

# INTERAÇÃO DA CÉLULA COM ATIVIDADE MITOCONDRIAL NA MANUTENÇÃO DO METABOLISMO APÓS LASER TERAPIA

**Oliveira, Deise A. A. Pires<sup>1</sup>; Oliveira, Rodrigo F.<sup>2</sup>; Pacheco-Soares, Cristina.<sup>3</sup>**

1 Doutoranda em Engenharia Biomédica – IP&D , Universidade Vale do Paraíba, Univap; Docente do curso de Fisioterapia da Faculdade de Pindamonhagaba – FAPI –SP; Laboratório de Biologia Celular e Tecidual- Univap

2 Doutorando em Engenharia Biomédica – IP&D , Universidade Vale do Paraíba, Univap; Coordenador e Docente do curso de Fisioterapia da Faculdade de Pindamonhagaba - FAPI – SP; Laboratório de Biologia Celular e Tecidual- Univap

3 Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - Universidade do Vale do Paraíba – Univap  
Av. Shishima Hifumi, 2911. Cep: 12.211-300. São José dos Campos SP  
[deisepyres@yahoo.com.br](mailto:deisepyres@yahoo.com.br)

**Resumo** – O tecido ósseo é altamente organizado, com um potencial único de reconstrução de sua estrutura original após um trauma, uma doença ou transplante ósseo. A radiação Laser de Baixa Potência (LBP) um dos recursos terapêuticos de grande resposta nos tecidos biológicos, incluindo efeitos como aceleração da formação e cicatrização óssea. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do laser Arseneto de Galio (GaAIs) sobre a cultura de células osteoblásticas e analisar a atividade mitocondrial nas mesmas. A Linhagem celular (OFCOL II), suplementadas em meio MEM a 80%, 20% SFB e 1% antibiótico. Foram cultivadas 11 placas de Petri, onde 6 placas foram irradiadas com o laser Arseneto de Galio e 5 placas controle. Após 24 horas de bioestimulação, observou-se intenso agrupamento das mitocôndrias na região perinuclear, com alteração da atividade mitocondrial. Neste trabalho concluímos que o laser Arseneto de Galio (GaAIs) altera o potencial e a morfologia de mitocôndrias de células osteoblásticas, acarretando um processo bioestimulatório nas mesmas.

**Palavras-chave:** Cultura de células, osteoblastos, laser de baixa potencia, microscopia de fluorescência e osteoporose

**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde.

## INTRODUÇÃO

Com o envelhecimento, ocorre na medula óssea, diminuição da capacidade dos precursores dos Osteoblastos (OBs), reduzindo o número de unidades formadoras de colônia de fibroblastos e, conseqüentemente dos OBs.

A osteopenia, ou massa óssea reduzida, significa um osso ou esqueleto com menos tecido ósseo que o normal [1]. A perda de massa óssea relacionada à idade, que ocorre em ambos os sexos, e a perda óssea que ocorre após a menopausa são as principais causas da osteoporose[2]. Ao contrário da perda óssea após a menopausa que está relacionada a uma excessiva atividade osteoclástica, a perda óssea relacionada à idade está associada a uma diminuição da função dos osteoblastos[3].

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial em células é bastante interessante. O potencial de

membrana mitocondrial está diretamente relacionado à produção de ATP, considerando o papel que a mitocôndria exerce em muitas condições fisiopatológicas; semelhante a homeostase de Cálcio, geração radical de oxigênio e controle de apoptose. Os efeitos do Laser nos sistemas biológicos tem sido investigados, tanto em *in vivo* como *in vitro*. [4]. O efeito a curto prazo do Laser Baixa Potência e a estimulação mitocondrial, enquanto a longo prazo são resultados da estimulação e/ou inibição da transcrição e replicação do DNA [5].

A irradiação provoca aumento no potencial de membrana mitocondrial, causando assim, algumas modificações como: alterações na taxa de ADP/ATP, aumento na taxa de DNA e de RNA, ativação de rearranjos de nucleotídeos e cromatina e aumento da síntese de proteínas na mitocôndria [6].

A irradiação gera novas conformações mitocondriais, e pode

acarretar no aparecimento de mitocôndrias gigantes, fato que se atribui à possível junção de mitocôndrias menores em uma só unidade. A absorção da irradiação pela mitocôndria ocorre devido às suas propriedades ópticas [6].

A célula possui um limiar de sobrevivência que depende do tecido onde ela está localizada e do seu estado fisiológico. Quando é oferecida uma baixa intensidade de energia, esta será utilizada pela célula de maneira a estimular a membrana ou as mitocôndrias, ocorrendo a bioestimulação. Assim, a bioestimulação é a ação da luz de baixa potência sobre processos bioquímicos e moleculares que normalmente ocorrem nos tecidos [7].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do laser Arseneto de Galio (GaAIs) sobre a cultura de células osteoblásticas e analisar a atividade mitocondrial nas mesmas.

## MATERIAIS E METODOS

A Linhagem celular (OFCOLII), suplementadas em meio MEM a 80%, 20% SFB e 1% antibiótico. Foram cultivadas 11 placas de Petri, onde 6 placas foram irradiadas com o Laser Arseneto de Galio Alumínio (GaAIs);  $\lambda = 830\text{nm}$  e 5 placas controle. As células foram irradiadas com os parâmetros:

DE J/cm <sup>2</sup>	DP W/cm <sup>2</sup>	Area cm <sup>2</sup>	Potência mW	Tempo min
3,0	0,0052	9,6	50	9,6

Modo de irradiação = contínuo

Intervalo irradiação = 24 horas, 48 horas e 72 horas

Distância da fibra a placa = 12 cm

As células (OFCOLII) foram preparadas para microscopia de fluorescência com o corante *Mitotracker* (500  $\mu\text{l}$ ), incubado por 20 minutos, ao abrigo da luz e em seguida lavado com o tampão PHEM (800  $\mu\text{l}$ ), Paraformoldeído diluído em PHEM a 3% a 10 minutos. Após a lavagem para remoção do corante, as células foram fixadas com n-propil galato e vedadas com esmalte incolor. Para observação das lâminas foi utilizado um microscópio *Leica* DLMB e em seguida fotografadas para analisar as alterações do potencial de membrana mitocondrial nas células controle e; nas irradiadas puderam ser analisadas devido a intensidade de fluorescência e a atividade mitocondrial através de sua morfologia.

Antes e após a irradiação, as lâminas foram analisadas ao microscópio. O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento e mantido sob as mesmas condições que os irradiados, porém sem receber irradiação.

## RESULTADOS

Análise dos resultados de microscopia de fluorescência demonstra que as células não submetidas a irradiação apresentam as mitocôndrias com baixa atividade mitocondrial, como observado na fig. 1. Inicia-se a observação da atividade mitocondrial a partir de 24 horas (Fig. 2), persistindo alteração no potencial e na morfologia até 72 horas. (Fig 4 e 6).



Figura 1 - Células OFCOL II grupo controle marcado com Mitotracker – análise da atividade mitocondrial após 24 horas, demonstra a distribuição das mitocôndrias (seta), com baixa atividade mitocondrial. Aumento 2.500x

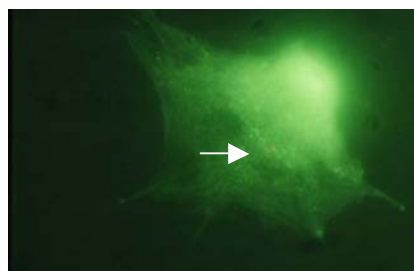


Figura 2 – Células OFCOL II grupo irradiado marcado com Mitotracker – análise da atividade mitocondrial após 24 horas bioestimulação. Observa-se intenso agrupamento das mitocôndrias na região perinuclear, com alteração da atividade mitocondrial (seta). Aumento 2.500x



Figura 3 – Células OFCOL II grupo controle marcado com Mitotracker- análise da atividade mitocondrial após 48 horas, constatamos a distribuição das mitocôndrias em todo o citoplasma, com potencial de membrana normal. Aumento 2.500x

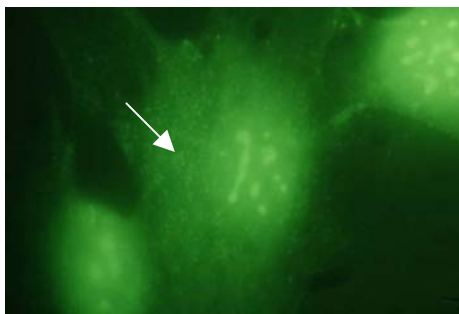


Figura 4 – Células OFCOL II grupo irradiado marcado com Mitotracker - análise da atividade mitocondrial após bioestimulação 48 horas, observa-se alteração na morfologia das mitocôndrias com potencial normal (seta). Aumento: 2.500x

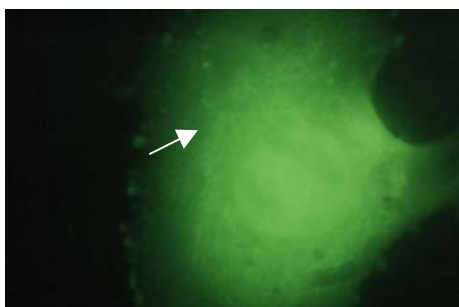


Figura 5 – Células OFCOL II grupo controle marcado com Mitotracker - análise da atividade mitocondrial após 72 horas, com potencial normal (seta). Aumento: 2.500x



Figura 6 – Células OFCOL II grupo controle marcado com Mitotracker- análise da atividade mitocondrial após bioestimulação 72 horas, observa-se intensa distribuição da mitocôndrias com potencial alterado. Aumento: 2.500x

## DISCUSSÃO

A terapia laser de baixa potencial, tem sido amplamente explorada nos processos de reparação, cicatrização e analgesia, [8]. A aplicação da laser terapia em tecidos ósseos tem sido investigada devido a estas características, despertando o interesse em avaliar a sua aplicação em processos de osteopenia, estimulando a produção de matriz óssea [9]. Os dados obtidos demonstram que as células OFCOL II submetidas a radiação laser, apresentaram alteração da atividade mitocondrial, sendo observado agrupamento de mitocôndrias na região perinuclear, evidenciando a solicitação de energia, provavelmente para a ser utilizada na síntese protéica e duplicação de material genético. Uma observação interessante em relação ao aspecto das mitocôndrias, o grupo controle apresenta as mitocôndrias com aspecto filamentososo enquanto as submetidas a radiação laser apresentam mitocôndrias com aspecto granular. Tal alteração necessita ser mais estudada pois é descrito a formação de mitocôndrias gigantes em fibroblastos submetidos a radiação laser [8], que não é o nosso caso, uma vez que as mitocôndrias parecem intumescida.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho concluímos que o laser Arseneto de Galio (GaAIs) altera o potencial e a morfologia de mitocôndrias de células osteoblásticas, acarretando um processo bioestimulatório nas mesmas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] FROST, H.M; JEE,W.S.S. On the rat model of human Osteopenias na Osteoporosis . **Bone and mineral**, v. 18, p.227-236, 1992
- [2] MANOLOGAS,S.C; JILKA,R.L. Bone marrow, citocinas, and boné remodeling. **The England Journal of Medicine** v.332,n 5, p.305-311,1995
- [3] DEMPSTER,D.W;LINDSAY,R. Pathogenesis of osteoporosis .**The Lancet**, v.341,p.797-801,1993
- [4] BORTOLETO et al. Mitochondrial membrane potential after low-power laser

irradiation: **Lasers in Medical Science**, v.18,p.204-206, 2004

[5] KARU,T.I. Photobiological fundamentals of low power therapy. **IEEE J Quantum Elect, QE**, v. 23,n 10,p.1703,1987

[6] MANTEIFEL,V; BAKEEVA,L; KARU,T. Ultrastructural changes in chondriome of

human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: Apperance of giant mitochondria. **J.of Photochemistry and Photobiology B: Biology**,v.38, p.25-30, 1997

[7] KARU,T.I et al. Nonmonotonic behavior of the dose dependence of the radiation effect on cells in vitro exposed to pulsed laser radiation: **Lasers Surg. Méd.** v.21,p.485-492,1997

[8] KARU et al. European Medical Laser Association. Lasers in medicine and dentistry: **Basic science andu p to date clinical application of level laser therapy: LLLT**. Croatia: Vitagraf, 2000

[9] PINHEIRO, ALB et al. A Laserterapia não cirúrgica em Implantodontia. In: **Implantes Osteointegrados – Técnica e Arte**. 2002