

Laser de baixa intensidade promove proliferação de células-tronco derivadas de tecido adiposo criopreservadas

Low-level laser irradiation promotes proliferation of cryopreserved adipose-derived stem cells

Fernanda Ginani¹, Diego Moura Soares², Hugo Alexandre de Oliveira Rocha¹, Carlos Augusto Galvão Barboza¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do *laser* de baixa intensidade na proliferação e na viabilidade de células-tronco derivadas de tecido adiposo murinas previamente submetidas à criopreservação. **Métodos:** Células-tronco derivadas de tecido adiposo foram isoladas da região inguinal de três camundongos, submetidas à criopreservação em soro fetal bovino com 10% de dimetilsulfóxido por 30 dias e, depois, descongeladas e mantidas em condições normais de cultivo. As células cultivadas foram irradiadas ou não (controle) com um *laser* de diodo InGaAlP nos intervalos de zero e 48 horas, utilizando duas densidades de energia diferentes (0,5 e 1,0J/cm²). A proliferação celular foi avaliada pelo método de exclusão de azul de tripan e ensaio MTT, nos intervalos de zero, 24, 48 e 72 horas após a primeira aplicação do *laser*. A viabilidade celular e a apoptose das células previamente criopreservadas submetidas à laserterapia foram avaliadas por citometria de fluxo. **Resultados:** Os Grupos Irrradiados (0,5 e 1,0J/cm²) apresentaram aumento da proliferação celular ($p < 0,05$) quando comparados ao Grupo Controle, porém não foi observada diferença significativa entre as duas densidades de energia. A citometria de fluxo revelou percentagem de células viáveis superior a 99% em todos os grupos. **Conclusão:** O *laser* de baixa intensidade tem efeitos estimuladores sobre a proliferação de células-tronco derivadas de tecido adiposo previamente submetidas à criopreservação.

Descritores: Tecido adiposo; Criopreservação; Terapia a laser; Células-tronco; Proliferação celular

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of murine adipose-derived stem cells previously submitted to cryopreservation. **Methods:** Adipose-derived stem cells were isolated from inguinal fat pads of three mice, submitted to cryopreservation in fetal bovine serum with 10%

dimethylsulfoxide for 30 days and then thawed and maintained in normal culture conditions. Culture cells were either irradiated or not (control) with an InGaAlP diode laser at zero and 48 hours, using two different energy densities (0.5 and 1.0J/cm²). Cell proliferation was evaluated by trypan blue exclusion method and MTT assay at intervals of zero, 24, 48, and 72 hours after the first laser application. Cell viability and apoptosis of previously cryopreserved cells submitted to laser therapy were evaluated by flow cytometry. **Results:** The Irradiated Groups (0.5 and 1.0J/cm²) showed an increased cell proliferation ($p < 0.05$) when compared to the Control Group, however no significant difference between the two energy densities was observed. Flow cytometry revealed a percentage of viable cells higher than 99% in all groups. **Conclusion:** Low-level laser irradiation has stimulatory effects on the proliferation of adipose-derived stem cells previously submitted to cryopreservation.

Keywords: Adipose tissue; Cryopreservation; Laser therapy; Stem cells; Cell proliferation

INTRODUÇÃO

Células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTTA) vem sendo amplamente investigadas, pois são acessíveis após lipoaspiração subcutânea, encontram poucos questionamentos éticos e apresentam potencial de diferenciação múltipla. Estas características as tornam uma opção viável para a medicina regenerativa.⁽¹⁾

Com o desenvolvimento da terapia celular e da engenharia de tecidos, um grande número de células tornou-se necessário. Neste sentido, diversos estudos avaliaram o efeito da irradiação de *laser* de baixa intensidade (LBI) na proliferação de células-tronco mesenquimais (CTM) obtidas de diferentes fontes,⁽²⁾ com

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

² Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente: Carlos Augusto Galvão Barboza – Avenida Senador Salgado Filho, 3.000, Campus Universitário – Lagoa Nova – CEP: 59078-970 – Natal, RN, Brasil – Tel.: (84) 3215-3431
E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

Data de submissão: 20/2/2017 – Data de aceite: 5/6/2017

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082017AO3991

resultados satisfatórios relatados em CTTA.⁽³⁻⁷⁾ Assim, a terapia a *laser* aparece como alternativa para a estimulação de proliferação celular *in vitro*.

Outra possibilidade para a coleta de CTM é seu armazenamento por longos períodos para subsequente aplicação clínica, sem perda de função, o que requer que elas sejam criopreservadas. O objetivo da criopreservação é cessar, reversivelmente, todas as funções biológicas de tecidos vivos em temperaturas entre -80 e -196°C. Esta técnica já é utilizada há muitas décadas com CTM obtidas de diferentes fontes, como medula óssea,⁽⁸⁾ tecido adiposo,^(9,10) cordão umbilical,⁽¹¹⁾ polpa dentária^(12,13) e ligamento periodontal.⁽¹⁴⁾

OBJETIVO

Avaliar o efeito do *laser* de baixa intensidade na proliferação e na viabilidade da cultura primária de células-tronco derivadas do tecido adiposo murinas previamente submetidas à criopreservação.

MÉTODOS

Isolamento e cultura das células

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (protocolo 036/2012) e cumpriu as diretrizes da Declaração de Helsinque. Os experimentos foram realizados nos Departamentos de Morfologia e Bioquímica da instituição, em 2013 e 2014. Fragmentos do tecido adiposo foram isolados da região inguinal de três camundongos albinos (Swiss) de 2 meses de idade, de acordo com um protocolo previamente descrito.⁽⁹⁾ De forma breve, os fragmentos foram lavados com meio essencial mínimo (α -MEM; Cultilab, Brasil), suplementados com agentes antibióticos e antifúngicos (Gibco, Estados Unidos) e, então, submetidos à digestão enzimática com solução contendo 3mg/mL de colagenase I (Gibco, Estados Unidos) por 1 hora, a 37°C. As células foram cultivadas em α -MEM suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco, Estados Unidos) e mantidas a 37°C, em 5% de dióxido de carbono, até atingirem confluência entre 70 e 90%.

A natureza multipotencial das células foi confirmada na segunda passagem (P2), após criopreservação e descongelamento, por expressão de CD44 e CD29 (BD Biosciences, Estados Unidos) em mais de 98% das células. Além disto, após cultivo das células em meio de diferenciação osteogênica e adipogênica (StemPro® Differentiation Kits, Invitrogen Corp., Estados Unidos) por 21 dias, as células apresentaram a morfologia característica de células osteoblásticas e adiposas quando observadas em microscópio de luz.

Criopreservação

Na primeira passagem (P1), as células foram submetidas a criopreservação em FBS com 10% dimetilsulfóxido com diminuição gradual de temperatura (2 horas a 4°C, 18 horas a -20°C e, então, armazenadas a -80°C). Estas células foram criopreservadas por 30 dias e, então, descongeladas e mantidas em condições normais de cultura.

Irradiação de *laser*

Na terceira passagem (P3), as células foram divididas em três grupos de acordo com o tratamento: (1) controle: sem irradiação; (2) 0,5J/cm²: células irradiadas com dose de 0,5J/cm²; e (3) 1,0 J/cm²: células irradiadas com dose de 1,0J/cm². As irradiações foram realizadas nos momentos zero e 48 horas com *laser* de diodo InGaAlP (Kondortech Bio Wave LLLT Dual, Brasil), de acordo com os parâmetros listados no quadro 1. As células foram plaqueadas de tal modo que foram deixados poços vazios entre aqueles semeados para a prevenção de dispersão acidental de luz durante a irradiação do *laser*.

Quadro 1. Parâmetros do *laser*

Parâmetros	Referência
Potência	30mW
Comprimento de onda	660nm
Modo de ação	Contínuo
Área de saída	0,03cm ²
Diâmetro da ponta	0,01cm ²
Densidade de energia	0,5 e 1,0J/cm ²
Tempo de irradiação	16 segundos (0,5J/cm ²) e 33 segundos (1,0J/cm ²)
Modo de aplicação	A sonda foi direcionada em ângulo perpendicular a cada placa, a uma distância de 0,5cm das células

Análise do efeito de tratamento com *laser* na proliferação celular

As análises de proliferação celular foram feitas em intervalos de zero, 24, 48 e 72 horas, após a primeira aplicação do *laser* no Grupos Controle (sem irradiação) e nos Grupos Irrradiados por meio do método de exclusão do azul de tripan e do ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Para coloração com azul de tripan, as células foram cultivadas em placas com 24 poços, na densidade de 3x10⁴ células por poço. A contagem celular foi realizada em quatro placas por grupo por intervalo, por dois examinadores calibrados cegos usando uma câmara de Neubauer. Para o ensaio MTT, as células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5x10³ células por poço por grupo (controle, 0,5J/cm² e 1,0J/cm²). As células foram incubadas em 100µL de meio de cultura com 1mg/mL de

MTT durante 4 horas e, então, o produto colorimétrico (formazan) foi solubilizado com 100µL de dimetilsulfóxido. A absorbância das amostras foi monitorada em leitor de ELISA a 570nm.

Análise de viabilidade celular

A viabilidade e a apoptose celulares de células previamente criopreservadas e submetidas à terapia com laser foram avaliadas por citometria de fluxo usando o kit FITC/Annexin V Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin and propidium iodide (PI; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para isto, as células foram cultivadas em triplicata em placas de seis poços a uma densidade de 2×10^5 células por poço. Após 72 horas de cultura, as células foram tripsinizadas, coletadas e lavadas com FBS gelado. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em 200µL de tampão de ligação 1X. Depois, foram adicionados 3µL de anexina V-FITC e 1µL de PI em 100µg/mL. As células foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz. Após incubação, adicionaram-se 400µL de tampão de ligação 1X para anexina V, e as células foram analisadas em um citômetro de fluxo, medindo a fluorescência emitida a 530 e 575nm.

Análise estatística

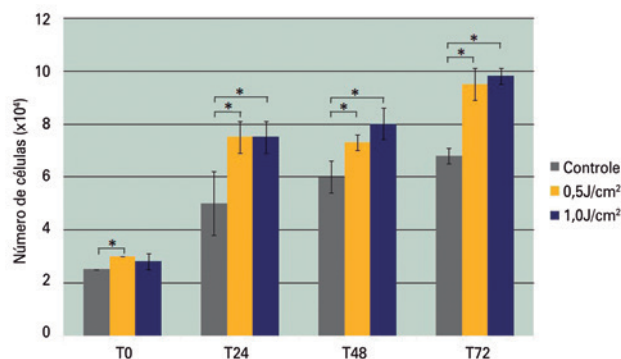
As diferenças entre os grupos em cada momento foram analisadas pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

As médias de CTTA analisadas pelo método de exclusão de azul de tripan nos diferentes grupos são mostradas na figura 1. Os Grupos Irrradiados (0,5 e 1,0J/cm²) apresentaram elevação na proliferação celular ($p < 0,05$) em comparação ao Grupo Controle nos intervalos de 24, 48 e 72 horas (Figura 1). Porém, não foi observada diferença significativa entre as duas densidades de energia.

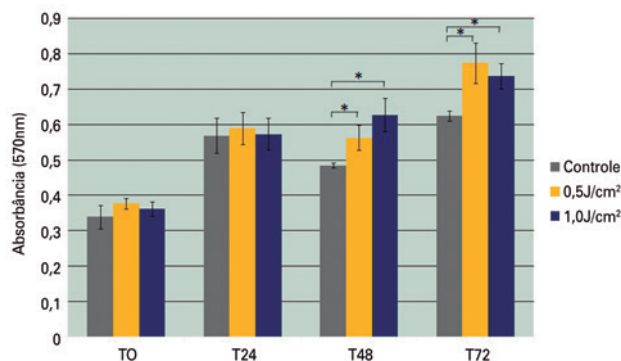
O padrão da atividade mitocondrial analisado pelo ensaio MTT apresentou resultados similares ao da contagem celular por ensaio com azul de tripan, com Grupos Irrradiados demonstrando atividade de MTT significativamente mais alta nos intervalos de 48 e 72 horas ($p < 0,05$) em comparação ao Grupo Controle (Figura 2).

A citometria de fluxo revelou uma porcentagem de células viáveis acima de 99% em todos os grupos (Figura 3), indicando que a viabilidade das células previamente criopreservadas não foi afetada pela terapia com laser durante o experimento.



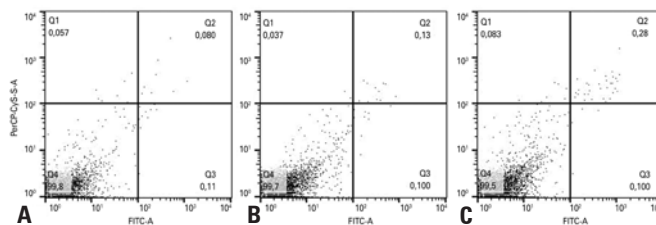
* $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

Figura 1. Número de células-tronco derivadas do tecido adiposo nos diferentes momentos estudados. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão de quatro poços/grupo



* $p < 0,05$, teste de Mann-Whitney.

Figura 2. Atividade mitocondrial de células-tronco derivadas do tecido adiposo medida por ensaio MTT. Dados expressos em média \pm desvio padrão da absorbância de quatro poços/grupo



Q1: anexina V negativa/PI positivo; Q2: anexina V positiva/PI positivo; Q3: anexina V positiva/PI negativo; Q4: anexina V negativa/PI negativo.

Figura 3. Imunomarcção com anexina V/PI de células-tronco derivadas do tecido adiposo previamente submetidas a criopreservação. (A) Controle, (B) irradiadas com 0,5J/cm² e (C) irradiadas com 1,0J/cm²

DISCUSSÃO

Considerando-se o crescente número de procedimentos de lipoaspiração nos últimos anos, o que facilita a obtenção de tecido adiposo, a criopreservação deste tecido para uso clínico subsequente vem sendo amplamente estudada.⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ Para o armazenamento de órgãos e células durante longos períodos, diferentes protocolos

de criopreservação foram testados. No presente estudo, CTTA foram criopreservadas durante 30 dias, tendo mantido sua viabilidade após descongelamento e obtendo resultados similares aos de outros estudos.^(9,15,17,18)

Neste estudo, decidimos criopreservar as células a -80°C , já que se trata de uma técnica mais simples, acessível e de baixo custo. Estudos anteriores avaliaram a criopreservação de células-tronco da polpa dentária por 6 meses,^(13,19) e do ligamento periodontal, por 30 dias,⁽¹⁴⁾ concluindo que a criopreservação a -80°C apresenta taxas de viabilidade celular similares às de células criopreservadas em nitrogênio líquido.

Uma das dificuldades encontradas no processo de criopreservação é a recuperação de propriedades biológicas após o descongelamento. Geralmente, o rendimento celular inicial é baixo e, portanto, o LBI pode auxiliar na promoção da bioestimulação de diversos tipos de células. Este trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito positivo de LBI na proliferação de CTM previamente submetidas à criopreservação, confirmando a taxa proliferativa elevada, previamente demonstrada em CTM frescas (não criopreservadas) obtidas de diversas fontes, como medula óssea,⁽²⁰⁾ tecido adiposo,⁽⁴⁾ ligamento periodontal⁽²¹⁾ e polpa dentária.^(22,23) Há apenas uma exceção: um estudo verificou um número mais elevado de unidades formadoras de colônias (UFC) em células progenitoras de sangue periférico criopreservadas expostas a uma única irradiação de $1,0\text{J}/\text{cm}^2$.⁽²⁴⁾

Quando o objetivo for a bioestimulação celular, o comprimento de onda e a densidade de energia são parâmetros que precisam ser considerados. A literatura relata que o espectro de luz visível (600 a 700nm) proporciona resultados mais efetivos para a bioestimulação celular *in vitro*, sendo o mais utilizado em estudos com LBI em células-tronco.⁽²⁾ Com relação à densidade de energia, sabe-se que o processo de bioestimulação pode ser alcançado com doses muito baixas, como $0,001\text{J}/\text{cm}^2$ até doses mais altas de $10\text{J}/\text{cm}^2$.⁽²⁵⁾ No presente estudo, utilizando-se um comprimento de onda de 660nm, observou-se que doses de 0,5 e $1,0\text{J}/\text{cm}^2$ foram efetivas no aumento da proliferação de CTM criopreservadas em comparação ao grupo não irradiado, corroborando achados prévios em CTTA frescas irradiadas com as mesmas densidades de energia (0,5 e $1,0\text{J}/\text{cm}^2$).⁽⁶⁾ Outros estudos mostraram o efeito bioestimulante de LBI em CTTA frescas usando um comprimento de onda de 660nm e uma dose única de $5\text{J}/\text{cm}^2$.⁽³⁻⁵⁾ O único estudo que avalia o efeito de LBI com comprimentos de onda acima de 800nm em CTTA mostrou que um laser de 830nm ($0,05\text{J}/\text{cm}^2$) promoveu um aumento na proliferação celular de CTTA em comparação ao Grupo Controle.⁽⁷⁾

CONCLUSÃO

O laser de baixa intensidade tem efeitos estimulantes na proliferação de células-tronco derivadas de tecido adiposo murinas previamente submetidas à criopreservação. Portanto, a associação entre criopreservação e terapia com laser pode representar um avanço importante para procedimentos técnicos de terapia celular e engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

- Zhan W, Tan SS, Lu F. Adipose-derived stem cell delivery for adipose tissue engineering: current status and potential applications in a tissue engineering chamber model. *Stem Cell Rev.* 2016;12(4):484-91. Review.
- Ginani F, Soares DM, Barreto MP, Barboza CA. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2015;30(8):2189-94. Review.
- Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2008;23(3):277-82.
- Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):33-9.
- de Villiers JA, Houreld NN, Abrahamse H. Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. *Stem Cell Rev.* 2011;7(4):869-82.
- Barboza CA, Ginani F, Soares DM, Henriques AC, Freitas Rde A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *einstein (São Paulo).* 2014;12(1):75-81.
- Min KH, Byun JH, Heo CY, Kim EH, Choi HY, Pak CS. Effect of low-level laser therapy on human adipose-derived stem cells: in vitro and in vivo studies. *Aesthetic Plast Surg.* 2015;39(5):778-82.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):278-94.
- Ginani F, Soares DM, Barboza CA. Effect of a cryopreservation protocol on the in vitro yield of adipose-derived stem cells. *Rev Bras Cir Plast.* 2012; 27(3):359-63.
- Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(2):401-10.
- de Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS, Covas DT. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. *Cytotherapy.* 2012;14(6):694-700.
- Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):319-25.
- Ginani F, Soares DM, Rabêlo LM, Rocha HA, de Souza LB, Barboza CA. Effect of a cryopreservation protocol on the proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(8):598-604.
- Vasconcelos RG, Ribeiro RA, Vasconcelos MG, Lima KC, Barboza CA. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. *Cell Tissue Bank.* 2012; 13(3):461-9.
- Davies OG, Smith AJ, Cooper PR, Shelton RM, Scheven BA. The effects of cryopreservation on cells isolated from adipose, bone marrow and dental pulp tissues. *Cryobiology.* 2014;69(2):342-7.
- Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, et al. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. *Cell Transplant.* 2012;21(2-3):617-22.

17. Liu G, Zhou H, Li Y, Li G, Cui L, Liu W, et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*. 2008;57(1):18-24.
18. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(4):659-67.
19. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009;59(2):150-7.
20. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts: an in vitro study. *Laser Med Sci*. 2012;27(2):423-30.
21. Soares DM, Ginani F, Henriques ÁG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci*. 2015;30(3):1171-4.
22. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zzell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low-intensity laser. *Lasers Surg Med*. 2007;39(4):365-72.
23. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ÁC, Barboza CA. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Lasers Med Sci*. 2015;30(9):2259-64.
24. do Nascimento RX, Callera F. Low-level laser therapy at different energy densities (0.1-2.0 J/cm²) and its effects on the capacity of human long-term cryopreserved peripheral blood progenitor cells for the growth of colony-forming units. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(5):601-4.
25. Tunér J, Hode L. *The laser therapy handbook*. Grängesberg: Prima Books; 2007.