

Efeito da laserterapia de baixa potência sobre o tecido ósseo – Revisão de literatura

Effect of low Power laser therapy on bone tissue – Literature review

Gustavo Tralli Nogueira¹; Raquel Agnelli Mesquita Ferrari²; Manoela Domingues Martins²; Sandra Kalil Bussadori²; Tatiana Dias Silva¹; Kristianne Porta Santos Fernandes²

¹Mestrando em Ciências da Reabilitação – Uninove. Especialista em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

²Doutor, Professor Integral do curso Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil

Endereço para correspondência

Kristianne Porta Santos Fernandes
Av. Francisco Matarazzo, 612, Água Branca
05001-100 – São Paulo, SP [Brasil]
kristianneporta@gmail.com

Resumo

A estrutura óssea presente no corpo humano é um tecido rígido que possui vasos sanguíneos, nervos e boa capacidade de regeneração. Ela tem como funções principais sustentação, proteção e armazenamento de sais minerais. Nessa estrutura, os osteoblastos são as células responsáveis pela reparação e deposição de matriz óssea. São realizados cada vez mais estudos para aumentar a adesão e a proliferação dos osteoblastos a fim de melhorar a cicatrização. A laserterapia pode contribuir, de maneira significativa, no processo de reparação óssea, por exemplo, diminuindo a inflamação, melhorando a cicatrização, aliviando a dor, modulando os processos metabólicos celulares, reforçando o potencial biológico regenerativo dos tecidos. Essa terapia pode proporcionar bons resultados nas reações metabólicas ósseas, embora os mecanismos que os tornam possíveis não estejam bem elucidados ainda, esses dados sugerem que a terapia com *laser* de baixa potência pode promover uma bioestimulação e favorecer a proliferação, diferenciação e ativação do metabolismo dos osteoblastos.

Descritores: *Laser* de baixa potência; Osteoblastos; Tecido ósseo.

Abstract

The bone structure present in the human body is a rigid tissue that has blood vessels and good capacity of regeneration. It has as main functions sustentation, protection and salt mineral storage. In this structure, the osteoblasts are responsible for repairing and deposition of bone matrix. More studies are made each time to increase the adhesion and the osteoblasts proliferation in order to improve the cicatrization. The laser therapy can contribute in significant way the bone repairing process, for example, reducing the inflammation, improving the cicatrization, relieving pain, modulating the cellular metabolic processes, strengthening the regenerative biological potential of the tissues. This therapy can provide good results in the bone metabolic reactions, even so the mechanisms become possible are not elucidated yet, these data suggest that the therapy with low power laser can promote a bioestimulation and improve the proliferation, differentiation and activation of the osteoblasts metabolism.

Key words: Low level laser; Osteoblasts; Bone tissue.

Introdução

O tecido ósseo é composto por uma matriz orgânica e uma inorgânica mineral, que produz como resultado uma combinação de cristais de hidroxiapatita impregnados por fibrilas de colágeno tipo I que resistem à compressão, formando um tecido conjuntivo denso, especializado, organizado e diferenciado.

As fibrilas de colágeno no osso adulto são colocadas em camadas regulares, uma paralela à outra, em um ângulo reto com as fibrilas nas camadas do lado oposto. A matriz óssea é secretada pelos osteoblastos, que se localizam na superfície da matriz existente e depositam camadas de osso sobre ela. Alguns deles permanecem livres na superfície, e outros ficam envolvidos na sua própria secreção^{1, 2, 3, 4, 5}.

O *laser* de baixa potência tem sido estudado nas últimas décadas como um acelerador do processo de cicatrização por ter um efeito bioestimulador sobre diferentes tipos celulares.

Esse instrumento tem baixa energia, ausência de potencial fototérmico e seus fótons de energia são inferiores as ligações das moléculas biológicas e do DNA, assim não são capazes de quebrar as ligações químicas, induzir mutação ou carcinogênese^{6, 7}.

O efeito de bioestimulação parece depender do comprimento de onda, da potência, da intensidade e também do tipo celular em questão^{8, 9, 10, 11, 12, 13}.

O objetivo neste trabalho é revisar a literatura sobre o efeito da terapia com *laser* de baixa potência sobre o tecido ósseo e seus componentes celulares.

Revisão de literatura

O *laser* de baixa potência tem seus efeitos bioestimuladores em diversas situações clínicas, sendo efetivo na aceleração da cicatrização de tecidos moles e no controle de sintomatologia dolorosa crônica¹². Estudos experimentais e clínicos com esse tipo de *laser* têm mostrado que ele é eficaz no tratamento de inflamação e no alívio da dor, além disso, modula processos metabólicos celulares, re-

forçando assim o potencial biológico regenerativo dos tecidos^{11, 13, 14}.

Em outros estudos experimentais, têm-se tentado elucidar os mecanismos da bioestimulação do *laser* de baixa potência, porém ainda não se sabe, ao certo, qual seu mecanismo de ação nas células^{8, 9, 10, 15}.

O efeito desse *laser* vem sendo analisado também *in vitro*, utilizando cultura de células em razão da facilidade de padronização da amostra e do controle de PH, temperatura, pressão osmótica e tensão de CO₂ e O₂. O resultado obtido com o uso desse instrumento é preciso e as amostras fornecidas de forma homogênea¹⁶.

Ozawa et al.¹⁷, tentaram identificar as células-alvo responsáveis por acelerar a regeneração óssea durante a laserterapia. Utilizaram células da calvária de ratos (OSTEO-I) que foram irradiadas com *laser* GaAlAs pulsado, com comprimento de onda de 830 nm, 500 mW e potência de 3,87 J/cm², durante 10 minutos de exposição. O mesmo procedimento foi repetido no 1º, 6º, 12º e 15º dia, após o subcultivo celular. Nos estágios iniciais, o *laser* parece ter estimulado significativamente a proliferação celular, a atividade ALP e a expressão gênica da osteocalcina. Após 21 dias, houve um aumento (1,7 vezes) no número de células e (3,4 vezes) de nódulos ósseos. Os resultados sugerem que esse instrumento pode estimular a multiplicação celular por meio do aumento das células formadoras dos nódulos ósseos, os osteoblastos, e também mostram que ele estimula a diferenciação celular, resultando num aumento de células diferenciadas que aumentam a quantidade de osso formado.

Em outro estudo *in vitro*, realizado por Martinasso et al.¹⁸, investigou-se o efeito da irradiação do *Laser* de Baixa Potência (LBP) sobre a proliferação e formação óssea em células derivadas de osteoblastos humanos. Foram realizados experimentos com tempo de irradiação de 5 minutos a, a cada 24 horas, totalizando quatro dias de tratamento. Observou-se que o número de células aumentou a partir do segundo dia de tratamento. Esses resultados sugerem que repetidas irradiações com o LBP estimulam a formação dos

osteoblastos e aumenta a quantidade de proteínas essenciais para a formação óssea.

Renno et al.¹⁹ avaliaram os efeitos do *laser* de baixa potência em três diferentes comprimentos de onda, 670 nm, 780 nm e 830 nm, sobre osteoblastos (MC3T3) e células de proliferação do osteosarcoma (MG 63), *in vitro*. Notou-se que cada linhagem de célula reagiu de forma diferente, ou seja, na submetida a 830 nm, os osteoblastos tiveram um aumento de 9%, e o osteosarcoma não apresentou acréscimo significativo; na que recebeu 780 nm, houve diminuição da proliferação dos osteoblastos e aumento da multiplicação das células provenientes de osteosarcoma. Já na linhagem em que se usou 670 nm, observou-se um menor aumento estatístico da proliferação dos osteoblastos e das células de osteosarcoma.

No estudo realizado por Stein et al.²⁰, investigou-se o efeito da irradiação do LBP sobre a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Osteo I), *In Vitro*, usando o *Laser* He-Ne de 632nm, 10mW. Verificou-se que o *laser* utilizado foi capaz de promover um importante aumento (31% - 58%) da proliferação e maturação dos osteoblastos e que esses resultados podem ter implicações clínicas.

Em outro estudo realizado com LBP, tendo como diferencial a análise da frequência de 1 Hz sobre osteoblastos derivados de calvária de rato *in vitro*, estimulou-se intensamente a formação óssea que posteriormente era comparada com outra submetida a irradiação contínua. Entretanto, para definir melhor o modo de irradiação, concluiu-se que era necessário realizar novos estudos, avaliando diferentes pulsos e seus efeitos na formação óssea²¹.

Yamamoto et al.²² investigaram a clonagem do gene MCM3, responsável pela replicação do DNA de células de ratos (MC3T3-E1), designado como MCL-140, para tentar entender o efeito da bioestimulação e da proliferação celular em células irradiadas. Utilizaram um *laser* de baixa potência GaAlAs, no comprimento de onda de 830 nm, com potência de 500 mW, densidade de potência de 7,64 J/cm², durante 20 minutos. Após análise, concluíram que os níveis mais altos de RNAm foram observados nas células irradiadas. O clone MCL-14 apresentou 96,2% de homologia com o MCM3. Os

resultados sugerem que o *laser* de baixa potência pode aumentar a replicação do DNA, estimulando assim a proliferação dos osteoblastos por meio do aumento da expressão do gene MCM3.

Em estudos utilizando o *Laser Sintered poly (ether-ether-ketone)*, comprovou-se que houve aumento da proliferação de osteoblastos humanos *in vitro* que colocados sobre vidro bioativo (Bioglass), estimularam o aumento da formação óssea, o que mostra que o Bioglass associado à laserterapia pode ser uma ótima alternativa para reconstruções ósseas extensas²³.

Fujihara⁶ avaliou essa terapia com LBP, mais especificamente o *laser* de Diodo Ga-Al-As, com 780nm, 10mW, totalizando 12 segundos sobre osteoblastos de calvária de rato, (Osteo I), *in vitro*, que eram previamente tratadas com dexametasona. As culturas celulares foram avaliadas após 0, 72, 120 e 168 horas, sendo analisada a proliferação, adesão e a síntese de osteonectina. Os resultados sugeriram que a dosagem de 3J/cm² aumentou a taxa de adesão celular com diferença estatisticamente significativa, além disso, o grupo previamente tratado com dexametasona teve inibição da adesão celular.

Tentando recriar os sucessos encontrados nos estudos *in vitro* para experimentos *in vivo*, outro trabalho foi realizado por Ninomiya et al.¹⁰ por meio da irradiação em fêmures de ratos com *laser* Nd:YAG, utilizando a 10 Hz, 7-9 ns, 500mW/cm², por 10 minutos, com comprimento de onda de 1064nm, observados após o 1º, 3º, 5º e 7º dias, depois da irradiação por intermédio da análise histológica e imuno-histoquímica. Nessa pesquisa, avaliaram o volume ósseo, a quantidade de osso trabecular e a taxa de deposição mineral. As análises histológicas revelaram que a taxa de ação dos osteoclastos estava diminuída no terceiro dia após irradiação, e a atividade dos osteoblastos foi melhor no primeiro e terceiro dias. O autor concluiu que, após a laserterapia, houve um aumento no número de osteoblastos e uma diminuição no número de osteoclastos.

Outro efeito do LBP a 100 mW, 690nm, 1 min, 6 joules irradiado *in vivo*, em locais com reabsorção óssea e com a instalação de implantes de titânio,

foi o aumento de osteócitos do grupo irradiado que se mostrava 3% maior que o do controle, sendo essa uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto, é necessário realizar mais estudos para comprovar se a irradiação, realmente, é benéfica na integração dos implantes em osso sem injúrias²⁴.

Khadra et al.¹⁴ investigaram o efeito da terapia com *laser* de baixa potência sobre a perda, proliferação, diferenciação e produção de fator de crescimento transformador X1 (TGF-β1) em osteoblastos humanos. Células derivadas do osso mandibular foram expostas ao *laser* diodo GaAlAs, no comprimento de onda de 830 nm e potência de 84 mW, em dosagens de 1,5 ou 3 J/cm², em seguida, foram semeadas em discos de titânio. Após a 1^a, 3^a e 24^a horas as células foram contadas e expostas ao *laser*, por mais três dias consecutivos. Após 96 horas, foi observado um aumento da proliferação celular. A síntese de osteocalcina e TGF-β1 foram significativamente maiores nas amostras expostas a 3 J/cm². Entretanto, a atividade da fosfatase alcalina não se diferenciou estatisticamente entre os três grupos. Concluíram que osteoblastos humanos cultivados em material de implante (titânio) tiveram as taxas de adesão e proliferação aumentadas, o que leva a crer que o *laser* de potência pode acelerar a cicatrização nos tecidos ao redor do implante.

Outro estudo realizado em cultura com osteoblastos humanos colhidos durante a preparação para instalação de implantes na região de mandíbula de pacientes edêntulos, utilizando o *Laser Er:Yag*, com 10 Hz, 100mJ de energia e totalizando 23,5s, mostrou que houve eficácia na remoção de *Porphyromonas gingivalis*, permitindo a deposição de novos osteoblastos em superfícies de implantes.²⁶ Já Romanos et al.²⁷ aplicaram *laser* de baixa potência em discos de titânio e concluíram que ele foi capaz de aumentar a proliferação, diferenciação e modulação dos osteoblastos na superfície dos discos.

Histologicamente, a recuperação de osteotomias realizadas em tíbia de ratos com *laser* de plasma, com 1 picosecond, 240 Hz, 800 nm, média de 650μJ, mediante ablação comparada com utilização de serra convencional, analisadas após o

4^o e 6^o dias por meio de cortes histológicos, sugerem uma diferença significativa na deposição de matriz óssea, aumentando a migração das células osteocondroprogenitoras. O que ocasionou uma reação inflamatória inicial reduzida e uma cicatrização mais rápida e eficaz³.

O LBP vem sendo cada vez mais utilizado na regeneração dos tecidos moles. Nicolau et al.²⁹ avaliaram o efeito da laserterapia de baixa potência em fêmures de 48 ratos que foram perfurados simulando uma lesão. Desses ratos, 24 foram tratados com *laser* GaAlAs de 660 nm, 10 J/cm², após o 2^o, 4^o, 6^o e o 8^o dias da cirurgia, e os 24 restantes receberam o mesmo tratamento, porém com o *laser* desligado. Os autores realizaram análises histomorfométricas e concluíram que a atividade das células ósseas, em torno na área a ser reparada, foi maior no grupo que recebeu o tratamento com o LBP do que no controle, além disso, o osso neoformado não apresentou alteração da estrutura óssea.

Bigi et al.³⁰ cultivaram osteoblastos sobre as superfícies de octacálcio fosfato (OCP) e Mn²⁺ e aplicaram *laser* UV KrF, com 248 nm e taxa de repetição de 2 Hz. Após 21 dias, os autores observaram boa taxa de proliferação e viabilidade celular nessas células. A fosfatase alcalina foi sempre maior nos grupos irradiados que no grupo controle. A produção de colágeno tipo I foi maior entre o 7^o e 21^o dia nos grupos irradiados. O nível do fator de transformação e crescimento beta 1 (TGF-β1) foi menor do 3^o ao 7^o dia, mas aumentou consideravelmente entre o 14^o e o 21^o dia. Os resultados comprovam que ambos os revestimentos OCP e Mn²⁺ favorecem a proliferação, diferenciação e ativação do metabolismo dos osteoblastos, podendo assim a irradiação a *laser* melhorar a osteointegração em vários tipos de implantes ósseos.

Conclusão

A laserterapia de baixa potência pode acelerar a proliferação dos osteoblastos e a cicatrização, porém são necessários mais estudos sobre as reações bioquímicas das células submetidas a esse tipo de tratamento, bem como para estabelecer pa-

drões de frequência, intensidade, tempo e modo de aplicação dos *lasers*.

Referências

- Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, et al. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. *Lancet* 1993;341:72-5.
- Haxsen V, Schikora D, Sommer U, Remppis A, Greten J, Kasperk C. Relevance of laser irradiance threshold in the induction of alkaline phosphatase in human osteoblast cultures. *Lasers Med Sci*. 2008;23(4):381-4. Epub 2007 Oct 31.
- Leucht P, Lam K, Kim JB, Mackanos MA, Simanovskii DM, Longaker MT, Contag CH, Schwettman HA, Helms JA. Accelerated bone repair after plasma laser corticotomies. *Ann Surg*. 2007;246(1):140-50.
- Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y. Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med*. 2007;39(6):551-9.
- Hao L, Lawrence J, Phua YF, Chian KS, Lim GC, Zheng HY. Enhanced human osteoblast cell adhesion and proliferation on 316 LS stainless steel by means of CO2 laser surface treatment. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;73(1):148-56.
- Fujihara NA. Estudo da adesão, proliferação e síntese de proteínas por osteoblastos cultivados e submetidos à ação do laser de baixa potência. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade São Paulo; 2002.
- Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med*. 2005;36:8-12.
- Hamajima S, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tagawa T, Kawahara M, Ohta M, Sasahara H, Abiko Y. Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2003;18(2):78-82.
- Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, Takahashi T. Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2006;79(6):443-50. Epub 2006 Dec 8.
- Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H. Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone*. 2007;40(1):140-8. Epub 2006 Sep 15.
- Fujihara NA, Hiraki KR, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. 2006;38(4):332-6.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med, New York*. 1985;5(1):31-9.
- Gaida K, Koller R, Isler C, Aytakin O, Al-Awami M, Meissl G, Frey M. Low level laser therapy – a conservative approach to the burn scar? *Burns*. 2004; 30:362-7.
- Khadra M, Stale P, Lyngstadaas, Hans R, Haanaes, Kamal Mustafa. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials*. 2005;26:3503-9.
- 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*. 2008;120(3-4):112-7.
- Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 5^a ed. New York (NY): Wiley-Liss; 2005.
- 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*. 1998;22(4):347-54.
- Martinasso G, Mozzati M, Pol R, Canuto RA, Muzio G. Effect of superpulsed laser irradiation on bone formation in a human osteoblast-like cell line. *Minerva Stomatol*. 2007;56(1-2):27-30.
- Renno AC, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(4):275-80.
- Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(2):161-6.
- 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*. 2003;21(5):271-7.



22. Yamamoto M, Tamura K, Hiratsuka K, Abiko Y. Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2001;16(3):213-7.
23. Von Wilmsow C, Vairaktaris E, Pohle D, Rechtenwald T, Lutz R, Münstedt H, Koller G, Schmidt M, Neukam FW, Schlegel KA, Nkenke E. Effects of bioactive glass and beta- TCP containing three-dimensional laser sintered polyetheretherketone composites on osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2008;87(4):896-902.
24. Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(3):288-92.
25. Friedmann A, Antic L, Bernimoulin JP, Purucker P. In vitro attachment of osteoblasts on contaminated rough titanium surfaces treated by Er:YAG laser. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(1):53-60.
26. Romanos G, Crespi R, Barone A, Covani U. Osteoblast attachment on titanium disks after laser irradiation. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(2):232-6.
27. Nicolau RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zângaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):89-94.
28. Bigi A, Bracci B, Cuisinier F, Elkaim R, Fini M, Mayer I, Mihailescu IN, Socol G, Sturba L, Torricelli P. Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings. *Biomaterials.* 2005;26(15):2381-9.