

ESTUDO DE BIOESTIMULAÇÃO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Eller, R. B. 1; Ricci, R. 2; da Silva, N. S. 1; Pacheco-Soares, C. 1*

Univap /Laboratório de Biologia Celular - IP&D, Av. Shishima Hifumi 2911, Urbanova, 12244-000, SJC, SP, Brasil, eller@univap.br

Unifesp /Laboratório de Biologia Molecular – INFAR, Av. vinte e três de maio 100, Vila Clementino, 04023-900, São Paulo, SP, Brasil, tekaricci@yahoo.com.br

Univap /Laboratório de Biologia Celular - IP&D, Av. Shishima Hifumi 2911, Urbanova, 12244-000, SJC, SP, Brasil, nsoares@univap.br

Univap /Laboratório de Biologia Celular - IP&D, Av. Shishima Hifumi 2911, Urbanova, 12244-000, SJC, SP, Brasil, cpssoares@univap.br

Palavras-chave: cultura celular, bioestimulação, células endoteliais

Área de conhecimento: Ciências biológicas

Resumo: O uso da laser terapia de baixa potência (LTBP) na bioestimulação de células endoteliais cardíacas pode transformar-se em mais um recurso em cirurgias cardíacas para recuperação de áreas isquêmicas do coração. Os resultados da análise dos efeitos do LTPB é muito importante para estudos futuros, possibilitando cirurgias menos invasivas a um grupo de pacientes cardíacos crescentes em todo mundo. Em nosso trabalho, analisamos o efeito do LTBP na proliferação de células endoteliais através de cultura de células em função do uso do LTBP com dosimetrias de 2-4 J/cm² e 30 mW. Observamos o aumento da proliferação celular através do laser.

Introdução

As doenças cardiovasculares são dentre outras, uma das maiores causadoras de mortes no Brasil desde a década de 60 [1]. As causas mais graves nas doenças cardíacas, referem-se ao infarto do miocárdio e suas complicações. O infarto acontece quando o suprimento de sangue é reduzido ou cortado totalmente ao músculo cardíaco devido uma artéria estar contraída ou obstruída, parcial ou totalmente [2]. A fase aguda do infarto do miocárdio, pode levar a uma insuficiência na região ventricular necessitando de uma cirurgia convencional de revascularização [3].

Uma forma de tratamento não invasivo que vem ganhando interesse na área médica, é a terapia com laser de baixa potência (LPB). Inúmeros experimentos e estudos clínicos vêm demonstrando que a irradiação com LBP na região visível e infravermelha contribui para biomodulação de processos celulares [4].

Assim, o presente trabalho tem como objetivo, avaliar o crescimento e proliferação de células endoteliais cardíacas em diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB), e submete-las a irradiação com laser de baixa potência (LBP), em diferentes dosimetrias, acompanhando assim, uma possível proliferação destas células "in vitro".

Material e Métodos

Foram cultivadas em placas de 24 poços (nunc), células endoteliais de aorta de coelho – RAEC, com uma concentração inicial de 10⁴ células/ml, mantidas em meio de cultura Ham-F12 (gibco), sendo este suplementado com 2 concentrações diferentes, em 5% e 10% de soro fetal bovino (SFB). Dois grupos foram avaliados durante o experimento, sendo um grupo controle (sem irradiação) e outro grupo irradiado.

A irradiação foi executada com o Laser de Baixa Potência Fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) (Thera Lase®), em

comprimento de onda de 685nm, fluência = 2-4J/ cm² e potência = 30mW e irradiância de 5,5 mW/ cm².

Os experimentos foram realizados em triplicata, e as células foram irradiadas em 3 doses de irradiação laser em intervalos de 24 horas. Os grupos controle foram mantidos sob as mesmas condições que os irradiados, porém sem serem submetidos à irradiação.

A contagem celular foi realizada em intervalos de 24 horas após o plaqueamento, diretamente no microscópio invertido olympus CK40, usando um fator de correção de 234,3 com objetiva de 20X.

Resultados:

A análise da radiação Laser (685nm) com dosimetrias de 2 e 4 J/cm² demonstrou aumento na proliferação celular na linhagem RAEC, ocorrendo maior aumento a partir do 4^a dia de plaqueamento. Observou-se após 120 horas do plaqueamento, que, o grupo controle com 5% de SFB, com concentração inicial de 10.000 célula/ml, atingiu um total de 25.000 células, enquanto que o grupo irradiado, com a mesma concentração inicial atingiu o total de 31.000 células, utilizando 2 J/cm², e 32.300 células quando utilizou 4 J/cm². (Figura 1)

No caso das células com 10% de suplementação, o grupo controle com número inicial de 10.000 células/ml, atingiu o total de 18.000 células, enquanto que o grupo irradiado com 4 J/cm² atingiu o total de 31.000 células e o grupo irradiado com 2 J/cm², atingiu o total de 22.000 células, após 120 horas de plaqueamento (Figura 2).

A análise dos resultados, evidenciou aumento na proliferação celular do grupo irradiado em relação ao controle, para todas as dosimetrias utilizadas e um maior aumento foi observado nas células em que se encontrava estresse nutricional, ou seja, com 5 % de suplementação com SFB. Observou-se que, a irradiação com maior aumento na proliferação celular entre grupos irradiados, ocorre com 4 J/cm².

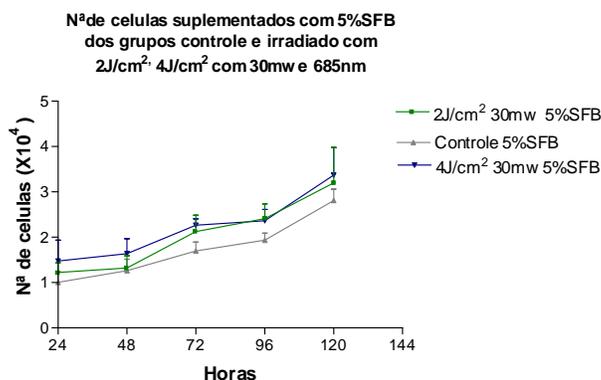


Figura 1: Grupo controle e irradiado com 2 J/cm² 4 J/cm² e 30 mW em 3 sessões em intervalos de 24 horas após plaqueamento, com 5% de suplemento de SFB.

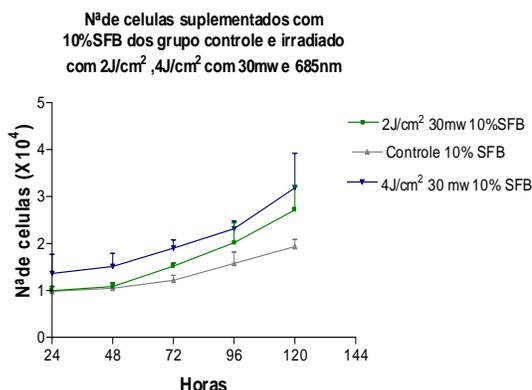


Figura 2: Grupo controle e irradiado com 2 J/cm² e 4 J/cm² e 30 mW em 3 sessões em intervalos de 24 horas após plaqueamento, com 10% de suplemento de SFB.

Discussão

A linhagem RAEC (células endoteliais de aorta de coelho) foram irradiadas com comprimento de onda de 685 nm (visível), com fluências de 2 e 4 J/cm² e potência de 30 mW.

Para as células em situação de estresse nutricional (5% SFB), foi observado aumento significativo do grupo irradiado em relação ao grupo controle, após 120 horas de plaqueamento.

Na cultura em situação normal (10% SFB), foi observado pequena diferença entre as

curvas de crescimento das irradiadas com 2J/cm² do grupo controle, e uma diferença significativa quando comparada a curva de crescimento da irradiada com 4 J/cm², corroborando assim com o fato que a terapia á laser empregando baixa potência intensifica as funções celulares, quando a célula se encontra em situação de estresse [5].

O que observamos em nossos experimentos, foi que o laser de baixa potência bioestimula células endoteliais em cultura, provocando bioestimulação. Quando a linhagem RAEC foi estimulada com o laser, obteve-se um crescimento significativo apresentando um crescimento superior ao grupo controle. O efeito Bioestimulatório na proliferação celular da linhagem RAEC observado neste trabalho, pode ser possivelmente explicado, entre outros fatores, pelo aumento de fatores de crescimento no meio de cultura das células irradiadas [5], demonstrando que o Laser de Baixa Potência pode Bioestimular células endoteliais em cultura, causando um aumento significativo da proliferação celular, o que pode ser um possível caminho da neovascularização laser-induzida [3].

Novas abordagens para o aumento da angiogênese no miocárdio isquêmico pela introdução de fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de crescimento derivado de endotélio vascular (VEGF) e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), estão sendo adaptados e têm sido encontrados efeitos benéficos em pacientes com angina severa [3] . A irradiação Laser tem efeitos como aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP, aceleração do processo de cicatrização de feridas [3] e promoção do processo regenerativo. Após irradiação na zona de injúria, pode-se encontrar diminuição da resposta inflamatória e aumento da neoformação de vasos sanguíneos [6].

Conclusão:

Quando a radiação do laser de baixa potência é usado em células endoteliais (RAEC), em situação de privação nutricional, é observado que esta energia induzida pelo laser é usada pelas células para estimular sua proliferação. Assim a célula é induzida a biomodulação, ou seja, trabalhará procurando seu estado de equilíbrio (normalização) da área afetada. Com a

suplementação em questão utilizada de 5% de SFB, ocorre um efeito estimulatório após a irradiação, tendo um aumento do numero de células. Conclui-se que em situação de estresse nutricional, as células respondem mais efetivamente a irradiação Laser que as em condições normais

Agradecimentos

FAPESP – Fundação de amparo a pesquisa do Estado de São Paulo

Referências

[1] - BAYER, R. Ethics, politics, and access to health care: a critical analysis of the President's Commission for the study of ethical problems in medical and biomedical and behavioral research. *Cardozo Law Ver. Winter*, vol. 6, n. 2, p. 303-320, 1984.

[2] – DALLAN L A O & Oliveira S A – Cirurgia Revascularização transmiocárdica a laser de CO₂; *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*; 15 (2); 89-104; 2000.

[3] – RICCI, R. Biomodulação em células endoteliais com dosimetrias diferentes do laser de baixa potencia arsenito de Índio galio. 2-30 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.

[4] – KIPSHIDZE, *et al.* Low-Power Helium:Neon Laser Irradiation Enhances Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Endothelial Cells *in vitro*. *Laser Surg. Med.* V.28, p.355-364,2001.

[5] - LOPES, AL. Análise *in vitro* da Proliferação celular de fibroblastos de.

Gengiva Humana tratados com laser de Baixa Potência. 2-13p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 1999.

[6] - BIBIKOVA, A ; BELKIN V.; ORON U.; Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low energy laser irradiation. Anatomy and embryology, v. 190, 597-602p.1994.