

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS VERO *IN VITRO* SUBMETIDAS À TERAPIA LASER EM BAIXA INTENSIDADE

G.V. Scocca*, C.B. Lombello* e P.A. Ana*

*Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, Brasil

e-mail: gabriel.scocca@aluno.ufabc.edu.br

Resumo: A literatura indica que a terapia com laser em baixa intensidade (*LILT*) apresenta a capacidade de aumentar o metabolismo celular. Sendo assim, este estudo avaliou os efeitos da *LILT* na proliferação e na viabilidade de células Vero, com características de fibroblastos, cultivadas sob estresse nutricional a 37° C e 5% de CO₂. As células foram aleatoriamente distribuídas em três grupos experimentais: G1 - controle positivo (sem tratamento e sem estresse nutricional, cultivado com 10% de soro fetal bovino); G2 - controle negativo (sem tratamento e sob condição de estresse nutricional, cultivado com 5% de soro fetal bovino); e G3 - grupo tratado (*LILT*, 660 nm, 40 mW, 6 J/cm², cultivadas com 5% de soro fetal bovino). As análises de proliferação e viabilidade celular foram feitas 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento do grupo G3, através da técnica de contagem celular. Nos mesmos períodos, avaliou-se a morfologia das células em microscopia invertida por contraste de fase. A análise estatística foi efetuada, considerando-se o nível de significância estatística de 5%. O grupo tratado manteve maior número de células que os controles ao longo dos três dias de análise, além de manter a viabilidade destas células. Ademais, a morfologia das células tratadas não foi alterada negativamente ao longo de todo o período de análises. Desta forma, conclui-se que a *LILT* (sob os parâmetros utilizados neste estudo) atua significativamente na proliferação e viabilidade de células em situação de estresse nutricional, sem causar efeitos prejudiciais à morfologia das mesmas.

Palavras-chave: Laser em baixa intensidade, proliferação celular, viabilidade celular.

Abstract: *The literature indicates that low intensity laser therapy (LILT) has the capability of increasing the cellular metabolism. Therefore, this research evaluated the effects of LILT on the proliferation and viability of Vero cells cultivated under nutritional stress at 37°C and 5% of CO₂. The cells were randomly distributed into three experimental groups: G1 - positive control (no treatment and no nutritional stress, cultivated with 10% of fetal bovine serum); G2 - negative control (no treatment and with nutritional stress condition, cultivated with 5% of fetal bovine serum); G3 - treated group (LILT, 660 nm, 40 mW, 6 J/cm², cultivated with 5% fetal bovine serum). The tests of cell proliferation and viability were made 24 h, 48 h and 72 h after the*

treatment, using the counting cells technique. At the same periods, the cells morphology was evaluated by inverted phase contrast microscopy. The statistical analysis was performed at 5% significance level. The greatest number of cells was observed in treated group when compared to the control groups, in all observed periods. Also, LILT kept the viability of these cells under nutritional stress, causing no injurious effects to the cell morphology. In this way, it can be concluded that LILT, under the parameters used in the present study, acts significantly on the proliferation and viability of cells under nutritional stress without deleterious effects on their morphology.

Keywords: *Low intensity laser, cellular proliferation, cellular viability.*

Introdução

Há diversas situações em que se deseja acelerar o processo de reparação tecidual, diminuindo o tempo de recuperação após traumas (cirúrgicos ou acidentais) assim como as chances de infecção. Assim, a terapia com laser em baixa intensidade (*LILT – Low Intensity Laser Therapy*) tem se mostrado uma excelente forma de acelerar a cicatrização de tecidos duros e moles, além de ter efeitos de analgesia e modulação do processo inflamatório [1,2].

Estudos têm demonstrado a capacidade da *LILT* em estimular a síntese e deposição de matriz colagênica, além de induzir a síntese de enzimas e causar o aumento da atividade mitocondrial, migração e proliferação celular [3-5]. Visto que os fibroblastos – células encontradas abundantemente em tecidos conjuntivos – atuam de forma essencial na manutenção e renovação do colágeno nos tecidos, bem como em processos de cicatrização, é interessante que se conduzam estudos capazes de investigar a atuação da *LILT* neste tipo celular [6]. Desta forma, a cultura de células tem sido uma ferramenta de extrema relevância, pois permite a realização de diversos tipos de análise capazes de fornecer importantes informações a cerca de diferentes parâmetros do metabolismo celular [7].

Quando se trata de aplicações clínicas, a *LILT* ainda apresenta limitações. Isto se deve, principalmente, à não padronização de parâmetros para a irradiação laser. As pesquisas divergem significativamente quanto à potência, densidade de energia, tempo de aplicação,

número de repetições e na forma de irradiar as amostras, tornando difícil a obtenção de um protocolo bem definido que seja eficiente e seguro para as inúmeras aplicações clínicas. Deste modo, este estudo *in vitro* procurou avaliar os efeitos da *LILT*, com parâmetros previamente definidos, na proliferação e viabilidade de células da linhagem Vero.

Materiais e métodos

Delineamento experimental – Para a realização do estudo, células da linhagem Vero (oriundas de células de rim de epitélio de macaco verde africano – *Cercopithecus aethiops*) foram aleatoriamente distribuídas nos seguintes grupos experimentais: G1 – controle positivo, células cultivadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e sem tratamento; G2 – controle negativo, células cultivadas sob estresse nutricional com 5% de SFB e sem tratamento; G3 – grupo tratado, células cultivadas sob estresse nutricional com 5% de SFB e submetidas à irradiação laser. As análises foram realizadas em triplicata 24 h, 48 h e 72 h após as células do G3 terem sido submetidas à laserterapia. A análise estatística foi efetuada nos dados de proliferação celular, após a verificação dos pressupostos de normalidade e homogeneidade dos dados experimentais obtidos, sendo empregada a análise de variância + teste *post hoc* de Tukey, considerando-se o nível de significância estatística de 5%. Para tal, foi empregado o software BioStat 5.0.

Cultura de células – Células da linhagem Vero (Adolfo Lutz, São Paulo) foram cultivadas em meio HAM F10, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina, mantendo a temperatura em 37° C e 5% de CO₂. As trocas de meio foram realizadas semanalmente, com repiques dois dias antes e dois dias após cada troca de meio devido à confluência da monocamada de células. No período de experimentação, as células foram inoculadas em placas de 96 poços, sendo que as células dos grupos G2 e G3 foram submetidas à condição de estresse nutricional, onde o meio de cultura HAM F10 continha apenas 5% de SFB, mantendo os 100 µg/ml [8]. As culturas foram acompanhadas através de observações em microscópio invertido por contraste de fase (Axiovert A1 / Zeiss, Alemanha). Para as análises de proliferação e viabilidade celular, foi necessário o cultivo de 3,0x10⁴ células/poço por 24 h em placas de 96 poços. Todas as culturas foram realizadas em triplicata, em poços distantes uns dos outros.

Tratamento com *LILT* – Para o tratamento das células do grupo G3, foi utilizado o laser de diodo em baixa intensidade com meio ativo de arseneto de gálio alumínio (GaAlAs – Ortho Laser, DMC Equipamentos, São Paulo), de comprimento de onda de 660 nm, modo contínuo, potência de 40 mW, com diâmetro do feixe igual a 0,65 cm e densidade de energia de 6 J/cm². Para garantir que a potência efetivamente utilizada fosse 40 mW, utilizou-se um medidor de potência e energia (Field Master, Coherent, USA) ajustado ao

comprimento de onda em questão. A medida da potência foi realizada com uma tampa de placa de cultura (mesmo material e espessura do fundo do poço da placa de cultivo, os quais possuem fundo chato com 0,653 cm de diâmetro – medido com paquímetro digital) entre o laser e o medidor, considerando-se, assim, a redução de potência devido à presença da placa. O método utilizado para a realização da aplicação do laser nos poços de cultura foi padronizado, de forma que se irradiou sob a forma pontual (modo desfocado) a superfície inferior da placa (com o feixe do laser de mesmo diâmetro do fundo dos poços de cultura), com a ponta de emissão do laser a 1 mm de distância da camada de células (correspondente à espessura do fundo da placa, medida com paquímetro digital). Realizou-se uma única sessão de irradiações, com duração de 50 s em cada poço de cultura. A fim de evitar que quaisquer fótons provenientes da irradiação laser atingissem as células dos grupos controle (G1 e G2), foram utilizadas duas placas cultura. Em uma das placas foram cultivadas as células de G1 e G2, enquanto que na outra placa foram cultivadas apenas as células do G3. Ainda assim, as células foram cultivadas em poços distantes uns dos outros evitando-se interferências do tratamento de um poço adjacente.

Análise da proliferação e viabilidade celular – A proliferação e a viabilidade celular (definida como a porcentagem de células viáveis em relação ao total de células em cultura) foram avaliadas nos períodos de 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento. A contagem das células foi realizada através da ressuspensão das células com a tripsina e coradas com corante vital azul, utilizando-se a câmara de Neubauer. Na análise de proliferação celular, utilizou-se como método a contagem de suspensão celular e a análise por MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), sendo as placas lidas em leitor de Elisa ($\lambda = 630$ nm). Para a análise da viabilidade celular, as células foram ressuspensas com solução de tripsina (0,25%) e coradas com corante vital azul de tripan. Foi avaliada a porcentagem de células viáveis em relação a porcentagem total de células em cultura ao microscópio invertido. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análises morfológicas – A observação das células para a avaliação da sua morfologia ao longo do período de experimentação foi realizada através de microscopia invertida por contraste de fase.

Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados das contagens celulares, além da diferenciação estatística apresentada por estes. Os dados evidenciam a manutenção da concentração celular nos poços irradiados ao longo de todo o experimento, havendo um aumento no primeiro dia após a irradiação, com posterior diminuição. Ainda assim, o valor da concentração celular do Grupo 3 foi superior aos grupos controles nos três dias de análise.

Tabela 1 - Concentração celular (células/poço) nos períodos 24 h, 48 h e 72 h após o tratamento com LILT*.

	Dia 1 (0 h) (célus/poço) $\times 10^2$	Dia 2 (24 h) (célus/poço) $\times 10^2$	Dia 3 (48 h) (célus/poço) $\times 10^2$	Dia 4 (72 h) (célus/poço) $\times 10^2$
Grupo 1	300,0	-----	(160,0 \pm 21,2) (a) 00	(80,0 \pm 21,2) (b)
Grupo 2	300,0	(112,0 \pm 36,7) (a)	(71,3 \pm 22,1) (b)	(32,0 \pm 16,0) (c)
Grupo 3	300,0	(324,0 \pm 21,6) (d)	(294,0 \pm 24,0) (d)	(184,0 \pm 17,4) (e)

*Entre parênteses, letras diferentes evidenciam médias estatisticamente distintas de acordo com o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Na Tabela 2 encontram-se os valores referentes à viabilidade celular. Nota-se que o tratamento com LILT não resulta na queda da viabilidade celular ao longo dos dias de experimentação, ao contrário, causando um aumento no percentual das células viáveis mesmo sob estresse nutricional. Entretanto, as células cultivadas sob estresse nutricional (G2) apresentaram significativa diminuição na viabilidade, quando comparadas ao grupo sem tratamento e sem estresse nutricional (G1).

Tabela 2 - Porcentual médio da viabilidade celular de cada grupo experimental em cada um dos dias analisados.

	Dia 2 (24 h)	Dia 3 (48 h)	Dia 4 (72 h)
Grupo 1	-	93,65%	94,32%
Grupo 2	93,33%	83,78%	72,22%
Grupo 3	95,29%	98,99%	100%

O gráfico da Figura 1 ilustra a proliferação das células ao longo do tempo. É possível notar que o número de células do grupo tratado manteve-se constante em até 48 horas após o tratamento, tendo uma redução significativa em 72 horas quando comparado com o valor original. Nos demais grupos, contudo, observou-se uma significativa redução no número de células já em 24 horas após cultivo, sendo este decréscimo constante ao longo dos dias avaliados.

Para apresentar os resultados das análises morfológicas, optou-se por selecionar uma fotomicrografia representativa de cada grupo experimental em cada um dos dias de análise, mostradas na Figura 2. É possível observar células em processo de adesão, arredondadas (*). Além disso, pode-se observar células alongadas, parte da monocamada (\rightarrow) e células em suspensão (\blacktriangleright). Tal fato evidencia que não há diferenças morfológicas induzidas pela LILT, em nenhum dos períodos avaliados neste estudo.

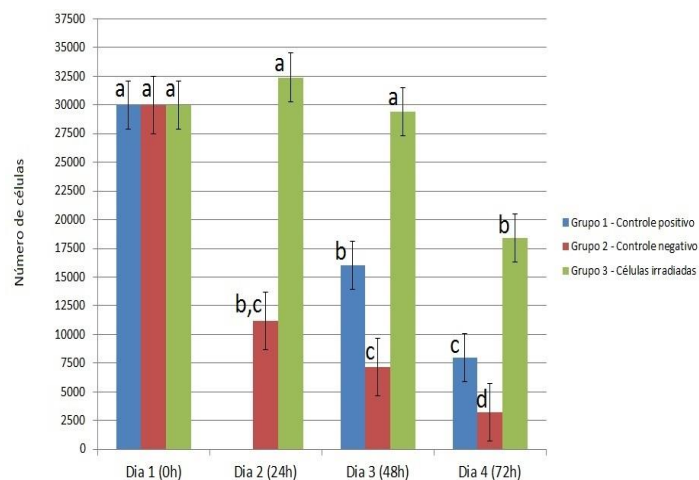


Figura 1 – Número médio de células em cada grupo experimental em cada dia de experimentação. As barras indicam desvio padrão. Letras distintas indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

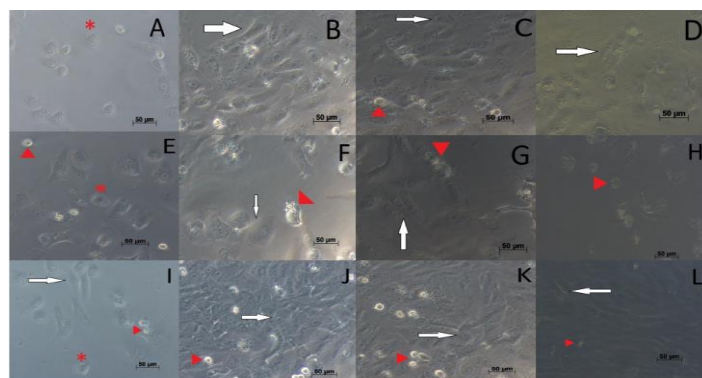


Figura 2 - Fotomicrografias representativas das células Vero, de cada grupo experimental, nos diferentes tempos de avaliação. **A, B, C, D:** G1 (controle positivo) 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após irradiação, respectivamente. **E, F, G, H:** G2 (controle negativo) 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após irradiação, respectivamente. **I, J, K, L:** G3 (células tratadas) 0 h, 24 h, 48 h e 72 h após irradiação, respectivamente. A escala utilizada em todas as micrografias foi de 50 µm.

Discussão

Apesar de se encontrar publicações mostrando que a LILT pode ter efeitos positivos sobre o cultivo de células, ainda não se sabe quais parâmetros de irradiação são mais adequados para cada tipo celular em cada situação específica. Neste estudo, pôde-se observar a atuação da LILT em células Vero em relação à proliferação, viabilidade e morfologia celular.

Em relação à proliferação, inicialmente todos os grupos apresentavam a mesma concentração celular. Porém, nas primeiras 24 h após o tratamento das células do Grupo 3 já é possível notar um aumento de 289,2% ($p < 0,01$) na concentração das células irradiadas em

relação às células do Grupo 2. Infortunadamente, as células do Grupo 1 que seriam utilizadas para as análises de 24 h não puderam ser completamente ressuspendidas da placa de cultura, tendo os resultados para estes poços sido descartados. A contagem realizada 48 h após as irradiações mostrou uma diferença estatística significativa entre os grupos controle (G1 e G2), ao nível de 5%. Neste mesmo período, as células tratadas do Grupo 3 apresentaram uma concentração significativamente maior que os grupos G1 ($p < 0,05$) e G2 ($p < 0,01$). Finalmente, 72 h após a realização do tratamento, o número de células por poço do grupo de células irradiadas (G3) é significativamente maior que no controle positivo ($p < 0,05$) e no controle negativo ($p < 0,01$).

Após 72 h foi possível observar que o grupo tratado apresentou um decréscimo significativo na concentração celular em relação aos períodos de 24 h ($p < 0,01$) e 48 h ($p < 0,05$), o que permite sugerir que uma nova sessão de irradiação seja realizada 72 h após a primeira para que os benefícios do tratamento sejam prolongados. Estes resultados estão de acordo com os apresentados em [9], visto que houve um aumento significativo na proliferação das células tratadas em relação ao grupo controle nos períodos de 48 h e 72 h.

Quanto à viabilidade celular, os resultados indicam que os parâmetros utilizados no tratamento com *LILT* mantiveram os percentuais de viabilidade das células irradiadas superiores aos valores obtidos para as células do controle positivo (G1) e do controle negativo (G2) em todos os dias de análise. Estes resultados acordam com os apresentados em [10], onde o comprimento de onda utilizado também foi de 660 nm e a densidade de energia empregada foi de 5 J/cm^2 , muito próxima da utilizada no presente estudo (6 J/cm^2).

No primeiro dia de análise, as células dos três grupos experimentais apresentavam-se com morfologia semelhante (Figura 2). Nos períodos de 24 h e 48 h, as células dos três grupos apresentam morfologia característica de células aderidas, com a diferença de que as células do grupo controle negativo (G2) apresentam-se mais espalhadas que as células dos demais grupos, devido a sub confluência da monocamada. A morfologia característica de fibroblastos e monocamada celular foram observados ao longo de todo o experimento nos grupos G1 (controle) e G3 (estresse mas com aplicação de *LILT*), enquanto que as células do grupo G2 (cultivadas sob estresse nutricional e sem aplicação de *LILT*), apresentaram alterações morfológicas importantes, em concordância com os resultados publicados na literatura [10]. Isto mostra que o tratamento com *LILT* sob os parâmetros de irradiação aqui apresentados afetam positivamente a viabilidade celular por um período de até 72 h.

Conclusão

Concluiu-se que a *LILT*, sob os parâmetros aqui utilizados, trata-se de uma alternativa promissora para o tratamento de células em condição de estresse

nutricional, aumentando a proliferação e a viabilidade das mesmas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa de Iniciação Científica da UFABC pelo financiamento do trabalho.

Referências

- [1] Anneroth G, Ryden H, Zetterqvist L. The effect of low energy infra-red laser irradiation on wound healing in rats. *Brit J Oral Maxfac Surg*. 1998;26:12-7.
- [2] Reddy, GK. Photobiological basis and clinical role of low intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(2):141-50.
- [3] Koutná M, Janisch R, Veselska R. Effects of low-power irradiation on cell proliferation. *Scripta Medica (BRNO)*. 2003; 76: 163-72.
- [4] Zungu IL, Evans DH, Abrahamse H. Mitochondrial responses of normal and injured human skin fibroblasts following low level laser irradiation – an in vitro study. *Photochem Photobiol*. 2009;85:987-996.
- [5] Karu T, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effect of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med*. 2005; 36: 307-14.
- [6] Junqueira LC, Carneiro J. *Tecidos Conjuntivos. Histologia Básica*. 6ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara; 1985, p. 87-117.
- [7] Luisi SB., Barbachan JJD, Chies JAB, Filho MS. A cultura de células como ferramenta para estudos do comportamento pulpar. *Rev Fac Odonto*. 2004; 45(1): 3-8.
- [8] Genari SC, Gomes L, Wada MLF. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biol Inter*. 1998; 22(4): 285-294.
- [9] Frozanfar A, Ramezani M, Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Arbab HR. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. *Iranian J Basic Med Sci*. 2013;16:1071-1074.
- [10] Ayuk SM, Houreld NN, Abrahamse H. Collagen production in Diabetic Wounded Fibroblasts in Response to Low-Intensity Laser Irradiation at 660 nm. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2012; 14: 1110-1117.