



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

**MARCELO NORONHA VELOSO**

Influência da luz LED em culturas de células-tronco mesenquimais *in-vitro*.

Botucatu  
Estado de São Paulo – Brasil  
2010

**MARCELO NORONHA VELOSO**

Influência da luz LED em culturas de células-tronco mesenquimais *in vitro*.

Trabalho de Conclusão de  
Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho” para obtenção do  
Título de Bacharel em Física  
Médica

Orientadores: FMVZ: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga  
IBB: Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda

Botucatu  
Estado de São Paulo – Brasil  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Veloso, Marcelo Noronha.

Influencia da luz LED em culturas de células-tronco mesenquimais *in-vitro* /  
Marcelo Noronha Veloso. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Capes: 31301002

1. Bioengenharia. 2. Células-tronco. 3. Luz – Efeito fisiológico.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; In vitro; LED; Proliferação  
celular.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Roberto e Rita de Cássia, por terem se dedicado ao máximo para que eu pudesse chegar onde cheguei, por sempre sentirem orgulho de mim, pelo amor, carinho, dedicação e esforço com que dirigiram minha educação. Por terem me ensinado a viver e me deixarem ser livre nas minhas escolhas. Amo vocês.

A minha irmã que, apesar dos desentendimentos, amo e admiro demais.

A minha avó Geni e a minha madrinha Rosangela que sempre oraram por mim e a quem tenho um amor e um carinho imenso; e a toda minha família.

Aos amigos Woner Mion e Angelo Govone por me inserirem nesse projeto, por serem os idealizadores desse trabalho, por me orientarem e estarem sempre dispostos a ouvir minhas idéias.

À Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga por ter me orientado, por ter acreditado em mim e no projeto, por ter me cedido espaço no laboratório e por sempre estar disposta a discutir novas idéias.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda pelas críticas construtivas que me fizeram abrir os olhos durante minha graduação e iniciação científica; e por acreditar e apostar em mim.

À Profa. Dra. Denise Zezell que muito gentilmente me recebeu no CLA-IPEN e ajudou-me a focar e estruturar meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sílvio Govone que, com muita boa vontade, ajudou-me com a análise estatística dos dados.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal e Zootecnia da FMVZ de Botucatu: João, Giovana, Leandro, Bruna, e a todos do laboratório que cederam um pouco do seu tempo e contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos da IV Turma de Física Médica da Unesp Botucatu pela boa convivência e amizade.

Ao amigo e mestre Alisson Buchi que ajudou e orientou-me nesse trabalho e em minhas decisões.

Às amigas Ana Luísa, Mariana e Renata que me aturaram com paciência e com quem compartilhei bons momentos.

Ao Murilo e ao Thales do Dreamstate que me inseriram no meio musical, onde desenvolvi habilidades e encontrei essa maravilhosa válvula de escape que é a musica.

Aos amigos integrantes do Grau Etfílico, banda de que tenho orgulho de fazer parte e que foi responsável pelos melhores momentos da minha graduação.

Aos amigos da república BGD, com quem tive o grande prazer de conviver durante esses anos, por serem verdadeiros irmãos.

## RESUMO

Células-tronco são definidas como células capazes de auto-renovação e diferenciação em células especializadas quando submetidas a sinalizações externas do meio. Dentre as células-tronco adultas, as mesenquimais ocupam posição de destaque, pois podem se diferenciar em células mesodérmicas como osteoblastos, adipócitos e condrócitos. A terapia celular consiste no emprego de células tronco (CT) no tratamento de doenças degenerativas e reconstituição de tecidos lesados. Devido ao longo tempo e alto custo para o cultivo das CTM foi proposto o emprego de fontes de luz de baixa potência, como diodos emissores de luz (LED), a fim de otimizar tais fatores. Estudos recentes apresentam uma série de resultados da influência da luz LED em tecidos biológicos tais como: aumento da taxa de proliferação de células, aumento da taxa de síntese de RNA, DNA e ATP. O presente estudo tem como objetivo comparar os efeitos biomoduladores da luz LED nos comprimentos de onda  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  (vermelho) e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  (infravermelho) sobre a proliferação de células-tronco mesenquimais. Os processos de coleta e cultivo celular seguiram critérios do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. As CTM foram obtidas a partir de medula óssea coletada de eqüinos adultos e isoladas através da separação por gradiente de densidade, com o reagente FICOLL, e por centrifugação. O *pellet* contendo células foi retirado e essas foram acondicionadas em meio de cultura DMEM de baixa glicose, contendo 10% de soro fetal bovino e antibiótico. O material foi observado diariamente por microscopia invertida para monitoramento da evolução celular e posteriormente contabilizada em câmara de Neubauer. A quantificação de CTM foi obtida através do cultivo das células semeadas em placas com 24 poços e segregada em três grupos distintos: o Grupo 1 foi irradiado com comprimento de onda de  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ; Grupo 2 foi irradiado com comprimento de onda de  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e o Grupo 3 foi o controle. Ambos os grupos irradiados foram submetidos à fluência de  $6,5\text{J}/\text{cm}^2$  diários durante três dias. Para análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5%. Os resultados mostraram que houve um leve aumento na taxa de proliferação das células tronco mesenquimais irradiadas com LED, mas não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados.

Palavras-Chaves: LED, Células-tronco mesenquimais, *in vitro*, Proliferação celular.

## ABSTRACT

Stem cells are defined as cells capable of self-renewal and differentiation into specialized cells when submitted to external signalings in the environment. Among adult stem cells, mesenchymal cells occupy an important position because they can differentiate into mesodermal cells such as osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Cell therapy consists in the use of mesenchymal stem cells (MSC) in the treatment of degenerative diseases and harmed tissue reconstruction. Due to the longstanding and costly procedure for cultivation of MSC, it was proposed the use of low power light sources, such as light emitting diodes (LED), to optimize these factors. Recent works have shown a series of results from the influence of LED light on biological tissues such as increased rate of cell proliferation, increased RNA, DNA and ATP synthesis rate. The purpose of this study is to compare the biomodulator effect of LED light set at wavelengths  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  and  $805\text{nm} \pm 10\text{nm}$  on the mesenchymal stem cells proliferation. For this, the mesenchymal stem cells culture adopted the procedure used in the Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences of Botucatu. MSC were obtained from an adult horse bone marrow, and isolated by density gradient separation, with the FICOLL reagent and by centrifugation. The pellet containing the stem cells was removed and these were placed in low glucose DMEM culture medium, containing 10% fetal calf serum and antibiotics. The material was observed daily by inverted microscopy for monitoring the progression of the cells and subsequently the amount of cells were counted in a Neubauer counting chamber. The amount of MSC was obtained by cell culture seeded in 24 wells culture plate and segregated into three distinct groups: Group 1 was irradiated with wavelength set at  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$ , Group 2 was irradiated with wavelength set at  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  and Group 3 was the control. Both irradiated groups underwent daily to fluency of  $6.5\text{J}/\text{cm}^2$  for three days. For statistical analysis, data were submitted to Kruskal-Wallis test, to the level of 5%. Results showed there was a slight increase in proliferation rate of mesenchymal stem cells irradiated with the LED, but no statistically significant difference was observed in either group studied.

## SUMÁRIO

### RESUMO

### ABSTRACT

### LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

### LISTAS DE ABREVIACÕES

#### 1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais .....	1
---------------------------	---

#### 2. REVISÃO DA LITERATURA ..... 2

2.1 Células-Tronco Mesenquimais .....	2
---------------------------------------	---

2.2 Diodos emissores de luz (LEDs) .....	3
--	---

2.3 Interações da Luz com Tecidos biológicos .....	4
--	---

2.4 Mecanismos da fotobiomodulação .....	7
--	---

2.5 Conceito de Irradiância, Fluência e Energia Depositada .....	8
--	---

#### 3. OBJETIVO ..... 9

3.1 Geral .....	9
-----------------	---

3.2 Específicos .....	9
-----------------------	---

#### 4. METODOLOGIA ..... 9

4.1 Coleta e Preparo do Meio de Cultura .....	10
---	----

4.2 Irradiação das culturas celulares .....	11
---	----

4.3 Contagem de células .....	12
-------------------------------	----

4.4 Análise de viabilidade celular .....	12
--	----

#### 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES ..... 13

#### 6. CONCLUSÕES ..... 16

#### 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 17

## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Células-tronco mesenquimais aderidas em placa de cultura.
- Figura 2** Representação do LED.
- Figura 4** Espectro eletromagnético.
- Figura 3** Coeficientes de absorção para diferentes tecidos em função do comprimento de onda.
- Figura 5** Interação da luz com a matéria.
- Figura 6** Interação Luz–Tecido.
- Figura 7** Fluxograma do experimento.
- Figura 8** Equipamento utilizado na irradiação das células tronco mesenquimais.
- Figura 9** Imagem do Microscópio confocal invertido, câmara de Neubauer e imagem da contagem das células-tronco mesenquimais.
- Figura 10** Análise de viabilidade celular por Fluorescência.
- Tabela 1** Número de células obtidas nas contagens de cada grupo
- Tabela 2** Resultados da análise de variância; Média e Desvio padrão da proliferação celular.
- Tabela 3** Resultados da análise estatística Kruskal-Wallis.
- Tabela 4** Resultados da análise de médias e desvio padrão das viabilidades celulares dos grupos em estudo.

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

**ATP** - Adenosina tri-fosfato

**CA** – Células aderidas

**CS** – Células em suspensão

**CT** – Células-tronco

**CTM** – Células-tronco mesenquimais

**DNA** - cido desoxirribonucléico

**He-Ne** – Helio – Neônio

**J** - Joule

**J/cm<sup>2</sup>** - Joule por centímetro quadrado

**LASER** - Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiao

**LED** - Diodo Emissor de Luz

**MO** – Medula ssea

**NASA** - National Aero Space Agency

**nm** - Nanmetro ( $10^{-9}$  metros)

**RNA** - cido ribonucléico

**TC**- Terapia celular

**W** - Watts

**W/cm<sup>2</sup>** - Watts por centímetro quadrado

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Gerais.

A produção de células-tronco mesenquimais (CTM) emerge como uma avançada estratégia terapêutica e importante ferramenta no desenvolvimento de novas técnicas de terapia celular, principalmente na recuperação de tecido superficial como a pele, pois tem grandes vantagens em relação a agentes químicos utilizados em terapias. A terapia celular (TC) consiste em usar aplicações de células-tronco (CT) a fim de tratar doenças e tecidos lesados substituindo células doentes por células saudáveis. (WODEWOTZKY, 2008). Nos últimos anos, as pesquisas com CTM têm despertado um grande interesse por seu potencial regenerativo, observado principalmente por técnicas *in vitro*. Infelizmente seu custo de produção é muito alto, pois grande quantidade de material importado é utilizada nas culturas celulares. Há uma crescente preocupação em se aperfeiçoar o processo de obtenção de CTM, visando à redução de custos e um maior volume de células disponíveis em menor tempo para uso em TC. Neste contexto surgem o LASER e o LED como ferramentas auxiliares ao procedimento de cultivo celular. Estudos na área de estimulação biológica com luz visível e infravermelha (fotobiomodulação) surgiram de trabalhos pioneiros publicados a partir da década de 60, logo após a criação do LASER. No início da década de 70, Mester e colaboradores (MESTER et al, 1971; MESTER et al, 1972), desenvolveram um trabalho pioneiro na aplicação de LASER de rubi *in vitro* e *in vivo* em úlceras crônicas obtendo resultados efetivos no processo de cicatrização. O LASER de He-Ne, com emissão em 632,8nm (cor vermelha) foi o primeiro LASER disponível comercialmente, o que levou ao forte desenvolvimento do estudo dos efeitos da luz com este comprimento de onda em aplicações médicas. Sabe-se atualmente que existe um mecanismo fotobiológico universal da ação da luz em células eucarióticas e procarióticas com enzimas terminais da cadeia respiratória, na mitocôndria, atuando como fotoaceitadores (KARU; KOLYAKOV, 2005). Tal descoberta mostrou que a resposta celular à fotobiomodulação não estava associada às propriedades inerentes da luz LASER como: coerência (grau de correlação entre ondas), monocromaticidade (único comprimento de onda) e unidirecionalidade (fótons se propagam com trajetória praticamente paralela, sofrendo pouca dispersão), permitindo o avanço tecnológico de novas fontes emissoras de luz, dentro as quais o LED surgiu como uma alternativa para substituir o LASER, por ser mais barato, mais simples e mais econômico. Estudos desenvolvidos pela NASA

demonstraram fortes evidências de que a eficiência do LED em processos de proliferação e crescimento celular *in vitro* é semelhante a do LASER de baixa potência. Atualmente a fotobiomodulação é um recurso terapêutico não farmacológico que contribui para acelerar a recuperação dos tecidos biológicos e tem sido usada em diferentes campos da saúde como medicina, odontologia e fisioterapia. Diversos trabalhos publicados apresentam uma série de resultados da influência da luz LED e do LASER em tecidos biológicos tais como o aumento da taxa de proliferação de células, aumento da taxa de síntese de RNA e DNA, síntese de ATP (KARU, 1989 e 1999); aumento da vascularização em feridas (CORAZZA, 2005), variações na condução nervosa (ROCHKIND, 1989), aumento na microcirculação local (MIRÓ, 1984); regeneração de sistema linfático em feridas (LIEVENS, 1990), proliferação de células epiteliais (STEINLECHNER; DYSON, 1993) e fibroblastos (LUBART et al., 1995) assim como o aumento da síntese de colágeno dos fibroblastos (ENWEMEKA et al., 1990; SKINNER et al., 1996).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Células-Tronco Mesenquimais**

Células-tronco são células indiferenciadas que possuem capacidade prolongada ou ilimitada de multiplicação através de sucessivas mitoses, podendo se dividir em células idênticas a ela, ou seja, com o mesmo potencial de auto-renovação, ou dar origem a células especializadas, como células sanguíneas, epiteliais, musculares, etc. As CTM são células-tronco presentes em diversos tecidos do organismo, capazes de se diferenciar em tecidos ósseos, cartilagosos, adiposos, musculares, epiteliais e neurais. São na maioria das vezes coletadas a partir da aspiração da medula óssea que é um dos tecidos orgânicos mais ricos em células mesenquimais indiferenciadas. Estas células foram descritas primeiramente por Friedenstein et al que descobriu que as CTM aderem às placas de cultura, se assemelham a fibroblastos *in vitro* e formam colônias (FRIEDENSTEIN, 1974). Essas propriedades são usadas como método de identificação e isolamento desse tipo celular (Figura 1). A principal desvantagem para o uso das CTM é o fato de não serem capazes de permanecer em um estado indiferenciado por longos períodos de tempo quando cultivadas *in vitro*, o que dificulta sua utilização. (WODEWOTZKY, 2008).

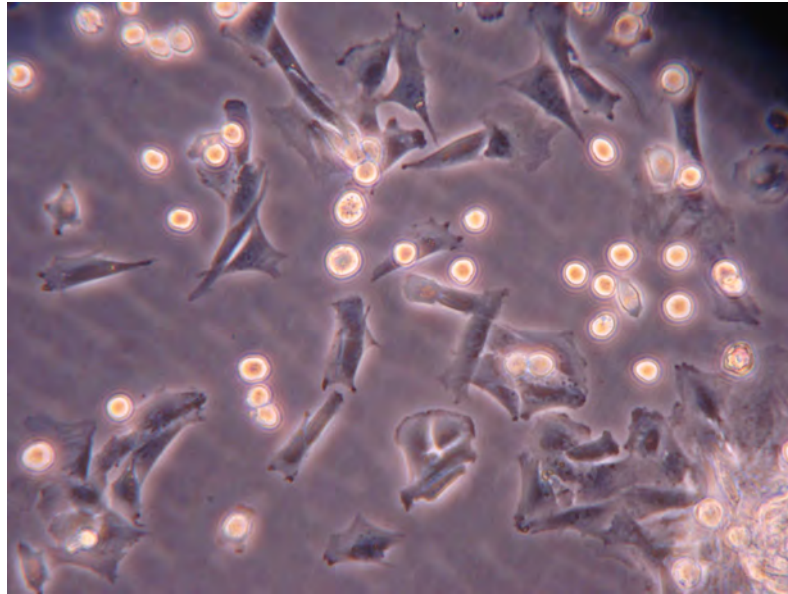


Figura 1 – Células-tronco mesenquimais aderidas em placa de cultura.

## 2.2 Diodos Emissores de Luz (LED's)

O LED - do inglês *light emitting diode* - é um diodo semicondutor que, quando energizado, emite luz. Diodos são os mais simples dispositivos semicondutores, mas que desempenham papel vital em sistemas eletrônicos. Sua função é basicamente a de bloquear a passagem de corrente elétrica em um sentido, permitindo o fluxo no sentido contrário (BOYLESTAD &, 2004). A luz produzida pelo LED é um tipo de luz divergente e não coerente, e apesar de não ser monocromática como um laser, consiste de uma banda espectral relativamente estreita (KURACHI, 2000). Essas emissões são produzidas pelas interações entre as bandas eletrônicas do material num processo denominado *eletroluminescência* (CORAZZA, 2005). Sua principal vantagem consiste na ausência de um filamento, fato este que reduz o efeito joule produzido pelo atrito entre os elétrons. Seu rendimento é maior, pois uma porcentagem muito mais alta de energia elétrica está indo diretamente para a geração de luz, o que diminui consideravelmente a demanda de consumo (Disponível em: <<http://electronics.howstuffworks.com/led3.htm>>. Acessado em 07/08/2010).

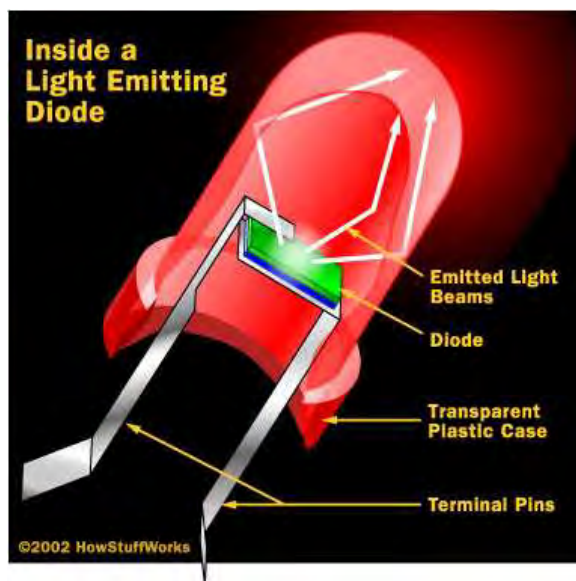


Figura 2 – Representação do LED

### 2.3 Interação Luz-Matéria

Luz de modo geral é um tipo de energia que se propaga no espaço na forma de radiação eletromagnética. Um feixe de luz é absorvido ou emitido pela matéria de forma discreta, pois é composto por pacotes de energia. Esta idéia de pacotes de energia, ou “*quanta*” como são chamados, foi primeiramente proposta por Plank no estudo da radiação de corpo negro e posteriormente adotada por Einstein no estudo do efeito fotoelétrico de 1906, onde foi introduzida a idéia “*quanta*” de luz, ou fótons como ficou conhecida. A energia contida num fóton é calculada pela equação de Plank – Einstein,

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

onde  $h$  é a constante de Plank ( $6,626 \times 10^{-34}$  J.s), e  $\nu$  é a frequência da radiação em Hertz. Quanto maior a frequência, maior a energia de um fóton. A partir da equação de Plank – Einstein e da relação  $\nu = c/\lambda$ , onde  $c$  é a velocidade da luz no vácuo ( $3 \times 10^8$  m/s) e  $\lambda$  é o comprimento de onda, temos que quanto menor o  $\lambda$ , maior a energia do fóton (figura 3) (GASIOROWICZ, 2003).

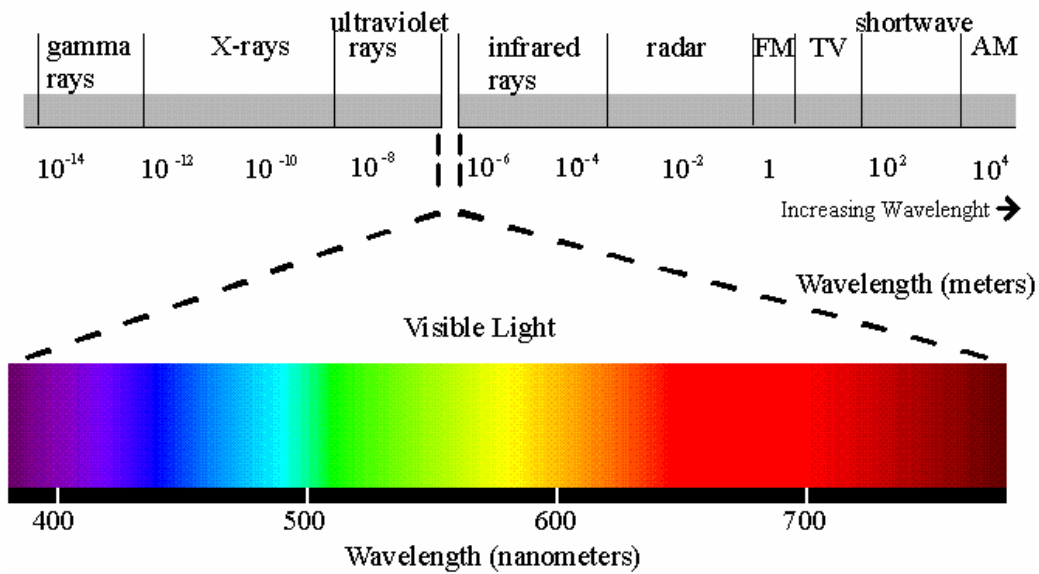


Figura 3 – Espectro eletromagnético.

A luz interage com a matéria de diversas maneiras, alterando ou não suas propriedades. Mas antes de abordar os efeitos causados pela ação da luz no tecido, é importante ressaltar a interferência causada pela matéria na propagação da radiação eletromagnética. Na figura 4 podemos observar a situação onde um feixe de luz incide na superfície de um material. O feixe tem sua propagação alterada pelos fenômenos de refração e reflexão, que são correlacionados pela *Lei de Fresnell*, por espalhamento e por absorção do material. (NIEMZS, 2004).

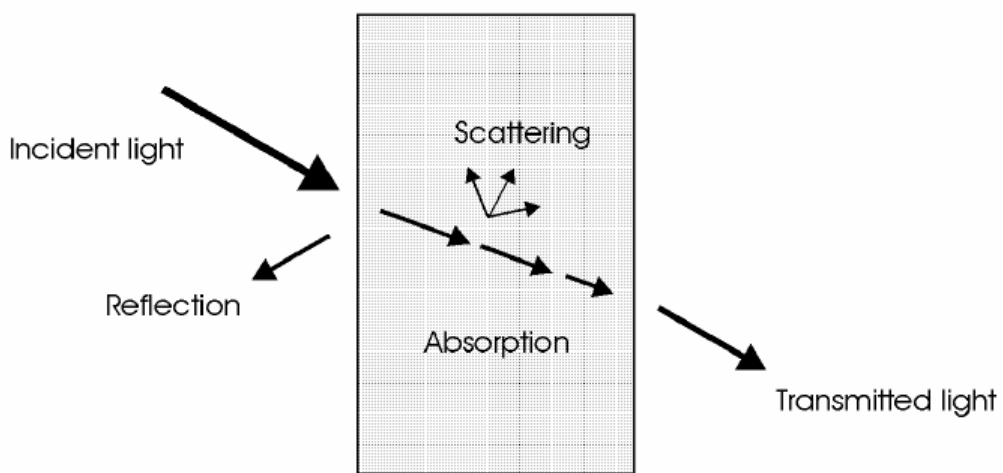


Figura 4 – Representação da interferência da matéria no feixe de luz

Os processos que regem as interações da luz visível de baixa intensidade com os tecidos biológicos são a absorção e o espalhamento, pois a reflexão e refração são consideradas secundárias e de menor importância. A absorção ocorre quando o feixe de luz atravessa um meio e tem sua intensidade atenuada. Esse fenômeno ocorre, pois a energia eletromagnética é convertida em energia vibracional das moléculas que compõem o meio (NIEMZS, 2004). A capacidade do meio de absorver radiação eletromagnética pode ser descrita pela equação de Beer-Lambert:

$$N(z) = N_0 \cdot e^{-\mu \cdot z} \quad (2)$$

Onde  $z$  é a espessura da camada atenuadora,  $N_0$  é o número de fótons incidente,  $N(z)$  o número de fótons transmitidos e  $\mu$  o coeficiente total de atenuação do material (soma dos coeficientes de absorção e espalhamento) que depende da composição, concentração, temperatura e opacidade do material; e do comprimento de onda do feixe. (HOBBIE & ROTH, 2006).

Os principais responsáveis pela absorção de fótons em tecidos biológicos são: as moléculas de água (principal constituinte destes tecidos), macromoléculas (proteínas, a exemplo, a hemoglobina) e pigmentos (melanina) (figura 3) (NIEMZS, 2004).

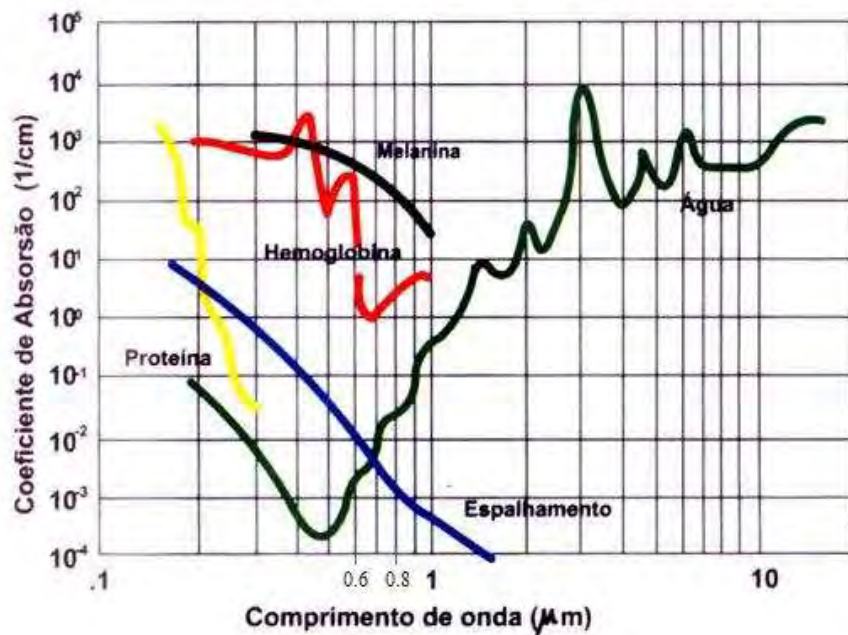


Figura 5 – Coeficientes de absorção para diferentes tecidos em função do comprimento de onda, proposto por Jacques em 1995.

A dispersão ou espalhamento ocorre quando a radiação é desviada de sua trajetória pela interação com o material, alterando sua amplitude e fase em comparação com a onda incidente. O processo de espalhamento pode ser inelástico ou elástico, isso dependerá da energia doada pelos fótons incidentes durante o processo (NIEMZS, 2004).

## 2.4 Mecanismos da Fotobiomodulação

A absorção de fótons pode produzir efeitos fototérmicos, fotomecânicos, fotofísicos e fotoquímicos, no tecido biológico. A ocorrência desses efeitos vai depender do comprimento de onda ( $\lambda$ ) do feixe de luz, da irradiância ( $W/cm^2$ ) e da fluência de energia depositada no tecido ( $J/cm^2$ ) (RIBEIRO et al, 2004; NIEMZ, 2004).

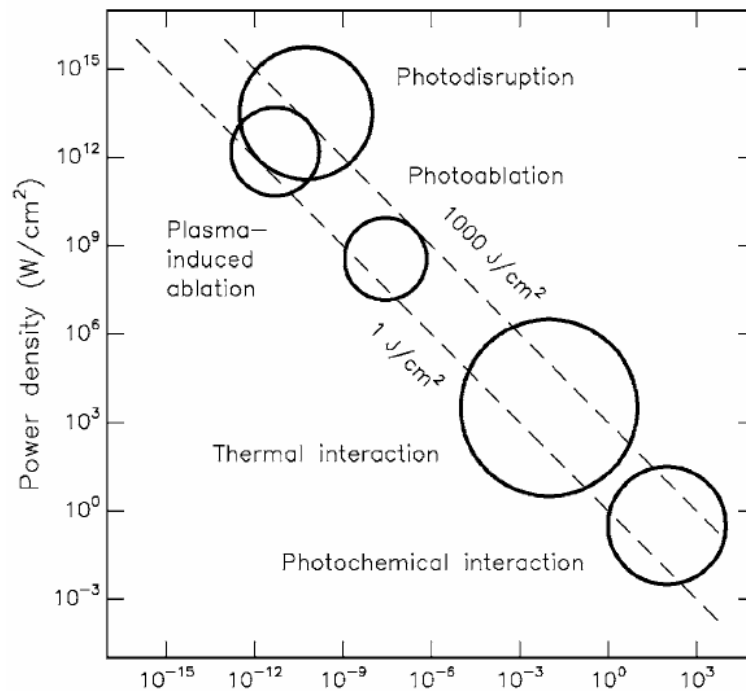


Figura 6 - Interação Luz-Tecido. Os círculos apresentam uma estimativa grosseira dos parâmetros associados aos efeitos entre interação Luz-Tecido. (Modificado por Boulnois 1986).

Os efeitos fototérmicos e fotomecânicos são mais observados na prática de cirurgia a Laser. Ambos os efeitos dependem da conversão da energia luminosa em calor (PATRIOTA, 2007).

Os efeitos fotoquímicos e fotofísicos são responsáveis pelo processo de fotobiomodulação. O mecanismo de interação da luz em nível molecular foi descrito por Karu, em 1988, a qual verificou que há um mecanismo de ação diferente para LASERs

que emitem radiação na faixa do visível e para os que emitem na faixa do infravermelho próximo (KARU, 1988).

O efeito fotoquímico estimula a síntese de DNA, síntese protéica, síntese enzimática e a produção de ATP intracelular (KARU, 2003). Este efeito ocorre devido à absorção de fótons de um determinado comprimento de onda de luz, por moléculas intracelulares específicas (fotoceptores), que promovem estimulação de atividades enzimáticas e de reações óxido-redução (redox) do metabolismo celular. De acordo com Karu, em 1988, a luz visível induz a ativação do metabolismo celular por regulação das reações redox, provocadas pela absorção da luz por fotoceptores primários presentes na cadeia respiratória (KARU, 1988).

O efeito fotofísico é responsável pela mudança de potencial na membrana celular, atuando na mobilidade iônica sendo responsável indiretamente pelo aumento da produção de ATP (RIBEIRO et al, 2004; PINHEIROS et al., 2002). Smith propôs, em 1991, que a absorção da radiação infravermelha inicia a cascata de eventos metabólicos através de efeitos provocados pela alteração do potencial de membrana (SMITH, 1991). Esses efeitos induzem modificações nos potenciais, incrementando a síntese de ATP por excitação de elétrons, vibração e rotação de partes da molécula; ou rotação de moléculas como um todo (COLLS, 1986; PINHEIROS et al., 2002).

### **2.5 Conceito de Fluência, Irradiância e Energia Depositada.**

Potência é expressa em unidades de watts (W) e energia é expressa em unidades de joules (J). A potência óptica de uma fonte de luz é a energia luminosa que a fonte emite por unidade de tempo (RIBEIRO, 2000). Energia é uma grandeza física que, no caso do LED ou do LASER, representa a quantidade de luz que está sendo emitida pela fonte, e é calculada pela multiplicação da potência óptica útil do aparelho em Watts pelo tempo de exposição. O resultado obtido é dado em Joule (J) (MION, 2009). Os sinônimos densidade de potência, intensidade e irradiância são expressos em unidades de  $W/cm^2$ , os sinônimos densidade de energia, fluência e exposição radiante, em unidades de  $J/cm^2$  (NIEMZ, 2004). Fluência, densidade de energia ou exposição radiante é a quantidade de energia por unidade de área transferida ao material em unidades de  $J/cm^2$ . Variações na irradiância e na quantidade de energia depositada podem produzir efeitos sobre o tecido biológico que são nitidamente diferenciados (figura 6).

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

Avaliar a eficácia do LED na redução do tempo de obtenção da confluência em cultivos *in vitro* de células-tronco mesenquimais de equinos.

#### Específicos

Determinar taxa de viabilidade de CTM cultivadas *in vitro* submetidas aos LEDs comparativamente à cultura padrão.

Comparar a eficácia dos dois LEDs, à  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$ , em comparação com à cultura padrão.

### 4. METODOLOGIA

A metodologia proposta para esse trabalho foi realizada de acordo com o fluxograma da figura 7.

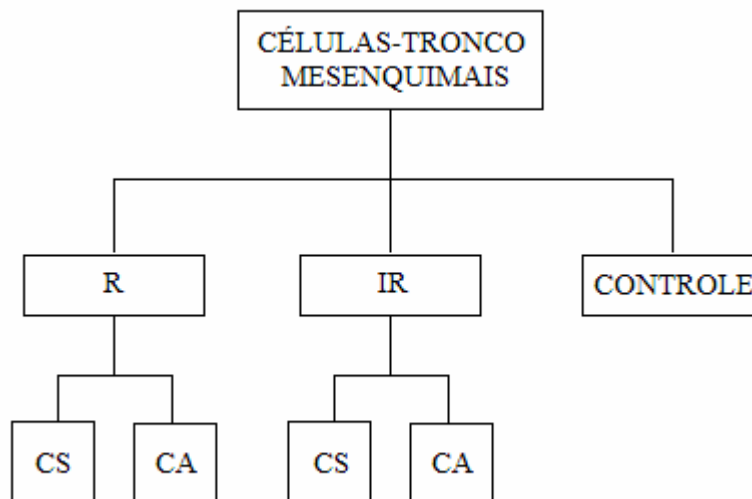


Figura 7 - Fluxograma do experimento.

O experimento consiste na análise do número e viabilidade de células-tronco mesenquimais em cultura, submetidas à irradiação LED nos comprimentos de onda  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  em comparação com o procedimento padrão.

A coleta e a cultura de células-tronco mesenquimais foram realizadas seguindo procedimento do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. As células-tronco mesenquimais foram obtidas de amostras de medula óssea retirada de eqüinos fornecidos pelo departamento. Depois de coletada, a amostra de medula é levada para cultivo primário em garrafas de cultivo, para separação das CMT do restante das células contidas na medula óssea. O material foi separado em quatro grupos; Grupo 1: Controle, Grupo 2: LED no comprimento de onda de  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  (Vermelho), Grupo 3: LED no comprimento de onda de  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  (Infravermelho).

Os grupos de células irradiadas foram divididos em dois subgrupos cada um: O grupo de células em suspensão (CS) continha células irradiadas logo depois de semeadas nos poços; e o grupo de células aderidas (CA) continha células que foram irradiadas depois de sua aderência no fundo da placa (aproximadamente 7 horas depois do subgrupo CS). As CMT foram segregadas em placas de cultivo de 24 poços para cada grupo. A contagem e o cálculo de viabilidade foi feita após cinco dias do início do cultivo e comparado com o grupo controle.

#### **4.1 Coleta e Preparo do Meio de Cultura**

O animal foi mantido em estação, contido em tronco e sedado com detomidina pelo veterinário responsável. Em seguida, foi realizada a tricotomia da área na região referente ao osso esterno do eqüino. Depois de localizada a 5<sup>a</sup> (Quinta) esternebra, foi realizado o bloqueio anestésico local com 10ml de cloridrato de lidocaína, seguido de anti-sepsia local. A aspiração do material da medula óssea (MO) foi feita com a utilização de uma agulha de punção de medula óssea modelo *Jamshidi 6*, de calibre 8 e 12 cm de comprimento. Uma vez bem fixa a agulha dentro do esterno, é retirado o mandril para realizar a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20ml contendo 1ml de heparina a 1000UI/ml, para que o sangue não coagulasse.

As células mesenquimais foram isoladas através da separação por gradiente de densidade com o reagente FICOLL e posteriormente a MO foi diluída em PBS e centrifugada. Depois de coletada, a amostra de medula foi levada para cultivo primário em garrafas para separação das CMT do resto das células contidas na MO. As células-tronco mesenquimais foram isoladas da população de células mononucleares com base

na sua aderência seletiva à superfície do plástico. Após a aderência das CTM no fundo da garrafa, foram semeadas  $1 \times 10^4$  células por poço utilizado em placas de cultivo de 24 poços da marca Corning®, que foram marcadas de forma específica, sem a informação aos técnicos da cultura celular, de qual placa está recebendo o tratamento com luz LED. As culturas foram mantidas em meio de cultivo composto de DMEN de baixa glicose, suplementado com 10% Soro Fetal bovino (SFB) – os dois fornecidos pela empresa Invitrogen® - Penicilina e Anfotericina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C sendo retiradas somente para irradiação. O mesmo procedimento foi aplicado ao grupo controle. Para garantir reprodutibilidade dos dados, este experimento foi realizado em triplicata para cada grupo.

#### 4.2 Irradiação das Culturas

Optou-se desenvolver dois jogos com quatro LEDs cada, da marca Cromateck® com 3W de potência elétrica, emissão de modo contínuo nos comprimentos de onda de  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$ , ambos com potência radiante média de 130mW e lentes lambertianas de ângulo de emissão de 130°. A fonte de alimentação foi desenvolvida junto ao Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociência de Botucatu que foi responsável também pela aferição dos LEDs, com o equipamento de aferição radiométrica International Light Technologies® modelo IL1400A. As placas de cultivo contendo as CTM foram irradiadas em compartimentos limpos e opticamente vedados, para não haver risco de contaminação e para que nenhum indivíduo fosse diretamente exposto à luz LED (figura 8). As células foram irradiadas diariamente com fluência de  $6,5 \text{ J/cm}^2$  durante três dias.

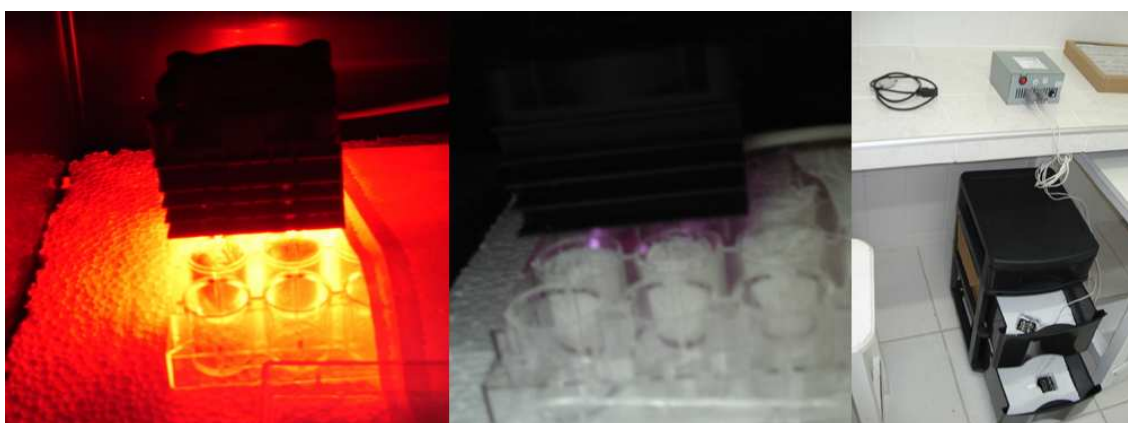


Figura 8 - Equipamento utilizado na irradiação das células tronco mesenquimais.

### 4.3 Contagem de Células

A contagem de células por unidade de volume ( $\text{mm}^3 = \mu\text{L}$ ) foi realizada através de uma contagem manual em câmara de Neubauer, técnica esta padronizada no laboratório de Reprodução Animal. Para tal procedimento agiu-se da seguinte forma:

As células-tronco mesenquimais em primeira passagem foram ressuspendidas, realizando o processo de tripsinização. Quando retirado todo meio de cultivo dos poços, estes foram lavados com solução de PBS, e adicionados de 2ml de Tripsina / EDTA a  $37^\circ\text{C}$ . As placas foram mantidas em estufa a  $37,5^\circ\text{C}$  por no máximo 10 minutos até que todas as células se soltassem do fundo. Amostras de  $50\ \mu\text{l}$  foram retiradas e adicionadas a  $50\ \mu\text{l}$  do corante Tripán Blue. Com a ajuda de uma micropipeta, a câmara de Neubauer foi preenchida com a solução e após esse procedimento as células foram contadas com o auxílio de um microscópio invertido (figura 9). Para calcular o número de células, usou-se a seguinte equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de Células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados contados}} \cdot 10^4 \times \text{FD} \quad (3)$$

Onde FD = Fator de Diluição utilizado com o corante (  $50\mu\text{L}$  de suspensão celular +  $50\mu\text{L}$  de corante).

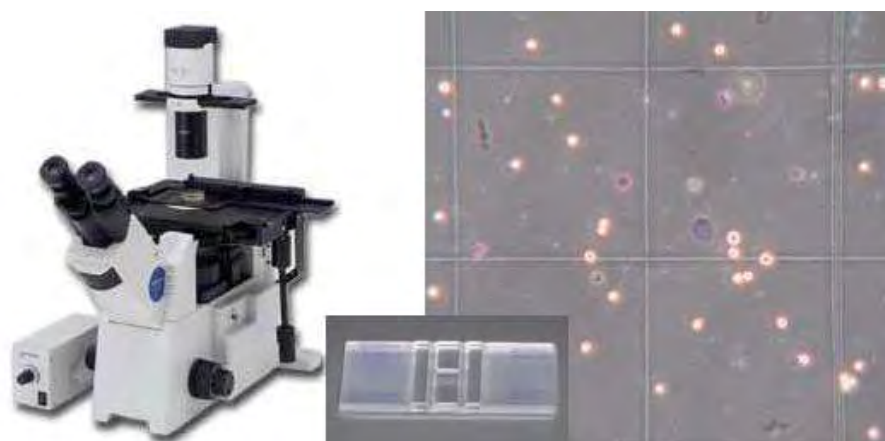


Figura 9 - Microscópio invertido confocal, câmara de Neubauer e imagem das células inseridas na câmara.

#### 4.4 Análise da Viabilidade Celular

Para análise da viabilidade celular, o meio de cultivo das placas foi removido, em seguida foi adicionado 0,5ml de PBS acrescida de 20µL de solução de Hoescht 33342 (10mg/ml), aguardando-se 30 minutos. Após este período foi adicionado 5µL de solução de iodeto de propídio (1,0mg/ml) e aguardado por 5 minutos antes de realizar a leitura. A leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490nm, com aumento de 200x). Células viáveis se apresentavam com o núcleo em uma coloração azul brilhante. Células com membrana lesada (necrose) se apresentavam com o núcleo em uma refringência vermelha, devido à penetração do iodeto de propídio (figura 10).

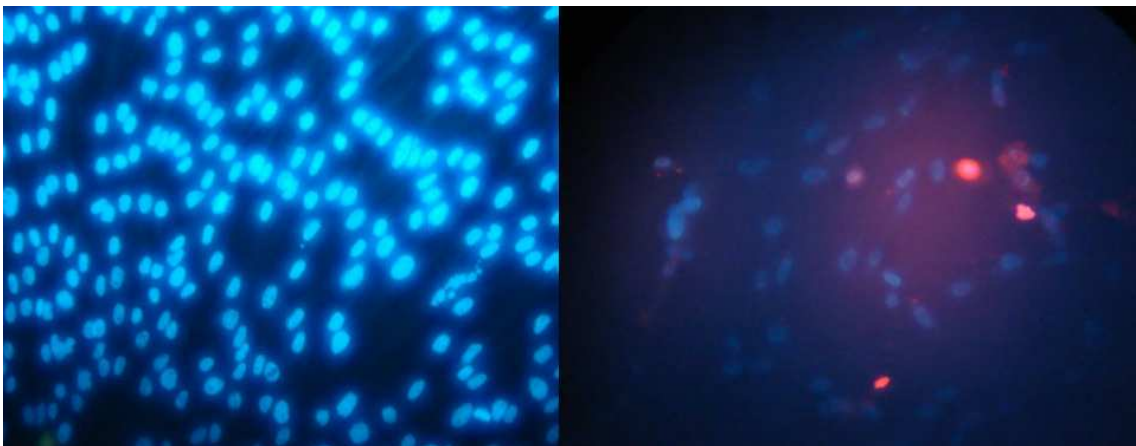


Figura 10 – Análise de viabilidade celular por fluorescência.

Para calcular o nº de células viáveis efetuou-se a contagem, das células vivas e células mortas (CM e CV). Depois da contagem foi feito o calculo de viabilidade de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{n}^\circ \text{ de células viáveis} + \text{n}^\circ \text{ de células mortas}} \quad (4)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através das contagens realizadas em câmara de Neubauer sofreram análise comparativa paramétrica e não paramétrica. A análise paramétrica foi feita a partir de análise de variância (ANOVA), e a análise não paramétrica foi feita a partir do teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Este teste compara

amostras independentes, do mesmo tamanho, sem levar em conta os tratamentos; e é indicado para comparação de grupos, principalmente quando há poucas repetições.

Os resultados obtidos nas contagens podem ser observados na tabela 1.

	Controle	630nm-CA	630nm-CS	850nm-CA	850nm-CS
1	120000	165000	160000	150000	150000
2	130000	140000	170000	140000	170000
3	140000	140000	150000	160000	140000
4	170000	160000	160000	140000	150000

Tabela 1. Número de células obtidas nas contagens de cada grupo.

Uma análise descritiva forneceu as seguintes médias e desvios.

	Controle	630nm - CA	630nm - CS	850nm - CA	850nm - CS
Média	140000	151250	160000	147500	152500
Desvio	21602	13150	8165	9574	12583

Tabela 2. Resultados da análise de variância; Média e Desvio padrão da Taxa de proliferação celular.

As diferenças entre os grupos são pequenas, de maneira que não chegam a ser significativas do ponto de vista estatístico. Aplicado o teste de comparação de Kruskal-Wallis observou-se que o valor “p”, maior que a probabilidade de erro que utilizamos (0.05), indica que não há diferença significativa entre os grupos quanto ao comprimento de onda utilizado ( $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ), nem tão pouco quanto ao momento de início da aplicação da radiação (CA ou CS). (Tabela 3).

Resultado (H)	Graus de Liberdade	Kruskal-Wallis (p)	Diferença Estatística
3,9689	4	0,4102	Não

Tabela 3. Resultados da análise estatística Kruskal-Wallis.

Devemos observar que o número de repetições (4) dentro dos grupos e a quantidade de dias de irradiação não são suficientes para determinar se há realmente

influência dos LEDs nos comprimentos de onda  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$ , no cultivo de células-tronco mesenquimais.

Temos também que de acordo com Karu, a magnitude do efeito da fotobiomodulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Foi observado que o estado geral redox da célula e seu pH no momento da irradiação podem levar a respostas mais fortes ou mais fracas das células irradiadas. Células com um pH mais baixo que o normal, onde o estado redox é alterado na direção reduzida, são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora de luz que aquelas com os respectivos parâmetros sendo ótimos ou próximos a ótimo. Esta circunstância explicaria as possíveis variações nas magnitudes observadas e porque o efeito não é sempre possível. (KARU, 2003).

Os resultados obtidos referentes às viabilidades dos grupos em estudo demonstraram que todos os grupos apresentaram viabilidade 100% com exceção do grupo 630nm - CA, como mostra a tabela 4.

	Controle	630nm - CA	630nm - CS	850nm - CA	850nm - CS
Média (%)	100,00	91.6	100,00	100,00	100,00
Desvio (%)	0,00	0.28	0,00	0,00	0,00

Tabela 4. Resultados da análise de médias e desvio padrão das viabilidades celulares dos grupos em estudo.

A morte por necrose observada no teste de fluorescência pode ser decorrente do stress sofrido pelas células na realização do experimento. A variação de temperatura causada pelo ato de retirar e devolver as culturas à estufa; a manipulação das culturas; e erros na execução do processo de ressuspensão, que envolve a tripsinização, podem ser responsáveis pelo stress que resultou na lesão da membrana celular de algumas CTM. Entretanto, aparentemente não houve ação deletéria da estimulação dos LEDs, principalmente quando o comprimento de onda de  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$  foi utilizado. Novamente, o fato da estimulação ter se iniciado com as células em suspensão ou aderidas não parece ter influenciado a taxa de viabilidade.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo estabeleceu a taxa de proliferação de células-tronco mesenquimais submetidas à influência da luz LED nos comprimentos de onda  $630\text{nm} \pm 10\text{nm}$  e  $850\text{nm} \pm 10\text{nm}$ , comparadas ao procedimento padrão após três dias de irradiação. O mesmo procedimento foi feito para a viabilidade celular.

Sobre os parâmetros estudados pode-se afirmar que houve um leve aumento na taxa de proliferação das células tronco mesenquimais irradiadas com LED, mas não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados, o que pode ser decorrente do baixo número de dias de irradiação das culturas. Quanto à viabilidade da cultura celular, conclui-se que a irradiação com LED não acarretou em efeito deletério para as CTMs, mas o stress causado às células no ato de retirá-las da estufa, irradiá-las e colocá-las de volta, pode ter gerado uma interferência subjetiva na técnica de contagem por fluorescência.

Para concluir realmente se houve ou não influência da luz na proliferação das CTM, seria necessário aumentar o número de amostras e também o tempo de análise celular, com contagens e avaliações de viabilidade celular em intervalos determinados de dias, para que se obtenha a curva de crescimento celular e taxa de variabilidade por tempo de cada grupo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BOYLESTAD, R. L.; NASHELSKY L. **Dispositivos eletrônicos e teoria de circuitos**. 8º edição; tradução Rafael Monteiro Simon São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004.

CHA, J.; FALANGA, V. **Stem Cells In Cutaneous Wound Healing**. Clin Dermatol. Jan-Feb; v. 25, n. 1, p. 73-78, 2007.

COLLS, J. **La terapia laser, hoy**. Barcelona: Centro Documentacion Laser, p. 39-70, 1986.

CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos**. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos. 2005.

ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; GALL, N.; WALSH, N. **Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons**. J Clin Laser Med Surg. p.47-52. 1990.

FRIEDENSTEIN A.J.; et al. **Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method**. Exp Hematol, vol.2, p.83-92. 1974.

GASIOROWICZ, S. **Quantum Physics**. Third Edition. Cap 1. p 1-7. 2003.

HOBBIE, R.K., ROTH, B.J. **Intermediate Physics for Medicine And Biology**. Fourth edition. 2006. Cap 14, p. 365.

JACQUES S. L. NATO Advanced Studies Institute, 1995.

KAMIKAWA, K.; OHNISHI, T. **Essential mechanisms of low-power laser effects, in: Laser applications in medicine and surgery**. G. Galetti, U. Bolognani, eds. Bologna: Monduzzi, p. 11–18. 1992.

KARU, T. **Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation**. Lasers Life Sciences, vol 2, p.53-74, 1988.

KARU, T. **Photobiology of low-power laser effects**. Health Physics vol. 56, n.5. p. 691-704, 1989.

KARU, T. **Primary and secondary mechanisms of action of visible to near I-R radiation on cells**. J. Photochem. B. Biol. vol 49, p.1-17, 1999.

KARU, T. **Low power laser therapy.** 2003. Disponível em: <<http://www.isan.troitsk.ru/dls/publ/300.pdf>>

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.

KURACHI, C. **Estudo Comparativo do Laser, do LED Azul e da Lâmpada Convencional no processo de polimerização da resina composta dental.** 2000. 216 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

LIEVENS, P. C. **The effect of a combined He:Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing.** Laser News. v.3, n.3, p.3-9. 1990.

LUBART, R.; FRIEDMANN H.; SINYKOV M.; GROSSMAN N. **Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy.** Laser Therapy, v.7, p.101-106. 1995.

MESTER, E.; ESPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. **Effect of laser rays on wound healing.** American Journal of Surgery, New York, v. 122, n. 4, p. 532-535, 1971.

MESTER, E.; SZENDE, B.; SPIRY, T.; SCHER, A. **Laser stimulation of wound healing by laser rays.** Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae, Budapest, v. 13, n. 3, p. 315-324, 1972.

MION, W. **Influência da luz led na cultura celular de Mieloma múltiplo murino – NS1 *in vitro*.** Monografia (Bacharelado em Física Médica). Instituto de Biociências de Botucatu / Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2009.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN E.M.B. **Células-tronco: o que são e o que serão?** Rev. Genética na Escola, p. 12-15, 2006.

MIRÓ, L.; COUPE, M.; CHARRAS, C.; JAMBON, C.; CHEVALIER, J.M. **Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación.** Inv Clin Laser, v.1. n.2, p.9-14. 1984.

NIEMZ, M.H. **Laser Tissue Interactions Fundamentals and Applications, Third Enlarged Edition.** Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Cap 2, p. 9-41, Cap 3, 52-75. 2004.

PATRIOTA, R. C. R. **Laser um aliado na dermatologia.** Rev Med (São Paulo). v.86(2). p.64-70. abr.-jun. 2007.

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.

**RIBEIRO, M. Interação da Radiação Laser Linearmente Polarizada de Baixa Intensidade com Tecidos Vivos: Efeitos na Aceleração de Cicatrização Tissular em Lesões de Pele.** Dissertação (Doutorado), Centro de Laser e Aplicações, IPEN, São Paulo, 2000.

**RIBEIRO, M. S. et al. Effects of Low-Intensity Polarized Visible Laser Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study.** Journal of clinical laser medicine & surgery. v.22, n.1, p.59-66. 2004

**ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns.** Lasers Surg Med, v.9, p.174-182. 1989.

**SMITH, K.C. The photobiological basis of low-level laser radiation therapy.** Laser Ther. v.3, p.19–24. 1991.

**STEINLECHNER, C.; DYSON M. The effect of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes.** Laser Therapy. 1993; 5 (2): 65.

**WODEWOTZKY, T. I. Células-tronco e terapia celular: Suporte didático para o ensino fundamental e médio.** Monografia (Licenciatura em Biologia). Instituto de Biociências de Botucatu / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2008.