

Laser de baixa intensidade induz à proliferação *in vitro* de células-tronco mesenquimais

Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of mesenchymal stem cells

Carlos Augusto Galvão Barboza¹, Fernanda Ginani¹, Diego Moura Soares²,
Águida Cristina Gomes Henriques¹, Roseana de Almeida Freitas¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da terapia com laser de baixa intensidade sobre a proliferação e as possíveis alterações morfológicas nucleares em células-tronco mesenquimais de camundongos. **Métodos:** Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e do tecido adiposo foram submetidas a duas aplicações (T0 e T48 horas) de laser de baixa intensidade (660nm; doses de 0,5 e 1,0J/cm²). O ensaio de azul de tripan foi utilizado para a avaliação da viabilidade celular, e curvas de crescimento foram usadas para avaliar a proliferação das células em zero, 24, 48, e 72 horas. Alterações nucleares foram avaliadas por coloração com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindolo) em 72 horas. **Resultados:** As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea responderam a terapia com laser de forma dose-dependente. Um maior crescimento celular foi observado quando as células foram irradiadas com dose de 1,0J/cm², especialmente depois de 24 horas ($p < 0,01$). As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo responderam melhor à dose de 1,0J/cm², com maior proliferação após 48 ($p < 0,05$) e 72 horas ($p < 0,01$). Nem alterações nucleares nem a mudança significativa na viabilidade celular foi detectada nos grupos estudados. **Conclusão:** Laser de baixa intensidade estimulou a proliferação de células-tronco mesenquimais sem causar alterações nucleares. A bioestimulação de células-tronco mesenquimais por laserterapia pode ser uma ferramenta importante para a terapia regenerativa e a engenharia tecidual.

Descritores: Terapia a laser; Proliferação de células; Células-tronco; Medula óssea; Tecido adiposo

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of low-level laser irradiation on the proliferation and possible nuclear morphological changes of

mouse mesenchymal stem cells. **Methods:** Mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue were submitted to two applications (T0 and T48 hours) of low-level laser irradiation (660nm; doses of 0.5 and 1.0J/cm²). The trypan blue assay was used to evaluate cell viability, and growth curves were used to analyze proliferation at zero, 24, 48, and 72 hours. Nuclear alterations were evaluated by staining with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) at 72 hours. **Results:** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells responded to laser therapy in a dose-dependent manner. Higher cell growth was observed when the cells were irradiated with a dose of 1.0J/cm², especially after 24 hours ($p < 0.01$). Adipose-derived mesenchymal stem cells responded better to a dose of 1.0J/cm², but higher cell proliferation was observed after 48 hours ($p < 0.05$) and 72 hours ($p < 0.01$). Neither nuclear alterations nor a significant change in cell viability was detected in the studied groups. **Conclusion:** Low-level laser irradiation stimulated the proliferation of mouse mesenchymal stem cells without causing nuclear alterations. The biostimulation of mesenchymal stem cells using laser therapy might be an important tool for regenerative therapy and tissue engineering.

Keywords: Laser therapy; Cell proliferation; Stem cells; Bone marrow; Adipose tissue

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas com potencial importante para aplicações em terapia celular, devido a sua capacidade para autorrenovação, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células especializadas.⁽¹⁾ As CTMs adultas são responsáveis pela reposição de tecidos da-

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente: Carlos Augusto Galvão Barboza – Avenida Salgado Filho, 3.000 – Campus Universitário, Lagoa Nova – CEP: 59072-970 – Natal, RN, Brasil – Tel.: (84) 3215-3431 – E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

Data de submissão: 9/4/2013 – Data de aceite: 23/12/2013

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082014AO2824

nificados no local onde residem. Essas células podem ser isoladas a partir de vários tecidos, como medula óssea,⁽²⁾ cordão umbilical,⁽³⁾ polpa dentária,⁽⁴⁾ ligamento periodontal⁽⁵⁾ e tecido adiposo.⁽⁶⁾ As CTMs derivadas do tecido adiposo (ADSCs) têm um potencial de diferenciação similar àquelas derivadas da medula óssea (BMMSCs) e podem diferenciar-se em tipos de células diferentes, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos e mioblastos.⁽⁷⁾

Estudos têm demonstrado que quanto maior a proliferação de CTMs, maiores as capacidades regenerativa e cicatricial dos tecidos onde residem. Dentro desse contexto, o laser de baixa intensidade (LBI) tem mostrado eficiência em diversas condições médicas, como cicatrização da mucosa, úlcera na pele, dermatites e mucosites, por exercer efeitos biomoduladores positivos nas CTMs.^(8,9) Essa capacidade de acelerar o processo de cicatrização está provavelmente relacionada aos achados que o LBI promove na proliferação celular. Contudo, o mecanismo molecular subjacente para esse processo ainda não é completamente compreendido.⁽¹⁰⁾ Sugere-se que a energia do laser seja absorvida por cromóforos intracelulares e convertida em energia metabólica, que, então, é utilizada pela cadeia respiratória mitocondrial, para produzir ATP, e aumentar a atividade do DNA, e aumentar a síntese de RNA e proteínas.^(11,12)

O espectro da luz visível, infravermelha ou ultravioleta pode ser utilizado para LBI. De acordo com a literatura, o espectro da luz visível varia de 600 a 700nm⁽¹³⁾ bandas de resultados mais efetivos, em termos de proliferação e diferenciação celular. Yu et al.⁽¹⁴⁾ relataram alta produção do fator de crescimento de fibroblastos quando os fibroblastos foram irradiados com onda de laser de 600nm. Pourreau-Schneider et al.⁽¹⁵⁾ mostraram que a irradiação de laser com comprimento de onda de 632,8nm induziu à transformação de fibroblastos nos miofibroblastos em cultura. Além disso, encontrou-se que a luz do laser de 632,8nm aumenta a proliferação de células nas culturas de queratinócitos⁽¹⁶⁾ e estimula a secreção de citocinas IL-1 e IL-8.⁽¹⁷⁾ Stein et al.^(18,19) observaram alta proliferação, diferenciação e maturação de osteoblastos quando irradiados a 632,8 e 670nm, respectivamente.

O LBI tem mostrado estimular o crescimento, a proliferação e a diferenciação de tipos diferentes de células em cultura, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, mioblastos e osteoblastos, por exercer efeitos biomoduladores positivos.^(19,20) Todavia, pouco é conhecido em relação ao efeito da terapia a laser nas CTMs.^(4,12,21) Devido a proliferação das CTMs ser geralmente lenta e o percentual dessas células após

a primeira colheita ser baixo, uma ferramenta terapêutica que aumente a proliferação dessas sem causar danos moleculares enquanto mantém suas características específicas é importante para aplicação clínica efetiva dessas células.

OBJETIVO

Avaliar danos ao percentual de células e DNA em células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e naquelas derivadas do tecido adiposo tratadas com duas doses (0,5 e 1,0J/cm²) de laser de baixa intensidade em 660nm.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo 008/2009) e conduzido no Departamento de Morfologia/Centro de Biociências da instituição, entre 2010 e 2011.

Cultura celular

BMMSCs e ADSCs foram obtidas de dois camundongos albinos Swiss machos com 3 meses de idade. As BMMSCs foram extraídas de acordo com protocolo de Soleimani e Nadri.⁽²²⁾ Os fêmures e as tíbias foram dissecados, e as cavidades da medula óssea foram lavadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, EUA), 50mg/L de sulfato de gentamicina e 2mg/L de anfotericina (ambos da Cultilab, Brasil). Para isolamento das ADSCs, um fragmento de tecido adiposo foi removido da região inguinal do animal e lavado três vezes com α -MEM suplementado com antibióticos e agentes antifúngicos (Gibco, EUA). Após, o fragmento do tecido foi digerido enzimaticamente em solução de colagenase (3mg/mL; Gibco, EUA) por 1 hora a 37°C.

Os dois tipos de célula foram cultivados em placas contendo meio α -MEM suplementado com 10% SFB em atmosfera úmida, com 5% CO₂ a 37°C. O meio de cultura era trocado em intervalos de 3 a 4 dias, até as células atingirem 80 a 95% de confluência.

Para analisar a natureza multipotente das células antes da terapia a laser, as BMMSCs e ADSCs foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico e adipogênico (*StemPro® Differentiation kits, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EUA*) por até 21 dias. A análise das células, após esse período, utilizando microscopia de luz, revelou características morfológicas de osteoblastos e células adiposas (Figura 1).

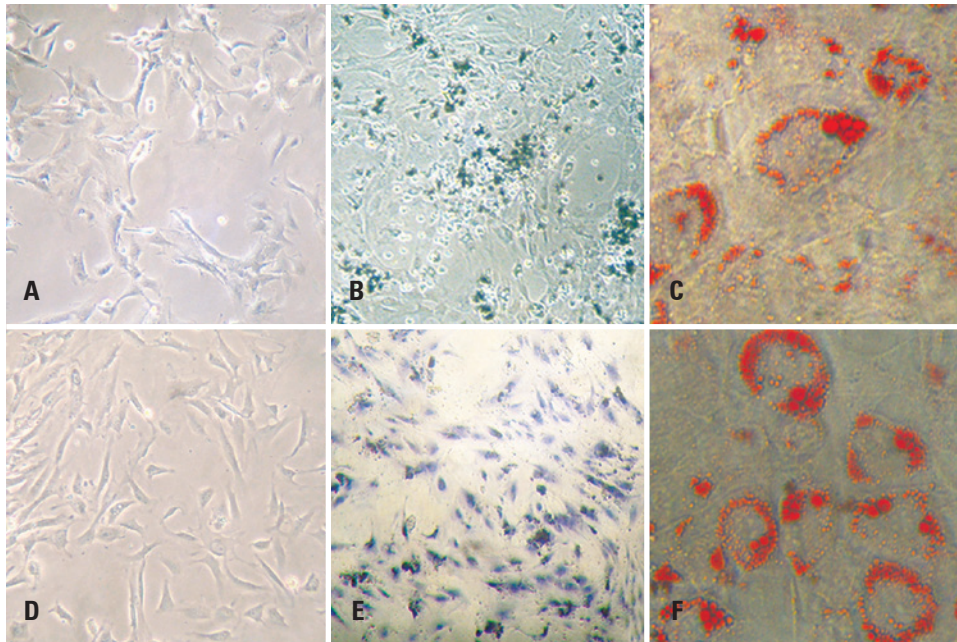


Figura 1. Fotomicrografia de células-tronco da medula óssea (A a C) e do tecido adiposo (D a F) no estágio de indiferenciação (A e D) e submetidas a diferenciação osteogênica (B e E) e adipogênica (C e F). Microscopia de luz, A e D: 40x; B e E: corante de von Kossa, 40x; C e F: corante Oil Red, 100x

Irradiação a laser

Na terceira passagem (P3), as culturas celulares foram irradiadas com laser diodo InGaAIP (Kondortech Bio Wave LLLT Dual, Brasil) em modo contínuo utilizando potência de 30mW, comprimento de onda de 660nm e doses de 0,5 e 1,0J/cm². Cada poço tratado com doses de 0,5 e 1,0J/cm² foi irradiado por 16 e 33 segundos, respectivamente, às zero e 48 horas. Após a primeira irradiação a laser, as células foram, então, analisadas em zero, 24, 48 e 72 horas. Para irradiação a laser, a sonda foi direcionada perpendicularmente a cada placa, com distância de 0,5cm das células. As células foram incubadas de modo que um poço, entre os semeados, fosse deixado vazio, para prevenir a dispersão intencional de luz entre os poços durante a irradiação a laser.

Análise do efeito da irradiação a laser na proliferação e viabilidade celular

O ensaio de azul de tripan foi utilizado para avaliar a viabilidade celular durante o experimento, e as curvas de crescimento obtidas foram utilizadas para estabelecer a proliferação das células submetidas à terapia a laser. As células foram cultivadas em placas para cultura celular de 24 poços com densidade de 3x10⁴ células/poços, e as células coradas com azul de tripan foram contadas em câmara de Neubauer em zero, 24, 48 e 72 horas.

Análise do efeito da irradiação a laser no núcleo celular

Para avaliar as mudanças morfológicas, as células foram coradas com DAPI (4'-6-diamidina-2-fenilindol) para identificar a presença do núcleo picnótico e a fragmentação nuclear após 72 horas.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise não paramétrica. As diferenças entre os grupos a cada momento (zero, 24, 48 e 72 horas) foram analisadas utilizando os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Adotou-se nível de significância de 5% (p<0,05).

RESULTADOS

Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

A figura 2 ilustra as curvas de crescimento de BMMSCs nos diferentes grupos. A menor proliferação foi observada para o grupo controle (sem tratamento a laser), em todos os momentos estudados, em comparação aos grupos irradiados.

A comparação das duas doses de laser mostrou uma tendência em relação à alta proliferação de células no grupo tratado com 1,0J/cm², porém essa diferença foi significativa somente após 24 horas (Tabela 1). Uma diferença significativa na proliferação celular foi observada entre o grupo controle e os grupos tratados com duas doses (0,5 e 1,0J/cm²) após 24 horas (Tabela 1),

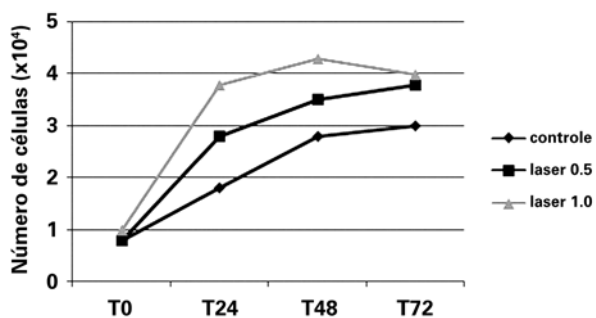


Figura 2. Curvas de crescimento das células-tronco mesenquimais da medula óssea, submetidas ou não à irradiação laser ao longo do tempo

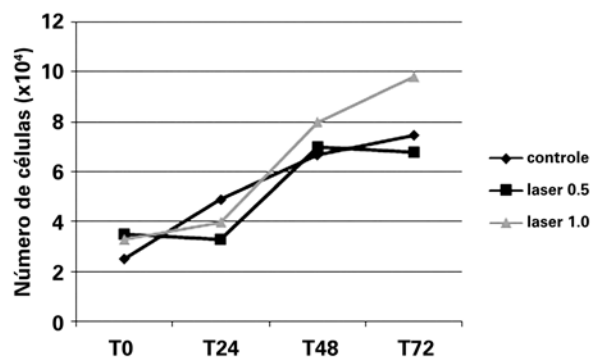


Figura 3. Curvas de crescimento das células-tronco derivadas do tecido adiposo submetidas ou não à irradiação laser ao longo do tempo

Tabela 1. Crescimento e viabilidade de células-troncos mesenquimais derivadas da medula óssea submetidas ou não à irradiação a laser em diferentes momentos do estudo

	Controle	Laser 0,5	Laser 1,0	Valor de p*		
				Controle versus 0,5	Controle versus 1,0	0,5 versus 1,0
T0	0,8±0,3 100%	0,8±0,3 100%	1,0±0,0 93,4%	0,9266	0,0705	0,0705
T24	1,8±0,3 100%	2,8±0,3 94,9%	3,8±0,3 96,8%	0,0039**	0,0039**	0,0039**
T48	2,8±0,3 100%	3,5±0,0 97,8%	4,3±0,8 98,5%	0,0024**	0,0039**	0,0705
T72	3,0±0,0 98,6%	3,8±0,3 100%	4,0±0,0 100%	0,0024**	0,0013**	0,0705

Valores do crescimento celular relatados por médias±desvio padrão; viabilidade relatada por porcentagem de células viáveis. Não se observaram diferenças significativas na viabilidade celular.
*Teste de Mann-Whitney; ** diferença significativa (p<0,01).

Tabela 2. Crescimento e viabilidade de células-troncos mesenquimais derivadas do adiposo derivado submetidas ou não à irradiação a laser em momentos diferentes do estudo

	Controle	Laser 0,5	Laser 1,0	Valor de p*		
				Controle versus 0,5	Controle versus 1,0	0,5 versus 1,0
T0	2,5±0,5 100%	3,5±0,5 100%	3,3±0,3 93,8%	0,0239**	0,0239**	0,4871
T24	4,9±0,9 98,1%	3,3±0,3 94,4%	4,0±1,1 100%	0,0041**	0,3674	0,4871
T48	6,7±0,6 98%	7,0±1,6 95,9%	8,0±1,1 100%	0,8671	0,0383**	0,1613
T72	7,5±0,8 96,8%	6,8±0,8 96,9%	9,8±1,4 100%	0,1659	0,0084**	0,0039**

Valores do crescimento celular relatados por médias±desvio padrão; viabilidade relatada por porcentagem de células viáveis. Não se observaram diferenças significativas na viabilidade celular.
*Teste de Mann-Whitney; ** diferença significativa (p<0,05).

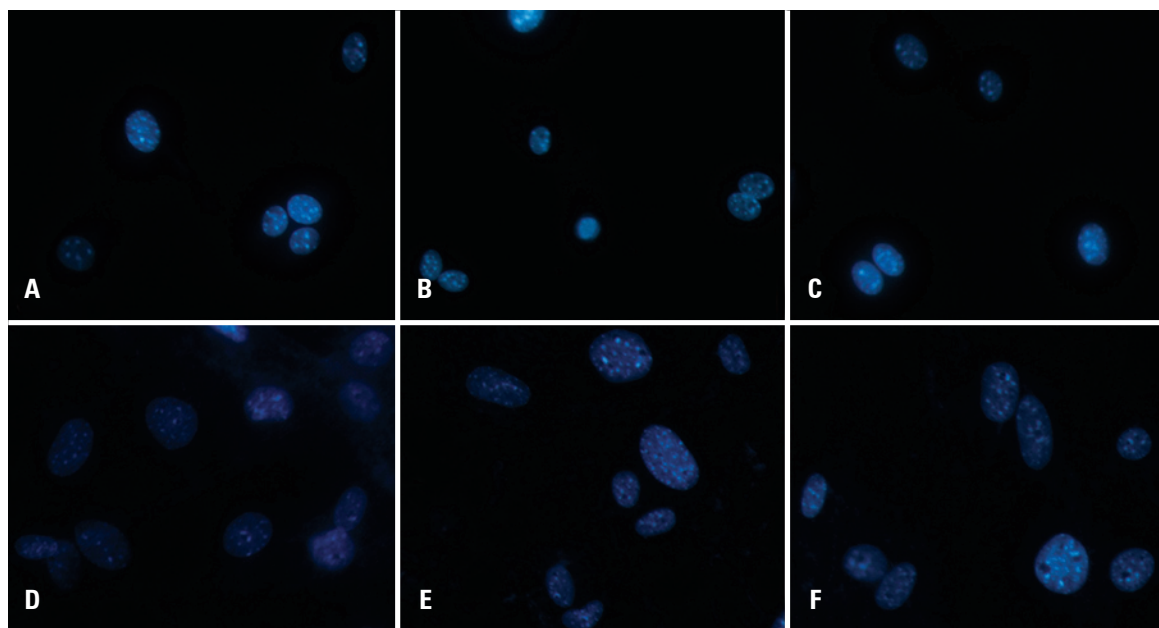


Figura 4. Micrografia de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (A a C) e do tecido adiposo (D a F) corada com DAPI, mostrando ausência de mudanças nucleares morfológicas. (A e D) Controle; (B e E) laser 0,5J/cm², (C e F) laser 1,0J/cm²

com ambas as doses estimulando o crescimento celular. Não se observou diferença na viabilidade celular (Tabela 1) utilizando o método de exclusão de azul de tripan.

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

A proliferação de ADSCs mostrou tendência de aumento em todos os grupos estudados (Figura 3). Tendência em relação à alta proliferação foi observada no grupo que recebeu irradiação com dose de 1,0J/cm² após 24 horas quando comparado com o grupo controle e o grupo que recebeu irradiação com 0,5J/cm².

A comparação da proliferação celular dos grupos que receberam irradiação a laser mostrou diferença significativa apenas após 72 horas (Tabela 2). A irradiação a laser, utilizando dose de 1,0J/cm², pareceu influenciar positivamente a proliferação de ADSCs. Um comportamento distinto foi observado ao longo do tempo quando a média de proliferação celular foi comparada entre os grupos que receberam irradiação a laser e o grupo controle (Tabela 2). O ensaio de exclusão com azul de tripan não mostrou diferença na viabilidade celular nos grupos estudados.

Efeito de irradiação a laser no núcleo celular

Não foi detectada mudança nuclear (fragmentação nuclear ou núcleo picnótico) nas BMMSCs ou ADSCs (Figura 4).

DISCUSSÃO

O LBI é utilizado para estimular a proliferação e a diferenciação de diversos tipos de células.^(4,6,9,11,23) Porém, a bioestimulação não é sempre observada, devido a uma variedade de fatores que influenciam no processo.⁽²⁴⁾ Nesse sentido, a bioestimulação *in vitro* depende de parâmetros relacionados ao laser, como o comprimento da onda, dose, potência e tempo de irradiação,^(11,23,25) tipo de célula irradiada,⁽²⁶⁾ e características fisiológicas de células no momento da irradiação.^(23,25) Como consequência desses fatores, a interação da luz do laser com células e tecidos pode estimular ou inibir a proliferação celular.

Pinheiro et al.⁽²⁷⁾ recomendou baixas doses para irradiação da mucosa e das feridas, já que a absorção e a propagação da luz são maiores em razão da falta de uma barreira óptica. De acordo com os autores, estudos *in vitro* normalmente refletem as mesmas condições como observado em feridas abertas, *i.e.*, a falta de uma barreira óptica e baixas doses, sendo, portanto, indica-

dos em caso de bioestimulação. Baseado nessa hipótese, as doses de 0,5 e 1,0J/cm² foram utilizadas no presente estudo devido ao objetivo de estimular a proliferação de BMMSCs e ADSCs. De acordo com Karu,⁽²⁸⁾ a dose aumenta os danos aos fotorreceptores, que reduzem o efeito biomodular do laser, como resultado da inibição do metabolismo e consequente morte celular. Kreisler et al.⁽¹¹⁾ apoiaram essa hipótese, demonstrando que a irradiação a laser utilizando uma dose de 4,0J/cm² exerceu efeito estimulante na proliferação celular, enquanto altas doses parecem exercer um efeito negativo nesse processo biológico.

Estudos investigando os efeitos da irradiação a laser em células-troncos têm mostrado que a terapia pode aumentar a proliferação celular^(18,21) e contribuir para diferenciação dessas células.^(18,29) Comprimentos de onda de 600 a 700nm foram utilizados quando o objetivo foi estimular a proliferação e diferenciação celular.⁽¹³⁾

Um estudo demonstrou que a irradiação de ADSCs em humanos utilizando um laser com comprimento de onda de 635nm e dose de 5,0J/cm² influenciou positivamente a proliferação e a viabilidade celular, também como a expressão de proteínas, tal como o fator de crescimento epidérmico.⁽⁶⁾ Tais resultados corroboram os achados do presente estudo, que mostram um número aumentado de células. Todavia, baixas doses foram utilizadas (0,5 e 1,0J/cm²), o que suscitou respostas similares àquelas relatadas na literatura. Acreditamos que as baixas doses reduzem o risco de dano celular e promovem a proliferação de células-tronco, que mantêm suas características iniciais intactas. Além disso, a terapia a laser mostrou efeito dose-dependente no presente estudo, como indicado pela taxa alta de proliferação de BMMSCs e ADSCs, quando irradiadas com a dose de 1,0J/cm², comparadas com 0,5J/cm². Stein et al.⁽¹⁹⁾ observaram que LBI utilizando um comprimento de onda de 670nm e doses de 1,0 e 2,0J/cm² exerceu um efeito biomodular positivo no crescimento e na diferenciação de osteoblastos humanos durante as primeiras 72 horas após irradiação. Os melhores resultados foram obtidos com dose de 1,0J/cm² que concordou com os achados do presente estudo, mostrando alta proliferação de BMMSCs e ADSCs tratadas com uma dose de 1,0J/cm² ao longo do mesmo período de tempo (72 horas).

Moore et al.⁽²⁶⁾ estudaram o efeito da irradiação a laser em diferentes comprimentos de ondas (625, 635, 645, 655, 665, 675 e 810nm) em dois tipos de células (fibroblastos e células endoteliais) por meio da avaliação das taxas de proliferação de células após 72 horas de cultura. Os autores encontraram um aumento no crescimento de células endoteliais em todos os comprimentos de onda testados. O mesmo foi observado em

fibroblastos, exceto no comprimento da onda de 810nm. Resultados similares em relação à proliferação de fibroblastos foram relatados por Evans e Abrahamse,⁽³⁰⁾ que avaliaram comprimentos de onda de 632,8 e 830nm. Esses autores observaram maior estimulação efetiva da proliferação de fibroblastos em células tratadas com laser 632,8nm, sugerindo que a operação de comprimento de onda de laser interferiu na resposta celular. O comprimento da onda utilizado neste estudo (660nm) estava dentro da variação empregada em estudos de bioestimulação e, como relatado na literatura, observou-se um efeito positivo na proliferação das células testadas.

Bouvet-Gerbettaz et al.⁽⁹⁾ analisaram a influência de LBI na proliferação e diferenciação de BMMSCs na suspensão e observaram a presença de unidades de colônias de tamanho médio (diâmetro <0,5mm) no grupo controle e no grupo tratado com laser após 7 dias, sem diferença significativas entre os grupos. Esses resultados discordam do presente estudo, que observou diferenças significativas na taxa de proliferação de BMMSCs e ADSCs, entre o grupo controle e o que recebeu irradiação. Os fatores que podem ter influenciado a falta de uma diferença no estudo de Bouvet-Gerbettaz et al.⁽⁹⁾ incluem o comprimento da onda (808nm), a dose utilizada (4,0J/cm²), e o desenho do estudo. Como discutido anteriormente, os comprimentos de onda fora da variação de 600 a 700nm e as altas doses de irradiação podem exercer efeitos inibitórios na proliferação celular.^(13,23,25)

Neste estudo, BMMSCs responderam à terapia a laser de uma forma dose-dependente. Uma curva de proliferação celular similar nas duas doses testadas (0,5 e 1,0J/cm²) e uma ação cumulativa dessas doses foram observadas ao longo do tempo. Todavia, uma taxa alta de proliferação foi observada para células irradiadas com 1,0J/cm², especialmente após 24 horas de cultura. As ADSCs responderam melhor à dose de irradiação de 1,0J/cm², com alta proliferação celular sendo observada após 48 e 72 horas de cultura. Esses resultados concordam com a sugestão de alguns pesquisadores de que a ação do laser é diretamente relacionada à dose de irradiação, ao estado fisiológico da célula, à linhagem celular e ao comprimento da onda utilizada.^(20,23)

A linhagem celular utilizada é um fator que influencia o efeito da terapia a laser. Nesse sentido, de Villiers et al.⁽⁷⁾ avaliaram o efeito de irradiação utilizando um laser diodo de 636nm em dose de 5,0J/cm² na proliferação de ADSCs em humanos. Os autores utilizaram uma linhagem celular obtida durante a cirurgia e uma linhagem celular comercial, sendo obtidos resultados distintos. Não foi observada diferença significativa na

proliferação da linha comercial em nenhum momento do estudo (24, 48 e 72 horas). Em contraste, foram observadas diferenças significativas na proliferação celular em 24 e 72 horas após irradiação entre as células obtidas durante a cirurgia e o controle não irradiado. Hou et al.⁽²⁹⁾ utilizaram LBI para aumentar a taxa de proliferação de BMMSCs pela aplicação de doses de irradiação de 0,5, 1,0, 2,0 e 5,0J/cm² com laser 635nm; os autores encontraram diferenças significativas na citotoxicidade entre os grupos que receberam irradiação e os que não receberam. Porém, as BMMSCs irradiadas apresentaram taxa de proliferação altamente mais significativa do que as células controle. A dose de 0,5J/cm² mostrou-se mais efetiva; porém, o tempo de avaliação foi maior naquele estudo. Todavia, os resultados concordam com os do presente estudo em que o percentual de células foi significativamente mais alto para BMMSCs irradiadas, quando comparado ao grupo controle.

Tuby et al.⁽²¹⁾ demonstraram que a terapia de laser promove uma proliferação de CTMs e células-troncos cardíacas *in vitro*. Nesse estudo, as células foram irradiadas com laser diodo 804nm (AsGa) em doses de 1,0 a 3,0J/cm², e a proliferação de dois tipos de célula foi significativamente maior após a irradiação a laser, quando comparada com o grupo controle, que não recebeu irradiação. As doses utilizadas não induziram a efeitos adversos nas células, fato que também foi observado em nosso estudo, onde nenhuma alteração compatível com o dano no DNA, tal como núcleo picnótico ou fragmentado, foi detectada nas células submetidas à terapia a laser. Porém, outras alterações, como deleções ou translocações cromossômicas, não podem ser excluídas por esse método portanto a cariotipagem é essencial para futuros estudos.

CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o laser de baixa intensidade promoveu a proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e do tecido adiposo. Devido às células-troncos isoladas de fontes diferentes geralmente apresentarem um percentual baixo e baixa taxa de proliferação, o laser de baixa intensidade pode ser uma ferramenta útil para engenharia tecidual utilizando células-tronco. Nesse sentido, a terapia a laser permite o aumento significativo no número inicial de células-tronco antes da diferenciação, aumentando, com isso, o número de células diferenciadas para engenharia e regeneração teciduais, e processos de cicatrização. Porém, outros estudos são necessários para padronizar os parâmetros do laser e testar outros tipos celulares, visando melhorar o rendimento das células em cultura.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2012;27(2):423-30.
3. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-301.
4. Eduardo Fde P, Bueno DF, de Freitas PM, Marques MM, Passos-Bueno MR, Eduardo Cde P, et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2008;40(6):433-8.
5. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.
6. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):33-9.
7. de Villiers JA, Hourelid NN, Abrahamse H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. *Stem Cell Rev.* 2011;7(4):869-82.
8. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009;16(1):4.
9. Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med.* 2009;41(4):291-7.
10. Zhang L, Xing D, Gao X, Wu S. Low-power laser irradiation promotes cell proliferation by activating PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):553-62.
11. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low-level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002;30(5):365-9.
12. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med. Sci.* 2012;27(1):237-49. Review.
13. Wilden L, Karthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg.* 1998;16(3):159-65.
14. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 1994;59(2):167-70.
15. Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, Franquin JC, et al. Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol.* 1990;137(1):171-8.
16. Steinlechner C, Dyson M. The effects of low-level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Ther.* 1993;5:65-73.
17. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium-neon laser irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996;107(4):593-6.
18. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-Level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(2):161-6.
19. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(3-4):112-7.
20. Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(4):275-80.
21. 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.
22. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 2009;4(1):102-6.
23. de Castro JL, Pinheiro AL, Werneck CE, Soares CP. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(6):586-9.
24. Karu TI. *Biomedical Photonics Handbook. Low-power laser therapy.* Moscow: CRC Press LLC; 2003.
25. Werneck CE, Pinheiro AL, Pacheco MT, Soares CP, de Castro JL. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(3):300-3.
26. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* 2005;36(1):8-12.
27. Pinheiro AL, Brugnera Júnior A, Zanin FA. *Aplicação do laser na odontologia.* São Paulo: Santos; 2010.
28. Karu TI. *Photobiological fundamentals of low-power laser therapy.* J Quantum Electron. 1987;23:1703-17.
29. 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;40(10):726-33.
30. Evans DH, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008;24(4):199-210.