

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA REABILITAÇÃO

VICTOR PEREZ TEIXEIRA

**EFEITO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE A PROLIFERAÇÃO,
ADESÃO E EXPRESSÃO DE RUNX2 EM OSTEOBLASTOS CULTIVADOS
NA PRESENÇA DE LPS**

São Paulo, SP

2011

VICTOR PEREZ TEIXEIRA

**EFEITO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE A PROLIFERAÇÃO,
ADESÃO E EXPRESSÃO DE RUNX2 EM OSTEOLASTOS CULTIVADOS
NA PRESENÇA DE LPS**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho, para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Reabilitação.

Orientadora: Profa. Dra. Kristianne Porta
Santos Fernandes

Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Agnelli
Mesquita Ferrari

São Paulo, SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Teixeira, Victor Perez.

Efeito do laser em baixa intensidade sobre a proliferação, adesão e expressão de RUNX2 em osteoblastos cultivados na presença de LPS./ Victor Teixeira Perez. 2011.

60 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Nove de Julho – UNINOVE - Ciências da Reabilitação, São Paulo, 2011.

Orientador (a): Prof. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes.

1. Terapia a laser de baixa intensidade. 2. Osteoblastos. 3. Bactérias Gram-negativas.

I. Fernandes, Kristianne Porta Santos. II. Título

CDU 615.8

São Paulo, 12 de dezembro de 2011.

TERMO DE APROVAÇÃO

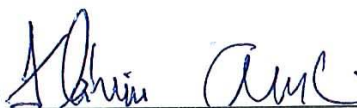
Aluno: VICTOR PEREZ TEIXEIRA

Título da Dissertação: "EFEITO DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE A PROLIFERAÇÃO, ADESÃO E EXPRESSÃO DE RUNX2 EM OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS NA PRESENÇA DE LPS"

Presidente PROFA. DRA. KRISTIANNE PORTA SANTOS FERNANDES



Membro: PROF. DR FLAVIO AIMBIRE SOARES DE CARVALHO



Membro: PROFA. DRA. REGIANE ALBERTINI DE CARVALHO



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido filho Daniel, nascido em pleno decorrer deste curso, trouxe o sentimento de complementação absoluta para mim e para sua mãe. Filho, você é responsável por me ensinar a enxergar o mundo muito mais leve e alegre.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao Universo por tudo.

À minha amada esposa, companheira de vida e de jornada, Amanda, por todo o afeto, motivação e incentivo. Ponto de sustentação e de equilíbrio em todos os momentos de oscilação. Sem você nada disto seria possível.

Ao meu filho Daniel por cada sorriso e carinho.

Aos meus pais por todos os ensinamentos, e por terem feito tantos sacrifícios para que eu tivesse as melhores oportunidades.

Ao meu irmão que sempre foi um grande exemplo desde minha infância. Muitos dos meus passos foram dados me espelhando em você.

À minha orientadora Profa. Dra. Kristianne Porta Santos Fernandes por todos os ensinamentos, além da paciência e confiança.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Raquel Agnelli Mesquita Ferrari por estar sempre disposta a me ensinar quando precisei.

À Profa. Dra. Manoela Domingues Martins e à Profa. Dra. Cristiane Miranda França por despertarem em mim a vontade de trilhar a vida acadêmica e por terem sido verdadeiras orientadoras deste processo desde minha graduação.

À Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori por me incentivar a ingressar neste programa de pós-graduação e por tudo desde a Faculdade de Odontologia.

À Universidade Nove de Julho pelo apoio através da concessão da minha bolsa.

À Profa. Dra. Márcia Martins Marques da FOU SP pela gentil doação das células OSTEO-1.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes por disponibilizar o Laboratório de Patologia Molecular da FOU SP para minhas pesquisas.

À Prof. Dra. Lília Alves Rocha pela paciência e ajuda na análise de minhas amostras.

A todos os meus colegas de curso pelos momentos de aprendizado e por toda assistência quando necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Tenha coragem de seguir o que seu coração e sua intuição dizem. Eles já sabem o que você realmente deseja.”

Steve Jobs

RESUMO

A destruição tecidual associada aos quadros de infecção óssea está relacionada aos constituintes dos microorganismos infectantes, aos seus produtos secretórios e à ativação de células do próprio tecido e do sistema imunológico. O lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede de bactérias gram-negativas, foi o primeiro componente bacteriano cuja potente capacidade de induzir reabsorção óssea foi demonstrada. Por outro lado, o laser em baixa intensidade (LBI) tem sido utilizado em tecidos ósseos com o intuito de acelerar o processo de reparo. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do LBI sobre a proliferação, a adesão e a diferenciação 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). Culturas irradiadas e não irradiadas (controle) foram submetidas a ensaios de proliferação em períodos de 1, 3 e 5 dias (MTT) e adesão após 20, 40 e 60 minutos (MTT). Além disso, a expressão gênica do fator de transcrição *run-related* (Runx2) foi avaliada após 24 h da irradiação utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação à proliferação celular e a expressão de Runx2. Quanto à adesão celular o LPS diminuiu a adesão nos grupos cultivados na presença das concentrações de 1 e 10 µg/mL após 20 min. e na concentração de 10 µg/mL após 40 e 60 min. Em todos os períodos avaliados o LBI não se mostrou capaz de alterar esta tendência.

Palavras-chave: Terapia a Laser de Baixa Intensidade; Osteoblastos, Bactérias Gram-negativas.

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, was the first whose potent ability to induce bone resorption was demonstrated. On the other hand, the low level laser therapy (LLLT) has been used in bone tissue in order to accelerate the repair process. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of LLLT on cell parameters important in the process of bone repair front of infection. To this end, the osteoblast lineage OSTEO-1 (derived from rat calvaria), grown in the presence of LPS (*E. coli*) were irradiated with LLLT (Ga-Al-As, 780 nm, 10 mW, 12s, 0.12 J , 3 J/cm²). Cultures irradiated and not irradiated (control) were subjected to proliferation assays at 1, 3 and 5 days (MTT) and adhesion after 20, 40 and 60 minutes (MTT). In addition, the gene expression of the transcription factor run-related (Runx2) was assessed after 24 h using the polymerase chain reaction (PCR) in real time. The results showed no statistically significant differences in relation to cell proliferation and the expression of Runx2. As for cell adhesion LPS decreased the adhesion in the groups cultured in the presence of concentrations of 1 and 10 µg/mL after 20 min. and the concentration of 10 µg/mL after 40 and 60 min.. In all periods evaluated LLLT was not able to change this trend.

Key-words: Laser Therapy, Low-Level; Osteoblasts; Gram-Negative Bacteria.

SUMÁRIO

Lista de figuras	12
Lista de tabelas	14
Lista de abreviaturas e símbolos	15
1. Contextualização	18
1.1. A infecção óssea e o lipopolissacarídeo (LPS)	18
1.2. Papel do LBI sobre o tecido ósseo	19
1.3. Papel do LBI sobre os osteoblastos	20
2. Objetivo	22
3. Método	23
3.1. Cultivo celular	23
3.2. Tratamento com LPS bacteriano (simulação de infecção)	23
3.3. Irradiação Laser	23
3.4. Ensaio de proliferação celular (método MTT)	24
3.5. Ensaio de adesão celular	25
3.6. Expressão gênica	26
3.7. Análise dos dados	28
4. Resultados	29
4.1. Artigo publicado	29
4.2. Resultados ainda não publicados	30
4.2.1. Proliferação celular	30

4.2.2. Adesão celular -----	33
4.2.3. Expressão gênica de Runx2 -----	41
5. Considerações finais -----	44
6. Referências bibliográficas -----	45
7. Apêndice -----	52
7.1. Artigo publicado: TEIXEIRA, V.P.; FERRARI, R.A.M.; BUSSADORI, S.K.; MASCARO, M.B.; FERNANDES, K.P.S. Efeito do lipopolissacarídeo de Escherichia coli sobre a proliferação de osteoblastos. <i>Conscientiae Saúde</i> . v.10, n. 2, p.210-14, 2011.	
8. Anexos -----	58
8.1. Levantamento bibliográfico sobre osteoblastos cultivados na presença de LPS	
8.2. Levantamento bibliográfico sobre aplicação de LBI em osteoblastos	

Lista de figuras

Figura 1. Análise de RNA total. Gel de agarose-formaldeído 1%.

Figura 2. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 24 de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Figura 3. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 48 de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Figura 4. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 1, 3 e 5 dias de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

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

Figura 6. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 20

minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Figura 7. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 20 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Figura 8. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 40 minutos de cultivo (* $p < 0,05$).

Figura 9. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 40 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Figura 10. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 60 minutos de cultivo (* $p < 0,01$).

Figura 11. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 60 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Lista de tabelas

Tabela 1. Adesão celular, comparação entre os grupos experimentais por ANOVA/Tukey. NS = não significante; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Lista de abreviaturas e símbolos

ANOVA - Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

BMP-4 – Proteína óssea morfogenética 4

CA - Califórnia

Ca²⁺ - Íon cálcio

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar

cm – Centímetro

cm² – Centímetros quadrados

CO₂ – Dióxido de carbono

DEPC - Dietilpirocarboneto

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

DV – Desvio padrão

EUA – Estados Unidos da América

FA – Fosfatase alcalina

Ga-Al-As – Arseneto de gálio-alumínio

Ga-As – Arseneto de gálio

GM-CSF – Fator estimulante de colonização macrófago-granulocitário

h – Hora

He-Ne – Hélio-neônio

IL-1 – Interleucina-1

IL-6 – Interleucina-6

In-Ga-Al-P - Índio-gálio-alumínio-fosforeto

J – Joule

J/cm² – Joules por centímetro quadrado

LBI – Laser em baixa intensidade

LPS – Lipopolissacarídeo

min - Minuto

mJ - Milijoules

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mm² – Milímetros quadrados

MO – Missouri

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5,-difeniltetrazólio

mW - Miliwatt

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

NO – Óxido Nítrico

OC – Osteocalcina

OH - Ohio

OSTEO I – Linhagem celular de osteoblastos derivados da calvária de ratos

PBS – *Phosphate-buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pH – Potencial hidrogênico

PTH – Paratormônio

RANK – Receptor ativador do fator nuclear

RNA – Ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

RPS18 – Proteína ribossomal S18

Runx2 – Fator 2 de transcrição *runt-related*

s – Segundo

SFB – Soro fetal bovino

TGF- β – Fator de crescimento tumoral β

TRAP – Fosfatase ácido tártaro resistente

UNINOVE – Universidade Nove de Julho

USP – Universidade de São Paulo

W – Watt

°C – Graus Celsius

> - Maior

\leq - Menor ou igual

% - Porcentagem

λ – Comprimento de onda

μg – Micrograma

μl - Microlitro

1

Contextualização

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que, em conjunto com o cartilaginoso, forma o sistema esquelético. Seus tipos celulares específicos são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (HEYMANN & ROUSSELLE, 2000).

Os osteoblastos derivam de células mesenquimais multipotentes e têm como função primordial a formação de osso. Neste processo formativo acabam por ficar aprisionadas em seu próprio produto secretório (matriz mineralizada) sendo progressivamente diferenciadas em osteócitos. (HEYMANN & ROUSSELLE, 2000; DUCY et al., 2000). Já os osteoclastos são células hematopoiéticas da linhagem dos monócitos / macrófagos e são essenciais no processo de remodelamento por serem responsáveis pela reabsorção óssea (KARSENTY & WAGNER, 2002; HARADA & RODAN, 2003; BOYLE et al., 2003).

A homeostase óssea é mantida pelas cargas mecânicas e por vários fatores solúveis que incluem o paratormônio (PTH), vitamina D, os hormônios sexuais e fatores locais como a interleucina-6 (IL-6), dentre outros (MANOLAGAS, 1995; HARADA & RODAN, 2003).

Existe um processo contínuo de remoção e substituição da matriz óssea que requer o recrutamento, a diferenciação e a ativação dos osteoblastos e osteoclastos (NAIR et al., 1996). O fator 2 de transcrição *runt-related* (Runx2) é considerado essencial para a diferenciação de osteoblastos, tanto de progenitores mesenquimais para pré-osteoblastos, quanto destes para osteoblastos (HARADA & RODAN, 2003).

1.1. A infecção óssea e o lipopolissacarídeo (LPS)

Os quadros de infecção óssea são em geral dominados por uma flora bacteriana mista, composta em sua maioria por bactérias Gram-negativas (DELLER-QUINN et al., 2009; JUNG et al., 2009).

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 (HAUSMAMM et al. 1970; NAIR et al., 1996; KATONO et al., 2009), porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente estabelecido.

Por um lado, já foi demonstrado que o LPS, advindo de diferentes espécies Gram-negativas, estimula osteoblastos a secretarem fatores osteolíticos como: IL-1 (HANAZAWA et al., 1987; KEETING et al., 1991), IL-6 (ISHIMI et al., 1990; LITTLEWOOD et al., 1991), GM-CSF (fator estimulante de colonização macrófago-granulocitário) (HOROWITZ et al., 1989) e óxido nítrico (NO) (DAMOULIS & HAUSCHKA, 1994).

Por outro lado, o cultivo de diferentes linhagens de osteoblastos com LPS (*E. coli*, 026:B6 Sigma) parece não alterar a proliferação celular, independente da concentração e dos períodos avaliados (SHOJI et al., 2006; DELLER-QUINN et al., 2009; JUNG et al., 2009; KATONO et al., 2009).

A adesão celular de osteoblastos cultivados na presença de LPS de *E. coli* na concentração de 10 µg/ml também parece não sofrer alteração após 24 horas de cultivo (DELLER-QUINN et al., 2009).

Já o efeito do LPS sobre a diferenciação de osteoblastos (mensurada pela atividade da enzima fosfatase alcalina - FA) parece ser dependente da espécie bacteriana, já que o LPS oriundo de *E. coli* (026:B6 Sigma) não causa alteração na atividade desta enzima, independentemente da dose (0,1; 1 e 10 µg/ml) e período avaliado (SHOJI et al., 2006; KATONO et al., 2009) e os LPS extraídos de bactérias da flora bucal (como *P. gingivalis* e *P. Intermedia*) foram capazes de diminuir a expressão e a atividade desta enzima, da osteocalcina e também do Runx2 (LOOMER et al., 1995; KADONO et al., 1999; PELT et al., 2002; BANDOW et al., 2010; XING et al., 2010) (anexo 1).

1.2. Papel do LBI sobre o tecido ósseo

Os efeitos do LBI no tecido ósseo são bastante controversos, as pesquisas mostram resultados diferentes e conflitantes, e é possível que o efeito do LBI na regeneração óssea dependa não só da dose total da

irradiação, mas também do tempo e modo da irradiação (MARTINEZ et al., 2008).

De fato, a comparação dos resultados dos estudos envolvendo o LBI é bastante difícil, devido à grande variedade de métodos e parâmetros dosimétricos utilizados (NICOLAU et al., 2003).

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 (TAKEDA, 1988; CARILLO et al., 1990; FERNANDO et al., 1993; FREITAS et al., 2000).

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 (PINHEIRO & GERBI, 2006; MARTINEZ et al., 2008).

1.2. Papel do LBI sobre os osteoblastos

Os osteoblastos em cultura são largamente utilizados para estudo do processo de reparação e formação óssea, pois eles expressam proteínas próprias do osso, além de manterem a capacidade de formação de nódulos ósseos mineralizados (HARRIS et al., 1995).

Os estudos conduzidos com LBI em culturas de osteoblastos utilizando diferentes parâmetros dosimétricos mostraram efeito positivo (OZAWA et al., 1998; KHADRA et al., 2005; STEIN et al., 2005; ARISU et al., 2006; FUJIHARA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; XU et al., 2009; CHELLINI et al., 2010), inibitório (RENNO et al., 2007; SARACINO et al., 2009) ou ausência de efeito (STEIN et al., 2008; PETRI et al., 2010) em relação à estimulação da proliferação celular (anexo 2).

A adesão celular após irradiação laser, foi avaliada por Fujihara et al. (2006) que cultivaram a linhagem OSTE0-1 após irradiação laser (Ga-Al-As, 780 nm, 10 mw, 3 J/cm², 12 s) e não obtiveram aumento nesta propriedade celular após 20, 40 e 60 minutos da aplicação.

Já com relação à expressão dos fatores de diferenciação de osteoblastos, especificamente o Runx2, existem poucos relatos.

Chellini et al. (2010) irradiaram culturas de osteoblastos da linhagem SAOS-2 (Nd:YAG, 1,064 nm, pulsado, 10 s e $1,5 \text{ J/cm}^2$) obtendo aumento na expressão de Runx2 após 7 dias. Já outro estudo publicado neste mesmo ano, por Kiyosaki et al. com cultura de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 utilizou o LBI (Ga-Al-As, 830 nm pulsado) em três tempos de aplicação diferentes (5, 10 e 20 minutos) resultando em densidades energéticas diferentes (0,96; 1,91; $3,82 \text{ J/cm}^2$) e obtiveram aumento na expressão de Runx2, após 48h de cultivo apenas no tempo de irradiação de 10 minutos.

Já Petri et al. (2010), cultivando osteoblastos primários humanos sobre discos de titânio irradiados com o laser diodo Ga-Al-As (780 nm, contínuo, 9 min. e 3 J/cm^2), obtiveram diminuição da expressão de Runx2 após 14 dias de cultivo.

O efeito do LBI sobre o tecido ósseo em situação infecciosa ainda não foi descrito, nem mesmo foi possível encontrar na literatura pertinente, artigos que descrevessem o efeito do LBI sobre osteoblastos tratados com LPS. Assim permanece incerto se este recurso terapêutico pode exercer um papel importante no reparo de infecções ósseas.

2

Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da irradiação laser em baixa intensidade na proliferação, adesão celular e na expressão gênica do fator de transcrição *runt-related* (Runx2) em osteoblastos (linhagem OSTEO-1) cultivados na presença de LPS (*E.coli*).

3

Método

3.1 Cultivo Celular

As células OSTEO I (DEBONI, 1995), gentilmente doadas pela professora Márcia Martins Marques, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), 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). A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase. O subcultivo foi feito quando a monocamada celular tornava-se subconfluenta para a perpetuação da linhagem celular. Para o repique, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS e tratadas com solução de tripsina 0,25% durante 1 minuto a 37°C. Após incubação foi realizada a neutralização com meio DMEM, centrifugação a 1.200 rpm a 20°C por 5 minutos e posteriormente ressuspensão em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por coloração com corante vital azul de Trypan (0,4%) e foram utilizadas nos ensaios as culturas com viabilidade maior que 95%.

3.2 Tratamento com LPS bacteriano (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 (SHOJI et al., 2006). Os grupos controle não receberam o tratamento com o LPS. Os períodos de tratamento e as concentrações (1, 1 ou 10 µg/ml) utilizadas variaram conforme a análise realizada e estão descritos posteriormente.

3.3 Irradiação Laser (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 $0,04 \text{ cm}^2$, no comprimento de onda de 780 nm. A aplicação foi única, tendo os seguintes parâmetros: densidade de energia de 3 J/cm^2 , potência de 10 mW, tempo de aplicação de 12 segundos, energia total de 0,12 J (FUJIHARA, 2002).

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 (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; FUJIHARA, 2002).

3.4 Ensaios de proliferação celular (método MTT)

A metodologia MTT se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do sal MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis. A posterior lise celular, utilizando um solvente como o isopropanol, faz com que estes sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de azul de formazana formados. A coloração resultante no meio de cultura é então mensurada por meio de um leitor de absorvância.

Deste modo, após o tratamento com LPS (nas concentrações de 0,1; 1 e $10 \mu\text{g/ml}$) e a irradiação laser, os osteoblastos (5×10^3) 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% CO_2 por períodos de 1, 3 e 5 dias.

Os experimentos de proliferação foram conduzidos em duas condições nutricionais (meio suplementado com 5% ou 10% de soro fetal bovino) para

avaliar se as células se mantinham viáveis no modelo de simulação de inflamação (5% SFB e presença de LPS) (FUJIHARA et al., 2002; FERREIRA, et al., 2009).

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 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).

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).

3.5 Ensaio de adesão celular

A quantificação da adesão celular também foi realizada pela técnica MTT (DA SILVA, 2010). Após o tratamento com LPS (nas concentrações de 0,1; 1 e 10 µg/ml) e a aplicação do LBI as células dos diferentes grupos experimentais (cultivadas em DMEM suplementado com apenas 5% de soro fetal bovino), foram incubadas (3×10^4 /poço) em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (TPP) e mantidas em estufa, em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO₂ por períodos de por 20, 40 ou 60 minutos.

Após os diferentes períodos de incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS (0,1 ml) para remoção das células não aderentes.

Os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e os dados de densidade óptica (DO) medidos como absorbância

(correspondente à adesão celular) foram obtidos em quadruplicata e estão representados como médias \pm valores de desvio padrão (DV).

3.6 Expressão gênica

Para a avaliação da expressão gênica, $1,5 \times 10^6$ osteoblastos por grupo experimental foram cultivados em placas de Petri de 4 cm de diâmetro, estéreis (TPP, St. Louis, MO, EUA), com meio de cultura DMEM (5% SFB), a 37°C e 5% de CO₂ por 24 h. As células dos grupos experimentais foram cultivadas com DMEM suplementado com 5% de SFB e tratadas com LPS (somente na concentração de 0,1 µg/ml). Posteriormente, as células foram irradiadas e incubadas por mais 24 horas em estufa à temperatura de 37 °C, atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e então se iniciou o processo de extração do RNA total. As células do grupo controle não foram irradiadas e não foram tratadas com LPS.

Desta forma, foram analisadas as seguintes condições: (a) osteoblastos controle (sem tratamento); (b) osteoblastos tratados LPS; (c) osteoblastos irradiados e (d) osteoblastos tratados LPS e irradiados.

3.6.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total, as células foram homogeneizadas em 1 ml do reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 10200 rpm por 5 min. e os sobrenadantes transferidos para novos microtubos. Foram então adicionados a cada tubo, 200 µl de clorofórmio para separação das diferentes frações (DNA, RNA e proteína) e a fase aquosa superior contendo o RNA total foi transferida para um novo microtubo. Por fim, foram adicionados 500 µl de isopropanol para precipitação do RNA total.

A ressuspensão do precipitado foi realizada utilizando água livre de RNase e as amostras armazenadas em freezer a -80 °C.

Para verificação da qualidade do procedimento de extração, as amostras de RNA total foram analisadas por meio de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1% (figura 1). O RNA total foi quantificado por espectrometria em

260 nm e todas as amostras tratadas com DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para evitar contaminação com DNA genômico.

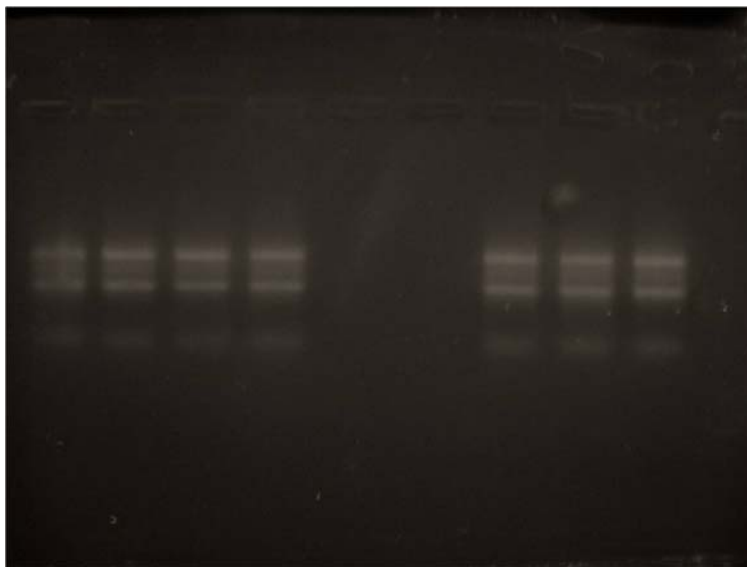


Figura 1. Análise de RNA total. Gel de agarose-formaldeído 1%.

Todas as soluções utilizadas para os procedimentos descritos foram preparadas com água livre de RNase tratada com 0,01% de dietil pirocarboneto (DEPC, Sigma, St. Louis, MO, EUA) e os materiais plásticos e vidraria receberam tratamento contra RNase.

3.6.2. Síntese de cDNA e PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo

O RNA total foi submetido à reação com a enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) para a obtenção do cDNA e este utilizado para a reação de PCR em tempo real por meio do “SYBR Green Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para este procedimento as amostras foram feitas em duplicata, sendo utilizados 10ng de cDNA para cada. O “software” usado foi o “Rotor Gene - 6” em um equipamento “Rotor-Gene RG 3000” (Corbett Research, Valencia, CA, EUA).

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para Runx2 foram usados para a realização deste procedimento. Além disso, utilizamos “primers” para o gene constitutivo RPS18 de forma a permitir a normalização dos dados (PÍPI, 2010).

RUNX2

FOWARD: ATGGCCGGGAATGATGAGAA

REVERSE: TCTGTCTGTGCCTTCTTGGT 151 bp

RPS18

FOWARD: CTCGTGATCCCCGAGAAGTTTC

REVERSE: TGTCTGCTTTCCTCAACACC 142bp

O programa utilizado consistiu de um período de 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de amplificação a 95°C, 30 s (desnaturação); 60°C (RPS18) e 56°C (Runx2), 30 s (anelamento); 72°C, 30 s (extensão).

3.7 Análise dos dados

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).

4

Resultados**4.1 Artigo Publicado**

TEIXEIRA, V.P.; FERRARI, R.A.M.; BUSSADORI, S.K.; MASCARO, M.B.; FERNANDES, K.P.S. Efeito do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sobre a proliferação de osteoblastos. **Conscientiae Saúde**. v.10, n. 2, p.210-14, 2011. (apêndice 1).

Os resultados deste artigo demonstraram que, independentemente da concentração de LPS de *E.coli* (026:B6 Sigma) utilizada (0,1; 1 ou 10 $\mu\text{g/ml}$) no tratamento das culturas de osteoblastos da linhagem OSTEO-1, não houve diferença estatisticamente significativa na proliferação celular após 24 e 48h entre os grupos (figuras 2 e 3). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% SFB, ou seja, situação de nutrição padrão.

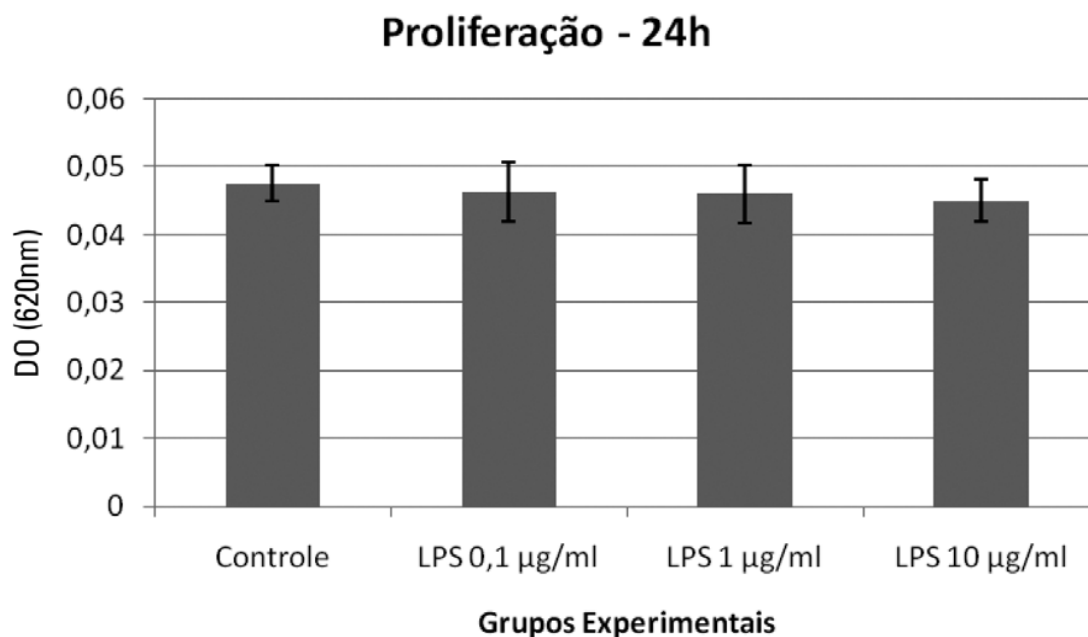


Figura 2. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 24 de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

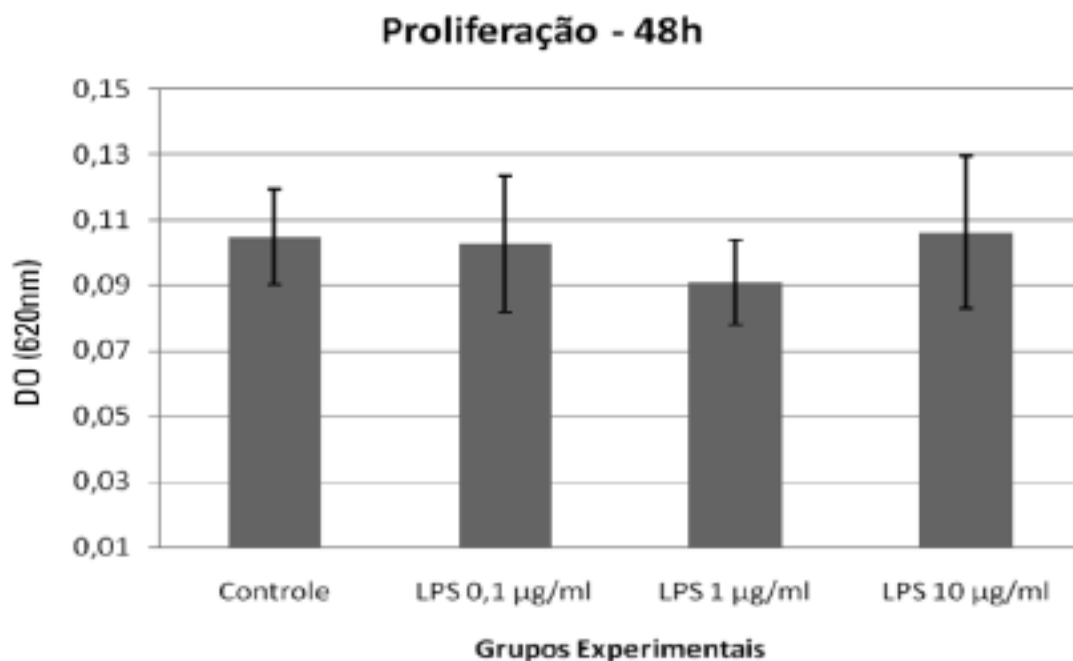


Figura 3. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 48 de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Shoji e colaboradores, em 2006, avaliaram a ação do LPS advindo de *E. coli* (Sigma 026-B6), na concentração de 1 e 10 µg/ml, em cultura da linhagem tumoral SAOS-2, não encontrando diferenças na proliferação celular após 3, 5, 7, 10 e 14 dias, aferida por meio de um método colorimétrico e análise da absorbância.

Deller-Quinn et al. e Jung et al. em 2009 utilizaram culturas de osteoblastos da linhagem MC3T3-1, tratadas de LPS de *E. coli* (026:B6 Sigma), nas concentrações de 10 e 1 µg/ml, respectivamente, e não também não encontraram diferenças na proliferação celular após 24 h de cultivo, utilizando o método de microscopia de fluorescência.

Katono e colaboradores, em 2009, também não observaram diferenças na proliferação celular de culturas de osteoblastos humanos (cultura primária) tratadas com LPS de *E. coli* (026:B6 Sigma) na concentração de 10 ng/ml após 3, 5, 7, 10 e 12 dias de cultivo utilizando um método colorimétrico e análise da absorbância.

4.2 Resultados ainda não publicados

4.2.1 Proliferação Celular

Na seqüência, foram realizados experimentos para avaliação da proliferação celular, nas mesmas condições experimentais, porém com a irradiação laser e com tempos de incubação maiores (1, 3 e 5 dias).

Não houve diferença entre a proliferação celular dos diferentes grupos experimentais, mesmo nos grupos irradiados (figura 4).

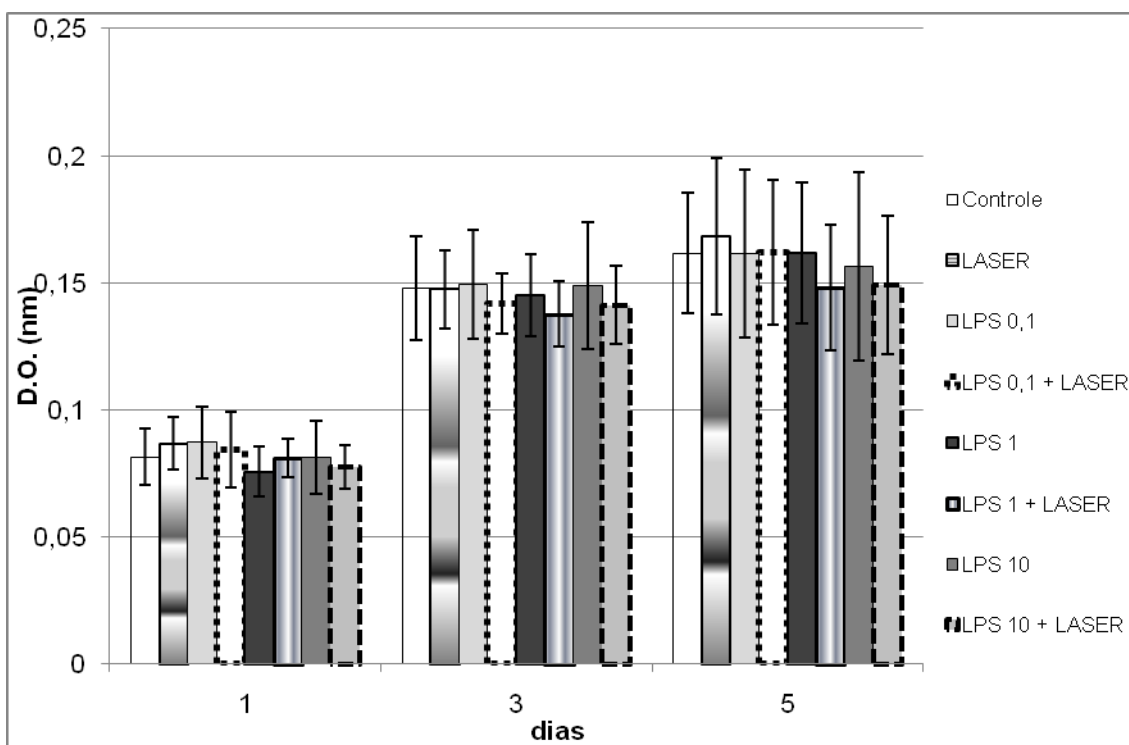


Figura 4. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTE0-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 10% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 1, 3 e 5 dias de cultivo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p \geq 0,05$).

Como a intenção deste estudo foi analisar os efeitos da irradiação laser sobre os osteoblastos em uma situação que simulasse a infecção óssea, e, portanto o sofrimento celular, conduzimos o mesmo modelo experimental, mas suplementamos o meio DMEM com apenas 5% SFB.

A carência nutricional oferece um modelo que em *in vitro* produz estresse similar às condições de estresse *in vivo*, reduzindo as taxas de

crescimento celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; FUJIHARA et al., 2006, FERREIRA et al., 2009) e, portanto, permite a observação dos possíveis efeitos da fototerapia no crescimento das culturas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; FERREIRA et al., 2009)

Nesta condição experimental, nosso resultado foi similar ao obtido na situação nutricional regular (10% de SFB), ou seja, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (figura 5).

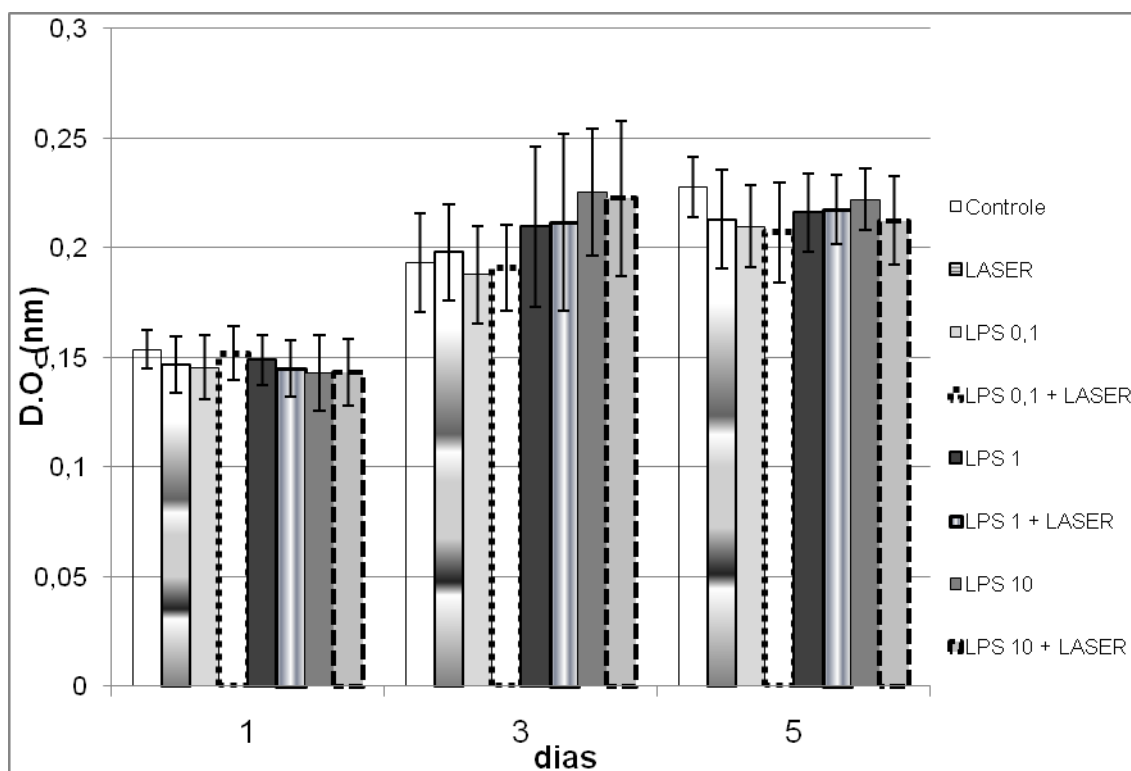


Figura 5. Proliferação celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 1, 3 e 5 dias de cultivo. Não houve diferença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

Com relação ao efeito do LBI sobre a proliferação celular de osteoblastos, existem relatos de estímulo (OZAWA et al., 1998; UEDA et al., 2003; FUJIHARA et al., 2006; RENNO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; XU et al., 2009; ALEKSIC et al., 2010; CHELLINI et al., 2010), de ausência de efeito (COOMBE et al., 2001; ARISU et al., 2006; RENNO et al., 2007; STEIN et al., 2008; ALEKSIC et al., 2010; PETRI et al., 2010) e ainda de inibição da proliferação celular (RENNO et al., 2007; SARACINO et al., 2009).

Esta grande divergência nos resultados dos estudos se deve, dentre outros fatores metodológicos, a grande variação nos parâmetros de irradiação e a linhagem celular avaliada (PINHEIRO & GERBI, 2006; FERREIRA et al., 2009). Os dados dos artigos referidos estão descritos no anexo 2 desta dissertação.

Neste sentido, buscamos comparar nossos resultados aos obtidos por autores que utilizaram o mesmo diodo emissor, a mesma intensidade e o mesmo comprimento de onda (FUJIHARA et al., 2006; PETRI et al., 2010) utilizados em nosso estudo.

Petri *et al.* (2010) utilizaram o laser de Ga-Al-As sobre culturas primárias de osteoblastos humanos cultivados sobre titânio. As células foram expostas a doses de 3 J/cm^2 (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).

Já Fujihara *et al.* (2006) cultivaram osteoblastos da linhagem OSTEO-1 em situação de carência nutricional (5% SFB) e observaram que 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.

A discrepância entre os resultados encontrados por nós e os de Fujihara e colaboradores muito provavelmente está ligada método de avaliação utilizado. O teste de viabilidade pelo azul de Trypan, método utilizado por Fujihara et al., se baseia na coloração de células cuja membrana celular foi rompida (WILSON, 2000).

Já o método MTT avalia a função mitocondrial por meio da redução do sal de tetrazólio nas mitocôndrias das células viáveis (DENIZOT & LANG, 1986). Este ensaio foi utilizado pela primeira vez na quantificação da proliferação celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT & LANG, 1986) passando a ter outras aplicações como rastreamento antitumoral e antiviral (LOFTI et al., 2002; GLATTHAR-SAALMÜLLER et al., 2001).

5.2.2 Adesão Celular

A adesão das células ósseas a matriz extracelular é um requisito fundamental para o seu desenvolvimento, diferenciação, função e sobrevivência (ILIC et al., 1998; GRONTHOS et al., 2001; LACONTURE et al., 2002; LIEGIBEL et al., 2002).

O efeito do LPS e do LBI sobre a adesão dos osteoblastos foi avaliado após 20, 40 e 60 minutos de incubação, conforme descrito por Fujihara et al. e Siva 2010. As comparações entre os grupos e seu grau de significância estão descritos na tabela 1.

Grupos comparados	Tempos (min.)		
	20	40	60
controle x LASER	NS	NS	NS
LPS 0.1 x LPS 0.1 + LASER	NS	NS	NS
LPS 1 x LPS 1 + LASER	NS	NS	NS
LPS 10 x LPS 10 + LASER	NS	NS	NS
controle x LPS 0.1	NS	NS	NS
controle x LPS 1	***	NS	NS
controle x LPS 10	***	*	*
LPS 0.1 x LPS 1	*	NS	NS
LPS 0.1 x LPS 10	***	NS	NS
LPS 1 x LPS 10	NS	NS	NS

Tabela 1. Adesão celular, comparação entre os grupos experimentais por ANOVA/Tukey. NS = não significante; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Após 20 minutos podemos observar que o tratamento com LPS gerou uma diminuição na adesão celular, esta diminuição foi estatisticamente significativa nas culturas tratadas com LPS nas concentrações de 1 e 10 $\mu\text{g/ml}$, quando comparadas ao grupo controle (figura 6, tabela 1). A irradiação laser, por sua vez, não alterou significativamente o padrão de adesão das células em nenhum dos grupos experimentais (figura 7, tabela 1).

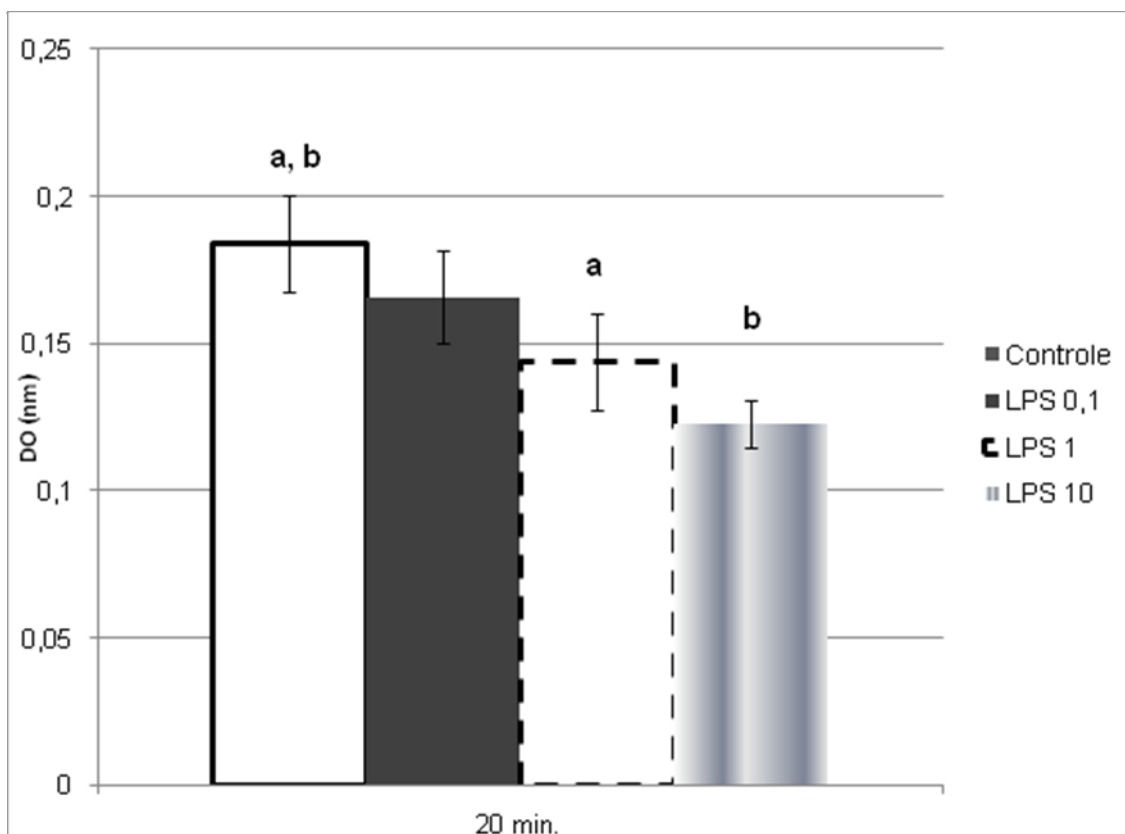


Figura 6. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTE0-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 20 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

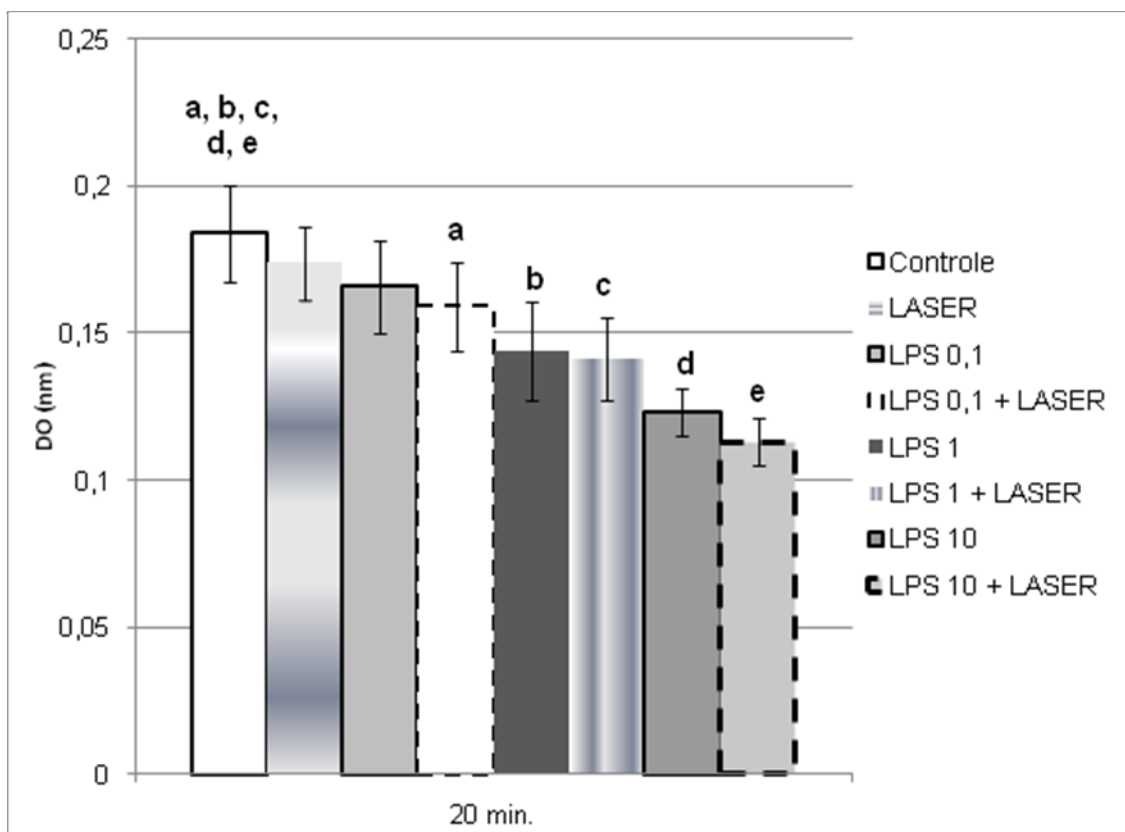


Figura 7. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 20 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Após 40 min. podemos observar em relação ao tratamento com LPS que somente na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ há uma diminuição da adesão celular em relação ao grupo controle. A irradiação laser por sua vez, continua não alterando o padrão de adesão celular (figura 8 e 9, tabela 1).

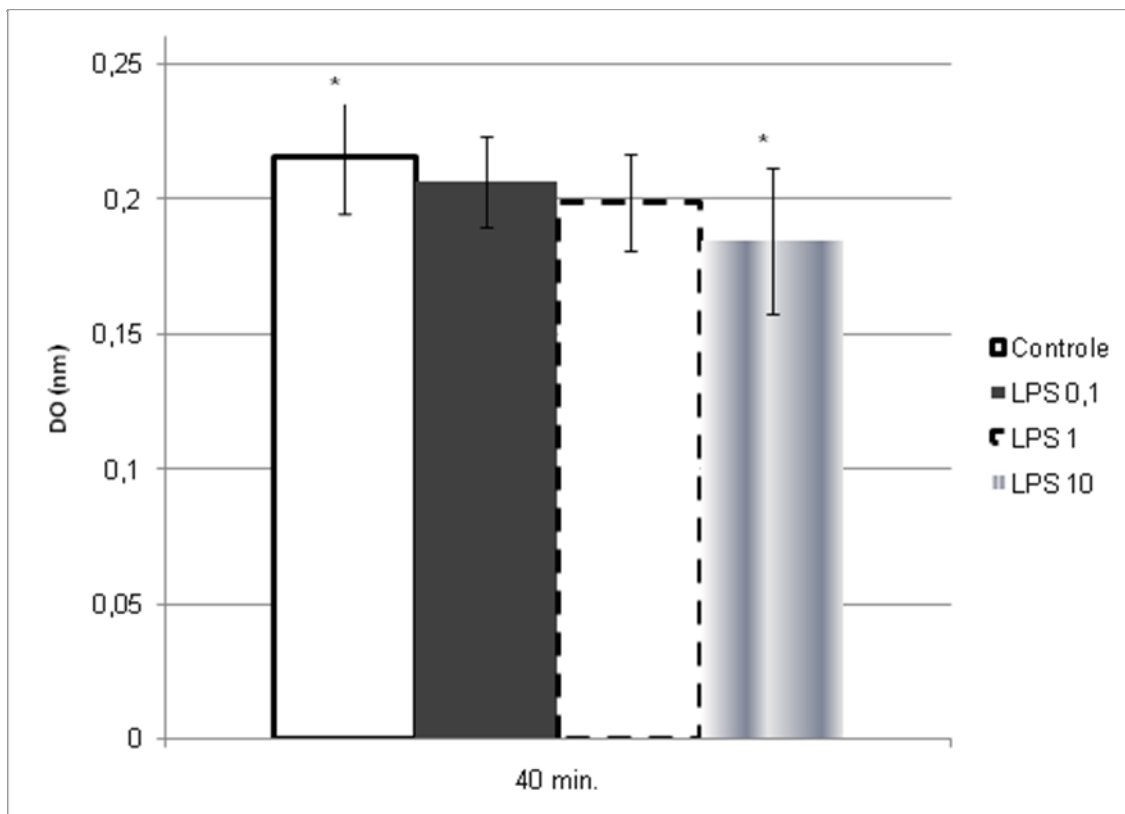


Figura 8. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTE0-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 40 minutos de cultivo (* $p < 0,05$).

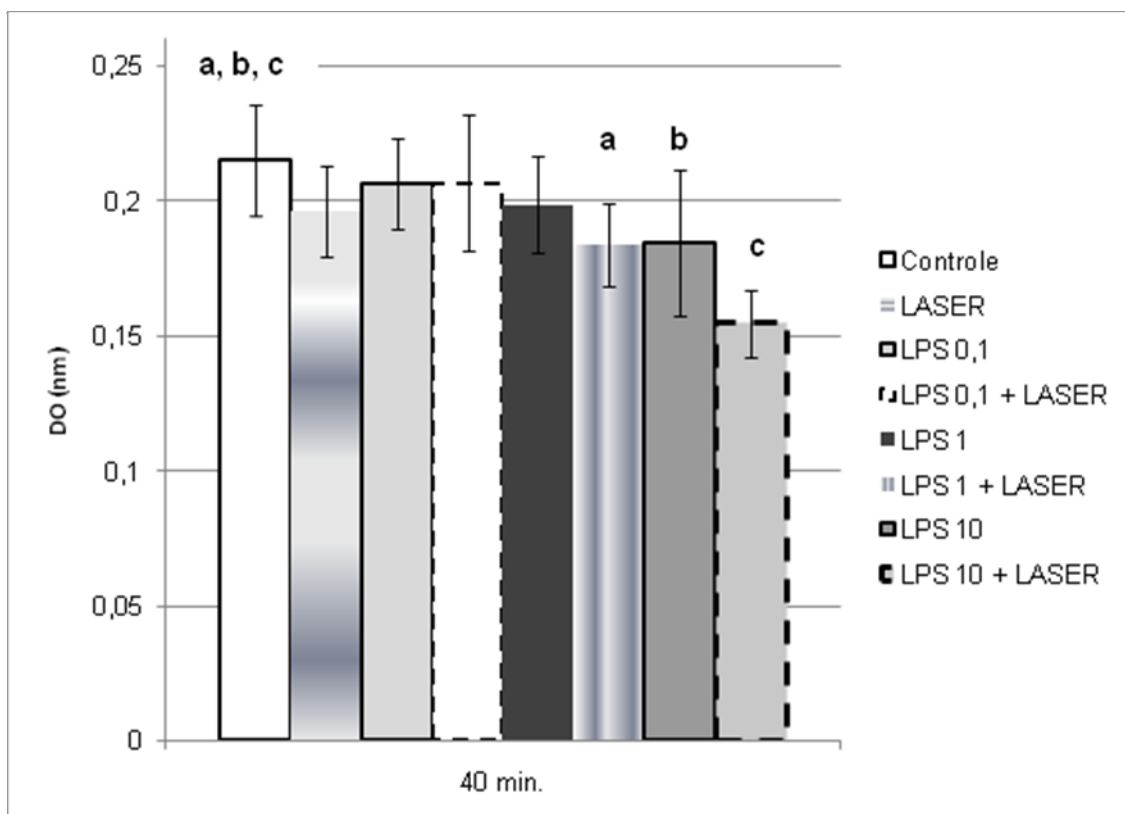


Figura 9. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 40 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

Após 60 minutos, o comportamento das culturas tratadas com LPS continua o mesmo já observado em 40 minutos, ou seja, podemos observar que somente na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ há uma diminuição da adesão celular quando comparada a do grupo controle. A irradiação laser por sua vez, continua não alterando o padrão de adesão celular (figura 10 e 11, tabela 1).

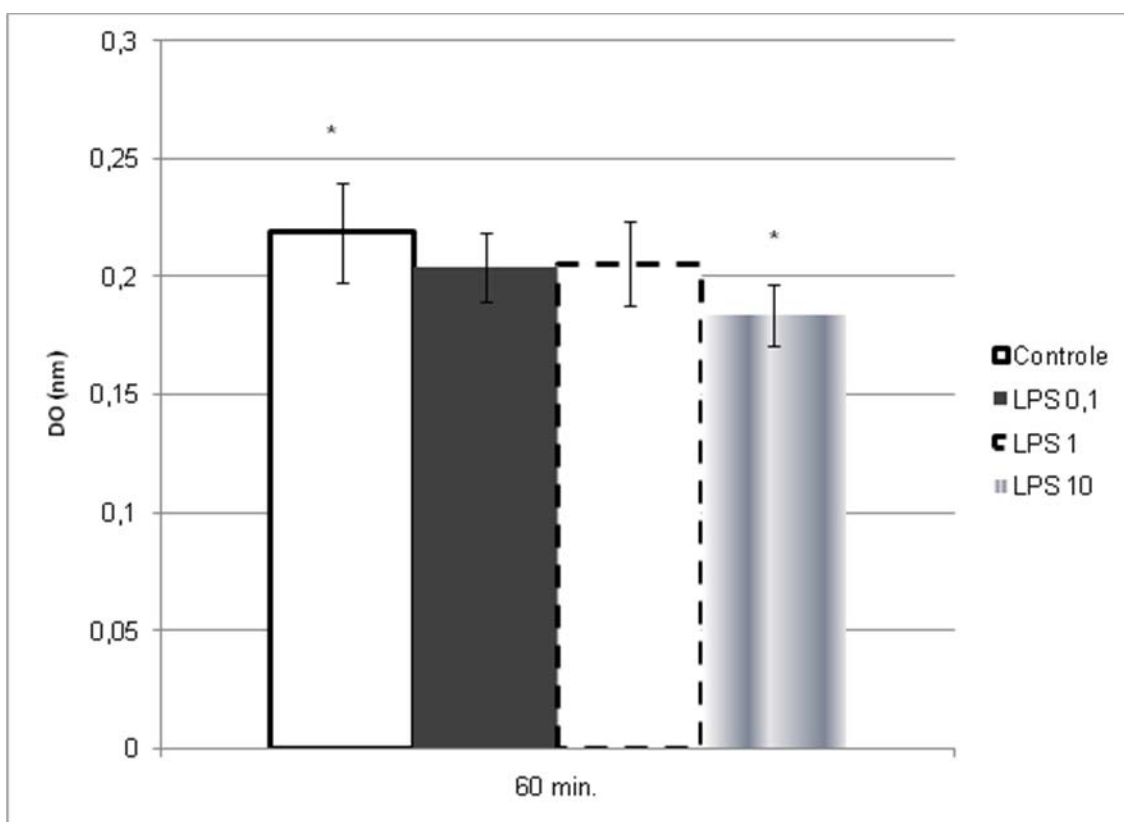


Figura 10. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 60 minutos de cultivo (* $p < 0,01$).

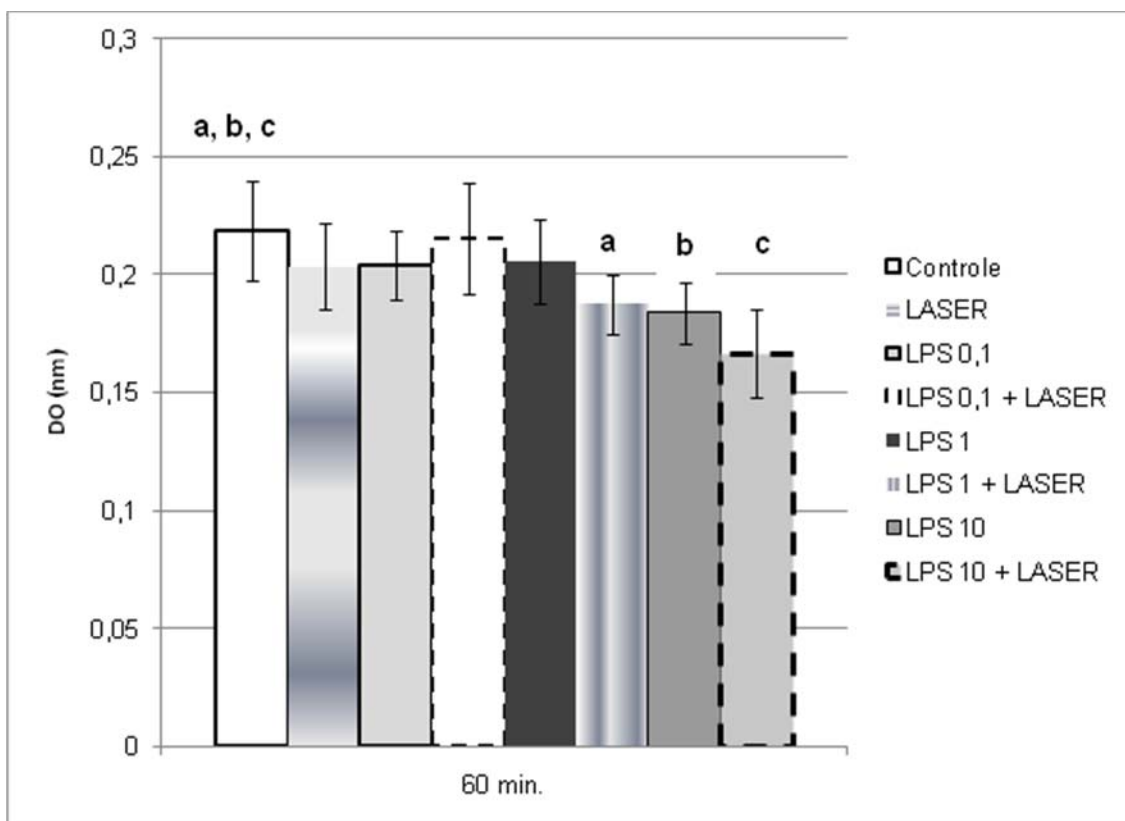


Figura 11. Adesão celular mensurada pelo método MTT como densidade óptica (DO), das culturas de células OSTEEO-1 do grupo controle e dos grupos experimentais cultivadas em DMEM (suplementado com 5% de SFB) e tratadas com diferentes concentrações de LPS, após 60 minutos de cultivo. As letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

A literatura nos mostra que são poucos os estudos que avaliaram a adesão de osteoblastos. Deller-Quinn e colaboradores em 2009 cultivaram a linhagem MC3T3-E1 sobre uma base mineral e na presença de LPS advindo de *E. coli* (Sigma 026-B6), concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, não obtendo qualquer alteração na adesão celular após 24 h, mensurada por contagem em microscopia de fluorescência.

Já Le et al. 2009, que cultivaram a linhagem MG-63 na presença de bactérias *P. gingivalis* inativadas (quantidade de 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9), obtiveram diminuição na adesão após 24h, avaliada pelo método MTT.

A comparação de nossos dados com os destes autores é muito difícil, pois as linhagens celulares foram diferentes da utilizada por nós, o tempo de avaliação foi bastante superior ao nosso e, além disso, um destes estudos avaliou a adesão das células sobre um biomaterial (DELLER-QUINN et al.,

2009) e no outro as células foram tratadas com bactérias inativadas e não somente na presença de LPS (LE et al., 2009).

O estudo de Fujihara et al. 2006 foi conduzido com a mesma linhagem celular (OSTEO-1), também cultivadas em situação de carência nutricional (5% SFB), o mesmo equipamento laser e os mesmos parâmetros dosimétricos (Ga-Al-As, 780 nm, 10 mw, 3 J/cm², 12 s). Estes autores também observaram que a irradiação com laser não modificou a adesão celular quando comparados os valores de adesão do grupo controle (20, 40 e 60 min.), avaliada pelo método do azul de Trypan.

5.2.3 Expressão Gênica de Runx2

O efeito do tratamento com LPS e do LBI sobre os osteoblastos também foi avaliado no que se refere à expressão do gene do fator de transcrição *runt-related* (Runx2) que é essencial para a diferenciação e maturação dos osteoblastos (HARADA & RODAN, 2003; ERIKSEN et al., 2010).

Após 24 h da irradiação, observamos que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (figura 12).

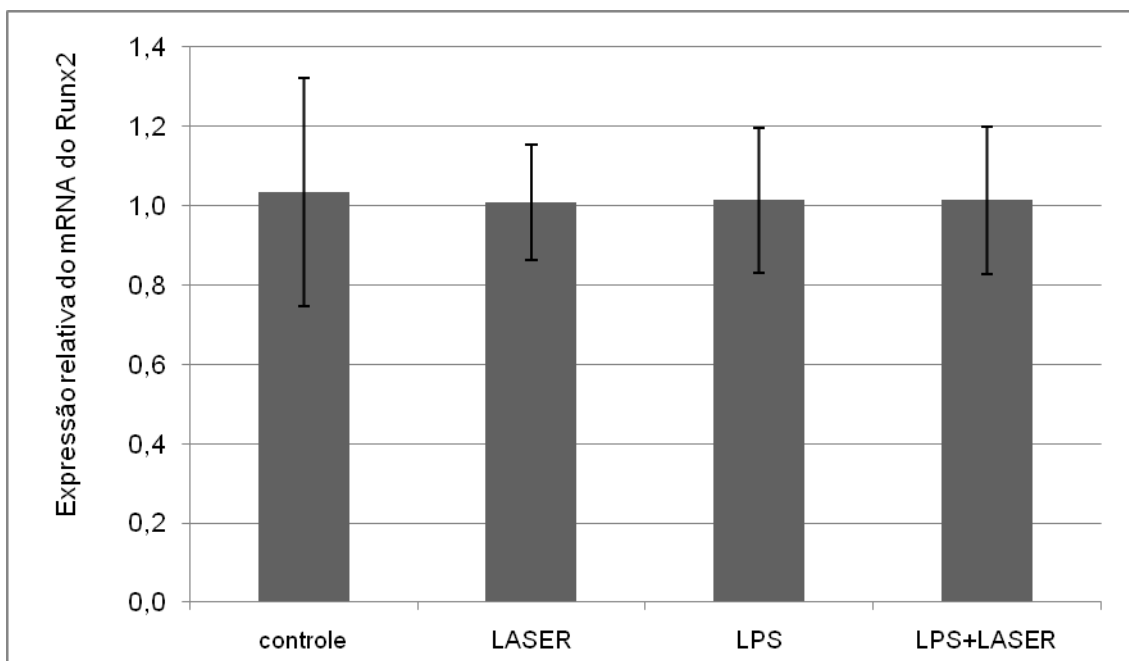


Figura 12. Análise da expressão relativa do RNAm do Runx2, normalizados por RPS18, em cultura de osteoblastos (OSTEO-1) e tratados com LBI e LPS (0,1 $\mu\text{g/ml}$), após 24 h de cultivo, verificada por PCR em tempo real. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Bandow e colaboradores, em 2010, ao cultivarem osteoblastos primários de ratos na presença de LPS *E. coli* (055-B5), na concentração de 10 ng/ml , observaram diminuição da expressão de Runx2 após 7, 14 e 21 dias de cultivo. Resultado similar a este foi o de Xing et al. 2010, que ao cultivarem osteoblastos MC3T3-E1 com extratos de *P. gingivalis*, na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, verificaram diminuição da expressão de RUNX-2 após 1, 3, 7 e 14 dias de cultivo.

Nosso resultado com relação ao tratamento dos osteoblastos com LPS não pode ser comparado ao do estudo de Bandow et al. 2010 pela diferença no período de tempo. Já o estudo de Xing et al. 2010 utilizou o mesmo período de 24 h, entretanto, as células foram tratadas com lisados da bactéria (*P. gingivalis*), e estes microorganismos possuem muito mais componentes ativos do que somente o LPS.

Já com relação ao LBI, encontramos a expressão de Runx2 sendo avaliada em alguns estudos mais recentes.

Fujimoto e colaboradores, em 2010, cultivaram osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 irradiados com LBI (Ga-Al-As, pulsado, 830 nm, 5, 10 e 20 min.,

0,96; 1,91 e 3,82 J/cm²) obtendo aumento da expressão de Runx2 após 12, 24 e 48 h na irradiação de 10 minutos com 1,91 J/cm². As outras duas doses não apresentaram diferenças em relação ao controle.

Outro estudo no mesmo ano de 2010 (Kyosaki et al. 2010) repetiu os mesmos parâmetros do estudo de Fujimoto et al., cultivando também MC3T3-E1 irradiadas com LBI (Ga-Al-As, pulsado, 830 nm, 5, 10 e 20 min., 0,96; 1,91 e 3,82 J/cm²) e obteve um aumento da expressão de Runx2 após 48h no grupo irradiado por 10 minutos com 1,91 J/cm².

Chellini et al. 2010, observaram que ao cultivar osteoblastos da linhagem SAOS-2 e irradiar com laser (Nd:YAG, 1,064 nm, pulsado, 10 s, 1,5 J/cm²) houve aumento da expressão de Runx2 após 7 dias de cultivo.

Já Petri e colaboradores, também em 2010, cultivaram osteoblastos primários humanos em discos de titânio irradiados com LBI (Ga-Al-As, 780 nm, contínuo, 70 mW, 9 min., 3 J/cm²) e obtiveram diminuição da expressão de Runx2 após 14 dias de cultivo.

Os estudos de Fujimoto et al., 2010 e Kyosaki et al., 2010 utilizaram células da linhagem MC3T3-E1 e laser em baixa intensidade Ga-Al-As, 830 nm, 10 min., 1,91 J/cm² em regime pulsado. Diferindo do nosso modelo em relação a linhagem celular e aos parâmetros da aplicação laser. Estas diferenças são uma constante nos estudos publicados o que torna difícil uma comparação entre trabalhos. Além dos mais variados meios, comprimentos de onda, tempo e dose do LBI, as linhagens celulares também são proporcionalmente variadas. Tendo desde culturas primárias de osteoblastos até linhagens tumorais (MG-63 e SAOS-2) e não tumorais (MC3T3-E1, OFCOLII e OSTEO-1) (anexos 1 e 2).

Estas diferenças se devem a grande gama de equipamentos disponíveis no mercado e suas possibilidades de utilização, além do anseio dos pesquisadores em perseguir uma possível dose maneira de administração ideal, conforme pode ser observado no anexo 2 desta dissertação.

Considerações finais

Os resultados deste estudo sugerem que nestas condições experimentais, 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 a expressão gênica de Runx2 após 24 h de cultivo. A adesão celular se mostrou diminuída, após 20, 40 e 60 minutos, somente nos grupos cultivados na presença de LPS na concentração de 10 µg/ml. O uso do LBI, por sua vez, não alterou a resposta dos osteoblastos ao LPS no que se refere à proliferação, adesão ou diferenciação celular (avaliada pela expressão de Runx2).

6

Referências bibliográficas

ALEKSIC, V.; AOKI, A.; IWASAKI, K.; TAKASAKI, A.A.; WANG, C.Y.; ABIKO, Y.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. **Lasers Med Sci.** v. 25, n. 4, p. 559-69, 2010.

ALMEIDA-LOPES, L.; RIAGAU, J.; ZÄNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med.** v. 29, p. 179-84, 2001.

ARISU, H.D.; TÜRKÖZ, E.; BALA, O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. **Lasers Med Sci.** v. 21, n. 3, p. 175-80, 2006.

BANDOW, K.; MAEDA, A.; KAKIMOTO, K.; KUSUYAMA, J.; SHAMOTO, M.; OHNISI, T.; MATSUGUCHI, T. Molecular mechanisms of the inhibitory effect of lipopolysaccharide (LPS) on osteoblast differentiation. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 402, n. 4, p. 755-61, 2010. BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** v. 423, p. 337-42, 2003.

CARILLO, J.S.; CALATAVUD, J.; MANSO, F.J.; BARBERIA, E.; MARTINEZ, J.M.; 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.** v. 40, n. 1, p. 31-6, 1990.

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 in Surgery and Medicine.** v. 42, p. 527-39, 2010.

COOMBE, A.R.; HO, C.T.; DARENDELIER, M.A.; HUNTER, N.; PHILIPS, J.R.; CHAPPLE, C.C.; YUM, L.W. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. **Clin Orthod Res.** v. 4, n. 1, p. 3-14, 2001.

DA SILVA, T.D. Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na proliferação, adesão e diferenciação de osteoblastos. Dissertação; Mestrado em Ciências da Reabilitação – Universidade Nove de Julho, São Paulo, 2010.

DAMOULIS, P.D.; HAUSCHKA, P.V. Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 201, n. 2, p. 924-31, 1994.

DEBONI, N.C.Z. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. Dissertação; Doutorado em Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

DELLER-QUINN, M.; PERINPANAYAGAM, H. Osteoblast expression of cytokines is altered on MTA surfaces. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 108, n. 2, p. 302-7, 2009.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods.** v. 89, n. 2, p. 271-7, 1986.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science.** v. 289, p. 1501-04, 2000.

ERIKSEN, E.F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 11, n. 4, p. 219-27, 2010.

FERNANDO, S.; HILL, C.M.; WALKER, R. A randomised doubleblind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower third molar teeth. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v.31, p. 170-2, 1993.

FERREIRA, M.P.; FERRARI, R.A.; GRAVALOS, E.D.; MARTINS, M.D.; BUSSADORI, S.K.; GONZALEZ, D.A.; FERNANDES, K.P. 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.** v. 27, n. 6, p. 901-6, 2009.

FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Appl Surf Sci.** n. 154-155, p. 548-54, 2000.

FUJIHARA, N.A. 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.

FUJIHARA, N.A.; HIRAKI, K.R.; MARQUES, M.M. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg Med.** v. 38, n. 4, p. 332-6, 2006.

FUJIMOTO, K.; KYOSAKI, T.; MITSUJ, N.; MAYAHARA, K.; OMASA, S.; SUZUKI, N.; SHIMIZU, N. Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. **Lasers Surg Med.** v. 42, n. 6, p. 519-26, 2010.

GLATTHAAR-SAALMÜLLER, B.; SACHER, F.; ESPERESTER, A. Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. **Antiviral Res.** v. 50, n. 3, p. 223-8, 2001.

GRONTHOS, S.; SIMMONS, P.J.; GRAVES, S.E.; ROBEY, P.G. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone.** v. 28, p. 174-81, 2001.

HANAZAWA, S.; AMANO, S.; NAKADA, K.; OHMORI, Y.; MIYOSHI, T.; HIROSE, K.; KITANO, S. Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by cultured bone cells from newborn mouse calvaria. **Calcif Tissue Int.** v. 41, n. 1, p. 31-7, 1987.

HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature.** v. 423, p. 349-55, 2003.

HARRIS, S.A.; ENGER, J.R.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. **J Bone Miner Res.** v. 10, n. 2, p. 178-86, 1995.

HAUSMANN, E.; RAISZ, L.G.; MILLER, W.A. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. **Science.** v. 168, p. 862-4, 1970.

HEYMANN, D.; ROUSSELLE, A.V. gp130 Cytokine family and bone cells. **Cytokine.** v. 12, n. 10, p. 1455-68, 2000.

HOROWITZ, M.C.; COLEMAN, D.L.; RYABY, J.T.; EINHORN, T.A. Osteotropic agents induce the differential secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by the osteoblast cell line MC3T3-E1. **J Bone Miner Res.** v. 4, n. 6, p. 911-21, 1989.

ILIC, D.; ALMEIDA, E.; SCHLAEPFER, D.; DAZIN, P.; AIZAWA, S.; DAMSKY, C. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. **J. Cell Biol.** v. 143, p. 547-60, 1998.

ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; JIN, C.H.; AKATSU, T.; ABE, E.; NAKAMURA, Y. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **J Immunol.** v. 145, p. 3297-303, 1990.

JUNG, W.K.; PARK, I.S.; PARK, S.J.; YEA, S.S.; CHOI, Y.H.; OH, S.; PARK, S.G.; CHOI, I.W. The 15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ inhibits LPS-stimulated AKT and NF-kappaB activation and suppresses interleukin-6 in osteoblast-like cells MC3T3E-1. **Life Sci.** v. 85, n. 1-2, p. 46-53, 2009.

KADONO, H.; KIDO, J.I.; KATAOKA, M.; YAMAUCHI, N.; NAGATA, T. Inhibition of Osteoblastic Cell Differentiation by Lipopolysaccharide Extract from *Porphyromonas gingivalis*. **Infection and Immunity.** v. 67, p. 2841-6, 1999.

KARSENTY, G.; WAGNER, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. **Dev Cell.** v. 2, p. 389-406, 2002.

KATONO, T.; KAWATO, T.; TANABE, N.; TANAKA, H.; SUZUKI, N.; KITAMI, S.; MORITAA, T.; MOTOHASHI, M.; MAENO, M. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen

activators, and their inhibitors in human osteoblasts. **Archives of oral biology**. v. 54, p. 146-55, 2009.

KEETING, P.E.; RIFAS, L.; HARRIS, S.A.; COLVARD, D.S.; SPELSBERG, T.C.; PECK, W.A.; RIGGS, B.L. Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. **J Bone Miner Res**. v. 6, n. 8, p. 827-33, 1991.

KHADRA, M. LYNGSTADAAS, S.P.; HAANAES, H.R.; MUSTAFA, K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. **Biomaterials**. v. 26, p. 3503-09, 2005.

KIYOSAKI, T.; MITSUI, N.; SUZUKI, N.; SHIMIZU, N. Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. **Photomed Laser Surg**. v. 28, p. 167-72, 2010.

LACOUNTURE, M.E.; SCHAFFER, J.L.; KLICKSTEIN, L.B. A comparison of type I collagen, fibronectin, and vitronectin in supporting adhesion of mechanically strained osteoblasts. **J Bone Miner Res**. v. 17, p. 481-92, 2002.

LE, X.K.; LAFLAMME, C.; ROUABHIA, M. Porphyromonas gingivalis decreases osteoblast proliferation through IL-6-RANKL/OPG and MMP-9/TIMPs pathways. **Indian J Dent Res**. v. 20, n. 2, p. 141-9, 2009.

LIEGIBEL, U.M.; SOMMER, U.; TOMAKIDI, P.; HILSCHER, U.; VAN DEN HEUVEL, L.; PIRZER, R.; HILLMEIER, J.; NAWROTH, P.; KASPERK, C. Concerted action of androgens and mechanical strain shifts bone metabolism from high turnover into an osteoanabolic mode. **J Exp Med**. v. 196, n. 10, p. 1387-92, 2002.

LITTLEWOOD, A.J.; RUSSEL, J.; HARVEY, G.R.; HUGHES, D.E.; RUSSEL, R.G.; GOWEN, M. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. **Endocrinology**. v. 129, p. 1513-20, 1991.

LOOMER, P.M.; ELLEN, R.P.; TENENBAUM, H.C. Characterization of inhibitory effects of suspected periodontopathogens on osteogenesis in vitro. **Infect Immun**. v. 63, n. 9, p. 3287-96, 1995.

MANOLAGAS, S.C. Role of cytokines in bone resorption. **Bone**. v. 17, p. 63s-7s, 1995.

MARTINEZ, M.E.M.; PINHEIRO, A.L.; RAMALHO, L.M. Effect of IR laser photobiomodulation on the repair of bone defects grafted with organic bovine bone. . **Lasers Med Sci**. v. 23, p. 313-17, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 16, n. 65, p. 55-63, 1983.

NAIR, S.P.; MEGHII, S.; WILSON, M.; REDDI, K.; WHITE, P.; HENDERSON, B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. **Infect Immun**. v. 64, p. 2371-80, 1996.

NICOLAU, R.A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.; DOS REIS, L.M.; ZÂNGARO, R.A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. **Lasers Med Sci**. v. 18, p. 89-94, 2003.

NOGUEIRA, G.T. EFEITO DA LASERTERAPIA SOBRE A DIFERENCIAÇÃO, ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ÓSSEAS TRATADAS COM ANABOLIZANTES [Dissertação]. São Paulo: Universidade Nove de Julho; 2010.

OLIVEIRA, D.A.P.; DE OLIVEIRA, R.F.; ZANGARO, R.A.; SOARES, C.P. Evaluation of Low-Level Laser Therapy of Osteoblastic Cells. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 26, n. 4, p. 401-4, 2008.

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**. v. 22, n. 4, p. 347-54, 1998.

PELT, P.; ZIMMERMANN, B.; ULBRICH, N.; BERNIMOULIN, J.P. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. **Archives of Oral Biology**. v. 47, p. 859-66, 2002.

PEREIRA, A.N.; EDUARDO, C.P.; MATSON, E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg. Med.** v. 31, n. 4, p. 263-67, 2002.

PETRI, A.D.; TEIXEIRA, L.N.; CRIPPA, G.E.; BELOTI, M.M.; DE OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. **Braz Dent J.** v. 21, n. 6, p. 491-8, 2010.

PINHEIRO, A.L.B.; GERBI, M.E.M.M. Photobioengineering of the bone repair process. **Photomed Laser Surg.** v. 24, p. 169-78, 2006.

PÍPI, E.F. Efeitos do laser terapêutico e do ultrassom pulsado de baixa intensidade na expressão de genes relacionados à diferenciação celular durante o processo de reparo ósseo. Dissertação; Mestrado em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

RENNO, A.C.; MCDONNELL, P.A.; PARIZOTTO, N.A.; LAAKSO, E.L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomed Laser Surg.** v. 25, n. 4, p. 275-80, 2007.

SARACINO, S.; MOZZATI, M.; MARTINASSO, G.; POL, R.; CANUTO, R.A.; MUZIO, G. Superpulsed laser irradiation increases osteoblast activity via modulation of bone morphogenetic factors. **Lasers Surg Med.** v. 41, n. 4, p. 298-304, 2009.

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.** v. 78, n. 17, p. 2012-8, 2006.

STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. **Photomed Laser Surg.** v. 23, n. 2, p. 161-6, 2005.

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.** v. 120, n. 3-4, p. 112-7, 2008.

STEIN, E.; KOEHN, J.; SUTTER, W.; SCHMIDL, C.; LEZAIC, V.; WENDTLANDT, G.; WATZINGER, F.; TURHANI, D. . Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. **Photomed Laser Surg.** v. 27, n.1, p. 71-7, 2009.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction: experimental study in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.17, p. 388-91, 1988.

UEDA, Y.; SHIMIZU, N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. **J Clin Laser Med Surg.** v. 21, n. 5, p. 271-7, 2003.

XING, Q.; YE, Q.; FAN, M.; ZHOU, Y.; XU, Q.; SANDHAM, A. . Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide inhibits the osteoblastic differentiation of preosteoblasts by activating Notch1 signaling. **A J Cell Physiol.** v. 225, n. 1, p. 106-14, 2010.

XU, M.; DENG, T.; MO, F.; DENG, B.; LAM, W.; DENG, P.; ZHANG, Z.; LIU, S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. **Photomed Laser Surg.** v. 27, n. 2, p. 309-15.

WILSON, J.K.; SARGENT, J.M.; ELGIE, A.W.; HILL, J.G.; TAYLOR, C.G. A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. **Br J Cancer.** v. 62, n. 2, p. 189-94, 1990.

APÊNDICE

TEIXEIRA, V.P.; FERRARI, R.A.M.; BUSSADORI, S.K.; MASCARO, M.B.;
FERNANDES, K.P.S. Efeito do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sobre a
proliferação de osteoblastos. **Conscientiae Saúde**. v.10, n. 2, p.210-14, 2011

Efeito do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sobre a proliferação de osteoblastos

Effect of Escherichia coli lipopolisacaride on proliferation of osteoblasts

Victor Perez Teixeira¹; Raquel Agnelli Mesquita Ferrari²; Sandra Kalil Bussadori³; Marcelo Betti Mascaro⁴; Kristianne Porta Santos Fernandes⁵

¹ Mestrando do Programa de Ciências da Reabilitação – Uninove, São Paulo, SP – Brasil.

² Doutora em Ciências Fisiológicas – UFSCar, Professora do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove, São Paulo, SP – Brasil.

³ Doutora em Ciências Odontológicas – USP, Professora do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove, São Paulo, SP – Brasil.

⁴ Doutor em Anatomia (ICB/USP), Professor do Curso de Odontologia – Uninove, São Paulo, SP – Brasil.

⁵ Doutora em Imunologia (ICB/USP), Professora do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove, São Paulo, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Kristianne Porta Santos Fernandes – Uninove/Departamento de Ciências da Reabilitação
Av. Francisco Matarazzo, 612
05001-100 – São Paulo – SP [Brasil]
victorpteixeira@hotmail.com

Resumo

Introdução: O lipolissacarídeo (LPS) é um componente majoritário da parede celular de bactérias gram-negativas, reconhecido como potente indutor de resposta inflamatória e de reabsorção óssea. **Objetivo:** Investigar o efeito do LPS de *Escherichia coli*, sobre a proliferação de osteoblastos. **Métodos:** Os osteoblastos foram cultivados com diferentes concentrações de LPS (0,1, 1 e 10µg/ml) e as culturas do grupo controle não receberam a adição desse composto. A análise da proliferação celular foi realizada por meio do teste MTT. **Resultados:** A adição de LPS, na concentração de 1µg/ml, diminuiu a proliferação celular (porém de maneira estatisticamente não significativa), quando comparado com as células do grupo controle e demais grupos. **Conclusão:** Esse resultado sugere que a proliferação de osteoblastos pode ser afetada pelo LPS de *Escherichia coli* e, sendo assim, poderia ter um papel importante nos quadros de destruição óssea por infecção de bactérias gram-negativas.

Descritores: Reabsorção óssea; Osteoblastos; LPS.

Abstract

Introduction: LPS is the major component of the gram-negative bacterial cell wall. It is traditionally recognized as an endotoxin which induces a strong response from normal animal immune systems and bone loss. **Objective:** In this study, we investigated the effect of LPS, extracted of *Escherichia coli*, on the proliferation of osteoblasts. **Methods:** The osteoblasts were cultured with different concentration of LPS (0.1, 1 and 10µg/ml). Untreated cultures were used as controls. The analysis of the cellular proliferation was performed using the MTT method. **Results:** The results revealed a non-significant decrease in the proliferation of osteoblasts treated with 1µg/ml of LPS. **Conclusion:** LPS of *Escherichia coli* may promote a decrease in osteoblasts proliferation and play an important role in cases of bone loss after gram-negative infection.

Key words: Bone resorption; Osteoblasts; LPS.

Introdução

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que, em conjunto com o tecido cartilaginoso, forma o sistema esquelético. Os tipos celulares específicos desse tecido são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos têm como função primordial a formação de osso, e nesse processo formativo acabam por ficar aprisionados em seu próprio produto secretório (matriz mineralizada), sendo progressivamente diferenciados em osteócitos¹. Já os osteoclastos são essenciais no processo de remodelamento por serem responsáveis pela reabsorção óssea^{2,3}.

O metabolismo ósseo é um processo contínuo e dinâmico de reabsorção e de deposição óssea regulado localmente por redes de hormônios, citocinas e outros fatores. Em situações patológicas, que incluem a osteoporose, a artrite reumatoide, a osteoartrite e infecções ósseas, citocinas e mediadores locais são responsáveis pelo aumento da reabsorção osteoclástica e pela inibição da reparação nos locais onde houve perda óssea⁴.

Bactérias e seus produtos causam perda óssea inflamatória em um grande número de condições, incluindo otite crônica média, periodontite, lesões endodônticas, perda de implantes ortopédicos etc.⁵. Entretanto, ainda não está suficientemente claro como elas provocam essa perda óssea, existindo três possibilidades: ou as bactérias destroem diretamente os componentes ósseos por liberação de ácidos e proteases; ou elas acarretam processos celulares que estimulam a degradação óssea; ou inibem a síntese de matriz óssea⁶.

O lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede de bactérias gram-negativas, foi o primeiro elemento bacteriano cuja capacidade de induzir reabsorção óssea já foi demonstrada⁷.

Várias evidências têm estabelecido o conceito de que o LPS estimula os osteoblastos e outras células a secretarem vários fatores promotores de reabsorção óssea como a prostaglandina E2 (PGE2) e as citocinas: fator de necrose

tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1) nos tecidos inflamados^{6,8,9,10,11}.

Entretanto, os mecanismos de ação envolvidos nesse processo não estão totalmente elucidados. Especificamente, não está claro se o LPS aumenta a osteoclastogênese diretamente tendo como alvo os precursores de osteoclastos ou indiretamente por meio de células intermediárias como os osteoblastos^{5,12}. Devido à grande prevalência na população em situações de perdas ósseas por infecção bacteriana, é fundamental compreendermos o processo pelo qual essa infecção produz reabsorção óssea, até mesmo para condução de terapias mais eficazes. Desse modo, neste artigo, propõe-se avaliar o efeito do lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sobre a proliferação de osteoblastos.

Material e métodos

Este estudo foi conduzido no laboratório de cultivo celular do curso de Mestrado em Ciências da Reabilitação da Universidade Nove de Julho (Uninove). As células utilizadas foram osteoblastos da linhagem OSTEO-1¹³, gentilmente doadas pela professora Márcia Martins Marques, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo USP/SP.

A linhagem foi cultivada no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA). O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular tornou-se subconflente, objetivando a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBSIX

(NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,4mM; pH 7.4) e tratadas com solução de tripsina 0,25%, durante três minutos, a 37 °C. Após incubação foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1.200 rpm, a 20 °C, por cinco minutos (Centrífuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e, posteriormente, ressuspensão em 1 ml de meio DMEM. A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%), e utilizadas, nos ensaios, as culturas com viabilidade maior que 95%.

Ensaio de proliferação celular (método MTT)

A metodologia se baseia na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase, encontrada somente em células viáveis, em clivar os anéis de tetrazólio do MTT, formando cristais azuis escuros de formazana, os quais são impermeáveis às membranas celulares, ficando então retidos no interior das células viáveis^{14, 15}. A posterior lise celular faz com que esses sais de formazana sejam liberados. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível desses cristais produzidos.

Para avaliar o efeito do LPS sobre as linhagens celulares, os osteoblastos (1x10⁴/poço) foram incubados em placas de cultura de fundo chato de 96 poços (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) e mantidos em meio DMEM (10% SFB). A proliferação foi avaliada após 24 e 48 horas de cultivo.

O LPS de *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado ao meio de cultura das células nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL^{4, 5, 12}. Os grupos controle não receberam o tratamento com o LPS.

Após cada período de cultivo, foi realizada a lavagem com 200 µl de PBS 1x, e adicionados 50 µl de MTT (0,5 µg/ml em tampão) (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue – SIGMA), posteriormente foi feita uma incubação de quatro horas, a 37 °C.

Terminado o tempo de incubação, a solução foi removida, sendo adicionados 100 µl de isopropanol para ressuspender e solubilizar o precipitado. Por fim, realizou-se a leitura da placa com auxílio de um leitor de placas a uma absorbância de 620 nm¹⁴.

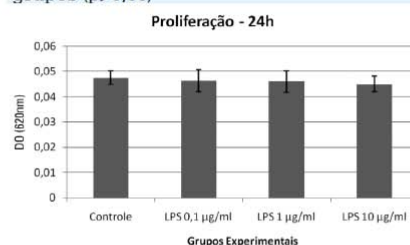
Análise dos resultados

Para a análise dos dados, utilizaram-se média, desvio-padrão e a análise de variância (*one-way* ANOVA) com auxílio do *software* GraphPad InStat-3. Selecionou-se esse teste estatístico por se tratar de grupos não-pareados. Quando observadas diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0.05$), aplicava-se o pós-teste Tukey.

Resultados

Nas primeiras 24 horas de cultivo celular na presença de LPS, não houve diferença entre a proliferação celular dos grupos experimentais e do grupo controle (Figura 1).

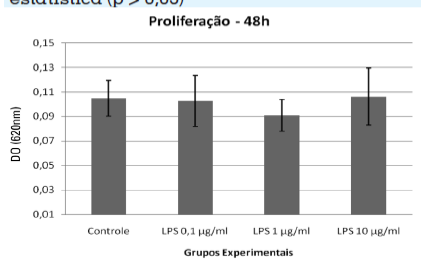
Figura 1: Valores obtidos de absorbância de acordo com os grupos experimentais, após 24 horas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$)



Após 48 horas de cultivo, foi possível observar que houve uma tendência de diminuição da proliferação celular no grupo tratado com LPS na concentração de 1µg/ml em comparação com o controle e com todas as outras concentrações.

ções, entretanto, sem diferença estatisticamente significativa (Figura 2).

Figura 2: Valores obtidos de absorvância de acordo com os grupos experimentais, após 48 horas. Diminuição da densidade ótica (DO) do grupo tratado com LPS 1 µg/ml, comparado aos demais, porém sem significância estatística ($p > 0,05$)



Discussão

O LPS é tido como indutor indireto de osteoclastogênese^{5, 6}. Neste estudo, utilizou-se o LPS, advindo de *E. coli*, por já ter sido usado em estudos anteriores com culturas de osteoblastos^{4, 16, 17, 18}.

Em uma pesquisa conduzida por Shoji et al.¹², em 2006, utilizando o mesmo LPS deste estudo (*E. coli* 026-B6), mas avaliando a linhagem de osteoblastos Saos-2 (derivada de osteossarcoma humano), mostrou que o LPS nas concentrações de 1 e 10 µg/ml, foi capaz de reduzir a proliferação celular, avaliada por um método metabólico, após cinco dias de cultura¹². No trabalho aqui apresentado, observou-se que o efeito do LPS sobre osteoblastos OSTEO-1 pode se dar de forma muito mais precoce, já que se verificou que após um período de apenas 48 horas a concentração de 1µg/ml capaz de induzir uma tendência de diminuição na proliferação. Essa diferença de resultados pode estar relacionada a diferenças na linhagem celular, ao período estudado e ao tipo de metodologia empregada.

Em 1999, Kadono et al.¹⁹, ao aplicarem diferentes concentrações de LPS de *P. gingivalis*

(de zero a 100 ng/ml), em cultura primária de osteoblastos de calvária de ratos não observaram qualquer diferença na proliferação celular, aferida por quantidade de DNA celular, entre seus grupos. A diferença em relação ao nosso resultado pode ser devido a diferenças na resposta ao LPS de *P. gingivalis*, ou diferenças no método de aferição da proliferação.

Katono et al.¹⁷ observaram que células de linhagem de osteossarcoma humano não diminuíam sua proliferação, avaliada por um método metabólico, apesar da introdução do LPS de *E. coli* na concentração de 100 ng/ml, constatando que ela era capaz apenas de interferir na diferenciação celular e na quantidade de fosfatase alcalina produzida.

A despeito dos resultados contrastantes em relação ao papel inibitório do LPS na cultura de osteoblastos, tem-se como certo o seu papel indutor da resposta inflamatória e de reabsorção óssea. Ressalte-se que, apenas pelo fato de ele ser capaz de inibir a proliferação de osteoblastos nos tecidos, ele já seria responsável pelo atraso na reparação óssea. Contudo, observando a literatura, constatou-se que o possível papel do LPS não se resume somente a interferência na proliferação, mas também na formação de osteoclastos independentemente da presença de osteoblastos⁵; do aumento de citocinas inflamatórias com ação fundamental no metabolismo ósseo, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, PGE2, e da matriz metaloproteinases 1, 2, 3 e 9 e osteoproteogélica^{5, 6, 8, 9, 17, 18, 20}.

Conclusão

Neste estudo, mostrou-se que houve uma tendência de diminuição da proliferação de osteoblastos, em curto prazo, tratados com LPS, na concentração de 1µg/ml; entretanto, mais estudos são necessários, para melhor compreensão do processo de reabsorção e reparação óssea mediada por bactérias, devido a sua complexidade e presença de múltiplos mediadores envolvidos.

Referências

1. Heymann D, Rousselle AV. gp130 Cytokine family and bone cells. *Cytokine* 2000;12(10):1455-68.
2. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003;423:349-55.
3. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337-42.
4. 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 Jul 3;85(1-2):46-53.
5. Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:348-54.
6. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*. 1996;64:2371-80.
7. Hausmann E, Raisz LG, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science*. 1970;168:862-4.
8. Aznar C, Fitting C, Cavaillon JM. Lipopolysaccharide-induced production of cytokines by bone marrow-derived macrophages: dissociation between intracellular interleukin 1 production and interleukin 1 release. *Cytokine*. 1990;2:259-65.
9. Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1h TNF-a, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res*. 1995;74:1057-65.
10. Meryon SD, Ferris AD. Lipopolysaccharide-induced bone resorption is mediated by prostaglandins. *Life Sciences*. 1981;28:1061-5.
11. Bom-van Noorloos AA, van der Meer JW, van de Gevel JS, Schepens E, van Steenberg T, Burger EH. *Bacteroides gingivalis* stimulates bone resorption via interleukin-1 production by mononuclear cells. The relative role for *B. gingivalis* endotoxin. *J Clin Periodontol*. 1990;17:409-13.
12. Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O et al. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E2 and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci*. 2006 Mar 20;78(17):2012-8.
13. Deboni NCZ. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas [dissertação de doutorado em Patologia Bucal]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 1995.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(2):55-63.
15. Löster K, Horstkorte R. Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron*. 2000;31:41-53.
16. Choi HG, Kim JM, Kim BJ, Yoo YJ, Cha JH. Mouse strain-dependent osteoclastogenesis in response to lipopolysaccharide. *J Microbiol*. 2007;45(6):566-71.
17. Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanakab H, Suzuki N, Kitami S, Moritaa 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;54:146-55.
18. Kondo A, Koshihara Y, Togari A. Signal transduction system for interleukin-6 synthesis stimulated by lipopolysaccharide in human osteoblasts. *J Interferon Cytokine Res*. 2001;21:943-50.
19. Kadono H, Kido JI, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1999;67:2841-6.
20. Le XK, Laflamme C, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* decreases osteoblast proliferation through IL-6-RABKL/OPG and MMP-9/TIMPs pathways. *Indian J Dent Res*. 2009;20(2):141-9.

ANEXOS

ANEXO 1

Levantamento bibliográfico sobre osteoblastos cultivados na presença de LPS

AUTOR	CULTURA	MEO	LPS	CONCENTRAÇÃO	PROLIFERAÇÃO	MÉTODO	ADESÃO	MÉTODO	RUNX2	
Loomer 1995	primária rato	BGJ _β 10% SFB	P. gingivalis	0,1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	BGJ _β 10% SFB		1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	BGJ _β 10% SFB		10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
Kadono 1999	primária rato	α-MEM 10% SFB	P. gingivalis	0,1 ng/ml	* (14 e 21 dias)	DNA	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	α-MEM 10% SFB		1 ng/ml	* (14 e 21 dias)	DNA	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	α-MEM 10% SFB		10 ng/ml	* (14 e 21 dias)	DNA	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	α-MEM 10% SFB		100 ng/ml	* (14 e 21 dias)	DNA	n/a	n/a	n/a	
Pelt 2002	primária rato	DMEM 2% SFB	Prev. intermedia	0,2 µg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	DMEM 2% SFB		1 µg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
	primária rato	DMEM 2% SFB		ATCC 25611	5 µg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	primária rato	DMEM 2% SFB			25 µg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Shoji 2006	SAOS-2	DMEM 10% SFB	E coli	1 µg/ml	* (3, 5, 7, 10 e 14 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a	
	SAOS-2	DMEM 10% SFB	O26-B6	10 µg/ml	* (3, 5, 7, 10 e 14 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a	
Jung 2009	MC3T3E-1	α-MEM 10% SFB	E coli	1 µg/ml	* (24 h)	MTT	n/a	n/a	n/a	
		α-MEM 10% SFB	O26-B6			MTT				
Katono 2009	primária humano	OGM 10 % SFB	E coli	100 ng/ml	* (3, 5, 7, 10 e 12 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a	
		OGM 10 % SFB	O26:B6			contagem				
Le 2009	MG-63	DME 10% SFB	P. gingivalis	10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹	↓ (24 h)	MTT	↓ (24 h)	↓ (24 h)	n/a	
		DME 10% SFB	ATCC 33277			MTT				
Wang 2009	MC3T3-E1	DMEM 10% SFB	E coli	500 ng/ml	↑ (6 e 12 h)	DNA	n/a	n/a	n/a	
Bandow 2010	primária rato	α-MEM 10% SFB	E coli	10 ng/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	↓ (7, 14 e 21 dias)	
		α-MEM 10% SFB	055:B5							
Xing 2010	MC3T3-E1	α-MEM 10% SFB	P gingivalis	10 µg/ml	n/a	n/a	n/a	n/a	↓ (1, 3, 7 e 14 dias)	

↑ aumento quando comparado ao controle

↓ diminuição quando comparado ao controle

* parâmetro pesquisado, mas, sem diferença com controle

n/a parâmetro não avaliado

ANEXO 2

Levantamento bibliográfico sobre aplicação de LBI em osteoblastos

CULTURA	MEO	LASER λ (nm)	TIPO POTÊN.	TEMPO	DENSIDADE	PROLIFERAÇÃO	MÉTODO	ADESÃO	MÉTODO	RUNX2
prim. rato	α -MEM 15% SFB	Ga-Al-As	puls.	10 min.	3,82 J/cm ²	↑ (6 e 9 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB	Ga-Al-As	cont. 90 mW		1,7 – 25,1 J/cm ²	* (1-10 dias)	cont. + MTT	n/a	n/a	n/a
prim. rato	α -MEM 15% SFB	Ga-Al-As	cont.	1,25 – 10 min	0,48 – 3,84 J/cm ²	↑ (6 e 9 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a
	α -MEM 15% SFB	Ga-Al-As	cont.				contagem	n/a	n/a	n/a
prim. rato	α -MEM 15% SFB	Ga-Al-As	puls.	2,5 – 20 min.	0,48 – 3,84 J/cm ²	↑ (6, 9 e 12 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a
	α -MEM 15% SFB	Ga-Al-As	puls.				contagem	n/a	n/a	n/a
prim. humano (Ti)	α -MEM 10% SFB	Ga-Al-As	cont. 84 mW		1,5 J/cm ²	↑ (96 h)	contagem	↑ (1, 3 e 24 h)	contagem	n/a
prim. humano (Ti)	α -MEM 10% SFB	Ga-Al-As	cont. 84 mW		3 J/cm ²	↑ (96 h)	contagem	↑ (1, 3 e 24 h)	contagem	n/a
prim. humano	OGM2% SFB	He-Ne	cont. 10 mW	1 s	0,14 J/cm ²	n/a	MTT	n/a	n/a	n/a
prim. humano	OGM2% SFB	He-Ne	cont. 10 mW	3 s	0,43 J/cm ²	↑ (24 e 48 h)	MTT	n/a	n/a	n/a
prim. humano	OGM2% SFB	He-Ne	cont. 10 mW	10 s	1,43 J/cm ²	n/a	MTT	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB	Nd:YAG	puls. 0,2 W	10 s	20 mJ	↑ (7, 14 e 21 dias)	MTT	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB	Nd:YAG	puls. 1,2 W	10 s	120 mJ	*	MTT	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB	He-Ne	cont. 0,1 W	10 s		↑ (7, 14 e 21 dias)	MTT	n/a	n/a	n/a
OSTEO-1	DMEM 5% SFB	Ga-Al-As	cont. 10 mW	12 s	3 J/cm ²	↑ (3, 5 e 7 dias)	contagem	* (20, 40 e 60 min.)	contagem	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 30 mW		0,5 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 30 mW		1 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 30 mW		5 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 30 mW		10 J/cm ²	↑ (MC3T3)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 50 mW		0,5 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 50 mW		1 J/cm ²	↑ (MG63) ↓ (MC3T3)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 50 mW		5 J/cm ²	↑ (MG63) ↓ (MC3T3)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 50 mW		10 J/cm ²	↑ (MG63) ↓ (MC3T3)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 10 mW		0,5 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 10 mW		1 J/cm ²	* (24 h)	MTS	n/a	n/a	n/a
MC3T3 e MG63	DMEM 10% SFB		cont. 10 mW		5 J/cm ²	↑ 24 h (MG63)	MTS	n/a	n/a	n/a
prim. hum. e SAOS2	DMEM 0,5% SFB			30 min.	51 mW/cm ²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
prim. hum. e SAOS2	DMEM 0,5% SFB			30 min.	102 mW/cm ²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
prim. hum. e SAOS2	DMEM 0,5% SFB			30 min.	204 mW/cm ²	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
OFOOL II	MEM 5% SFB	Ga-Al-As	cont. 50 mW	36 s	3 J/cm ²	↑ (24, 48 e 72 h)	MTT	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB		cont. 400 mW	30 s	1 J/cm ²	* (24, 48 e 72 h)	XTT	n/a	n/a	n/a
SAOS-2	DMEM 10% SFB		cont. 400 mW	1 min.	2 J/cm ²	* (24, 48 e 72 h)	XTT	n/a	n/a	n/a
MG63	MEM 10% SFB	Ga-As	puls. 200 mW	5 min.	6,7 J/cm ²	↓ (10 e 20 dias)	contagem	n/a	n/a	n/a
prim. rato	DMEM 10% SFB		puls. 2 mW	5 min.	1,14 J/cm ²	↑ (3 dias)	MTT	n/a	n/a	n/a
prim. rato	DMEM 10% SFB		puls. 2 mW	10 min.	2,28 J/cm ²	↑ (3 dias)	MTT	n/a	n/a	n/a

CULTURA	LASER	λ (nm)	TIPO	POTÊN.	TEMPO	DENSIDADE PROLIFERAÇÃO	ADEÇÃO	RUNX2
Aleksisr 2010	Er:YAG Er:YAG Er:YAG Er:YAG		puls. puls. puls. puls.		60 s e 3 min. 60 s e 3 min. 60 s e 3 min. 60 s e 3 min.	2,4 mj/cm ² * (1 e 3 dias) 4 mj/cm ² ↑ (1 e 3 dias) 5,2 mj/cm ² * (1 e 3 dias) 7,1 mj/cm ² * (1 e 3 dias)	n/a n/a n/a n/a	n/a n/a n/a n/a
Chellini 2010	Nd:YAG	1,064	puls.		10 s	1,5 J/cm ² ↑ (48 h) contagem	n/a n/a	n/a ↑ (7 dias)
Fujimoto 2010	Ga-Al-As Ga-Al-As Ga-Al-As Ga-Al-As Ga-Al-As Ga-Al-As Ga-Al-As	830 830 830 830 830 830 830	puls. puls. puls. puls. puls. puls. puls.		5 min. 10 min. 20 min. 5 min. 10 min. 20 min. 9 min.	0,96 J/cm ² 1,91 J/cm ² 3,82 J/cm ² 0,96 J/cm ² 1,91 J/cm ² 3,82 J/cm ² 3 J/cm ² (10 e 14 dias)	n/a n/a n/a n/a n/a n/a MITT	n/a n/a n/a n/a n/a n/a n/a
Petri 2010	humana	780	cont.	70 mw				↓ (14 dias)

↑ aumento quando comparado ao controle
 ↓ diminuição quando comparado ao controle
 * parâmetro pesquisado, mas, sem diferença com controle
 n/a parâmetro não avaliado