

# AValiação DA ATIVIDADE MITÓtica EM CÉLulas CHO-K1 DURANTE BIOMODULAÇÃO

**Karina Carvalho de Oliveira<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba/IP&D/Laboratório de Cultura de Células  
Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, karina@univap.br

<sup>2</sup>Universidade do Vale do Paraíba/IP&D/Laboratório de Cultura de Células  
Avenida Shishima Hifumi, 2911 - Bairro Urbanova - CEP 12244-000, cpsouares@univap.br

**Resumo-** O presente projeto teve por objetivo investigar o efeito do laser de baixa potência com diferentes densidades de energia, estando as células sob estresse nutricional. Através de uma sonda fluorescente específica, foi analisado o efeito do laser no núcleo de células CHO-K1 (fibroblasto de ovário de Hamster chinês). A laser terapia tem apresentado sucesso na cicatrização de feridas e reparação tecidual, devido a sua contribuição na biomodulação dos processos celulares. Análises *in vitro* de células CHO-K1 cultivadas em meio HAM- F12 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino e irradiadas por 3 seções de 24 em 24 horas utilizando o diodo laser InGaAIP ( $\lambda = 685\text{nm}$ , 15mW de potência, densidades de energia:  $2\text{Jcm}^2$  e  $4\text{Jcm}^2$ ), foram realizadas através de espectrofotometria e microscopia de fluorescência. Tais análises associando atividade mitocondrial e divisão celular, durante a laser terapia, demonstraram que após 72 horas de cultivo associado a irradiação, as células apresentaram alta atividade mitótica e alto potencial de membrana mitocondrial.

**Palavras-chave:** Biomodulação, Laser Terapia, Cultura de Células, Microscopia de Fluorescência, MTT  
**Área do Conhecimento:** II - Ciências Biológicas

## Introdução

Nas últimas duas décadas, a Terapia Laser de Baixa Potência ou Bioestimulação ganhou atenção crescente na Europa e Ásia no tratamento de vários processos patológicos, particularmente na cicatrização de feridas e reparo tecidual. Inúmeros experimentos e estudos clínicos vêm demonstrando que a irradiação com laser de baixa potência na região visível e infravermelha contribuem para biomodulação de processos celulares [1].

A célula tem um limiar de sobrevivência, de acordo com a localização do tecido e seu estado fisiológico. Quando trabalhamos respeitando esse limiar da célula, oferecemos uma baixa intensidade de energia, que será utilizada por ela de maneira que estimule sua membrana, suas mitocôndrias e outras estruturas celulares envolvidas em um processo de bioestimulação. Dessa forma estaremos induzindo essa célula a biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, isso se denomina Laser Terapia [2].

Fibroblastos são as células mais amplamente testadas no estudo dos efeitos biológicos dos lasers de baixa potência, pois um possível efeito bioestimulante nessas células implicará em efeitos relevantes em várias patologias [3].

Os trabalhos *in vitro* sobre fibroblastos descrevem um efeito proliferativo ou ativador da

síntese protéica, dependendo das características e parâmetros do laser utilizado, tais como: comprimento de onda, modo de emissão, densidade de potência e densidade de energia utilizada [4].

## Materiais e Métodos

**Cultura de Células:** Células CHO-K1 provenientes de ovário de Hamster chinês, foram cultivadas em garrafas de cultura de  $25\text{cm}^2$  contendo meio Ham F12 (Invitrogen), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen). A propagação celular foi efetuada quando a densidade de células formava uma monocamada confluenta. A troca de meio de cultivo deu-se a cada três dias, o crescimento celular foi acompanhado por meio da observação em microscópio invertido Olympus CK40.

**Irradiação:** Foram plaqueadas células CHO-K1, com meio HAM-F12 contendo 5% de soro fetal bovino, em placas de 96 ou 24 poços, sendo que estas últimas apresentavam lamínulas  $10 \times 10\text{mm}$ . E incubadas "overnight" a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Vinte e quatro horas após o plaqueamento e cultivo celular, as irradiações foram realizadas ao abrigo da luz, utilizando um aparelho clínico portátil diodo laser semicondutor Thera Lase – DMC, com meio ativo de Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAIP) emitindo radiação no comprimento de onda de  $685\text{nm}$  e densidade

de energia de 2 J/cm<sup>2</sup> e 4J/cm<sup>2</sup> e potência de 15mW . Os grupos irradiados receberam 3 doses da irradiação laser durante 72 horas em intervalos de 24 horas. As placas do grupo controle foram mantidas as mesmas condições do grupo irradiado.

**MTT:** Após o período de incubação as células foram submetidas a análise da proliferação celular onde se adicionou 50µL (concentração final de 0,5 mg/mL) MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) e incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> no escuro. Sobre os precipitados de formazana adicionou-se o solvente orgânico DMSO (100µL) em cada poço. A placa foi mantida sob agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 30 minutos. Após este período foi feita a leitura no espectrofotômetro de Elisa.

**Microscopia de Fluorescência:** Após irradiação a cultura de células CHO-K1 foi fixada com 4% paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,2). As células foram marcadas com DAPI (4', 6'-diamidino, 2'-phenylindole- 5µM; Molecular Probes) e incubadas por 10 minutos, lavadas com tampão PHEM. As lamínulas foram montadas sobre lâmina com N-propil galato, vedadas com esmalte sob proteção da luz e observadas em microscopia de epifluorescência. Foram feitas fotomicrografias do material em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30.

## Resultados

Os resultados obtidos são apresentados a seguir:

**MTT:** A análise do teste de proliferação celular demonstrou um aumento significativo das células submetidas à irradiação com densidade de energia de 4Jcm<sup>2</sup> em relação ao grupo 2Jcm<sup>2</sup> e controle (Figura1).

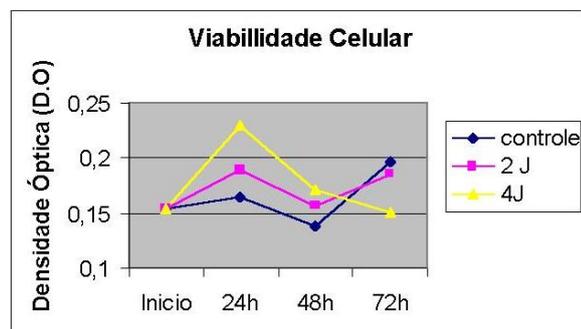


Figura 1- Análise da viabilidade celular através do teste do MTT.

**Microscopia de Fluorescência:** A análise dos grupos irradiados com densidade de energia de 2 e 4J/cm<sup>2</sup> nos tempos de 24, 48 e 72 horas demonstraram a presença de células em divisão

celular, principalmente no período de prófase, ocorrendo a observação de atividade mitótica mais intensa no grupo de 48 e 72 horas.

No grupo controle as células em todos os tempos permaneceram em interfase.



Figura 2: Células CHO-K1 controle marcadas com DAPI. Observamos núcleos em interfase. Aumento 2.500x

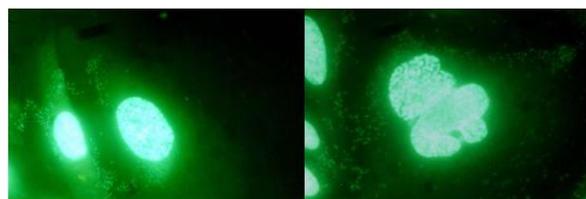


Figura 3: Células CHO-K1 marcadas com DAPI, após 24 horas. Na foto à esquerda células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de 2Jcm<sup>2</sup>, observamos núcleo em início de prófase. Foto à direita células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de 4Jcm<sup>2</sup>, observamos dois núcleos em prófase média. Aumento 2.500x

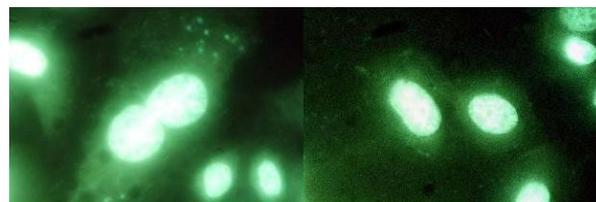


Figura 4: Células CHO-K1 marcadas com DAPI, após 48 horas. Foto à esquerda células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de 2Jcm<sup>2</sup>, observamos célula no final da telófase. Foto à direita células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de 4Jcm<sup>2</sup>, observamos células em interfase. Aumento 2.500x

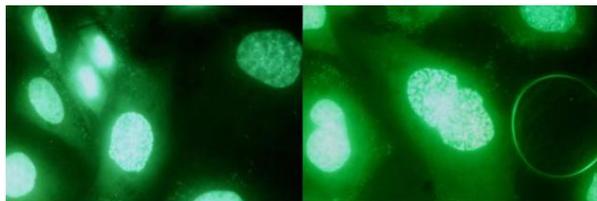


Figura 5: Células CHO-K1 marcadas com DAPI, após 72 horas. Foto à esquerda células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de  $2\text{Jcm}^2$ , observamos célula em início de prófase. Foto à direita células CHO-K1 irradiadas com densidade de energia de  $4\text{Jcm}^2$ , observamos célula em início de telófase. Aumento 2.500x.

### Discussão

Estudos do efeito do laser em cultura de células nos fornece um modelo simples e informativo sobre os aspectos significativos do uso da terapia a laser no sistema “*in vitro*”, fornecendo simulação mais acurada das condições “*in vivo*”; vários tipos celulares vem sendo usados para este estudo em sistemas biológicos [5,6] Estudos com cultura de fibroblasto tem revelado o efeito bioestimulador do LBP, dependendo da dosimetria aplicada e da situação em que as células se encontravam [2]. O Laser de Baixa Potência não apresenta ação quando aplicado em órgão ou célula em condição de normalidade, e estudos “*in vivo*” demonstraram que não ocorrem alterações significativas nos resultados obtidos em tecidos em homeostase quando irradiados [7]. Em nosso experimento utilizamos células fibroblásticas de ovário de Hamster sob uma situação de estresse, ou seja, suplementando o meio de cultura somente com 5% de SFB. Para se obter um efeito bioestimulador é necessário que se administre doses baixas (densidade de energia de 2 a 4  $\text{J/cm}^2$ ) do laser operando na região do vermelho e infravermelho, sendo que sob doses altas de energia as células são destruídas [8,9]. Observamos este fato em nosso experimento e verificamos os efeitos que o LBP apresenta na proliferação celular como apresentado na figura 1, onde a influencia da densidade de energia de 4J foi significativamente maior após 24 horas de irradiação ocorrendo um declínio nos tempos seguintes devido ao aumento populacional. Com  $2\text{Jcm}^2$  verificamos que as células embora apresentem menor proliferação em relação à  $4\text{Jcm}^2$ , a população celular apresenta uma sobrevida maior. Na análise de fluorescência constatamos aumentando na síntese de DNA, como apresentado nas figuras 4 e 5, dados corroborados por Loevschall and Arenholt, 1994 [10].

Muitos trabalhos em cultura de células, divulgam que o efeito bioestimulador do LBP, ocorre através da ativação da produção de ATP e incremento do processo mitótico devido excitação da respiração celular [3,11].

Pinheiro *et al*, 2005 teve um positivo efeito biomodulatório com células HEp2 irradiadas com comprimento de onda de 685 e 830nm, comparadas com amostras não irradiadas [12].

### Conclusão

Os resultados demonstram que a densidade de energia de  $4\text{Jcm}^2$  apresentou-se melhor na proliferação no tempo de 24 horas, entretanto devido ao acentuado aumento da população celular ocorreu um declínio, nos tempos subseqüentes. A densidade de energia de  $2\text{Jcm}^2$ , favoreceu um aumento gradativo ocorrendo proliferação até 72 horas no teste de MTT e ocorrendo divisão celular até 72 horas nas duas densidades nas marcações com fluorescência.

**Agradecimentos:** CNPq e Univap.

### Referências

- [1] KIPSHIDZE, et al. Low-Power Helium:Neon Laser irradiation Enhances Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Endothelial Cells in vitro. **Lasers Surg Med**,.28,p.355-364,2001.
- [2] LOPES AL. Análise in vitro da proliferação de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. 1999. 131p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 1999.
- [3] KIMURA Y. et al. Effects of Nanosecond Pulsed Nd: YAG laser Irradiation on Dentin Resistance to Artificial Caries - Likes Lesion. **Lasers Surg Med**, v.20. n.1, p.15-21, 1997.
- [4] AL-WATBAN, F.A.H.; ZHANG, Z. Disimetry-related Wound Healing Response in the Rat Model Following Helium Neon Laser LLLT. **Laser Therapy**, p.119-124,1994.
- [5] WEBB C; DYSON M; LEWIS WHP. Stimulatory effect on 660nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. **Lasers Surg Med**. V.22, p.294-301, 1998.

[6] DOYLE A; GRIFFITHS JB. Cell and tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. John Wiley & Sons Ltda, 1998.

[7] EL SAYED SO; DYSON M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg Med.** v.19, p. 433-437, 1996.

[8] KARU T; PYATIBRAT; KALEND G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.27, p. 219-223, 1995.

[9] RIGAU J. Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. Reus. Tese (Doutorado em Histologia). Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, 1996.

[10] LOEVSCHELL H, ARENHOLT-BINDSLEV D. Effects of low level diode laser (GaAlAs) irradiation on fibroblast of human oral mucosa in vitro. **Lasers Surg Med**, v.14, p. 347-354, 1994.

[11] CONLAN MJ; RAPLEY JW; COPP CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. **A review. Jclin Periodontol**, v.23, p.492-496, 1996.

[12] PINHEIRO, A.L.B., et al. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cell in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.23, n.3, p.300-303, 2005.