

Relatório Final

Trabalho de Conclusão de Curso

Desenvolvimento de Equipamento LED para Aplicação em Cultura Celular.

Aluno: Angelo Biasi Govone

Graduando em Física Médica, IBB-UNESP

Orientador: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

Departamento de Física e Biofísica, IBB-UNESP

Co-orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Hemocentro de Botucatu, FMB-UNESP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Govone, Angelo Biasi.

Desenvolvimento de equipamento LED para aplicação em cultura celular / Angelo Biasi Govone. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Joel Mesa Hormaza

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 10502025

1. Luz. 2. Biologia celular. 3. Radiação. 4. Câncer. 5. Anticorpos monoclonais.

Palavras-chave: Cultura celular; Fonte reguladora de tensão; LED; Mieloma murino; Radiação não ionizante.

Agradecimentos:

Agradeço aos meus pais, José Silvio e Maria Aparecida, ao meu irmão Alvaro e minha namorada Priscila que sempre me apoiaram e me motivaram na caminhada da graduação.

Agradeço também a doutora Elenice Deffune, que disponibilizou toda a estrutura dos laboratórios para que o experimento fosse realizado e ao professor Ney Lemke que auxiliou no trabalho, ajudando sempre que solicitado, cobrando melhorias que amadureceram o projeto e participando do desenvolvimento do mesmo.

Um agradecimento especial ao professor Joel Hormaza pela orientação e toda a colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Dedico este trabalho a Doutora Elenice Deffune, que muito ajudou, ensinando muito mais que biologia ou medicina, mostrando como transformar adversidades em motivação para construir novas idéias e conquistar seus objetivos. Obrigado por tudo!

“O fato de só “vermos” uma pequena parte dos vários tipos de radiação eletromagnética mostra o quanto a nossa percepção sensorial do mundo à nossa volta é limitada.”

Marcelo Gleiser, A Dança do Universo.

1.2 RESUMO.

O estágio realizado em parceria entre o Departamento de Física e Biofísica do IBB-UNESP e o Hemocentro de Botucatu da FMB-UNESP teve como objetivo desenvolver um novo equipamento de luz LED capaz de interagir com culturas celulares.

Desta forma foi desenvolvido um equipamento com luz azul e luz vermelha.

A luz azul é responsável por inibir o crescimento celular, a luz vermelha é responsável por aumentar o crescimento celular.

O equipamento consiste de uma fonte, e dois conjuntos com três LEDs cada.

A cultura celular escolhida foi a de *Miomela Murino* (NS1), uma linhagem que possui alta taxa de crescimento e que foi mantida em estufa e meio de cultura, (simulando condições normais de sobrevivência), sendo irradiada três vezes ao dia.

As amostras foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos, quando comparados com o controle, não apresentaram significativa diferença de crescimento quando irradiados com luz LED vermelho. Porém quando comparados o grupo controle com o grupo irradiado com LED azul, notou-se uma significativa redução da quantidade de células a partir do sétimo dia de irradiação.

Acredita-se que a ineficácia dos LEDs vermelhos ocorreram pois utilizamos células com metabolismo bastante elevado, dificultando um aumento ainda maior da taxa de crescimento.

A redução da população de células azuis ocorre pois a radiação interage com a membrana celular, causando a quebra dessa membrana e conseqüente

morte da célula. Outra via para a morte é a lesão causada no DNA das células, que ocorre quando a luz azul é absorvida pela molécula.

1.3 – INTRODUÇÃO.

A inovação e busca por novos conhecimentos fazem parte da característica humana.

A rápida disseminação do conhecimento, através dos novos meios de comunicação, permite a evolução da ciência de maneira muito mais rápida que séculos atrás.

O instinto pela busca de soluções, aliado ao acesso à informação, permite que possamos encontrar sólidos pilares para apoiar as novas idéias.

Desta forma, pesquisadores da área médica buscam soluções importantes para diversas áreas, como a estimulação celular, que é grande aliada dos profissionais da saúde para acelerar a cicatrização e aumentar a drenagem linfática, além de tratamento de úlceras, controle da dor, controle de processos inflamatórios e regeneração tecidual, dentre outros.

Uma das maneiras utilizadas para causar estimulação é a adoção de radiação eletromagnética na terapia celular, em especial radiação de luz visível na faixa dos 600nm ou no infravermelho próximo, até 960nm. Essa radiação tem a característica de possuir uma banda bastante estreita para emitir picos de energia com densidade óptica suficiente para causar interação com tecido biológico, como membrana celular, mitocôndrias, núcleo e DNA. Por isso é adotada a luz LASER e a luz LED para esse tipo de terapia celular em meios de cultura e também nos pacientes.

Também é possível, através da irradiação com outro comprimento de onda, causar a morte celular. Isto ocorre pela interação da luz com o DNA, causando quebra desta molécula e conseqüente morte da mesma ou com a

interação da luz com a membrana celular, causando uma ruptura irreparável nesta membrana, levando a morte da célula. Para que ocorra este fenômeno utiliza-se comprimentos de onda menores que variam de 100nm até 500nm.

Um LASER de boa qualidade possui uma banda discreta, com um comprimento de onda bastante específico, já o LED possui uma banda estreita, com pico também específico. Além da estimulação celular para o crescimento da cultura e para a apoptose, estes equipamentos são utilizados para muitos fins, como drenagem linfática, cicatrização de feridas, terapia fotodinâmica e cirurgias ablativas (neste último caso é utilizado LASER de alta potência).

Para a interação com tecido biológico, é importante esta “precisão” com picos energéticos restritos a certos comprimentos de onda, pois a luz interage diretamente com algumas estruturas das células, como a membrana celular (aumentando as trocas entre o meio e o interior da célula, ou rompendo a membrana celular, causando a morte da célula) e a mitocôndria (aumentando a respiração celular, causando aumento do metabolismo) e o DNA (causando a quebra irreparável da molécula, que leva a morte da célula).

Os efeitos são foto químico, foto mecânico, foto térmico e foto elétrico. A irradiação gera um estresse nas células, capaz de liberar uma cascata de ações que são responsáveis pela mudança em seu comportamento.

Desta forma, o presente estágio teve por objetivo desenvolver um equipamento LED de baixo custo, medir sua potência óptica e sua eficácia em irradiações de células de Mieloma Murino (NS1).

O equipamento foi desenvolvido no Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu sob orientação do Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza e cooperação do Prof. Dr. Ney Lemke.

Também houve parceria com o Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial com a Profa. Dra. Elenice Deffune que co-

orientou o projeto e viabilizou sua experimentação no Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu.

O equipamento foi testado no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, sob supervisão da Dra. Elenice.

1.4 METODOLOGIA.

O equipamento desenvolvido consiste em uma fonte redutora de tensão e retificadora, capaz de entregar - com precisão - tensões de 5, 9 e 12 Volts dotada de um ventilador para controle da temperatura interna. Para a irradiação foram montados em dissipadores térmicos de alumínio com ventilador para os LEDs, dois conjuntos de três LEDs cada um com 3 Watts de potência da marca Cromatek[®].

O equipamento foi capaz de fornecer luz com comprimentos de onda de 465 e 625nm.

Para isso, foi utilizado:

- Base de uma fonte de computador
- Placa para montagem de circuito eletrônico
- 1 transformador 110/220V - 15V (2A)
- 4 capacitores 16V - 4700 μ F (C1).
- 1 Circuito integrado LM7812
- 1 Circuito integrado LM7809 com dissipador térmico
- 1 Circuito integrado LM7805
- 4 diodos 1N4007
- Chave seletora de tensão de entrada (110/220V)
- 2 dissipadores de alumínio com ventilador
- 3 LEDs de 3 Watts 465nm.
- 3 LEDs de 3 Watts 625nm.

O esquema da fonte montada está representado na figura 1.

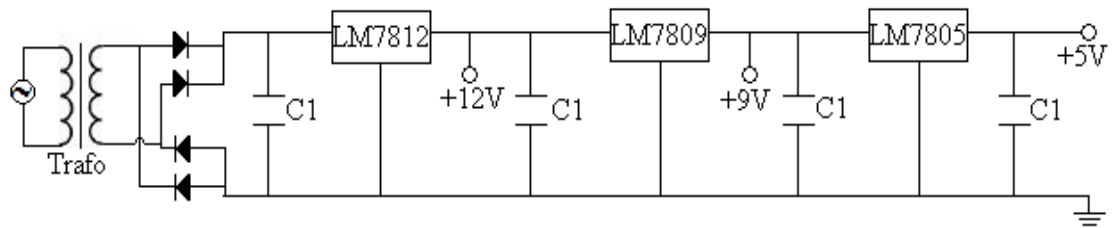


Figura 1: Esquema da fonte de alimentação.

As diferentes tensões foram utilizadas para alimentar o ventilador da fonte, os ventiladores dos LEDs e os LEDs.

As tensões da fonte sem carga foram medidas em osciloscópio que não demonstrou a presença de efeito *ripple*. Isso é explicado pela alta carga dos capacitores e pela regulação automática dos circuitos integrados LM 78XX.

Logicamente o efeito *ripple* existiu, mas foi imperceptível quando analisado no osciloscópio por ter ddp insignificante.

Os circuitos da linha LM78XX foram escolhidos por serem bastante robustos e capazes de suportar sobrecarga sem danificar o equipamento alimentado (no caso, os LEDs), por serem muito precisos, mesmo trabalhando em temperaturas elevadas e por possuírem baixíssimo custo, além de facilidade na montagem do projeto.

Para a montagem foi considerado o fato de que os reguladores não apresentam boa regulação quando alimentados com tensões menores que o valor de saída somado, no mínimo, a 2,5V. Por isso a diferença de tensão mínima entre a entrada e a saída do regulador foi de 3V. Desta forma as tensões medidas ficaram sempre bastante estáveis, mesmo em uso severo, quando ligados por mais de 4 horas ininterruptas.

O conjunto de LEDs foi montado com jogos de três LEDs azuis de 465 ± 10 nm e três LEDs vermelhos de 625 ± 10 nm.

Esses LEDs foram adquiridos da empresa Cromatek® e utilizamos o datasheet que acompanhou os LEDs para a montagem, calculo de dissipação térmica e calculo de tensão e corrente de alimentação.

A montagem ficou como no esquema representado pela figura 2 e na imagem da figura 3.

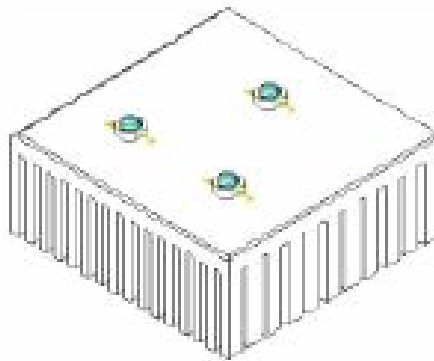


Figura 2: LEDs acoplados ao dissipador térmico.



Figura 3: Jogo de LEDs azul e vermelho montados.

As medidas ópticas foram realizadas com o Luxímetro Digital Minipa® modelo MLM-1010® que apontou fluência de $21,6 \text{ J/cm}^2$.

As células escolhidas para irradiação foram células de mieloma murino da linhagem NS1, originárias de camundongos. Estas células foram escolhidas por

possuírem um metabolismo bastante rápido, e por isso gostaríamos de verificar qual a resposta destas células quando estimuladas com os dois conjuntos de LEDs.

Estas células ficam em suspensão no meio de cultura, podendo decantar com o passar do tempo, mas não se aderem ao recipiente em que se encontram, essa característica facilita o manuseio das mesmas para contagem e diminui o estresse das células a cada manipulação

Para o estudo foram criados três grupos, sendo eles: CONTROLE, LUZ AZUL e LUZ VERMELHA, semeadas na quantidade de 1×10^4 células por grupo e mantidas em recipientes devidamente estéreis, em estufa com temperatura controlada a 37°C e mantidas em meio especial DMEM-Knockout suplementado com soro fetal bovino 10%, aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, insulina e antibióticos. Os grupos receberam sempre o mesmo tratamento, sem qualquer distinção. O experimento foi repetido a fim de obter seis amostras por grupo.

A irradiação era feita três vezes ao dia, sendo que o grupo azul e o grupo vermelho recebiam o mesmo tempo de exposição aos respectivos LEDs. A cada irradiação, os três grupos eram retirados juntos da estufa, separados na bancada e o grupo azul e vermelho eram irradiados separadamente, em três seções de 1 minuto, com intervalo de 30 segundos entre cada seção. Após a irradiação dos dois grupos, os três grupos retornavam à estufa.

Apesar da irradiação ser feita a cada 8 horas, a contagem era realizada uma vez ao dia, sempre antes da segunda irradiação do dia. Nesta contagem, o pesquisador não sabia a qual grupo pertencia a amostra, evitando assim qualquer tipo de vício na contagem.

A contagem de células por unidade de volume ($\text{mm}^3 = \mu\text{L}$) não pode ser efetuada por contadores automáticos, que não são preparados para a leitura deste tipo de células, mas deve ser obrigatoriamente realizada através de uma

contagem manual em câmara de Neubauer, técnica esta padronizada no laboratório de Engenharia Celular. A seqüência para tal procedimento foi:

1. Realizar uma diluição precisa da suspensão celular com a Solução de Azul de Trípano (blue trypan) na proporção de 50% de suspensão e 50% de Solução de Azul de Trípano.

2. Uma solução é considerada satisfatória para controle manual, quando se consegue uma correspondência de $5-10 \times 10^5$ células, o que nos dá aproximadamente de 50-100 células por linha de contagem. Uma linha inteira (10 retângulos) é igual a $0,1 \text{ mm}^3$ e um retângulo corresponde a $0,01 \text{ mm}^3$.

3. Foi colada a lamínula limpa com álcool sobre a câmara;

4. Com a ajuda de uma micropipeta P-100 (ponteira amarela), foi introduzida a suspensão celular dentro da câmara, enchendo a mesma para a contagem. Evitando excesso de líquido:

6. Deixou-se sedimentar em média 60 segundos;

7. Contamos várias linhas (no mínimo 100 células);

8. Foi então calculado o número de células propagando o resultado para todo o meio.

As figuras 4 e 5 demonstram o momento da irradiação, onde a bancada foi devidamente limpa com álcool 70 iodado e o operador utilizou óculos de segurança da marca MMOptics®. A base da bancada foi coberta com papel alumínio para refletir a luz transmitida, aumentando a quantidade de luz absorvida pelo meio de cultura.

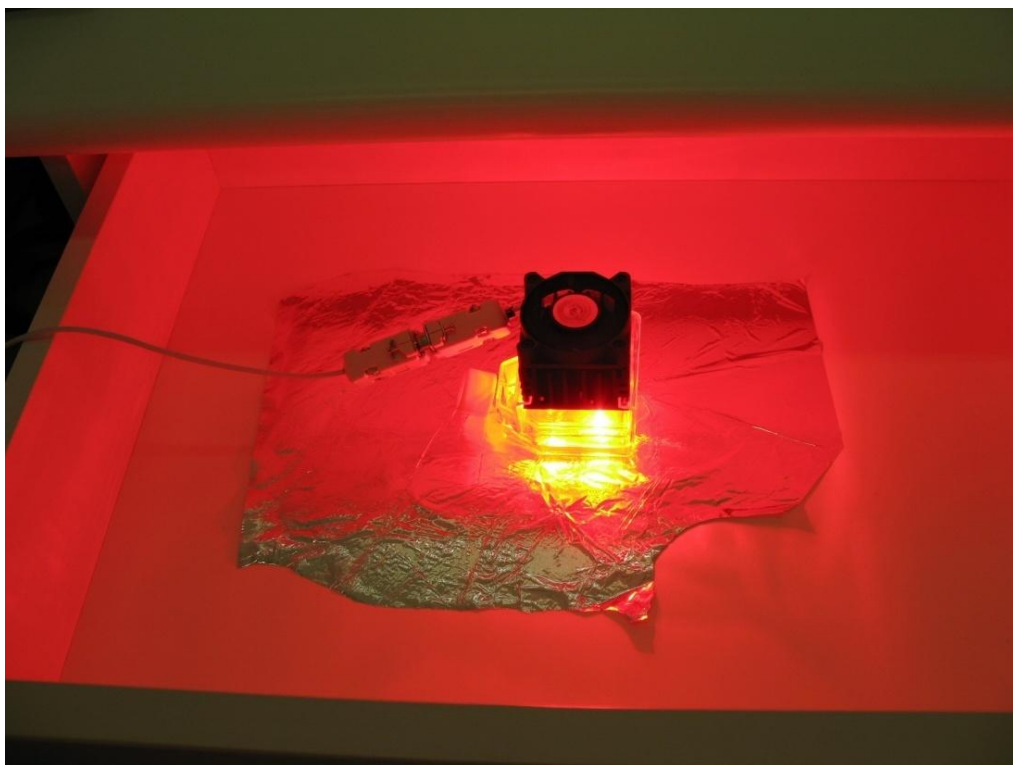


Figura 4: Irradiação com LEDs vermelhos.

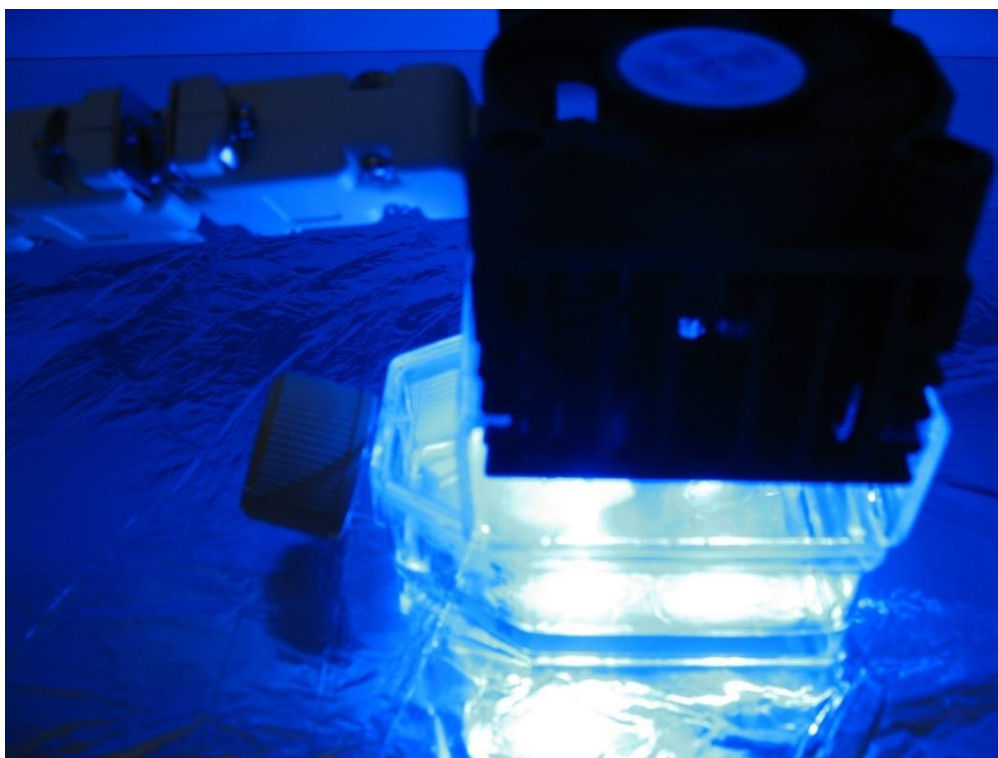


Figura 5: Irradiação com LEDs azuis.

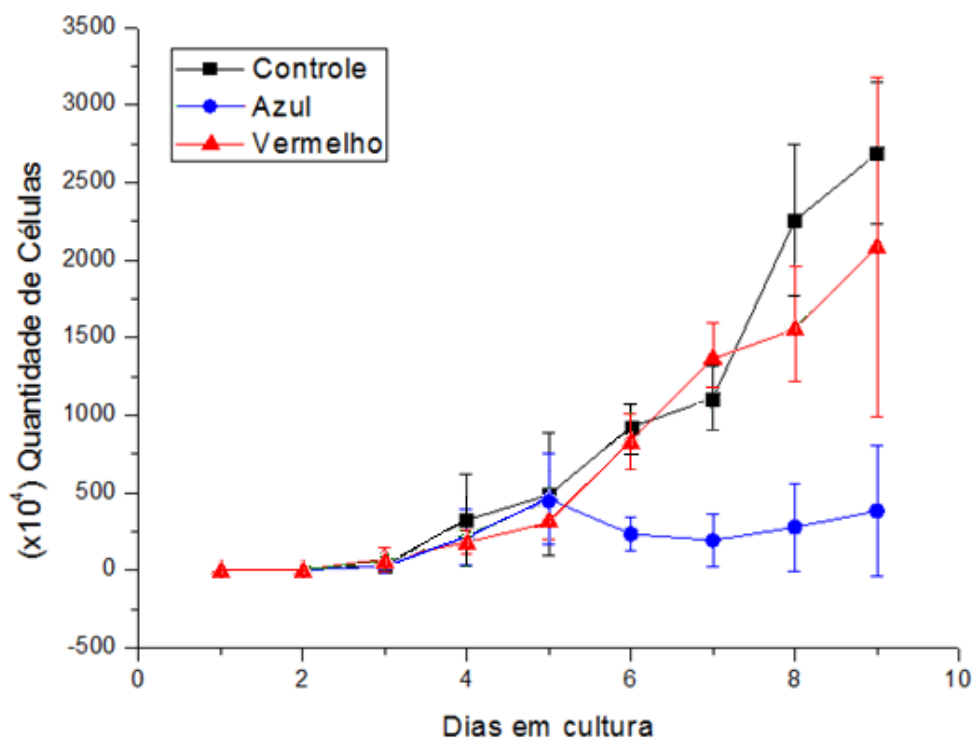
Os dados coletados foram submetidos a análise estatística, orientada pelo Prof. Dr. José Silvio Govone (IGCE-UNESP) que indicou qual o tipo de teste

adequado para a análise. Os testes indicados foram o teste de Kruskalwallis e o teste de Mann_whitney.

1.5 RESULTADOS E CONCLUSÃO.

A média dos dados colhidos foi tabelada e plotada no gráfico 1.

Gráfico 1: Resultados do experimento com Células de Mieloma.



Apesar de cada grupo possuir apenas seis repetições, isso se justifica pela complexidade em realizar o experimento e também pelos altos custos do meio de cultura.

Os dados coletados das seis amostras por grupo foram analisados pelo teste de Kruskalwallis, que identificou que as diferenças ocorrem a partir do sétimo dia. Aplicando o teste de Mann_whitney observou-se que o grupo que difere é o grupo azul, com $p=0,039$.

Desta forma, consideram-se estatisticamente iguais os grupos controle e vermelho. O grupo azul é o único que difere estatisticamente.

As figuras 6, 7 e 8 demonstram as células no oitavo dia de cultura com aumento de 10 vezes. Essas imagens são dos recipientes em que as células se encontravam, antes de serem homogeneizadas para contagem.

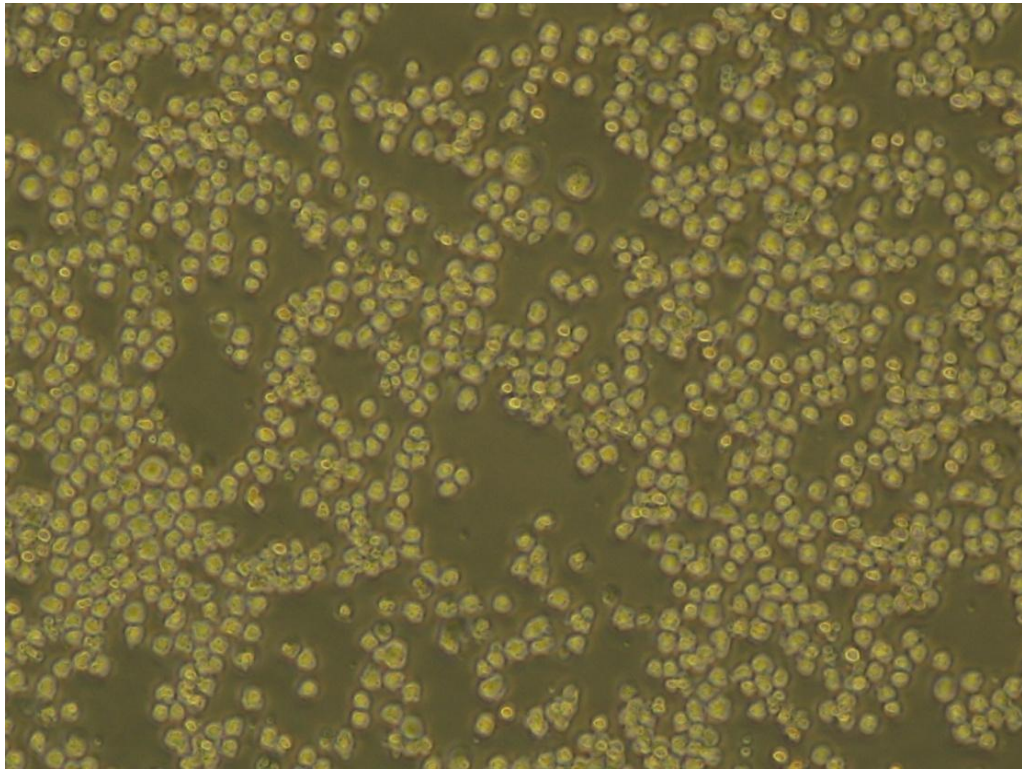


Figura 6: Imagem do grupo controle no oitavo dia com aumento de 10 vezes.

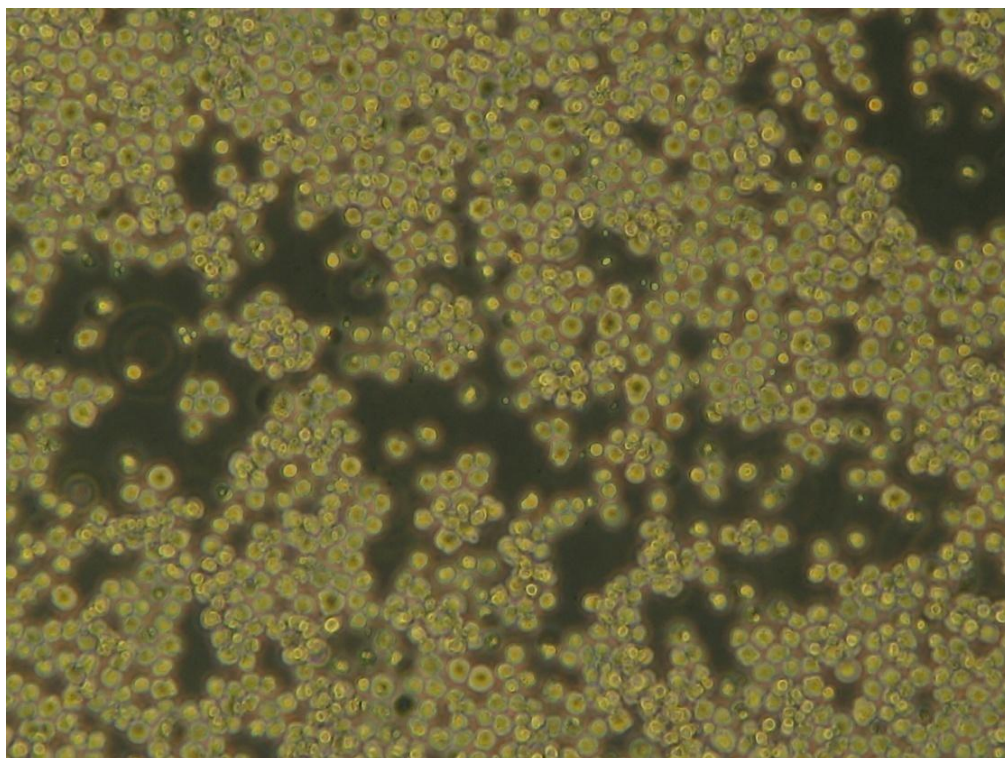


Figura 7: Imagem do grupo vermelho no oitavo dia com aumento de 10 vezes.

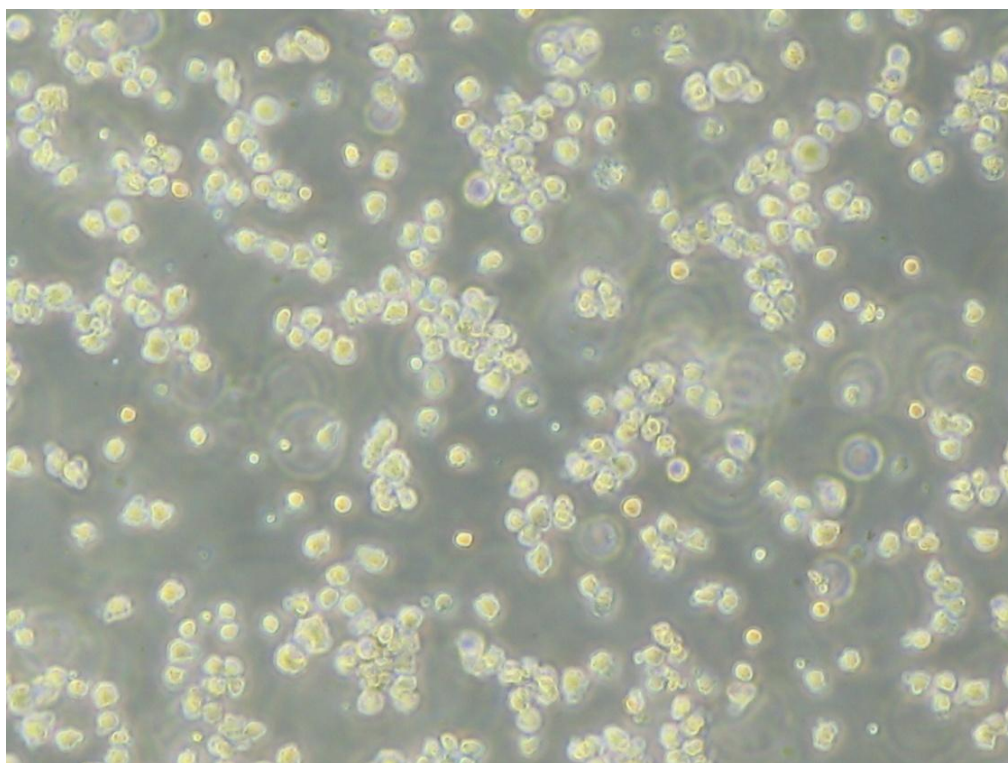


Figura 8: Imagem do grupo azul no oitavo dia com aumento de 10 vezes.

É possível, portanto, concluir que os dados colhidos apesar de não demonstrarem aumento no número de células do grupo vermelho quando comparado com o grupo controle, demonstra que o grupo azul sofreu grande redução populacional.

Não encontramos resultados na literatura com este tipo de célula, o que impede qualquer comparação, porém acreditamos que as células de mieloma, por se tratar de um tipo de célula cancerígena, já estão com seu metabolismo bastante acelerado, cuja limitação de crescimento está relacionada simplesmente a escassez de nutrientes e incapacidade de acelerar ainda mais a multiplicação celular. Desta forma mesmo com a estimulação com LEDs vermelhos, não foi possível incrementar ainda mais sua curva de crescimento.

O grupo irradiado com luz azul apresentou significativa redução populacional. Acredita-se que a energia entregue à cultura celular foi responsável por romper a membrana das células, causando morte, com redução estatisticamente significativa.

Desta forma o equipamento gerou resultados compatíveis com a literatura, mostrando que a luz azul possibilita um controle populacional em meios de cultura.

Este equipamento será doado ao Hemocentro de Botucatu, com o objetivo de dar seguimento às pesquisas nesta importante área da terapia celular.

Um próximo passo será estimular Células Tronco Mesenquimais humanas (CTMh) comparando os resultados com a literatura e auxiliando o trabalho dos pesquisadores do homocentro que necessitam de células tronco em abundância para suas pesquisas e tratamentos de pacientes.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde; BAGNATO, Vanderlei S.; Ed. Livraria da Física 2008.
2. LASER em Bio-Medicina. Princípios e prática; CHAVANTES, Maria C.; Ed. Atheneu 2009.
3. Análise de Circuitos em Engenharia; IRWIN David J.; Ed. Pearson Makron Books 2000.
4. Zar's Biostatistical Analysis, Fifth Edition, Prentice Hall, 2010.
5. Ayres, M.; Ayres Jr., M; Ayres, D.L.; Santos,A.S.S.; Ayres,L.L. BIOESTAT 5.0 - *Fundação Mamirauá - MCT*, Belem, PA, 2010
6. Molecular Driving Forces -Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology; DILL, Ken A.; BROMBERG, Sarina; Ed. Garland Science 2003.
7. MORGADO, A.M.; Utilização segura de LASER, 2002.
8. IGNATIEVA, N.; et. al.; Molecular Processes and Structural alterations in LASER reshaping of cartilage. *Laser Phys. Lett.* 4 N°10, 749-753 (2007).
9. KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power Laser therapy. *Journal of Quantum Electronics.* v.QE-23, n 10, p 1703-1717, 1987.
10. ROUNDS, D.E.; et al. the effect of intense visible light on cellular respiration. *Life Sci.* v.6, p. 222-271, 1984.
11. PINHEIRO, A. L. B.; et al. Effects of low-level Laser therapy on malignant cells: *In Vitro* study. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery.* v.20, n.1, p.23-26, 2002.
12. BIHARI, J.; et al. The biostimulative effect of low level Laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomised double blind comparative study. *Laser Therapy*, v.1, n.2, p.97, 1989.

13. SCHELLER, E.E.; et. al. Calculations regarding cell metabolism stimulation. *Laser Physics*. v.5, n.1, p.70-74, 2008.
14. SKINNER, S. M.; et al. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Australian Dental Journal*. v.41, p.3, 1996.
15. SOBOL, E.N.; et al. Laser reshaping and regeneration of cartilage. *Laser Physics*. v.4, n.7, p.488-502, 2007.
16. WHELAN, H. T.; SMITS, R. L.; BUCHMAN, E. V.; et al. Effect of NASA Light- Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *J Clin Laser Med Surg*, v. 19, n. 6, p.305-314, 2001.
17. TANG, J.; et al. Morphologic changes in collagen fibbers after 830 nm diode laser welding. *Lasers Surg Med*. v.21, p.438-443, 1997.
18. TRELLES, M. A.; et al. The action of low-reactive level laser therapy (LLLT) on Mast Cells: a possible pain relief mechanism examined. *Laser Therapy*. v.1, n.1, p.27-30, 1989.
19. WEBB, C.; et al. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. *Lasers Surg Med*. v.22, p.294-301, 1998.
20. WONG, B. J. F.; et. al. Characterization of temperature-dependent biophysical properties during laser mediated cartilage reshaping.[EDITORIAL]. *Arch Facial Plast Surg*. v.1, n.4, p.282-287, 1999.
21. KARU, T.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomedicine and Laser Surgery*, Larchmont, V. 23, n.4, p.355-361, 2005.
22. KARU, T. Low power laser therapy. *Biomedical Photonics Handbook*. c 48. p. 1-20. 2003