

Artigo original**Efeito do laser em baixa intensidade sobre a proliferação de osteoblastos cultivados em modelo de simulação de infecção*****Effect of low level laser therapy on the proliferation of osteoblasts cultured in an infection simulation model***

Tabara Santos de Oliveira*, Victor Perez Teixeira*, Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari, D.Sc.**, José Antonio Silva Jr., D.Sc.**, Sandra Kalil Bussadori, D.Sc.**, Kristianne Porta Santos Fernandes, D.Sc.**, Marcelo Betti Mascaro, D.Sc.***

.....
*Aluno do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, São Paulo/SP, **Professor do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo/SP, ***Professor do curso de Odontologia da UNINOVE, São Paulo/SP

Resumo

A destruição tecidual associada aos quadros de osteomielite está relacionada aos constituintes e aos produtos dos microorganismos infectantes e à ativação de células do próprio tecido e do sistema imunológico. O lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede de bactérias gram-negativas, é um potente indutor de reabsorção óssea. Por outro lado, o laser em baixa intensidade (LBI) tem sido utilizado em tecidos ósseos com o intuito de acelerar o processo de reparo. Este estudo avaliou os efeitos do LBI sobre a proliferação de osteoblastos cultivados em situação de simulação de infecção. Para tanto, osteoblastos da linhagem OSTEO-1 (derivados de calvária de ratos), cultivados na presença LPS (*E.coli*), foram irradiados com LBI (Ga-Al-As, 780 nm, 10 mW, 12s, 0,12 J, 3 J/cm²) e submetidos a ensaios de proliferação em períodos de 1, 3 e 5 dias (MTT). Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em relação à proliferação celular. Nos parâmetros e períodos avaliados, o LPS e o LBI não foram capazes de alterar a proliferação de osteoblastos cultivados em situação de simulação de infecção, sugerindo que outros tipos celulares devem estar envolvidos nos processos de reabsorção e de reparo ósseo ligados a infecções e a utilização do LBI.

Palavras-chave: osteomielite, terapia a laser de baixa intensidade, osteoblastos.

Abstract

The tissue destruction associated with bone infection is related to the constituents of infectious microorganisms, their products and the activation of secretory cells of the tissue itself and the immune system. The lipopolysaccharide (LPS), wall component of gram-negative bacteria, is a potent inducer of bone resorption. On the other hand, the low level laser therapy (LLLT) has been used in bone tissue in order to accelerate the repair process. The present study evaluated the effects of LLLT (AsGaAl 780 nm, 3 J/cm², 10 mW, beam spot of 0.04 cm², total energy 0.12 J) on the proliferation of osteoblasts cultured in the presence of LPS. The MTT method was employed to evaluate cell proliferation after 1, 3 and 5 days. The results showed no statistically differences in relation to cell proliferation between the groups. In these parameters, neither LLLT nor LPS were able to change the proliferation of osteoblasts cultured in a infection simulation model, suggesting that other cells types maybe involved in the processes of bone resorption and of bone repair linked to infection and the to LLLT.

Key-words: osteomyelitis, low level laser therapy, osteoblasts.

Recebido em 30 de agosto de 2012; aceito em 28 de março de 2013.

Endereço de correspondência: Kristianne Porta Santos Fernandes, Universidade Nove de Julho, Curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação, Av. Francisco Matarazzo, 612 Barra Funda 05001-100 São Paulo SP; E-mail: kristianneporta@gmail.com

Introdução

Os quadros de osteomielite são em geral dominados por uma flora bacteriana mista, composta em sua maioria por bactérias Gram-negativas [1,2]. Dentre os componentes bacterianos, o lipopolissacarídeo (LPS) da parede de bactérias Gram-negativas tem sido descrito como capaz de alterar o metabolismo ósseo, diminuindo a sua formação e aumentando a sua reabsorção [3-5], porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente estabelecido.

Por um lado, os efeitos do laser em baixa intensidade (LBI) no tecido ósseo são bastante controversos, sendo que as pesquisas mostram resultados diferentes e conflitantes [6,7].

Uma das hipóteses para explicar o efeito do LBI sobre o tecido ósseo seria que a energia laser excita os citocromos, resultando em aumento da atividade celular, maior concentração de ATP, fosfatase alcalina e liberação de cálcio, podendo afetar positivamente este processo [8-11]. Porém, mantêm-se incerto se os efeitos bioestimulantes do LBI sobre o tecido ósseo se devem a um efeito generalizado ou a estimulação dos osteoblastos isoladamente [6,12].

Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do LBI na proliferação de osteoblastos (linhagem OSTEO-1) cultivados na presença de LPS (*E.coli*) em um modelo de simulação de infecção óssea.

Material e métodos

As células OSTEO I [13] foram cultivadas no meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil). Os osteoblastos foram mantidos em estufa a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Tratamento com LPS bacteriano (modelo de simulação de infecção)

O LPS de *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado ao meio de cultura dos grupos experimentais, a fim de obter-se as concentrações finais de 0,1, 1 e 10 µg/ml [14]. Os grupos controle não receberam o tratamento com LPS.

Irradiação laser em baixa intensidade (LBI)

A irradiação laser foi realizada com o aparelho Ga-Al-As Twin-laser (MM Optics, São Carlos, SP, Brasil), que tem área do cabeçote de 0,04 cm², no comprimento de onda de 780 nm. A aplicação foi única, tendo os seguintes parâmetros: 3 J/cm², 10 mW, tempo de aplicação de 12

segundos, 0,12 J [15]. A potência de saída dos lasers foi checada por meio de um medidor de potência LaserCheck (Coherent, Santa Clara, CA, EUA). A irradiação deu-se num tubo de centrifugação contendo o precipitado celular, sendo aplicada de baixo para cima, para que a irradiação atingisse diretamente o precipitado celular com o mínimo de interferência do meio de cultivo, em um único ponto do lado de fora do tubo. O ambiente foi mantido com obscuridade parcial para não haver interferência da luz externa [16-18].

Ensaios de proliferação celular (método MTT)

Após o tratamento com LPS (nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml) e a irradiação laser, os osteoblastos (5x10³) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP, St. Louis, MO, EUA) e mantidos em estufa em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ por períodos de 1, 3 e 5 dias. Após os diferentes períodos de cultivo, foi realizada a retirada do meio de cultura por inversão da placa e lavagem com 100 µl de PBS 1x. Então foi adicionado 50 µl de MTT (0,5 mg/ml em tampão) (Thiazolyl blue – Sigma, St. Louis, MO, EUA) e realizada uma incubação de 3 h a 37°C. Após a incubação, 100 µl de isopropanol foi adicionado em cada poço e a absorbância foi medida a 620 nm usando um leitor de microplacas (Anthos2020, Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria). Os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e os dados de densidade óptica (DO) medidos como absorbância (correspondente à proliferação celular) foram obtidos em quadruplicata e estão representados como médias ± valores de desvio padrão (DV).

Análise dos resultados

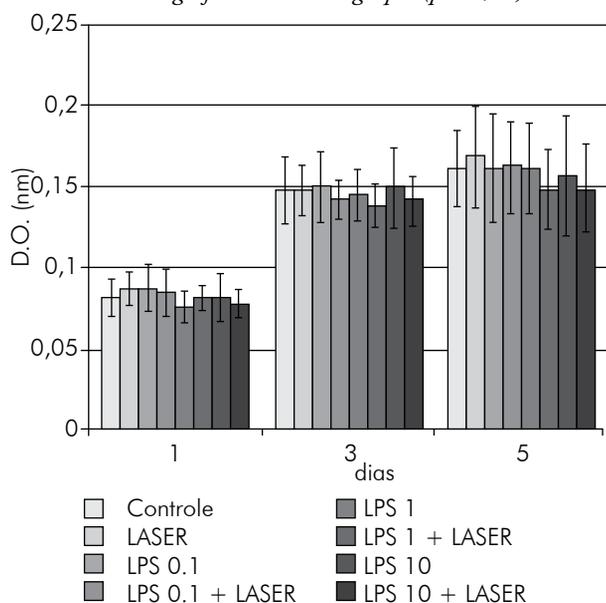
As comparações entre os grupos foram feitas utilizando análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas entre os grupos. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram analisados por meio do programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Resultados

Não houve diferença entre a proliferação celular dos diferentes grupos avaliados, ou seja, controle, irradiados com LBI, tratados com LPS e tratados com LPS associado à irradiação com LBI, nos diferentes períodos avaliados (Figura 1).

Além disso, foi possível verificar que houve um aumento da proliferação celular em função do período de incubação, conforme o esperado (Figura 1).

Figura 1 - Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 1, 3 e 5 dias de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).



Discussão

O efeito do LBI sobre os quadros de osteomielite ainda não foi descrito, deste modo, é importante que possamos obter dados referentes ao mecanismo de ação deste recurso terapêutico neste modelo analisando primeiramente os seus efeitos sobre os diferentes tipos celulares que o compõem. Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar o efeito do LBI em osteoblastos de linhagem, cultivados com LPS, já que este composto bacteriano é um potente indutor de reabsorção óssea, fato este característico da osteomielite.

Os resultados deste artigo demonstram que o LBI não alterou a proliferação de osteoblastos cultivados com LPS advindo de *E.coli* (0,1, 1 e 10 µg/ml) após 1, 3 e 5 dias de cultivo.

Em alguns artigos que descreveram isoladamente o papel do LPS de *E.coli* sobre a proliferação de osteoblastos, este também não altera a proliferação celular, independente da concentração e dos períodos avaliados [1,2,5,14,19], já no trabalho de Wang *et al.* [20], o LPS de *E.coli* usado em baixa concentração (500 ng/mL) foi capaz de estimular a proliferação de osteoblastos MC3T3-E1 após 6 e 12 horas de cultivo. Os nossos resultados com a linhagem OSTEO-1, mostraram que o LPS derivado de *E.coli* não altera a proliferação celular (quando comparado ao grupo controle não tratado) em períodos de cultivo de até 5 dias quando usados nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml.

Já com relação ao LBI, os estudos conduzidos em culturas de osteoblastos utilizando diferentes parâmetros dosimétricos mostram efeito positivo [21-27], inibitório [28,29] ou ainda ausência de efeito [30] em relação à estimulação da proliferação celular.

Assim, buscamos comparar nossos resultados aos obtidos por autores que utilizaram o mesmo diodo emissor, a mesma intensidade e o mesmo comprimento de onda utilizados em nosso estudo, encontramos os artigos de Fujihara *et al.* [31] e de Petri *et al.* [32]

Fujihara *et al.* [31] cultivaram osteoblastos da linhagem OSTEO-1 em situação de carência nutricional (5% SFB) e observaram que, nesta situação experimental, a irradiação laser nos mesmos parâmetros utilizados por nós acarretou um aumento na proliferação celular após 3, 5 e 7 dias de cultivo, utilizando o método exclusão do corante vital azul de Trypan. Os resultados destes autores não podem ser diretamente comparados aos nossos pela diferença na condição nutricional de cultivo das células e também pela diferença na metodologia de avaliação.

Já Petri *et al.* [32] utilizaram o laser de GaAlAs sobre culturas primárias de osteoblastos humanos cultivados sobre titânio. As células foram expostas a doses de 3 J/cm² (780 nm, 70 mW, 9 minutos, aplicação realizada a 12,63 cm da fonte) e após 3 e 7 dias de cultivo, os grupos irradiados também não demonstraram crescimento celular diferente do grupo controle (sendo o crescimento celular aferido pelo método de imunofluorescência). Embora os resultados deste artigo sejam os mesmos aos quais apresentamos, também existe uma diferença metodológica importante no modo de aplicação da irradiação laser e também na aferição dos resultados.

Um artigo recente avaliou o efeito do LBI sobre a adesão e a proliferação (MTT) de linhagem osteoblastos (MG63) derivada de osteosarcoma humano após 1, 2, 8 e 12 horas. A linhagem foi cultivada com LPS de *E.coli*. (dose não informada) e irradiada com laser pulsado (920 nm, 5 e 10 J/cm², 500 mW, área de 0.25 cm², tempo de aplicação de 2,5 e 5 s). Os autores observaram que após 12 horas havia um número significativamente maior de células aderidas nas placas irradiadas, porém este número foi menor que o número de células aderidas após 8 horas de cultivo. Novamente é difícil comparar os resultados obtidos por estes autores com os nossos porque a dose de LPS usada não foi informada e os parâmetros da laserterapia são muito diferentes, além disso, estes autores usaram uma linhagem de células tumorais o que diferem da linhagem utilizada no presente estudo (não tumoral). As linhagens de osteoblastos derivadas de culturas primárias de osteoblastos (MC3T3) e as derivadas de osteosarcoma (MG63) respondem de maneira diferente à laserterapia [28].

Conclusão

Concluindo, os resultados deste estudo sugerem que nas condições experimentais descritas, o LPS advindo de *E. coli*, nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/ml, não altera a proliferação celular de osteoblastos da linhagem OSTEO-1 (em 1, 3 e 5 dias de cultivo) e que o LBI (780 nm, 3 J/cm², 10 mW), por sua vez, também não altera a resposta dos osteoblastos ao LPS no que se refere à proliferação. Assim existe a necessidade de

novos estudos que possam estabelecer se recurso terapêutico pode ou não exercer um papel importante na modulação do processo de reparo na presença de infecções ósseas e qual seria seu mecanismo de ação.

Agradecimentos

Agradecemos a Profa. Dra. Márcia Marques Martins da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) pela doação da linhagem celular OSTEO-1.

Referências

- Deller-Quinn M, Perinpanayagam, H. Osteoblast expression of cytokines is altered on MTA surfaces. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(2):302-7.
- Jung WK, Park IS, Park SJ, YEA SS, Choi YH, Oh S, Park SG, Choi IW. The 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits LPS-stimulated AKT and NF-kappaB activation and suppresses interleukin-6 in osteoblast-like cells MC3T3E-1. *Life Sci* 2009;85(1-2):46-53.
- Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 1970;168:862-4.
- Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 1996;64(7):2371-80.
- Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanakab H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 2009;54(2):146-55.
- Martinez MEM, Pinheiro AL, Ramalho LM. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. *Lasers Med Sci* 2008;23(3):313-7.
- Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci* 2003;18(2):89-94.
- Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988;17(6):388-91.
- Carrillo JS, Calatavud J, Manso FJ, Barberia E, Martinez JM, Donado M. A randomized double-blind clinical trial on the effectiveness of helium-neon laser in the prevention of pain, swelling and trismus after removal of impacted third molars. *Int Dent J* 1990;40(1):31-6.
- Fernando S, Hill CM, Walker R. A randomised double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower third molar teeth. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1993;31(3):170-2.
- Freitas IGF, Baranauskas V, Cruz-HO Fling MA. Laser effects on osteogenesis. *Appl Surf Sci* 2000;154-155:548-54.
- Pinheiro AL, Gerbi MEM. Photobioengineering of the bone repair process. *Photomed Laser Surg* 2006;24(2):169-78.
- Deboni NCZ. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 1995.
- Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci* 2006;78(17):2012-8.
- Nogueira GT, Mesquita-Ferrari RA, Souza NH, Artilheiro PP, Albertini R, Bussadori SK, Fernandes KP. Effect of low-level laser therapy on proliferation, differentiation, and adhesion of steroid-treated osteoblasts. *Lasers Med Sci* 2012;27(6):1189-93.
- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):179-84.
- 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.
- Ferreira MP, Ferrari RA, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez DA, Fernandes KP. 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.
- Teixeira VP, Ferrari RAM, Bussadori SK, Mascaro MB, Fernandes KPS. Efeito do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sobre a proliferação de osteoblastos. *Consentia Saúde* 2011;10(2):210-4.
- Wang LY, Wang HY, Ouyang J, Yu L, Chen B, Qin JQ, Qiu XZ. Low concentration of lipopolysaccharide acts on MC3T3-E1 osteoblasts and induces proliferation via the COX-2-independent NFkappaB pathway. *Cell Biochem Funct* 2009;27(4):238-42.
- Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22(4):347-54.
- Khadra M, Lyngstadaa SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 2005;26(17):3503-9.
- 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.
- Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci* 2006;21(3):175-80.
- Pires Oliveira DA, de Oliveira RF, Zangaro RA, Soares CP. Evaluation of low-level laser therapy of osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* 2008;26(4):401-4.
- Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg* 2009;27(2):309-15.
- Chellini F, Sassoli C, Nosi D, Deledda C, Tonelli P, Zecchi-orlandini S, Formigli L, Giannelli M. Low pulse energy Nd:YAG laser irradiation exerts a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: "an in vitro study". *Lasers Surg Med* 2010;42(6):527-39.
- 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.
- Saracino S, Mozzati M, Martinasso G, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. *Lasers Surg Med* 2009;41(4):298-304.
- Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, Baghestanian M, Turhani D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr* 2008;120(3-4):112-7.
- Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 2006;38(4):332-6.
- Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J* 2010;21(6):491-8.