus controles. A privação nutricional também acarretou menor adesão nas células, quando comparadas aos grupos com perfil nutricional de 10% SFB (Figura 12).

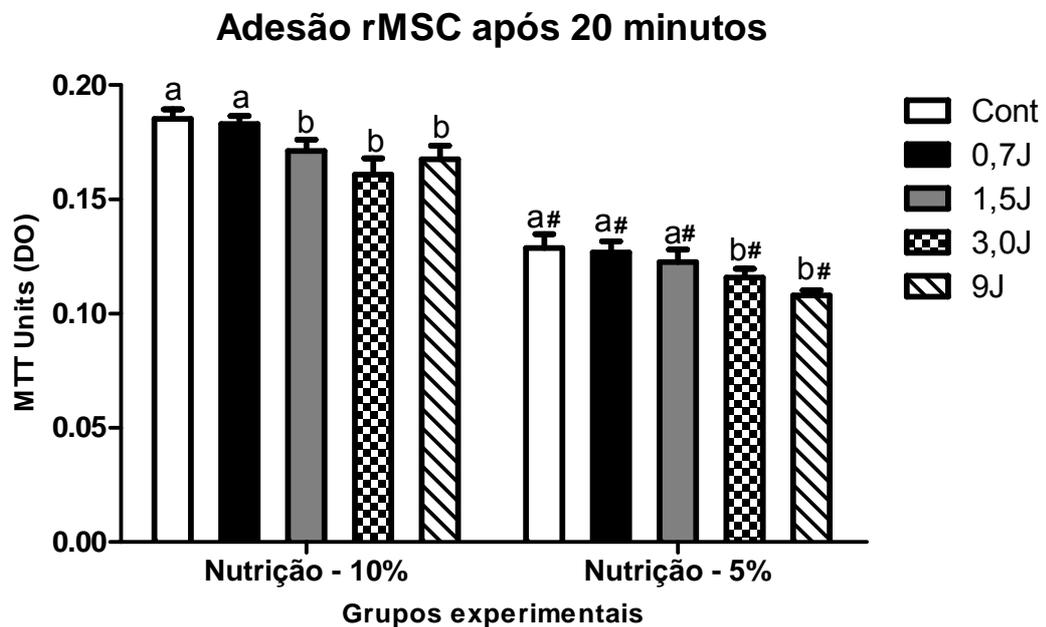


Figura 12. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

De acordo com a Figura 13, após 40 minutos de cultivo, os grupos com condição nutricional padrão não apresentaram diferenças significantes e aqueles com suplementação privada mantiveram menor adesão nas doses de 3J e 9J quando comparados ao seu controle não irradiado. A privação nutricional manteve a diminuição da adesão celular em todos os grupos, irradiados ou não, quando comparados aos grupos com suplementação regular.

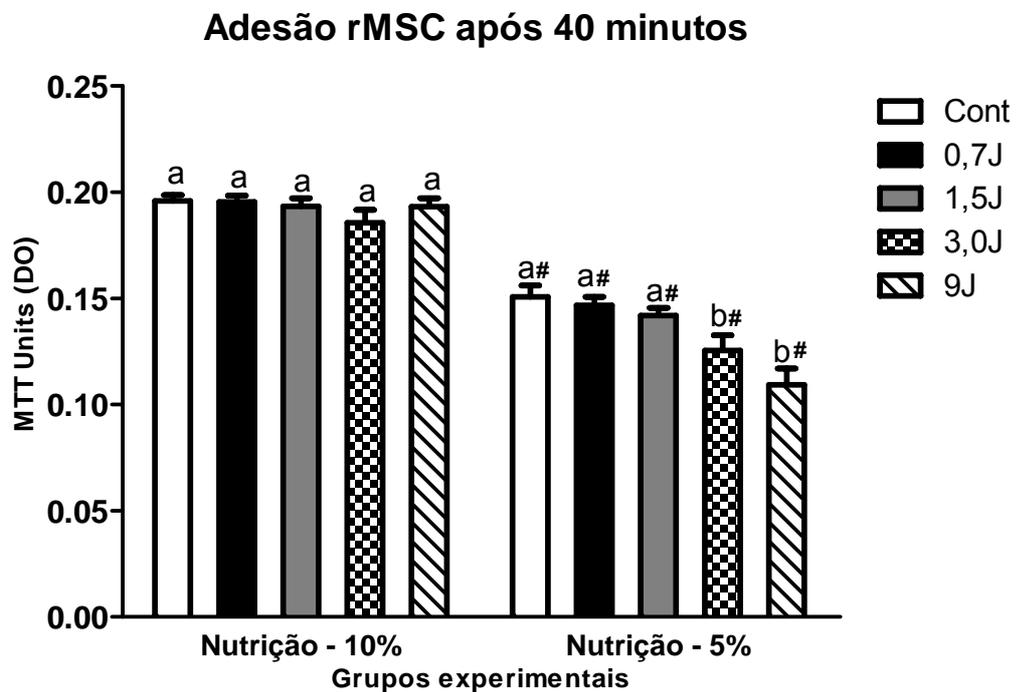


Figura 13. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # p<0,05 vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

As células irradiadas na dose de 3 e 9J, cultivadas a 10% de SFB, e na dose 9J/cm², cultivadas a 5% de SFB, apresentaram menor adesão quando comparadas aos seus controles não irradiados ao final de 60 minutos. A privação nutricional manteve um efeito inibitório da adesão celular em todos os grupos (Figura 14).

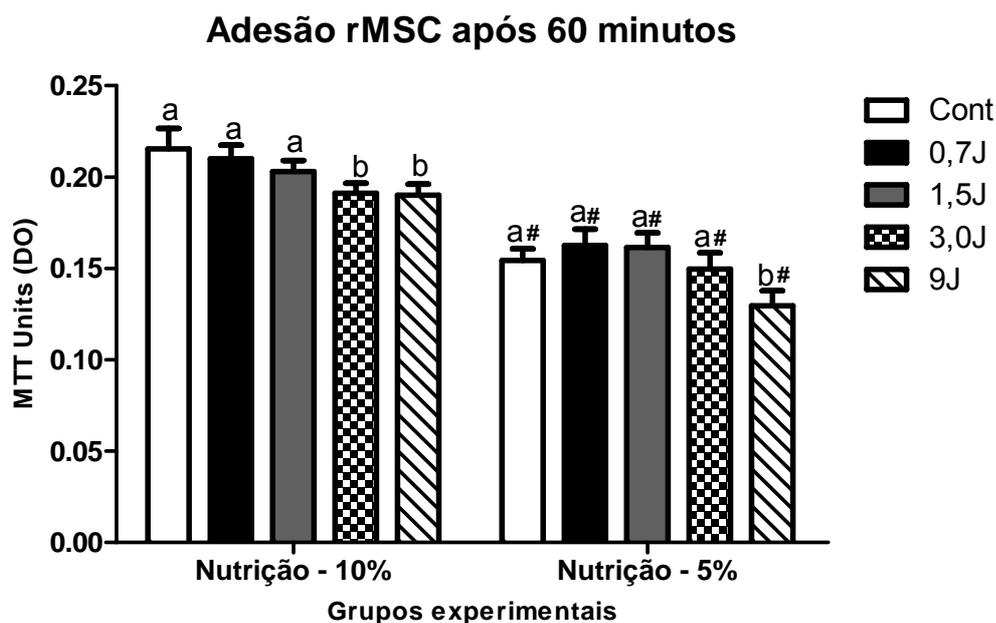


Figura 14. Dados referentes a adesão de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na adesão de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

4.4. PROLIFERAÇÃO hMSC – Tecido adiposo humano

Com 24 horas de cultivo, o grupo irradiado na dose 0,7J e mantido em condição padrão de nutrição apresentou maior proliferação quando comparado aos demais grupos. O grupo em privação nutricional, irradiado a 9J, apresentou menor proliferação que os demais grupos na mesma condição nutricional. Os grupos submetidos a privação nutricional apresentaram menor proliferação quando comparados aos grupos com suplementação padrão no mesmo período (Figura 15).

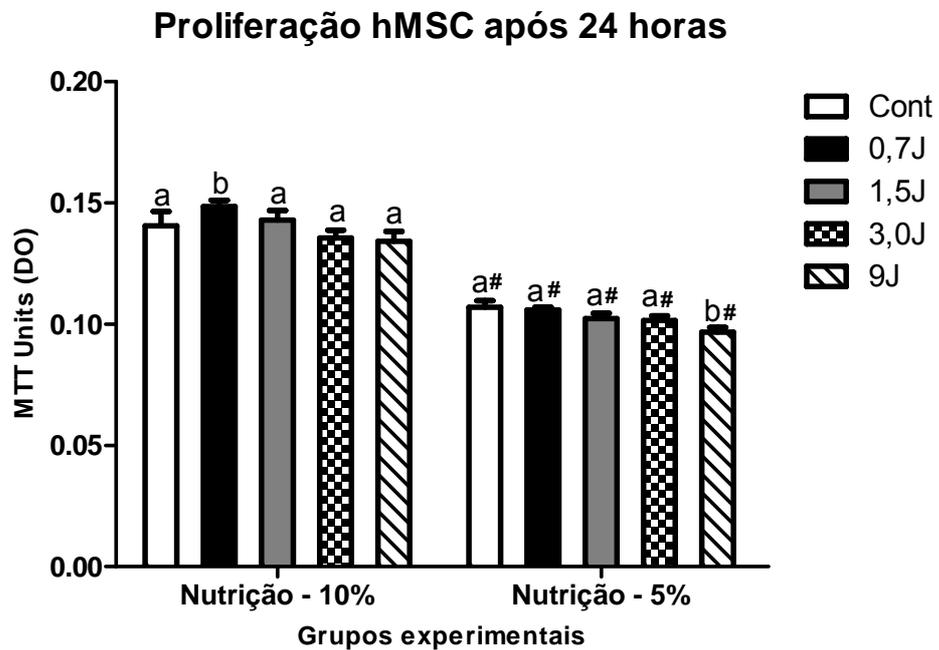


Figura 15. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

Ao terceiro dia, a dose de 9J promoveu inibição da proliferação no grupo com condição nutricional padrão enquanto os grupos com suplementação reduzida tiveram semelhante proliferação independente da dose irradiada (Figura 16). Entretanto, a taxa de proliferação manteve-se menor nos grupos com privação nutricional.

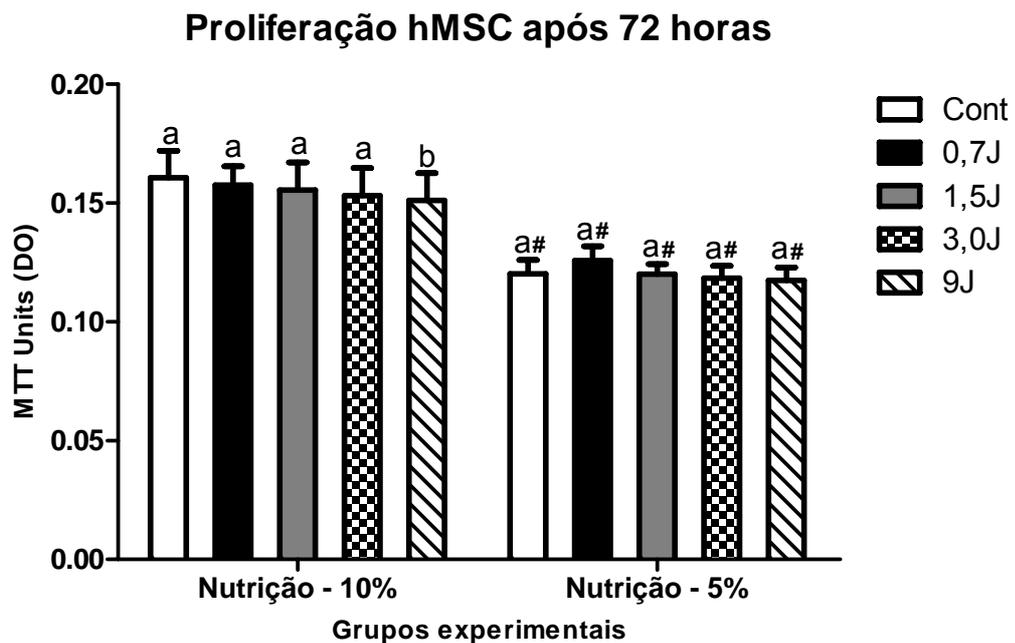


Figura 16. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

Ao final do quinto dia, os grupos irradiados na dose 3J, com suplementação padrão ou privativa, tiveram menor proliferação aos demais grupos e aqueles cultivadas a 5% de SFB com menor proliferação aos cultivados a 10% de SFB (Figura 17).

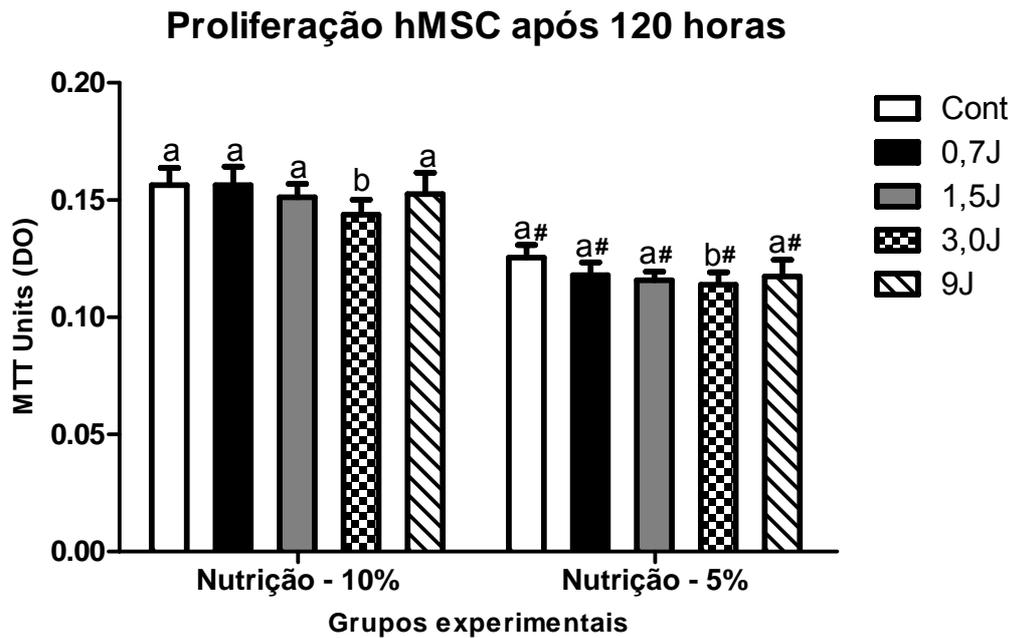


Figura 17. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

4.5. PROLIFERAÇÃO rMSC – Tecido adiposo de ratos

Após 24 horas de cultivo todos os grupos irradiados com doses acima ou igual a 1,5J apresentaram menor proliferação quando comparados seus controles não irradiados. No mesmo período os grupos com privação

nutricional apresentaram menor proliferação celular quando comparados aos seus respectivos controles (nutrição padrão) (Figura 18).

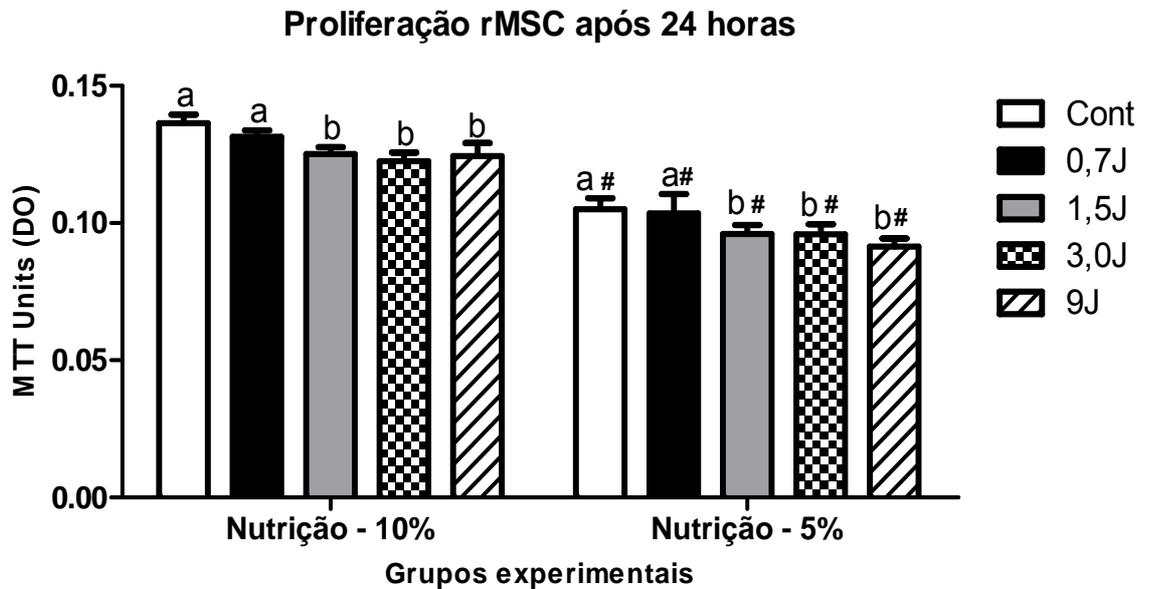


Figura 18. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

Ao terceiro dia de cultivo, o grupo irradiado com 9J, suplementação padrão, apresentou menor proliferação que seu respectivo controle não irradiado enquanto os grupos com suplementação privativa apresentaram semelhante comportamento entre si. A privação nutricional promoveu menor

proliferação celular os grupos quando comparados aos seus respectivos controles com perfil nutricional padrão (Figura 19).

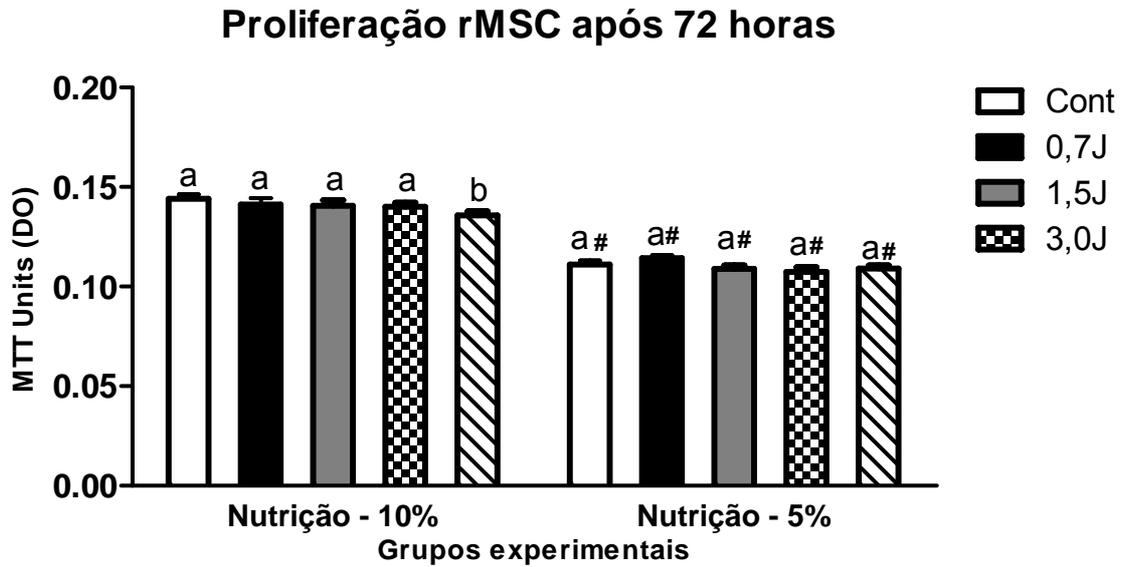


Figura 19. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

Como exposto na Figura 20, ao quinto dia, os grupos com suplementação padrão, irradiados com dose acima ou igual a 1,5J, voltaram a apresentar menor proliferação celular. Os grupos privados nutricionalmente mantiveram-se com proliferação semelhante, independente da dose

irradiada, e com menor proliferação aos grupos com suplementação de 10% de SFB.

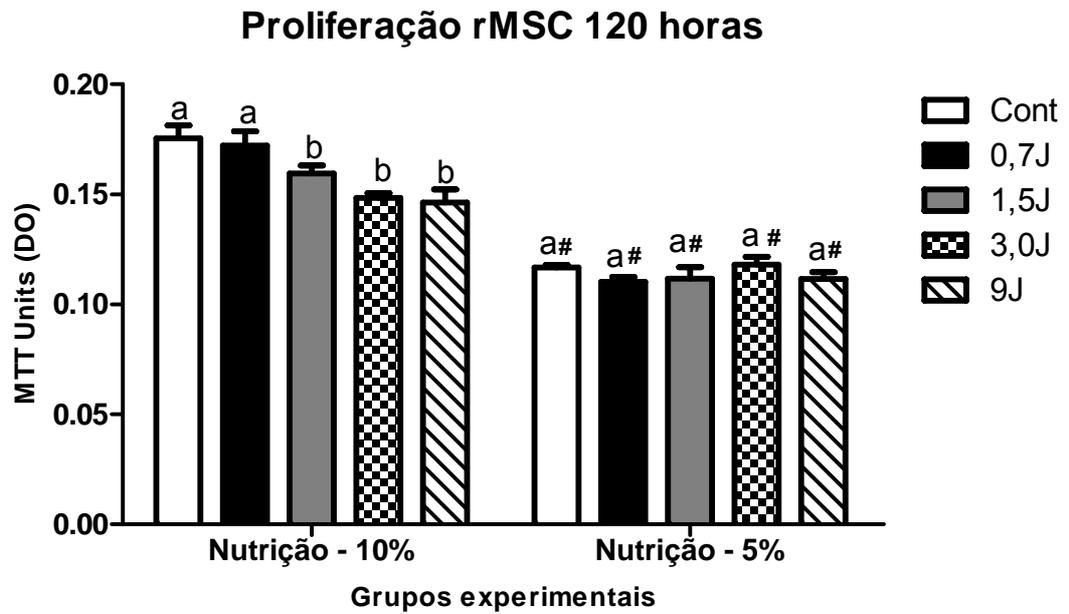


Figura 20. Dados referentes a proliferação de células-tronco cultivadas em meio de cultura a 10% e 5% de SFB. Letras diferentes indicam diferenças significantes na proliferação de células expostas a diferentes intensidades de LBI para as respectivas condições nutricionais. # $p < 0,05$ vs. respectivas células expostas a mesma intensidade de LBI sob cultivo a 10% de SFB.

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA hMSC

A laserterapia promoveu aumento significativo da expressão de RNA mensageiro do hormônio de crescimento endotelial vascular (VEGF) em

hMSC após irradiação com dose de 1,5J e 3J após cultivo a 5% de SFB (Tabela 1). Em condição padrão de cultivo, a laserterapia promoveu um aumento significativo do conteúdo de RNA mensageiro nas hMSC na dose de 0,7J, não havendo diferenças significativas entre os demais grupos experimentais e o controle (Tabela 1).

Neste estudo também foi analisado a expressão gênica do receptor 2 do VEGF (VEGFR2) após irradiação com laser em diferentes condições de cultivo e os resultados são mostrados na Tabela 1. Em condição deficiente de SFB, a expressão de RNA mensageiro em hMSC aumentou de forma significativa com as doses de 0,7J, 1,5J e 3J. Em condição padrão, a expressão do receptor 2 de VEGF apresentou aumento significativo na dose de 0,7J (Tabela 1).

Tabela 1. Expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor 2 de VEGF em hMSC irradiadas com laser.

	SFB	Controle	0,7J	1,5J	3J	9J
VEGF	5%	0,29±0,03	0,30±0,03	0,51±0,15*	0,49±0,04*	0,27±0,05
VEGF	10%	0,26±0,04	0,35±0,03 [^]	0,24±0,04	0,26±0,01	0,21±0,02
VEGFR2	5%	0,41±0,03	0,50±0,05 [§]	0,71±0,15 [§]	0,61±0,07 [§]	0,37±0,08
VEGFR2	10%	0,34±0,03	0,40±0,04 [^]	0,33±0,01	0,37±0,01	0,34±0,01

*p<0,05 1,5J:controle, 0,7J, 3J e 9J; *p<0,001 3J:controle, 0,7J e 9J, ^p<0,05 0,7J:controle, 1,5J, 3J e 9J; §p<0,01 0,7J, 1,5J e 3J:controle e 9J.

4.7. EXPRESSÃO GÊNICA rMSC

A laserterapia promoveu um aumento significativo da expressão de RNA mensageiro do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em

rMSC cultivadas a 5% de SFB na dose de 1,5J, não havendo diferenças significativas entre o controle e os demais grupos experimentais. Em condições de cultivo a 10% de SFB, as rMSC apresentaram expressão de VEGF aumentada significativamente apenas com a dose de 3J, sendo que as demais não foram diferentes do controle (Tabela 2).

A expressão gênica do receptor 2 do VEGF (VEGFR2) após irradiação com laser em diferentes condições de cultivo foi avaliada. Em condição deficiente de SFB, as rMSC apresentaram expressão de receptor 2 de VEGF significativamente aumentada somente no grupo irradiado com a dose de 3J (Tabela 2). Quando cultivadas em condição padrão, as rMSC apresentaram aumento significativo da expressão do receptor 2 de VEGF após irradiação com dose de 3J (Tabela 2), não havendo diferenças significativas entre os demais grupos experimentais e o grupo controle.

Tabela 2. Expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do receptor 2 de VEGF em células-tronco mesenquimais de ratos irradiadas com laser.

	SFB	Controle	0,7J	1,5J	3J	9J
VEGF	5%	0,20±0,02	0,35±0,15	0,55±0,06*	0,41±0,06	0,35±0,07
VEGF	10%	0,25±0,02	0,26±0,04	0,21±0,04	0,46±0,06*	0,27±0,05
VEGFR2	5%	0,37±0,02	0,33±0,03	0,39±0,04	0,67±0,09*	0,37±0,01
VEGFR2	10%	0,40±0,05	0,39±0,02	0,37±0,12	0,70±0,03*	0,38±0,11

*p<0,05 1,5J:controle, 0,7J, 3J e 9J; *p<0,001 3J:controle, 0,7J, 1,5J e 9J.

4.8. Artigo submetido para publicação

Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation and gene expression of VEGF and VEGF-R2 of mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency.

Tábata Santos de Oliveira¹, Andrey Jorge Serra¹, Martha Trindade Manchini¹, Vinicius Bassaneze², José Eduardo Krieger², Paulo José Ferreira Tucci³ and José Antônio Silva Jr^{1*}

¹Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 - Liberdade 01504-001 São Paulo, SP- Brasil

²Universidade de São Paulo, Incor - HCFMUSP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 Jardim Paulista 05403-900 - São Paulo, SP – Brasil

³Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Rua Coronel Lisboa, 819 Vila Clementino 04020-041 - Sao Paulo, SP - Brasil

*Address for correspondence: José Antônio Silva Jr, UNINOVE, Rua Vergueiro, 235 - Liberdade 01504-001 São Paulo, SP – Brasil – Phone/Fax +551133859222 - josejr@uninove.br

Running title: Laser irradiation and stem cell

ABSTRACT

In recent years, mesenchymal stem cells have been largely used in tissue engineering and regenerative medicine, for example, in post-myocardial infarction. Low level lasertherapy (LLLTT) has been shown to promote the proliferation of several cell types, including mesenchymal stem cells (MSCs) in culture. However, it appears necessary to better understanding the use of

laser therapy in preconditioning of MSCs. In this study, we used MSCs extracted from human adipose tissue (hMSC) and rat (rMSC) in culture. To analyze the effect of the low level lasertherapy and nutritional deficiency on cell behavior were observed parameters such as adhesion, proliferation and gene expression of VEGF and VEGF-R2. A dose-response curve was performed with cells treated with laser Ga-Al-As (660nm, 30mW) at doses of 0.7J, 1.5J, 3J and 9J. Cell adhesion and proliferation were quantified after 20, 40 and 60 minutes and 24, 72 and 120 hours of culture. Also the gene expression was verified by RT-PCR after 2 hours of irradiation. We conclude that regarding to the parameters used in this study, stem cells derived from human adipose tissue showed higher rates of proliferation and cell adhesion in standard condition and nutritional deficiency when compared with stem cells extracted from adipose tissue of rats. The mRNA expression of VEGF and VEGFR2 was increased with the laser action in both cell types, however, human cells grown in nutritional deprivation presented higher expression of VEGF and its receptor after irradiation with other laser doses. The importance of the results of this work, especially in relation to nutritional deprivation, is that this condition mimics the one found in tissue shortly after ischemia, and prior to stem cells transplantation, indeed an environment lacking nutrients and oxygen, which increased cell adhesion and angiogenesis induced by laser therapy would be extremely beneficial to the regenerative medicine.

KEYWORDS: Low level lasertherapy, mesenchymal stem cell, VEGF, cell proliferation

INTRODUCTION

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been shown to be a promising resource in tissue engineering and regenerative medicine, which may be very useful, for instance, in post-infarction^{1,2}. This is due to its capacity for self-renewal and differentiation into one or more types of specialized cells under *in vitro*³ controlled conditions. Besides these properties, the MSCs represent an easy to be isolated and cultivated type of adult stem cell.

MSCs are considered to be multipotent cells due to their capacity to originate different mesodermal lineage cells, such as osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, myocytes and cardiomyocytes^{3,4,5}. MSCs can be obtained from various tissues, such as the bone marrow⁶, the dental pulp^{7,8}, the umbilical cord⁹ and the adipose tissue¹⁰, the last mentioned being a great option when compared to the others, especially due to the easy manner to obtain these MSCs¹¹.

Studies have reported that the use of adult stem cells has important applications in regenerative medicine^{12,13}. However, the mechanisms involved in its beneficial effects come not only from their ability to differentiate, but mainly by its anti-apoptotic and angiogenic effect, mainly due to an increased secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF)¹⁴.

Though a promising resource, the use of stem depends on many factors, such as correct choice of cell type and number of cells used, administration routes, the development of strategies to improve their

retention and lifespan and the understanding of the mechanisms involved in its beneficial effects.

Several techniques have been developed in a way to improve MSCs adhesion and lifespan at the time of transplantation, such as their association with injectable biomaterials represented, for example, by collagen¹⁵.

On the other hand, low level lasertherapy (LLL) is already a successful methodology to cell proliferation of many cell types. The mechanism that LLL induces cell modifications remains unclear. One of the most acceptable pathway that LLL elicit its action is the induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) production, mainly in the endothelial cell in culture¹⁶. Also, the LLL is noticed to increase of angiogenesis in ischemic areas¹⁷, promoting significant growth of MSC and of cardiac stem cells in culture¹⁸. A longer lifespan is also observed when irradiated MSCs are implanted in infarcted area¹, mainly attenuating the healing process after myocardial infarction in rats¹⁹.

The main objective of this study was to analyze the effect of low level lasertherapy irradiated toward mesenchymal stem cell under deficient (5% FBS) and standard condition (10% FBS). The parameters quantified were the cell adhesion, the cell proliferation and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 in human and rat mesenchymal stem cell.

MATERIAL AND METHODS

Tissue and cell extraction

The subcutaneous adipose tissue was extracted under sterile conditions from four inbred male rats, Fisher 344 strain, and gently washed with phosphate buffered saline (PBS). The tissue was then enzymatically dissociated by collagenase IA digestion and centrifuged.

The pelleted cells were recovered and plated on a 10 centimeter-square culture plate. After 24 hours, the culture was washed with PBS to remove contaminating erythrocytes and other unattached and refilled with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, EUA) containing low glucose, cells. This process was daily repeated. When the cells reached a confluence of 80%, usually 5-7 days after the initial plating (passage 0), they were detached with trypsin solution -EDTA 0,25% and re-plated at 1×10^4 cells/cm². Such procedures have been previously described^{20,21,22}.

Cultivation

Mesenchymal stem cells were kept in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, EUA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS) and 1% streptomycin penicillin (1000UI/ml-1000mg/ml; GIBCO BRL, Gaithersburg). The cell incubation took place in an oven (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂. The monitoring of the cell growth was performed every 24 hours by using an inverted phase microscope (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, USA). The cells were kept semi-confluent in order to avoid differentiation and/or inhibition of proliferation by cell-cell contact. In order to count and check the viability of the 20µL cells of cell suspension, the MSCs were stained with the same amount of Trypan blue (0,4%) and then,

stained cells were counted in a Neubauer chamber. Cultures with viability greater than 95% were used in the tests.

Validation by flow cytometry

A flow cytometry analysis was performed to characterize the specific stem cell receptors on cell surface. Cells were incubated with 1mg of fluorescein isothiocyanate and phycoerythrin (PE), mixed with the specific antibodies for 30 min at 37°C and then washed three times in PBS containing 2% fetal bovine serum and 0.1% sodium azide. The antibodies used were the following: CD90 and CD29 (BD Biosciences, USA). They were utilized as a positive control since MSCs present this surface marker in large amount. The antibody CD45 (BD Biosciences, USA) was used as a negative control in order to ascertain that the culture was homogeneous, and free from contaminating cells, such as the endothelial cells^{27,28}.

Flow cytometer characterization was performed in a FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) and the data was analyzed by Cell Quest Software (Becton Dickinson, USA). This study employed 92% positive cultures for the CD90 and CD29 markers. Validation data are expressed at Figure 1.

Laser irradiation

Laser irradiation of the cells was performed with the InGAIP Photon Laser III device (DMC, São Carlos, Brazil). The irradiation was performed one single time in each experimental group during each assay. The parameters applied are listed in the chart below.

Chart 1. Irradiation Parameters

Parameters	
Wave-length: 660nm Head area: 0,028cm ² Irradiated area: 1cm ² Output power: 30mW	
Total energy	Time
0,75J	25seg.
1,5J	50seg.
3J	100 seg.
9J	300seg.

The stem cells were maintained for 24 hours in a culture medium supplemented with 10% FBS (standard supplementation group) or 5% FBS (nutritional deficiency group). After the incubation period, the cells were detached, centrifuged and then irradiated according to the experimental group.

Subsequently 1×10^3 and 1×10^4 cells were plated in 96-well plate (TPP, Switzerland) for cell proliferation and adhesion analysis, respectively. The cell adhesion was evaluated after 20, 40 and 60 minutes of cultivation, the proliferation after 1, 3 and 5 days and gene expression after 2 hours of cultivation. Given that the distance between the laser source and the surface of application is critical, the laser beam was applied constantly upwards from the same distance. This procedure was performed to ensure that radiation directly reached the cells with minimal interference from the culture medium at a single point on the outside of the conical tube. The room environment was kept partially dark not to have external light interference³⁰. Control groups received no laser irradiation.

Cell adhesion and proliferation assay [MTT method - (3 - (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide)]

This methodology relies on the ability of the mitochondrial enzyme dehydrogenase, found only in viable cells, to cleave the MTT tetrazolium ring, forming dark blue formazan crystals, which are impermeable to cell membranes, being then retained within the viable cells^{23,24}.

The subsequent cell lysis, by using isopropanol, causes the formazan salts to be released. The number of viable cells is directly proportional to the level of blue formazan crystals formed. Following the cultivation period, the removal of the culture medium was performed by inverting the plate and washing with 100mL of 1X PBS. Then was added 50mL of MTT (0.5 mg / ml in buffer) (3 - [4,5-Dimethylthiazol-2yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue - SIGMA) and followed by a 3h incubation at 37°C^{23,24}. All experiments were repeated three times independently, and each sample was analyzed in triplicate.

RNA Extraction

The cells cultured during the experimental times (one and two hours) immediately after irradiation were mixed with 1ml of TRIzol Reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) for isolation of the total RNA according to the manufacturer's directions.

Then, 200µl of chloroform were added to the homogenate and the mixture was stirred vigorously for 15s. Next the mixture was kept at room

temperature for 5 min. The samples were centrifuged for 15min, 12.000xg at 4 °C. The resulting aqueous layer of each sample was transferred to a 1,5ml Eppendorf sterile tube and 500µl of isopropanol were added to precipitate the RNA. The samples were kept at room temperature for 10 minutes, and were again centrifuged (12.000xg/ 4°C/10 min). The supernatants were removed and the RNA pellets were washed with 1ml of 75% ethanol (prepared with water treated with diethylpyrocarbonate, DEPC, 0.01%). The samples were once again centrifuged (12.000xg/ 4°C/ 5 min) and the supernatants were discarded. The pellets were dried in the open air, and then resuspended with 50µl of DEPC water.

The RNAs obtained were quantified by using a spectrophotometer (Eppendorf) with a reading filter of 260nm. The integrity of the RNAs was evaluated on gel electrophoresis in 1% agarose, stained with ethidium bromide. Samples which presented integrity of the subunits 18S and 28S of the RNA ribosomal were found intact and used in the experiments of quantification of the gene expression.

Quantitative RT-PCR in real time (Real-Time RT-PCR)

Total RNA

For the quantification of the mRNA expression of VEGF and VEGFR2, the total RNA extracted from mesenchymal stem cells of mice and human was used. To eliminate the contamination of genomic DNA of samples, 1µg of total RNA was incubated with 1 unit of DNase I / RNase free (Invitrogen, USA), 0.5 unit of RNase OUT (Invitrogen, USA), 0,5µl of MgCl₂ (50mM) and

DEPC water, in a reaction of 13,5µl. The samples were incubated at 37°C for 15 min, and 95°C per 5 min to inactivate the DNase I.

Reverse transcription (RT)

Shortly after the treatment above described, the reverse transcription reaction (RT) for cDNA synthesis was performed. To the treated RNA 2,0µl of incubation buffer (50mM KCl, Tris-HCl pH 8.4, 20mM and 2.5mM MgCl₂) were added, 1.0 unit of MuLV-RT reverse transcriptase (Invitrogen, USA), 0.5 unity of RNase-OUT (Invitrogen, USA), 1,0µl of dideoxynucleotides dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTPs, 10mM, Amersham Biosciences, USA), 50ng of a mixture of primers (Random Primer Hexamer, RH, Amersham Biosciences, USA) and 1.0µl of dithiothreitol (DTT, 10mM LGC Biotechnology, Brazil) in a reaction of final volume of 200µl. The samples were then submitted to the following incubations: 20°C for 10 min, 42°C for 45 min, 95°C for 5 min. After response, the samples of complementary DNA (cDNA) were kept at -20°C. To ensure the efficacy of the treatment with DNaseI, RT reactions were performed without the reverse transcriptase enzyme, as negative control, RNAs treated as described above. All samples were submitted to this control.

Polymerase Chain Reaction (PCR) in real time (Real-Time PCR)

The polymerase chain reaction in real time (Real-Time PCR) combines the PCR amplification with automated fluorescent detection,

performed as aid of the detection sequence apparatus ABI 7500 (Applied Biosystems, USA).

The detection system used for quantification of the mRNA expression of VEGF and VEGFR2 was the SYBR Green (Applied Biosystems, USA). In this system, the SYBR Green molecule interacts with the double strand DNA amplified by the PCR, and it emits a fluorescence when activated by a tungsten-halogen lamp, and this fluorescence is captured by the detection device. This method of activating-capturing fluorescence is performed in each cycle of PCR amplification, providing a real-time quantification of the sequences of the genes of interest.

The real-time PCR reaction was performed in the following manner: 0,5ul of sense primer (10µM), 0,5ul of antisense primer (10µM), 7,5 ul of buffer 2x Master Mix (Applied Biosystems, USA) and enough water to 15µl of reaction were added to 1,0µl of cDNA. The samples were then incubated at 95°C for 10 min, and underwent 40 thermal cycles at 95°C for 15s, 60°C for 30s and 72°C for 90s. The primers set used (Applied Biosystems, Brazil) for the PCR were VEGF rat (access n° AF_222779.1, *GenBank*TM) forward 5' - ACAGAAGGGGAGCAGAAAGCCCAT-3', reverse 5' - CGCTCTGACCAAGGCTCACAGT - 3'; VEGFR2 rat (access n° NM_002253, *GenBank*TM) forward 5' - TGGGGGAGCGTGTCAGAAT - 3', reverse 5' - CCGCTTTAATTGTGTGATTGAC - 3'; VEGF human (access n° NG_008732.1, *GenBank*TM) forward 5' - GAA GTG GTG AAG TTC ATG GAT GTC - 3', reverse 5' - CGA TCG TTC TGT ATC AGT CTT TCC - 3'; VEGFR2 human (access n°AF_063658.1, *GenBank*TM) forward 5' - CAC TGA GCA

GGA GAG CGT GT - 3' , reverse 5' - CTC ACT CTG CGG ATA GTG AGG TT - 3' and GAPDH (access n°NM 017008, *GenBankTM*) forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC - 3', reverse 5'- GCCCCACGGCCATCA - 3'.

The detection of fluorescence was made automatically by the device filters, and was immediately transferred to the analysis software. The experiments were performed in triplicate. As controls of specificity of reaction two parameters were utilized: presence of only one peak in the fluorescence dissociation protocol; presence of only one peak in the fluorescence protocol dissociation, and the absence of any amplification in the reactions with negative control of reverse transcription.

Quantification of mRNA expression of VEGF and VEGFR2

The quantification of mRNA of VEGF and VEGFR2 was performed as a value relative to an internal reference, the mRNA of GAPDH (Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), whose expression was found to be unchanged under the experimental conditions.

The quantitative values of mRNA expression of VEGF and VEGFR2 and GAPDH were obtained from an arbitrary threshold of fluorescence, analyzed in the exponential phase of the amplification curve, being the cycle threshold (Ct) calculated. Cts were calculated for each sample, in each reaction, for both genes. The average Ct of each sample was calculated and the computation of the relative expression was done by subtracting this average Ct gene of VEGF and VEGFR2 from the average Ct gene of GAPDH, obtaining the Δ Ct. Since it is unusual to use the relative expression

of a given gene in ΔCt values due to their logarithmic characteristics, the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ parameter was used in order to analyze the relative expression of mRNA of VEGF and VEGFR2.

STATISTICAL ANALYSIS

For data analysis, the average, the standard deviation and the two pathways variance analysis (ANOVA) were used. We considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

hMSC ATTACHMENT

In the assay on cell attachment, we found that, in 20 minutes, the groups with standard nutritional profile when irradiated with 3J and 9J had higher adherence compared to non-irradiated control in the same condition and nutritional potency (Figure 2A). Low level lasertherapy was not able to modify the cell adhesion of human MSCs derived from adipocytes in standard nutritional status. Groups with nutritional deprivation had similar adherence regardless of the irradiated dose. By analyzing the effect of nutritional deficiency on the adhesion profile, it was possible to verify that the control group and the group that was irradiated with 0.7J maintained at 5% FBS showed no statistically significant differences to their respective controls (10% FBS), however, the other groups had lower adherence in deficient nutritional condition.

According to Figure 2B, the LLLT in doses of 1.5 J and 3J resulted in weak cell adhesion in groups with regular supplementation. However, the groups submitted to nutritional deficiency presented similar adherence when submitted to different doses of irradiation. The control group that had not been irradiated and the group that had been irradiated with 9J had lower adherence than the groups with standard supplementation.

After 60 minutes, the cells maintained in regular supplementation condition presented lower adherence after irradiation at doses of 0.7J, 3J and 9J when compared to non-irradiated control (Figure 2C). The groups held at 5% FBS behaved similarly among themselves, only the group irradiated at a 1.5J showed lower proliferation when compared to the 5% control group. It was also found that the control groups and 9J in the condition of 5% FBS had no statistically significant differences in their respective groups with regular supplementation (Figure 2C).

rMSC ATTACHMENT

In 20 minutes of cultivation, the groups irradiated at doses of 1.5J, 3J 9J in standard nutritional status, and at a dose of 3J and 9J on condition of nutritional deprivation had lower adherence than their controls. Nutritional deprivation also led to lower adhesion, when compared to groups with nutritional profile of 10% FBS (Figure 2D).

According to Figure 2E, after 40 minutes of cultivation, standard nutritional condition groups presented the same behavior. Groups with deficient supplementation remained presenting lower adherence at doses of

3J and 9J when compared to their non-irradiated control. Nutritional deprivation promoted decrease in cell adhesion in all groups, irradiated or not, when compared to groups with regular supplementation.

Cells irradiated at a dose of 3 J and 9J and cultivated at 10% FBS, and at a dose of 9J, cultured at 5% FCS, had lower adherence compared to their non-irradiated controls at the end of 60 minutes. The nutritional deprivation maintained an inhibitory effect on cell adhesion in all groups (Figure 2F).

hMSC PROLIFERATION

Within 24 hours of cultivation, the group irradiated at a dose of 0.7J, maintained in standard conditions of nutrition, presented higher proliferation when compared to other groups. The group with nutritional deprivation, irradiated at 9J showed lower proliferation than the other groups in the same poor nutritional condition. The groups subjected to nutritional deprivation presented less proliferation when compared to groups with standard supplementation in the same period (Figure 3A). On the third day of testing, the dose of 9J promoted inhibition of proliferation in the group with standard nutritional status, while the groups with reduced supplementation had similar proliferation regardless of the irradiated dose. However, the rate of proliferation remained lower in groups with nutritional deprivation (Figure 3B).

At the end of the fifth day, the laser irradiation did not affect cell proliferation in the experimental groups, however, the groups with standard or poor supplementation, irradiated at a dose of 3J showed lower proliferation

to other groups and those cultured in 5% FBS presented less proliferation when compared to the ones cultivated at 10% FBS (Figure 3C).

rMSC PROLIFERATION

After 24 hours of cultivation, all irradiated groups at doses above or equal to 1.5J showed lower proliferation when compared to their non-irradiated controls. In the same period, the groups with nutritional deprivation showed lower cell proliferation when compared to their respective groups with regular nutrition (Figure 3D).

On the third day of cultivation, the group with standard supplementation irradiated with 9J showed lower proliferation than their respective non-irradiated control, while groups with inadequate supplementation presented similar behavior among themselves (Figure 3E). On the other hand, nutritional deprivation promoted lower cell proliferation when compared to their respective experimental groups with standard nutritional profile (Figure 3E).

According to Figure 3F, on the fifth day, the groups with standard supplementation, irradiated with a dose equal to or above 1.5 J, presented lower cell proliferation. The nutritionally deprived groups continued to present similar proliferation, regardless of the irradiated dose, and showing lower proliferation when compared to the groups supplemented with 10% FBS.

GENE EXPRESSION

The laser therapy yielded a significant increase in mRNA expression of vascular endothelial growth hormone (VEGF) in mesenchymal stem cells

of human origin after irradiation dose of 1.5 J and 3J after growing at 5% FBS (Table 1). Under standard conditions of cultivation, LLLT caused a significant increase of the content of messenger RNA in human mesenchymal stem cells at a dose of 0.7 J, with no significant differences between the control and the other experimental groups (Table 1).

In this study we analyzed the gene expression of the VEGF receptor 2 (VEGFR2) after laser irradiation at different cultivation conditions and the results are shown in Table 1. In low amount of FBS, the expression of messenger RNA in human mesenchymal stem cells significantly increased with doses of 0.7 J, 1.5 J and 3J. In default condition, the expression of VEGF receptor 2 showed a significant increase in the dose of 0.7 J (Table 1).

The laser therapy resulted in a significant increase in mRNA expression of vascular endothelial growth hormone (VEGF) in stem cells extracted from adipose tissue of rats grown to 5% FBS at a dose of 1.5 J, with no significant differences between control and the other experimental groups. Under conditions of cultivation at 10% FBS, mesenchymal stem cells showed significantly increased expression of VEGF alone at a dose of 3 J, while the others were not different from controls (Table 2).

Gene expression of VEGF receptor 2 (VEGFR2) after laser irradiation in different culture conditions was also evaluated. Under low amount of FBS, expression of messenger RNA of VEGF receptor 2 in rat mesenchymal stem cell was significantly increased only in the group irradiated with a dose of 3J (Table 2). When cultured in standard condition, the rat mesenchymal stem

cells showed a significant increase in the expression of VEGF receptor 2 after irradiation dose of 3J (Table 2), with no significant differences between the other experimental groups and the control group.

DISCUSSION

Although LLLT has been revealed a promising therapeutic resource, the success of its use directly dependent on the adoption of correct dosimetric parameters. By analyzing its effect on cell culture, Ferreira and colleagues (2009) addressed that different cell lines may respond peculiarly to different parameters, existing therefore the need to establish dosimetric parameters specific for each cell lines. This behavioral variability increases when the lasertherapy is applied to MSCs, since these cells can be extracted from different tissues and species, they are cultivated under different conditions, factors that, *per se*, have a strong influence on cell metabolism.

The effect of LLLT on the metabolism of MSCs has not been fully elucidated. Several studies report that irradiation is able to increase cell proliferation^{8,18,26,27}, increase VEGF expression, and consequently increasing angiogenesis after transplantation¹, induction of autologous MSCs in myocardium area close to ischemia¹⁹. However, there is a vast literature on the analysis and results of LLLT generated by the difference in the origin of MSCs (different tissues), culture protocols, dosimetric parameters, periods of analyzes and experimental techniques, and especially, the lack of methodological information difficult experimental reproducibility. Supplementation of the culture medium is rather decisive factor in cell

metabolism, and in many cases also is used without standardization. While it is necessary to remain alive in culture, the decrease in concentration of fetal bovine serum (FBS) is critical for proper cell proliferation.

Here, investigating the impact of SFB in cellular metabolism, we realized that the decrease of SFB concentration caused a significant decrease in proliferation and adhesion of hMSCs and rMSCs. In controlled conditions, we found that LLLT was unable to reverse this situation. Our findings support previous studies^{8,28,29}, which showed different behavior of MSCs when extracted from different species or tissue and that small differences in the dose irradiated can lead to different results.

One of the main findings of this study was that the dose of 0.7J resulted in increased proliferation of hMSCs. Although Mvula and coworkers (2008) have observed increased proliferation of adipose-derived hMSC at 24 and 48 hours with a dose of 5J/cm², our results showed no cell proliferation with higher doses of 0,7J. All parameters used by the authors differ from laser parameters used in our study. Mesquita-Ferrari and colleagues (2011) found that irradiation at different doses in C2C12 cells cultured under similar conditions and periods to ours did not result in increased cell proliferation. Furthermore, Pereira and colleagues (2012), using infrared laser at different doses (0.05, 0.30, 7 and 42 J/cm²) did not observe increased cell proliferation in stem cells of dental pulp.

In an interesting study, Anwer et al (2012) observed the effect of laser with a wavelength of 532nm in the proliferation and mitochondrial activity *in*

vitro on human mesenchymal stem cells. As noted in our study, lower exposure times led to increased cell proliferation, while longer exposures resulted in inhibition of proliferation of human stem cells in culture. Our data show that rMSCs showed decreased cell proliferation with energy doses greater than or equal to 1.5J, both in the acute and delayed more when grown in regular nutritional condition.

The effect of LLLT on adhesion of hMSC appeared irregular with different irradiation doses. In a more acute moment, and perhaps most importantly when the stem cells inoculum is made, the groups irradiated with higher doses (3J and 9J) showed higher adherence. Then, the subsequent periods analyzed showed a decrease in cell adhesion, behavior observed in the groups maintained with regular supplementation. The same behavior was observed in the experimental groups cultured with nutritional deprivation, which does not seem to respond to different doses of irradiation.

Our results suggest that LLLT can influence the metabolism of MSCs, however, such influence varies according to the origin of the mesenchymal cell and radiation parameters used. Based on results of cell behavior, human stem cells seem to be more responsive to the LLLT action than rat MSCs. For instance, regarding to higher proliferation in the early hours of culture, we observed that only the hMSC irradiated with 0.7J showed this effect, but this effect did not remain for a long term in cell culture. Doses of 3J and 9J induce greater adhesion hMSC only in the first 20 minutes, but this effect was not maintained also at the end of the cultivation period.

Several authors have demonstrated the modulation of VEGF by laser therapy, even after transplantation. Zhang et al (2010), using a laser diode with wavelength of 635nm, 5mW, with an energy density of 0.96 J/cm² for 150 seconds, it was verified that laser therapy was able to increase VEGF expression in stem cells derived from bone marrow transplanted into the myocardium. Kim et al (2012) found that low intensity laser therapy was able to increase survival, differentiation and secretion of VEGF in stem cells derived from canine adipocytes transplanted to wounds. In our results, we observed a significant increase of VEGF and its receptor 2 expression in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue and rats.

Although laser action has been, in both cell types, has resulted in increased expression of VEGF and VEGFR2, there are some peculiarities in each experiment. Thus, we found that the expression of VEGF and its receptor 2 in human stem cells occurs with lower doses (0,7J) and this condition is maintained at higher doses (1,5 and J 3J) only in situations of nutritional deprivation. We also observed that in standard condition of cultivation, only lower doses (0.7J) led to increased expression of VEGF and its receptor. Stem cells taken from rats showed higher expression of VEGF and its receptor with a dose of 3J, except for the expression of VEGF in condition of nutritional deprivation, which occurred at lower dose (1.5J). Although we have not analyzed the secretion of VEGF by stem cells, our experiments allowed to trace gene expression kinetics of VEGF and its receptor in deficient and standard condition. In our study, we observed that in situations of nutritional deficiency, a stem cell, especially a human, would be

more prone to modulation of the laser action on the mRNA production of VEGF and its receptor 2, which could result in increased protein production and receptor activation.

Hou et al (2008) reported that LLLT stimulated the proliferation of stem cells derived from bone marrow of mice at a dose of 0.5J/cm² and observed an increase in VEGF secretion in higher doses. In our study, we found that human stem cells showed increased proliferation with irradiation dose of 0,7J with the production of messenger RNA for VEGF and its receptor occurring at the same dose in standard culture situation, and an increased expression being observed at higher doses in state of nutritional deficiency.

Thus, we conclude that regarding to the parameters used in this study, stem cells derived from human adipose tissue showed higher rates of proliferation and cell adhesion in standard condition and nutritional deficiency when compared with stem cells extracted from adipose tissue of rats. The mRNA expression of VEGF and VEGFR2 was increased with the laser action in both cell types, however, human cells grown in nutritional deprivation presented higher expression of VEGF and its receptor after irradiation with other laser doses. The importance of the results of this work, especially in relation to nutritional deprivation, is that this condition mimics the one found in tissue shortly after ischemia, and prior to stem cells transplantation, indeed an environment lacking nutrients and oxygen, which increased cell adhesion and angiogenesis induced by laser therapy would be extremely beneficial to the individual.

Still, there is a need for new experiments that seek a better understanding of its effects and other parameters that would be most appropriate for each stem cell type. Further investigation of the possible molecular and biological changes entailed and how they can act when the stem cells were transplanted.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP for funding the study.

Figure 1.

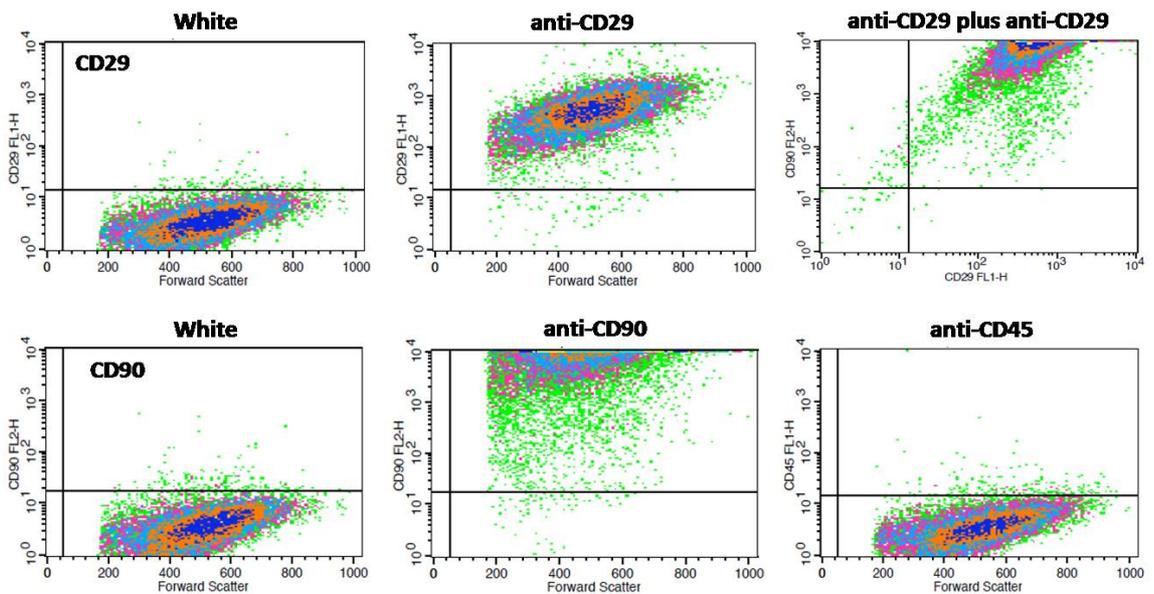


Figure 2.

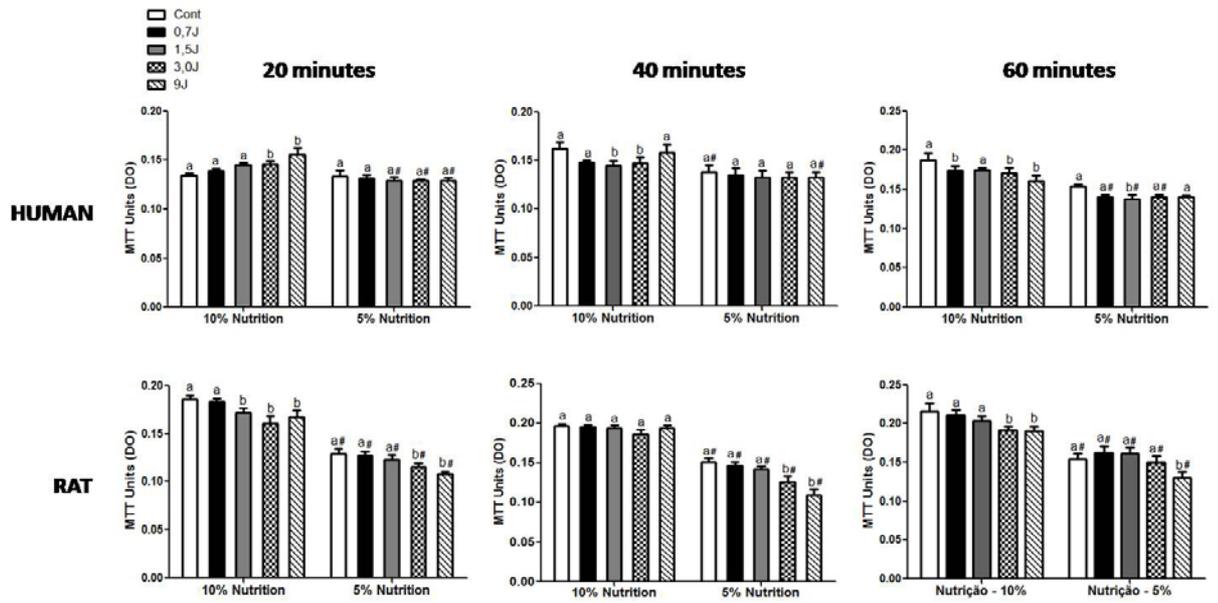


Figure 3.

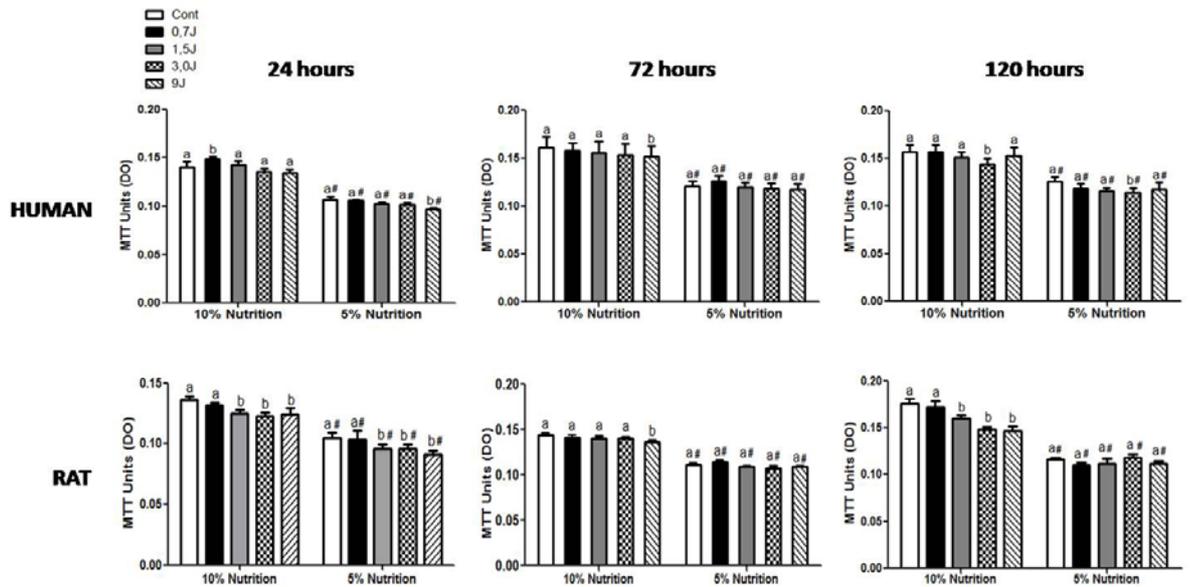


Table 1. Gene expression of vascular endothelial growth hormone (VEGF) and VEGF receptor 2 in human mesenchymal stem cells irradiated with laser.

	FBS	control	0,7J	1,5J	3J	9J
VEGF	5%	0,29±0,03	0,30±0,03	0,51±0,15 ²	0,49±0,04*	0,27±0,05
VEGF	10%	0,26±0,04	0,35±0,03 [^]	0,24±0,04	0,26±0,01	0,21±0,02
VEGFR2	5%	0,41±0,03	0,50±0,05 ⁵	0,71±0,15 ⁵	0,61±0,07 ⁵	0,37±0,08
VEGFR2	10%	0,34±0,03	0,40±0,04 [^]	0,33±0,01	0,37±0,01	0,34±0,01

²p<0,05 1,5J:control, 0,7J, 3J, and 9J; *p<0,001 3J:control, 0,7J, and 9J, [^]p<0,05 0,7J:control, 1,5J, 3J, and 9J; ⁵p<0,01 0,7J, 1,5J, and 3J:control and 9J.

Table 2. Gene expression of vascular endothelial growth hormone (VEGF) and VEGF receptor 2 in rat mesenchymal stem cells irradiated with laser.

	FBS	control	0,7J	1,5J	3J	9J
VEGF	5%	0,20±0,02	0,35±0,15	0,55±0,06 ²	0,41±0,06	0,35±0,07
VEGF	10%	0,25±0,02	0,26±0,04	0,21±0,04	0,46±0,06*	0,27±0,05
VEGFR2	5%	0,37±0,02	0,33±0,03	0,39±0,04	0,67±0,09*	0,37±0,01
VEGFR2	10%	0,40±0,05	0,39±0,02	0,37±0,12	0,70±0,03*	0,38±0,11

²p<0,05 1,5J:control, 0,7J, 3J, and 9J; *p<0,001 3J:control, 0,7J, 1,5J, and 9J.

REFERENCES

1. Tuby H, Maltz L, Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):227-33.
2. Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(3):321-6.
3. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations – Comparing apples and oranges. *Stem cell Rev.* 2007;3:239-48.
4. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50

5. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
6. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Banayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1335-47.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13625-30.
8. Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation: A preliminary study. *Laser Med Surg*. 2008;40(6):433-8
9. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical Cord: Cord is richer than blood. *Stem cells*. 2008. 26(1):146-50.
10. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarde DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
11. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
12. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound repair regen*. 2001; 9(6):429-42.
13. Mummery CL, Davis RP, Krieger JE. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci Transl Med*. 2010; 2:27ps17.

14. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal*. 2002;4(5):785-90.
15. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FLN, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat Adipose Tissue-Derived Stem Cells Transplantation Attenuates Cardiac Dysfunction Post Infarction and Biopolymers Enhance Cell Retention. *PLoS ONE*. 2010;5(8):e12077
16. Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low power He-Ne irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med*. 2001; 28(4):355-64.
17. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med*. 2006; 38(7):682-8.
18. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(4):373-8.
19. Tuby H, Maltz L, Oron U. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(5):401-9
20. Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, dos Santos-Junior GR, Saint-Clair D, Bajgelman MC, Faé KC, Kalil J, Miyakawa AA, Krieger JE. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferation capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(4):661-70.
21. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, Krieger JE. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial

growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010;19(3):371-8.

22. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, Schetttert IT, Krieger JE. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion.* 2009; 49(12):2680-5.

23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(2):55-63.

24. Löster, K., Horstkorte, R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron* 2000; 31:41-53.

25. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DAB, et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):901-6.

26. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2008; 23(3):277-82.

27. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2010; 25:33-39.

28. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S America.* 2001; 98: 7841–5.

29. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Cañizo MC. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol.* 2008; 36(8):1014-21.
30. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011; 49(6):423-8.
31. Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2012 Aug;57(8):1079-85.
32. Anwer AG, Gosnell ME, Perinchery SM, Inglis DW, Goldys EM. Visible 532 nm laser irradiation of human adipose tissue-derived stem cells: Effect on proliferation rates, mitochondria membrane potential and autofluorescence. *Lasers Surg Med.* 2012 Nov;44(9):769-78.
33. Zhang H, Hou JF, Shen Y, Wang W, Wei YJ, Hu S. Low level laser irradiation precondition to create friendly milieu of infarcted myocardium and enhance early survival of transplanted bone marrow cells. *J Cell Mol Med.* 2010 Jul;14(7):1975-87.
34. Kim H, Choi K, Kweon OK, Kim WH. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci.* 2012 Dec;68(3):149-56.
35. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med.* 2008 Dec;40(10):726-33.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a LBI mostre-se um promissor recurso terapêutico, o sucesso de sua utilização depende diretamente da adoção dos parâmetros dosimétricos corretos. Ao analisar seu efeito sobre cultura celular, Ferreira e colaboradores (2009) abordaram que diferentes linhagens celulares podem responder de forma peculiar a diferentes parâmetros, existindo, portanto, a necessidade do estabelecimento de parâmetros dosimétricos específicos para as diferentes linhagens celulares. Essa variabilidade comportamental aumenta para as MSCs, uma vez que estas podem ser extraídas de diferentes tecidos, espécie e serem cultivadas sobre diferentes condições, fatores que, *per se*, já exercem influência sobre seu metabolismo.

O efeito da LBI sobre o metabolismo das MSCs ainda não foi completamente elucidado. Vários estudos reportam que a irradiação é capaz de aumentar a proliferação celular^{11,46,52,53}, a expressão de VEGF e

consequente aumento de angiogênese após transplantação² e indução de MSCs autólogas em área implantada de miocárdio⁴⁷. Entretanto, há na literatura uma vastidão de análises e resultados contraditórios em relação à LBI gerados pela diferença na origem das MSCs (diferentes tecidos), protocolos de cultivo, parâmetros dosimétricos, períodos de análises e técnicas experimentais e, principalmente, em alguns artigos informações metodológicas deficitárias dificulta a reprodutibilidade experimental. A suplementação do meio de cultura é fator bastante determinante no metabolismo celular, e em muitos casos também é utilizado sem padronização. Embora seja necessário no cultivo, a diminuição da concentração de SFB é crítica para a proliferação celular.

Ao investigarmos o impacto do SFB no metabolismo celular, percebemos que a diminuição de sua concentração acarretou significativa diminuição da proliferação e adesão das hMSCs e rMSCs. Em condições controladas, verificamos que a LBI não foi capaz de reverter esse quadro. Nossos achados corroboram estudos anteriores^{11,15,16} onde foi verificado diferente comportamento das MSCs quando extraídas de diferentes espécies ou tecido e que pequenas diferenças na dose irradiada pode exercer resultados distintos.

Um dos principais achados deste estudo foi que a dose de 0,7J resultou em maior proliferação das hMSCs. Embora Mvula e colaboradores (2008), tenham observado aumento da proliferação de hMSC derivadas de tecido adiposo em 24 e 48 horas, com dose de 5J, nossos resultados não evidenciaram proliferação celular com doses maiores de 0,7J. Todos os

parâmetros utilizados pelos autores diferem dos parâmetros do laser utilizado em nosso estudo. Mesquita-Ferrari e colaboradores (2011) verificaram que a irradiação em diferentes doses em células C2C12 cultivadas em condições e períodos similares aos nossos, não resultou em aumento de proliferação. Além disso, Pereira e colaboradores (2012), usando laser infravermelho em diferentes doses (0,05 J/cm², 0,30 J/cm², 7J/cm² e 42 J/cm²) também não observaram aumento da proliferação celular em células-tronco de polpa dental.

Em um estudo interessante, Anwer e colaboradores (2012) observaram o efeito do laser com comprimento de onda de 532nm na proliferação e atividade mitocondrial *in vitro* em células-tronco mesenquimais humanas. Como observamos em nosso estudo, menores tempos de exposição levaram ao aumento da proliferação celular, enquanto que exposições mais longas resultaram em inibição da proliferação de células-tronco humanas em cultura. Nossos dados mostram que as rMSCs apresentaram diminuição da proliferação celular com doses de energia maior ou igual a 1.5J, tanto na fase mais aguda quanto tardia, quando cultivadas na condição nutricional regular.

A adesão das hMSC apresentou-se irregular com as diferentes doses de irradiação. Em um momento mais agudo (20 minutos), e talvez o mais importante quando se pensa em inóculo de células-tronco, os grupos irradiados com doses maiores (3J e 9J) apresentaram maior adesão e em seguida, nos próximos tempos apresentaram diminuição da adesão celular, comportamento este observado nos grupos mantidos com suplementação

regular. O mesmo comportamento foi observado nos grupos experimentais cultivados com privação nutricional, que parecem não responder às diferentes doses de irradiação.

Nossos resultados sugerem que a laserterapia pode influenciar o metabolismo das MSCs, entretanto, essa influência varia de acordo com a origem da célula mesenquimal e com parâmetros de radiação utilizados. Com base nos resultados de comportamento celular, as células-tronco humanas parecem mais responsivas à ação do laser que as de rato. De fato, em relação à proliferação nas primeiras 24 horas de cultivo, observamos que somente as hMSC irradiadas com 0,7J apresentaram este efeito, porém este efeito não permaneceu por longo prazo nas células em cultura. As doses de 3J e 9J induziram maior adesão somente em hMSC nos primeiros 20 minutos, mas este efeito também não se manteve ao final do período de cultivo.

Vários autores já mostraram a modulação do VEGF pela laserterapia, inclusive após transplantação. Zhang e colaboradores (2010), usando um laser diodo com comprimento de onda de 635nm, 5mW, com densidade de energia de 0,96J/cm² durante 192 segundos, verificou que laserterapia foi capaz de aumentar a expressão de VEGF em células-tronco derivadas de medula óssea transplantadas no miocárdio. Kim e colaboradores (2012) observaram que a laserterapia de baixa intensidade foi capaz de aumentar a sobrevivência, a diferenciação e secreção de VEGF em células-tronco caninas derivadas de adipócitos transplantadas para feridas. Em nossos resultados,

verificamos o aumento significativo de VEGF e seu receptor 2 em células-tronco mesenquimais derivadas tecido adiposo humano e de ratos.

Embora a ação do laser tenha sido, nos dois tipos celulares, similar, ou seja, aumentou da expressão de VEGF e de VEGFR2, há algumas particularidades em cada experimento. Assim, verificamos que a expressão de VEGF e seu receptor 2 em células-tronco humanas acontece com doses menores (0,7J) e esta condição é mantida em doses maiores (1,5J e 3J) apenas em situação de privação nutricional. Também observamos que em condição padrão de cultivo, apenas doses menores (0,7J) levaram ao aumento da expressão de VEGF e de seu receptor. As células-tronco retiradas de ratos apresentaram maior expressão de VEGF e seu receptor com a dose de 3J, com exceção da expressão de VEGF em condição de privação nutricional, que ocorreu em dose menor (1,5J). Apesar de não termos analisado a secreção de VEGF pelas células, nossos experimentos permitiram traçar uma cinética da expressão gênica de VEGF e de seu receptor em condição padrão e deficiente. Em nosso estudo, observamos que em situação de deficiência nutricional, em especial a célula-tronco humana, estaria mais propensa à modulação da ação do laser sobre a produção de RNAm de VEGF e seu receptor 2, que poderia resultar em maior produção proteica e ativação de receptores.

Hou e colaboradores (2008) verificaram que a LBI estimulou a proliferação de células-tronco derivadas de medula óssea de ratos na dose de 0,5J/cm² e o aumento de secreção de VEGF em doses maiores. Em nosso estudo, verificamos que hMSC apresentaram aumento da proliferação

com irradiação com dose de 0,7J, com a produção de RNA mensageiro para VEGF e seu receptor ocorrendo na mesma dose em situação de cultivo padrão, e um aumento de expressão sendo observado em doses maiores em situação de deficiência nutricional.

Assim, concluímos que, nos parâmetros utilizados neste trabalho, as células-tronco derivadas de tecido adiposo humano apresentaram melhores índices de proliferação e adesão celular em condição padrão e em deficiência nutricional quando comparadas com as células-tronco extraídas de tecido adiposo de rato. A expressão de RNAm de VEGF e VEGFR2 foi aumentada pela ação do laser nos dois tipos celulares, entretanto, as células humanas cultivadas em privação nutricional apresentaram maior expressão de VEGF e de seu receptor após irradiação com mais doses. A importância dos resultados deste trabalho, especialmente em relação à privação nutricional, é que esta condição mimetizaria a condição tecidual encontrada pelas células-tronco logo após o transplante, sendo um ambiente carente de nutrientes e oxigenação, cujo aumento de adesão celular e angiogênese induzidos pela laserterapia seriam extremamente benéficos para o indivíduo.

Ainda assim, existe a necessidade de novos experimentos que busquem o melhor entendimento de seus efeitos e quais parâmetros seriam mais adequados para cada tipo celular, além da maior investigação das possíveis alterações moleculares e biológicas acarretadas e como estas podem atuar quando as células forem transplantadas.

6. REFERÊNCIAS

36. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations – Comparing apples and oranges. *Stem cell Rev.* 2007;3:239-48.
37. Tuby H, Maltz L, Oron U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):227-33.
38. Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401(3):321-6.
39. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
40. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
41. Reyes M., Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood.* 2001; 98(9): 2615–25.
42. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boqqq SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284: 1168–70.
43. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from

- bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1291–302.
44. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Banayahu D, Robey PG. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1335-47.
 45. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25):13625-30.
 46. Eduardo FP, Bueno DF, Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo CP, Zatz M. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation: A preliminary study. *Laser Med Surg*. 2008;40(6):433-8.
 47. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto OK, Muotri AR, Zatz M. Multipotent stem cells from umbilical Cord: Cord is richer than blood. *Stem cells*. 2008. 26(1):146-50.
 48. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarde DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
 49. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
 50. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S America*. 2001; 98: 7841–5.
 51. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, Villarón E, Barbado V, Tabera S, Díez-Campelo M, Blanco J, San Miguel JF, Del Cañizo MC. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*. 2008; 36(8):1014-21.

52. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010; 77:6-10.
53. Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, dos Santos-Junior GR, Saint-Clair D, Bajgelman MC, Faé KC, Kalil J, Miyakawa AA, Krieger JE. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferation capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(4):661-70.
54. Danoviz ME, Nakamuta JS, Marques FLN, dos Santos L, Alvarenga EC, dos Santos AA, Antonio EL, Schettert IT, Tucci PJ, Krieger JE. Rat Adipose Tissue-Derived Stem Cells Transplantation Attenuates Cardiac Dysfunction Post Infarction and Biopolymers Enhance Cell Retention. *PLoS ONE*. 2010;5(8):e12077.
55. Yokoya S, Mochizuki Y, Natsu K, Omae H, Nagata Y, Ochi M. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Am J Sports Med*. 2012;40(6):1259-68.
56. Bassaneze V, Barauna VG, Lavini-Ramos C, Kalil J, Schettert IT, Miyakawa AA, Krieger JE. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(3):371-8.
57. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16(3):381–90.
58. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. 2001; 153(5):1133–40.
59. Anderson DG, Levenberg S, Langer R. Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004; 22(7): 863–6.
60. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006; 126:677–689.

61. Ahmadi-Ashtiani HR, Allameh A, Rastegar H, Mortaz E, Saraf Z. Immunoregulatory effects of glutathione during mesenchymal stem cell differentiation to hepatocyte-like cells. *Iran J Immunol.* 2012; 9(3):175-87.
62. Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC. Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 347:12–21.
63. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2005; 24:462–71.
64. Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, Ohgushi H. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng.* 2005; 11:663–73.
65. Naves KT. Estudo da ação da terapia com laser de baixa potência (LLLT) em um modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS [Dissertação]. São José dos Campos, SP: Universidade do Vale do Paraíba; 2008.
66. Bortone F. Efeitos da laserterapia de baixa potência na expressão gênica de receptores de cininas em modelo experimental de inflamação aguda em ratos [Dissertação]. São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2008.
67. Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
68. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cell. *J Photochem Photobiol B.* 1999;49(1):1-17.
69. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics.* 1989;56(5):691-704
70. Silva MP. Redução da expressão gênica de calicreínas teciduais e plasmáticas pela laserterapia em modelo de inflamação aguda induzida pela

carragenina em ratos [Dissertação]. São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2009.

71. Karu T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B.* 1989;3(4):638-40.
72. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989;56(5):691-704.
73. Stocum DL. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound repair regen.* 2001; 9(6):429-42.
74. Mummery CL, Davis RP, Krieger JE. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci Transl Med.* 2010; 2:27ps17.
75. Mirsky N, Krispel Y, Shoshany Y, Maltz L, Oron U. Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid Redox Signal.* 2002;4(5):785-90.
76. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Laser Surg Med.* 1985; 5(1):31-9.
77. Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B.* 1991; 11(1):87-91.
78. Eduardo FB, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, Marques MM. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med.* 2007;39(4):365-72.
79. Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low power He-Ne irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 2001; 28(4):355-64.
80. Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(7):682-8.

81. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(4):373-8.
82. Tuby H, Maltz L, Oron U. Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(5):401-9.
83. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, Schettert IT, Krieger JE. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion.* 2009; 49(12):2680-5.
84. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(2):55-63.
85. Löster, K., Horstkorte, R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron* 2000; 31:41-53.
86. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DAB, et al. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):901-6.
87. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2008; 23(3):277-82.
88. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2010; 25:33-39.

89. Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro R, Souza NH, Silva CA, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KP. No effect of low-level lasers on in vitro myoblast culture. *Indian J Exp Biol.* 2011; 49(6):423-8.
90. Horvát-Karajz K, Balogh Z, Kovács V, Drrernat AH, Sréter L, Uher F. In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. *Lasers Surg Med.* 2009; 41(6):463-9.
91. Pereira LO, Longo JP, Azevedo RB. Laser irradiation did not increase the proliferation or the differentiation of stem cells from normal and inflamed dental pulp. *Arch Oral Biol.* 2012 Aug;57(8):1079-85.
92. Anwer AG, Gosnell ME, Perinchery SM, Inglis DW, Goldys EM. Visible 532 nm laser irradiation of human adipose tissue-derived stem cells: Effect on proliferation rates, mitochondria membrane potential and autofluorescence. *Lasers Surg Med.* 2012 Nov;44(9):769-78.
93. Zhang H, Hou JF, Shen Y, Wang W, Wei YJ, Hu S. Low level laser irradiation precondition to create friendly milieu of infarcted myocardium and enhance early survival of transplanted bone marrow cells. *J Cell Mol Med.* 2010 Jul;14(7):1975-87.
94. Kim H, Choi K, Kweon OK, Kim WH. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci.* 2012 Dec;68(3):149-56.
95. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med.* 2008 Dec;40(10):726-33.

7. APÊNDICE

7.1. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Photomedicine and Laser Surgery*.

Manuscript ID:	PHO-2012-3446
Title:	Effects of low level laser therapy on attachment, proliferation and gene expression of VEGF and VEGF-R2 of mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency.
Authors:	Oliveira, Tabata Serra, Andrey Manchini, Martha Bassanese, Vinicius Krieger, Jose Tucci, Paulo Silva Jr, Jose
Date Submitted:	19-Nov-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

