

Woner Mion

Influência da luz LED na cultura celular de
Mieloma múltiplo murino – NS1 *in vitro*.

Botucatu
Estado de São Paulo – Brasil
2009

Woner Mion

Influência da luz LED na cultura celular de Mieloma múltiplo murino – NS1 *in vitro*.

Monografia apresentada ao Instituto
De Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu

Orientadores: FMB: Profa. Dra. Elenice Defunne
IBB: Prof. Dr. Joel Mesa Hormaza

Botucatu
Estado de São Paulo – Brasil
2009

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago – CRB 8/4716*

Mion, Woner.

Influência da luz LED na cultura celular de Mieloma múltiplo murino–NS1 *in vitro* / Woner Mion. – 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Física Médica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

1. Anticorpos monoclonais – Produção - Técnica.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; In vitro; LED; Mieloma murino NS1; Proliferação celular

Agradecimentos

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e pela possibilidade de finalizar mais uma etapa da minha vida, assim como faço justos agradecimentos aos Orixás, em especial a São Cosme, Damião e Doum.

Em especial agradeço minha mãe Maria Merse Dott Mion pelo grande esforço que fez para proporcionar-me a conclusão desse curso de Física-médica. Por isso dedico essa frase em homenagem ao seu esforço: *“Vim,vi,venci”*.

Agradeço ao meu amigo Carlos Alberto Pereira e sua mãe Adelina pelo incentivo árduo do meu ingresso em uma faculdade.

Meus sinceros agradecimentos:

Aos meus familiares, em especial a minha sobrinha-filha Erika Mion, pelo apoio e compreensão desses anos de luta.

A Profa. Dra. Elenice Deffune que acreditou na minha pessoa e proporcionou a realização deste trabalho, além de exercer com maestria a função de ensinar.

Ao Prof. Dr Joel Mesa Hormaza, juntamente com o Prof. Dr. Ney Lemke, que sempre estiveram dispostos a me auxiliar nas dificuldades.

Aos colegas da IV turma de Física-Médica, em especial a Angelo Biasi Govone, o qual participou conjuntamente nesta pesquisa e a Thiago Revers Dreyer que me aturou estes anos de convívio.

A Equipe do Laboratório de Engenharia Celular – Tata, Daniel, Renan, agradeço pela imensa colaboração de todos no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, não menos importante, agradeço ao meu pai que mesmo de longe sempre depositou sua confiança a mim. Por isso dedico essa frase a ele: *“Quem não compreende um olhar, tampouco compreenderá uma longa explicação.”*

Resumo

RESUMO

Introdução- A produção de anticorpos monoclonais (mAb) é uma importante ferramenta da biotecnologia médica e da produção de biofármacos, principalmente, para diagnósticos de doenças e tratamento de infecções, pois os anticorpos monoclonais têm significativa vantagem em relação a agentes químicos convencionais utilizados em terapias. Nos últimos trinta anos a tecnologia de obtenção de anticorpos monoclonais desenvolveu-se principalmente a técnica de obtenção *in vitro*, porém além da sua produção ser laboriosa, o custo é alto. Um dos elementos determinantes do elevado custo de produção é o fato de que a cultura a longo prazo consome grande quantidade de insumos importados de alto valor agregado. Uma das grandes contribuições do presente trabalho é a de promover crescimento celular mais rápido e eficiente. Atualmente há uma grande corrida para descobrir novas tecnologias e técnicas para sintetizarem novos anticorpos e aumentar significativamente a produção de mAbs murinos. Novas tecnologias como o LASER e o LED são inovações bem difundidas na vida moderna, a tal ponto que seu uso vem proliferando mundialmente, principalmente na área médica. Estudos recentes apresentam uma série de resultados da influência da luz LED em tecidos biológicos tais como; o aumento da taxa de proliferação de células, o aumento da taxa de produção de fibroblastos, aumento da taxa de síntese de RNA e DNA, síntese de ATP, etc. **Objetivo** - Avaliar a contribuição do LED na cultura de Mieloma NS1 murino em comparação ao procedimento padrão. **Material e Métodos** - As células de NS1 foram fornecidas e seguiram os critérios de meio de cultura do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu (POPs). A mesma quantidade de células foi semeada em frascos de 25 cm² de poliestireno *Tissue Culture Treated*, marcada de forma específica e mantida em meio especial RPMI 1640 Gibco BRL® suplementado com soro fetal bovino 10%, aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, insulina e antibióticos. Empregou-se LEDs Cromatek nos comprimentos de ondas de 630nm, 475nm e 530nm. Os grupos foram submetidos a uma dose de 21,6 J/cm² por um período de nove dias com três aplicações diárias. O material foi observado diariamente por microscopia invertida confocal e obtenção de imagens de monitoramento da evolução das células antes das contagens realizadas em câmaras de Neubauer. **Resultados e Discussões** - Para análise estatística, os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5%. Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa após o sétimo dia entre o grupo irradiado com LED azul, o qual apresentou um efeito de inibição na taxa de proliferação das células de Mieloma múltiplo murino-NS1 em relação ao grupo controle. Os grupos irradiados com LEDs vermelho e verde não apresentaram resultados significantes na taxa de proliferação das células de Mieloma Murino NS1. **Conclusão** – Concluem-se que o uso do LED azul é contra-indicado dentro da tecnologia de hibridomas, os LEDs de cor vermelha e verde não mostraram resultados estatisticamente significantes.

Palavra-Chave: LED, Anticorpos monoclonais, Mieloma murino NS1, *in Vitro*, Proliferação celular.

Abstract

ABSTRACT

Introduction- A monoclonal antibody (mAb) is an important tool in medical biotechnology and the production of biopharmaceuticals, especially for disease diagnosis and treatment of infections, because the antibodies have a significant advantage over chemical agents used in conventional therapies. The last thirty years the technology of production of monoclonal antibodies developed mainly the technique of obtaining in vitro, but also of their production is laborious, the cost is high. A major element of the high cost of production is the fact that the long-term culture consumes a large amount of imported inputs with high added value. A major contribution of this work is to promote cell growth more quickly and efficiently. Currently, a great race to discover new technologies and techniques to synthesize new antibodies and significantly increase the production of murine mAbs. New technologies such as laser and LED are innovations and widespread in modern life, so much so that its use has proliferated worldwide, primarily in the medical field. Recent studies show a series of results from the influence of the LED light in biological tissues such as: increasing the rate of cell proliferation, increased production rate of fibroblasts, increasing the rate of synthesis of RNA and DNA synthesis of ATP, etc. **Objective** - To assess the contribution of the LED in the culture of Myeloma NS1 murino compared to the standard procedure. **Material and Methods** - NS1 cells were provided and followed the criteria of culture medium of the Laboratory of Cellular Engineering Center of Botucatu (POPs). The same amount of cells was grown in bottles of 25 cm² polystyrene Tissue Culture Treated, specifically marked and kept in special medium RPMI 1640 Gibco BRL® supplemented with fetal bovine serum 10%, essential amino acids and non-essential, glucose, insulin and antibiotics. It was used in LEDs Cromatek wavelength of 630nm, 475nm and 530nm. The groups were subjected to a dose of 21.6 J/cm² for a period of nine days with three daily applications. The material was observed daily by inverted microscopy and confocal imaging to monitor the evolution of cell counts before performed in a Neubauer. **Results and Discussion** - For statistical analysis, the nonparametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis, the level of 5%. The results showed a statistically significant difference after the seventh day in the group irradiated with blue LED, which presented an inhibiting effect on the rate of cell proliferation of murine multiple myeloma-NS1 in the control group. The groups irradiated with red and green LEDs did not show significant results in the rate of cell proliferation of murine myeloma NS1. **Conclusion** - conclude that the use of blue LED is contraindicated in hybridoma technology, the LEDs red and green were not statistically significant.

Keyword: LED, Monoclonal antibodies, murine myeloma NS1, in vitro, Cell proliferation.

Sumário

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTAS DE FIGURAS	13
LISTAS DE GRÁFICOS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTAS DE ABREVIÇÕES	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Interações da Luz com Tecidos biológicos	23
1.2 Conceito de Irradiância, Fluência e Energia depositada	26
2. OBJETIVO	29
2.1 Geral	29
2.2 Específicos	29
3. METODOLOGIA	31
3.1 Preparo do meio de cultura para expansão do Mieloma NS1	31
3.2 Irradiação do Meio de Cultura	31
3.3 Contagem de Células	32
3.4 Contagem Celular e Cálculo do n° de Células Viáveis	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

Lista de Figuras

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1** Fluxograma das diferentes etapas de obtenção de Anticorpos Monoclonais murinos.
- Figura 2** Interação da luz com a matéria.
- Figura 3** Absorção espectral da melanina e hemoglobina (HbO₂) no sangue. Relativos picos de absorção da hemoglobina são: 280 nm, 420 nm, 540 nm e 580 nm. (Boulnois 1986).
- Figura 4** Interação Luz–Tecido. Os círculos apresentam uma estimativa grosseira dos parâmetros associados aos efeitos entre interação Luz-Tecido. (Modificado por Boulnois 1986).
- Figura 5** Representação do espectro de emissão de luz com seus respectivos comprimentos de onda.
- Figura 6** Equipamento utilizado na irradiação das células de Mieloma murino NS1.
- Figura 7** Imagem Microscópio e câmara de Neubauer utilizados para observação e contagem das células de Mieloma murino NS1.

Lista de Graficos

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no Comprimento de onda de 630 nm.
- Gráfico 2** Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no Comprimento de onda de 475 nm.
- Gráfico 3** Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no Comprimento de onda de 530 nm.
- Gráfico 4** Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 630 nm.
- Gráfico 5** Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 475 nm.
- Gráfico 6** Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 530 nm.

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Resultados da análise de variância; Médias e Desvio padrão da Taxa de proliferação Celular dos Grupos em estudo.
- Tabela 2** Resultados da análise estatística Kruskal-Wallis.
- Tabela 3** Resultados da análise de variância; Médias e Desvio padrão das Viabilidades dos Grupos em estudo.

Lista de Abreviações

LISTAS DE ABREVIACÕES

LED - Diodo Emissor de Luz

LASER - Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação

PDT - (Photo Dynamic Therapy) Terapia Fotodinâmica

NASA - National Aero Space Agency

mAb - Anticorpo Monoclonal

DNA - Ácido desoxirribonucléico

RNA - Ácido ribonucléico

ATP - Adenosina tri-fosfato

nm - Nanômetro (10^{-9} metros)

W - Watts

J- Joule

J/cm²- Joule por centímetro quadrado

W/cm² - Watts por centímetro quadrado

Nd:YAG - neodymium-doped yttrium aluminium garnet

σ - Desvio Padrão

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O emprego da luz como meio de cura de enfermidade vêm desde a antigüidade, os egípcios e gregos usaram a luz do sol para tratamentos de certas infecções dermatológicas, contudo os mecanismos de ação eram desconhecidos por eles.

No final do século XIX e início do século XX, o Eletromagnetismo desenvolvido por James Clerk Maxwell conjuntamente com a Teoria Quântica, aliaram-se à Óptica oferecendo embasamentos suficientes para exploração da luz em diversas áreas de pesquisa e do conhecimento.

Até o início da década de 80, desconheciam-se os mecanismos da radiação eletromagnética em nível molecular e celular (KARU et al., 1982). Trabalhos científicos realizados com LASER ao longo da década de 80 estabeleceram as bases para a compreensão dos mecanismos moleculares associados aos efeitos da luz sobre os tecidos biológicos (KARU et al., 1987).

Não obstante, a descoberta mostrou que a resposta celular à foto-estimulação não estava associada às propriedades inerentes da luz LASER; coerência apresenta relações de fase bem definidas no espaço e tempo, monocromaticidade, possuem fótons com mesmo comprimento de onda e unidirecionalidade, o feixe se propaga na mesma direção e sentido, além das limitações na capacidade da largura do feixe LASER para tratamentos e pesquisas, permitiram o surgimento o avanço tecnológico de novas fontes emissoras de luz, dentro as quais o LED surgiu como uma alternativa eficaz para substituir os LASERs.

Atualmente, assim como o LASER, o LED é uma tecnologia bem difundida na vida moderna, a tal ponto que seu uso vem proliferando mundialmente, principalmente na área médica, em pesquisas e áreas industriais. O LED é um dispositivo semicondutor que necessita de uma tensão para vencer a barreira interna de energia. Um condutor do tipo n, com excesso de elétrons, e um do tipo p, com “buracos receptores” recebem uma tensão com passagem de elétrons da camada n para a camada p, como resultado tem-se emissão de luz com uma banda espectral estreita, policromática e incoerente (FRANCO et al., 2003). A luz emitida por um LED é um tipo de luz divergente e não coerente, porém apesar não de ser monocromático, o seu espectro de emissão é bem mais estreito que o da luz comum (KURACHI, 2000).

Os efeitos da terapia com LED já são conhecidos e apresentam uma série de resultados tais como; aumento da taxa de proliferação de células, o aumento da taxa de produção de fibroblastos e da síntese de colágenos, aumento da taxa de síntese de RNA e DNA (KARU et al., 1987). Também observou o aumento de síntese de ATP, aumento da vascularização e variações na condução nervosa (LIEVENS et al., 1986). A Ledterapia vem sendo utilizada em diferentes disciplinas médicas para promover a regeneração epitelial, bem como empregada experimentalmente em células tronco mesenquimais e condrócitos *in vitro*. Novos estudos desenvolvidos pela NASA demonstraram fortes evidências de que a eficiência do LED em processos de proliferação e crescimento celular *in vitro*, é semelhante à do LASER de baixa potência.

Apesar dos vários trabalhos realizados confirmando a atuação do LED como bioestimulador, ainda não há relatos sobre a sua aplicabilidade na produção de anticorpos monoclonais, através do aumento da taxa de proliferação de mieloma múltiplo murino.

Anticorpos são proteínas usadas pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar corpos estranhos como bactérias, vírus ou células tumorais. Um anticorpo reconhece um alvo específico, o antígeno, presente nas células estranhas ao organismo. Cada anticorpo dispõe de dois sítios, chamado de parátomos, que se liga a uma parte específica do antígeno, o epítipo. A especificidade que determina a afinidade entre anticorpos e antígenos é semelhante à existente na relação entre fechaduras e chaves. Essa interação sinaliza uma ação para que outros componentes do sistema imunológico destruam, por exemplo, microorganismos ou células tumorais. Anticorpos pertencem a uma classe de proteínas, conhecidas como imunoglobulinas, que são produzidas e secretadas por linfócitos B em resposta a estimulação por antígenos.

Os anticorpos monoclonais são proteínas produzidas artificialmente contra um antígeno conhecido. Eles são extremamente específicos ligando-se aos antígenos alvo. Em laboratório, os anticorpos monoclonais são produzidos pela parceria construída *in vitro* entre uma célula normal, o linfócito B de camundongos de linhagem isogênica BALB/c, previamente imunizados contra o antígeno de interesse e uma linhagem de células de mieloma múltiplo murino NS1 imortal e não secretora de imunoglobulina.

A produção de anticorpos monoclonais é uma importante ferramenta da biotecnologia médica e da produção de biofármacos, principalmente, para diagnósticos como câncer no tratamento de infecções. Os anticorpos monoclonais têm significativa vantagem em relação a agentes químicos convencionais utilizados em terapias, pois possuem maior eficiência em relação a farmacocinética, apresentam menos efeitos colaterais e são capazes de recrutar efetores imunes ao iniciar a destruição da célula alvo (SOUZA, 2007).

A tecnologia de geração de hibridoma para produção de anticorpos monoclonais foi descrita pela primeira vez por Kohler e Milstein (1975). Nos últimos trinta anos a tecnologia de anticorpos monoclonais desenvolveu-se enormemente, principalmente a técnica de obtenção *in vitro*, um método alternativo amplamente adotado para produção de anticorpos monoclonais, porém sua produção possui elevado custo a requer longo tempo de manipulação. Nos protocolos clássicos, desde a escolha do antígeno, processo de imunização seguido da fusão celular, *screening* e confirmação da especificidade além da clonagem e comprovação da clonalidade, o espaço de tempo pode atingir 2 anos de trabalho árduo (figura 1). Além de muitas vezes não conseguir produzir a quantidade necessária de anticorpos (proteínas), mesmo com domínio tecnológico.

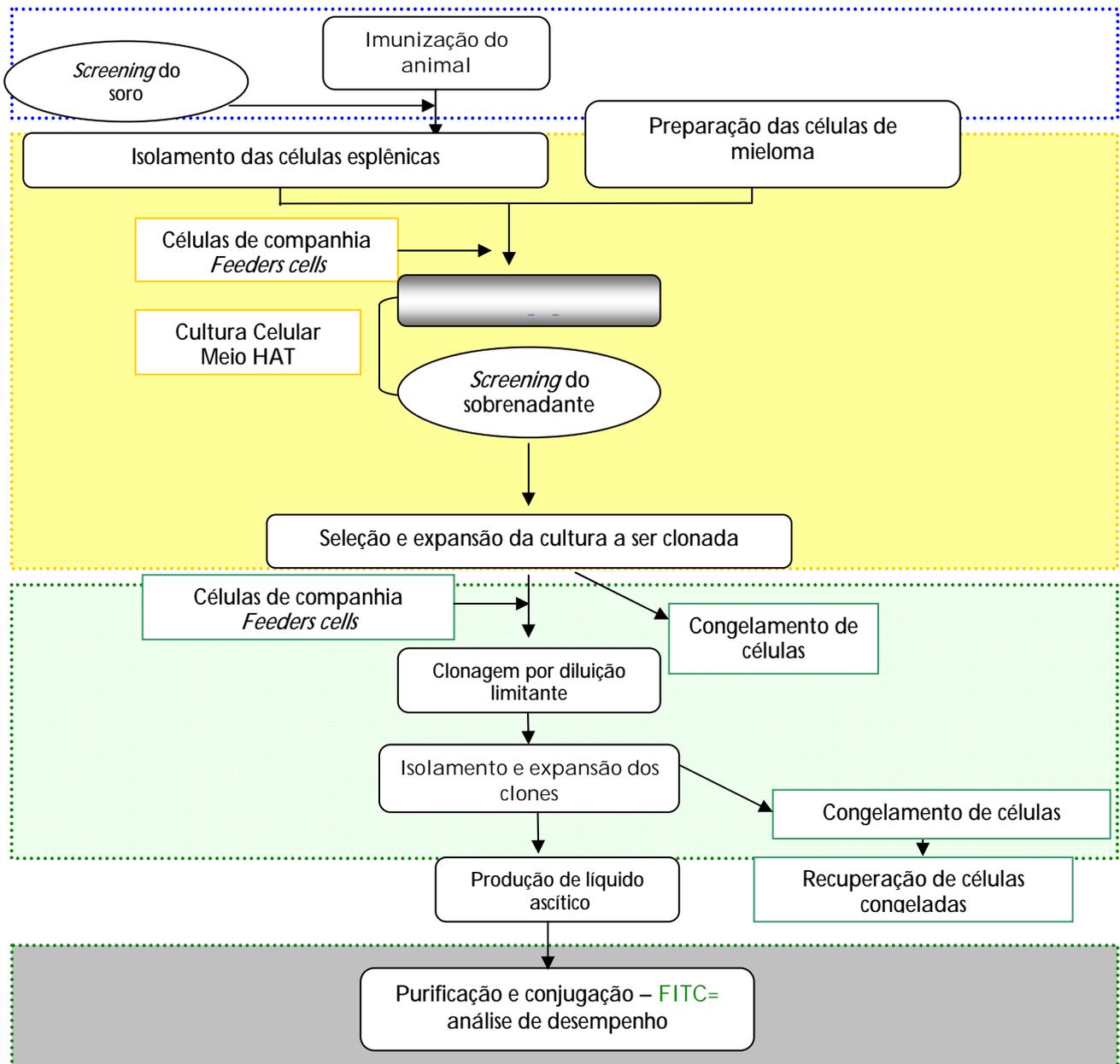


Fig.1. Fluxograma das diferentes etapas de obtenção de Anticorpos Monoclonais murinos.

Atualmente a uma grande corrida para descobrir novas tecnologias e técnicas, principalmente através da biotecnologia como as tecnologias de DNA-recombinante, Phage Display, quimerização e humanização utilizando camundongos transgênicos possibilitando anticorpos mais eficazes e seguros, para sintetizarem novos anticorpos e aumentar significativamente a produção de mAbs murinos.

1.1 Interações da Luz com Tecidos Biológicos

Os processos ópticos básicos da interação da luz incidente sobre a matéria obedecem aos princípios de reflexão e refração, as quais são correlacionadas, absorção e espalhamento (Figura 2). Contudo os processos que regem as interações da luz visível de baixa intensidade com os tecidos biológico são a absorção e o espalhamento, pois a reflexão e refração são consideradas secundárias e de menor importância (NIEMZS, 2004).

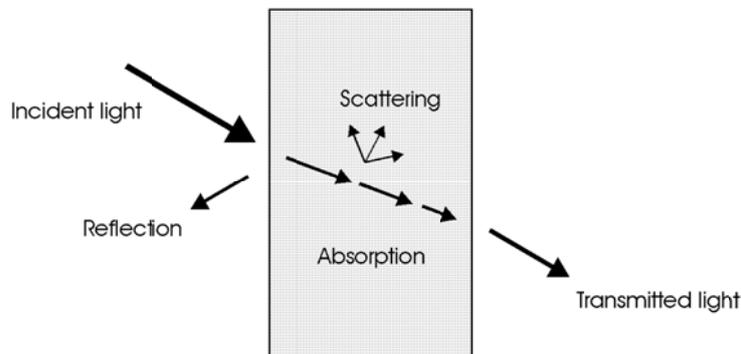


Fig.2. Interação da luz com a matéria.

O processo de absorção da intensidade de uma onda eletromagnética incidente é atenuado fornecendo energia para o material. A capacidade de um meio de absorver radiação eletromagnética depende de fatores, principalmente da camada eletrônica de seus átomos e constituição de suas moléculas, o comprimento de onda da radiação, a espessura da camada absorvente interna e parâmetros como a temperatura ou concentração de agentes de absorção, forma de emissão das ondas eletromagnéticas (contínua, pulsada), tempo de exposição, etc.

A absorção pode ser descrita através da Lei de Beer- Lambert ou Lei de Beer-Lambert-Bouguer;

$$z = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{I_0}{I(z)}$$

Onde z é a distância no meio, I_0 intensidade incidente, $I(z)$ intensidade transmitida e α é coeficiente de absorção do meio.

Em tecidos biológicos, a absorção é causada principalmente por moléculas de água, principal constituinte dos tecidos biológicos, ou macromoléculas, proteínas, exemplo hemoglobina, e pigmentos, exemplo da mielina (figura 3) (NIEMZS, 2004).

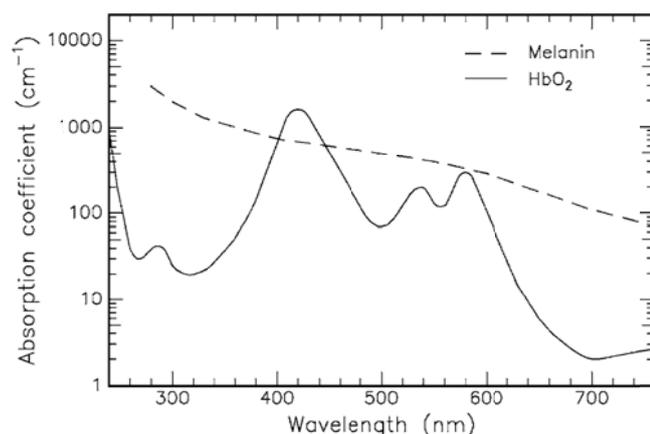


Fig.3. Absorção espectral da melanina e hemoglobina (HbO_2) no sangue. Relativos picos de absorção da hemoglobina são: 280 nm, 420 nm, 540 nm e 580 nm. (Boulnois 1986).

O processo de dispersão ou espalhamento pode ter caráter inelástico ou elástico, isso dependerá da parte da energia que o fóton incidente perde durante o processo. O espalhamento ou dispersão é a alteração da direção do fóton de luz incidente ao interagir com o tecido. Esse processo possui variação com o inverso do quadrado do comprimento de onda, logo em tecidos biológicos onde o comprimento de onda do fóton incidente é mais curto teremos maior intensidade de dispersão molecular.

Estes processos de interação da energia do fóton de luz incidente com o tecido biológico podem resultar em efeitos; fotoquímico, fototérmico, fotomecânico e fotoelétrico dependendo das características específicas do tecido, comprimento de onda da luz, potência aplicada e tempo de exposição.

Antes de entrar em detalhes sobre os efeitos, um resultado interessante deve ser mencionado. Todos estes tipos de efeitos, aparentemente, partem de um dado em comum; a característica dos intervalos de densidade de energia ou fluência de energia, as definições serão explicadas em um tópico posterior, termo utilizado para descrever a taxa de energia, (Figura 4), que esta senso aplicada no tecido biológico, é de aproximadamente 1 J/cm^2 a 1000 J/cm^2 (NIEMZS, 2004).

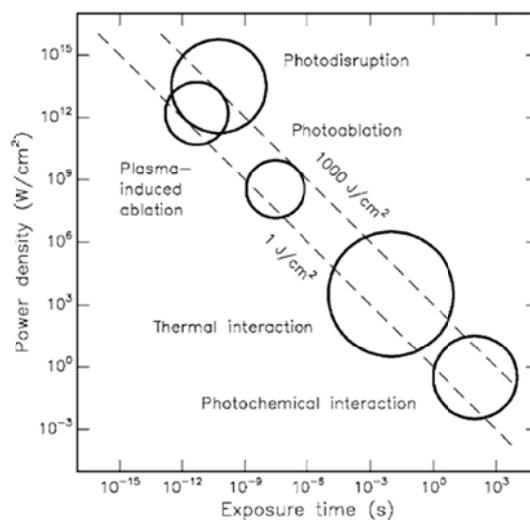


Fig.4. Interação Luz–Tecido. Os círculos apresentam uma estimativa grosseira dos parâmetros associados aos efeitos entre interação Luz–Tecido. Modificado por Boulnois 1986.

O efeito fotoquímico deve-se à absorção de fótons da luz por biomoléculas intracelulares específicas, as quais podem promover inibição ou estimulação de atividades enzimáticas específicas e de reações óxido-redução (redox) do metabolismo celular. Essas ações determinarão mudanças fotodinâmicas em cadeias complexas e moléculas básicas de processos fisiológicos celulares (PINHEIROS et al., 2002). As interações fotoquímicas ocorrem em densidades de energia muito baixas e a longos tempos de exposição (ROUNDS et al., 1984).

O exemplo mais flagrante, na área médica, do efeito fotoquímico é a oxidação de fotossensibilizadores, o qual desempenha um papel significativo durante terapia fotodinâmica (PDT).

O efeito fotoelétrico ou efeito fotofísico são processos que provocam modificações nos potenciais de membrana, incrementando a síntese de ATP (PINHEIROS et al., 2002). A transmissão do estímulo doloroso realiza-se mediante modificações no estado eletrofisiológico da membrana das

fibras nervosas. Para que a transmissão do impulso exista, é necessário um incremento na permeabilidade da membrana aos íons de sódio, os quais provocam uma variação do potencial de até 30 mV. A bomba de sódio e potássio põe-se em marcha, expelindo os íons extras com consumo de ATP (BIHARI, 1989). Nos estados patológicos, o LASER intervém no processo de intercâmbio iônico e acelera o processo de incremento de ATP (IGNATIEVA, 2007).

Os efeitos térmicos ao contrario do processo fotoquímico, o qual é regido por uma via de reação específica, em geral, tendem a não apresentar uma via específica para reações (NIEMZ, 2004). Dependendo da duração da transmissão de energia, densidade de energia e propriedades ópticas do tecido a transição dos efeitos térmicos terá efeitos diferentes sobre o tecido como; Hipertermia (42°C e 50°C), a qual promove mudanças conformacionais de moléculas, principalmente da membrana celular, que pode aumentar processos de fluxo de nutrientes e reações químicas das células, podendo promover a bioestimulação ou destruição das mesmas; desnaturação ou coagulação (Acima de 60°C) pode promover desnaturação das moléculas inativando-as; vaporização (100°C); carbonização (Acima de 100°C).

O mecanismo de interação fotomecânica promove efeitos que podem ser confundido com efeito fototérmico, pois ocorrem surgimentos de fenômenos de formação de plasma, de vaporização explosiva ou de cavitação. A todos estes fenômenos está associada a produção de uma onda de choque no interior do tecido. É a propagação desta onda de choque que provoca danos nos tecidos [8].

Feixes de luz com irradiâncias entre 10¹⁰ e 10¹² W/cm² (por exemplo, com lasers pulsados Nd:YAG) provocam a ionização dos átomos dos tecidos biológicos e conduzem à formação de um plasma. Na fronteira da região ionizada existe um gradiente de pressão muito elevado que origina a propagação de uma onda de choque (MORGADO, 2008).

Quando o tempo de exposição à luz é inferior ao tempo característico da difusão térmica no interior do tecido surge um efeito de confinamento térmico. Este mecanismo de confinamento térmico implica em acúmulo de calor sem difusão e resulta na vaporização explosiva do tecido com conseqüente formação de uma onda de choque. Se adicionarmos um mecanismo de confinamento mecânico ao confinamento térmico, deixa de ocorrer a vaporização explosiva. Ocorre sim um fenômeno de cavitação: formação de uma bolha de gás no interior do tecido. Esta bolha explode quando a irradiação for interrompida dando assim origem a uma onda de choque (MORGADO, 2008).

1.2 Conceito de Irradiância, Fluência e Energia depositada

Irradiância é o termo que os fotologistas usam como sinônimo para densidade de potencia (DP), que é definida como sendo a potencia óptica útil do LASER ou LED, expressa em Watt, dividida pela área irradiada, expressa em centímetros quadrados (cm²).

Fluência é o termo utilizado para descrever a taxa de energia que está sendo aplicada no tecido biológico. Ao multiplicarmos a irradiância pelo tempo de exposição, expresso em segundos

(s), obteremos a fluência ou densidade de energia ou ainda dose de energia expressa em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2).

Energia é uma grandeza física que, no caso de Laserterapia e Ledterapia, representa a quantidade de luz que está sendo depositado no tecido, e é definida pela multiplicação da potência óptica útil do aparelho em Watts pelo tempo de exposição. O resultado obtido tem como representação a unidade Joule (J).

Para uma dada potência, as variações na irradiância podem produzir efeitos sobre o tecido biológico que são nitidamente diferenciados, (figura 4). As quantidades de energia depositada, variações na dose, podem promover efeitos sobre os tecidos biológicos, os quais já foram discutidos anteriormente.

Objetivo

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a contribuição da luz LED na cultura de Mieloma NS1 *in vitro* para produção de anticorpos monoclonais em comparação ao procedimento padrão.

2.2 Específicos

Determinar a curva de crescimento de NS1 *in vitro* submetidos à luz LED comparativamente à cultura padrão.

Determinar taxa de viabilidade de Mieloma NS1 cultivados *in vitro* submetidos à luz LED comparativamente à cultura padrão.

Metodologia

3. METODOLOGIA

As células utilizadas como parceiras de fusão serão de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidos por Köhler e Milstein (1976), provenientes do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sangüine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido.

As células foram descongeladas segundo Deffune, 1992. Logo após foram colocadas em cultura em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) até apresentarem viabilidade celular igual ou superior a 90%.

A mesma foi semeada na quantidade de $1 \cdot 10^4$ em cada frasco de cultura *Tissue Culture Treated* da marca Greiner bio-one. As culturas foram mantidas em meio especial RPMI 1640, marca Gibco BRL® suplementado com soro fetal bovino 10%, aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, insulina e antibióticos, estas foram mantidas em estufa a 37°C sendo retirado somente para irradiação, o mesmo procedimento foi aplicado ao grupo controle.

O material foi cultivado por nove dias consecutivo separados em quatro grupos; Grupo 1: Controle, Grupo 2: LED no comprimento de onda de 630nm (Vermelho), Grupo 3: LED no comprimento de onda de 475nm (Azul), Grupo 4: LED no comprimento de onda de 530 nm (Verde), observado diariamente por microscopia invertida confocal e obtenção de imagens de monitoramento da evolução das células antes das contagens realizadas em câmaras de Neubauer. As placas sofreram marcações específicas, sem a informação aos técnicos da cultura celular, de quais placas estavam recebendo o tratamento com a luz. Para garantir reprodutibilidade dos dados, este experimento foi realizado em três etapas distintas e cada etapa foi realizada duplicata para cada grupo.

3.1 Preparo do meio de cultura para expansão do Mieloma NS1

Para cada frasco de RPMI 1640 de 500mL foram adicionados 10% de soro fetal bovino *Certified, Qualified, Endotoxin and virus Free* e a suplementação. O completo preparo do meio de cultura segue as regras estabelecidas e controladas pelo Escritório da Qualidade seguindo os POPs do laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

3.2 Irradiação do Meio de Cultura

Optou-se utilizar um jogo com três LEDs da marca Cromatek em modo contínuo com comprimentos de ondas dominantes; 630nm (Vermelho), 475nm (Azul) e 530nm (Verde), todos com potência de 3 W ($\pm 0,05$ W), (figura 6). A fonte utilizada na alimentação dos LEDs foi desenvolvida junto ao Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociência da UNESP.

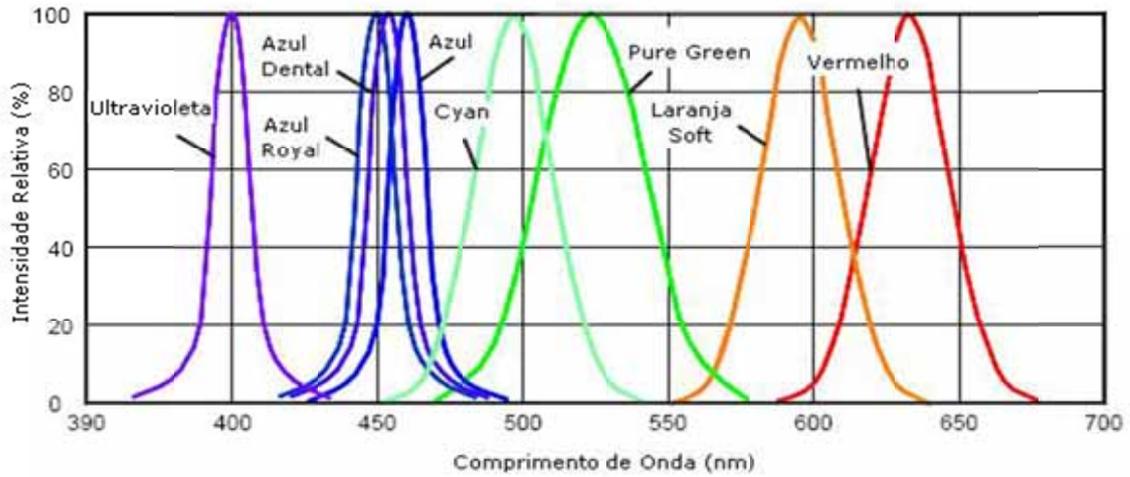


Fig.5. Representação do espectro de emissão de luz com seus respectivos comprimentos de onda.

As placas de cultura em estudo foram irradiadas por um período de nove dias seguidos com três aplicações diárias com um minuto de irradiação para trinta segundos de relaxamento, em três etapas separadas. Através de cálculos teóricos determinou-se que as amostras foram irradiadas com uma densidade óptica de $21,6 \text{ J/cm}^2$ para cada grupo irradiado. Vale ressaltar que os equipamentos desenvolvidos utilizado neste trabalho não sofreram aferição dosimétrica.

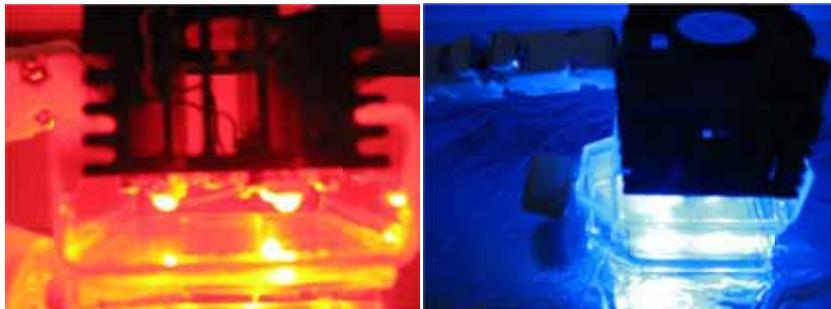


Fig.6. Equipamento utilizado na irradiação das células de Mieloma murino NS1.

3.3 Contagem de Células

A contagem de células por unidade de volume ($\text{mm}^3 = \mu\text{L}$) não pode ser efetuada por contadores automáticos, que são preparados para a leitura de células sanguíneas, mas deve ser obrigatoriamente realizada através de uma contagem manual em câmara de Neubauer, técnica esta padronizada no laboratório de Engenharia Celular. Para tal procedimento:

1. Fazer uma diluição precisa da suspensão celular com a Solução de Azul de Trípano (bleu trypan).
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 à $0,01 \text{ mm}^3$.

3. Colocar a lamínula limpa com álcool sobre a câmara;
4. Verificar a presença do anel de Newton para ter exatamente 0,2mm de profundidade entre a lamínula e a superfície da câmara. Preenchimentos incompletos não podem ser levados em consideração por determinarem falsa contagem. Caso o menisco ou anel de Newton não seja observado corretamente, não efetuar a contagem.

5. Com a ajuda de uma micropipeta P-100(ponteira amarela), introduza a suspensão celular dentro da câmara, enchendo a mesma para a contagem. Evite excesso de líquido:

6. Deixar sedimentar em média 60 segundos;

7. Contar várias linhas (conte no mínimo 100 células);

8. Calcular o número de células:

$$\mathbf{N^{\circ} \text{ de Células/mL} = N^{\circ} \text{ Médio de Células/Linhax} \times 10^4 \times \mathbf{FD}}$$

FD =Fator de Diluição utilizado com o corante (10µL de suspensão celular + 20µL de corante)

3.4 Contagem Celular e Cálculo do n° de Células Viáveis

1. Efetue a contagem celular em câmara de Neubauer

2. Anote separadamente as células mortas das vivas (CM e CV)

Calcule o n° de células viáveis /mL

Calcule o n° de células mortas /mL

$$\% \text{ de Viabilidade} = \frac{N^{\circ} \text{ de células viáveis} * 100}{N^{\circ} \text{ de células viáveis} + \text{células mortas}}$$

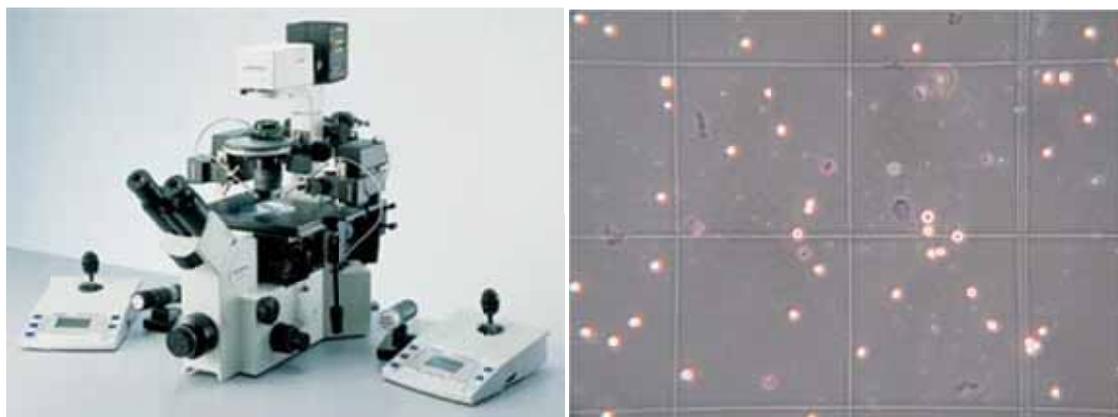


Fig.7. Imagem Microscópio e câmara de Neubauer utilizados para observação e contagem das células de Mieloma murino NS1.

Resultados e Discussões

4. Resultados e Discussões

Os dados obtidos através das contagens realizadas em câmaras de Neubauer sofreram análise estatística, os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância e os não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% ($p \leq 0,05$), (Tabelas 1 e 2).

<i>Contagem</i>	<i>Média Controle</i>	<i>σ Controle</i>	<i>Média λ 630 nm</i>	<i>σ λ 630 nm</i>	<i>Média λ 475 nm</i>	<i>σ λ 475 nm</i>	<i>Média λ 530 nm</i>	<i>σ λ 530 nm</i>
1	1,0	0	1,0	0	1,0	0	1,0	0
2	4,0	0,9	1,7	1,0	1,7	1,0	1,7	1,0
3	22,3	18,3	52,8	66,7	19,0	16,4	41,3	41,9
4	225,7	273,9	128,5	98,1	151,3	170,8	164,2	189,6
5	361,5	362,3	253,7	120,5	336,5	297,4	295,5	196,5
6	699,0	364,5	581,0	412,5	188,5	106,6	612,7	361,1
7	860,0	416,8	1050,5	518,9	189,8	130,2	852,5	392,6
8	1773,7	839,9	1361,0	430,5	237,3	235,4	1244,7	565,1
9	2146,3	911,0	1817,8	941,6	304,3	346,7	1874,2	828,9

Tabela 1. Resultados da análise de variância; Médias e Desvio padrão da Taxa de proliferação celular dos grupos em estudo.

Mesmo os valores referentes às contagens da etapa 1 apresentarem uma pequena discrepância em relação as demais etapas, o qual pode ser resultado de uma hipercontagem, não resultou diferenças significativa na média final, apresentando coerência na análise estatística.

<i>Dia</i>	<i>Resultados (H)</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>(p) Kruskal-Wallis</i>	<i>Diferença Estatística</i>
3	2,3433	3	0,5043	Não
4	0,3808	3	0,9442	Não
5	0,7372	3	0,8644	Não
6	6,1133	3	0,1062	Não
7	14,0867	3	0,0028	Sim
8	13,7067	3	0,0033	Sim
9	13,1874	3	0,0042	Sim

Tabela 2. Resultados da análise estatística Kruskal-Wallis.

Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa após o sétimo dia entre os grupos irradiados e grupo controle. Defronte aos resultados apresentados realizou-se um segundo teste, teste Mann-Whitney (2 a 2), para saber qual ou quais grupos irradiados apresentavam diferença significativas em relação ao controle.

Observou-se que os grupos 2 e 4, referentes ao comprimento de onda 630 nm e 530 nm, não apresentaram diferença estatística significativa na taxa de proliferação celular, enquanto o grupo 3, referente ao comprimento de onda 475 nm, foi o único a apresentar diferença estatística significativa na taxa de proliferação celular quando confrontado com o grupo controle.

Curvas de Crescimento do Mieloma murino NS1

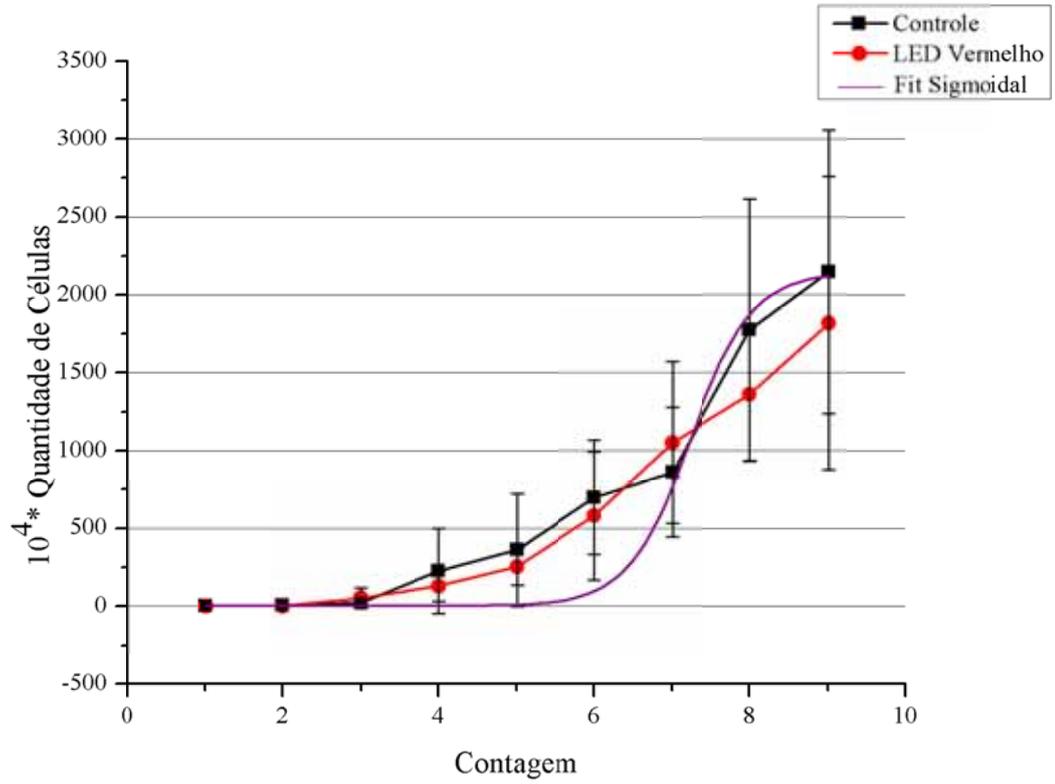


Gráfico 1. Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no comprimento de onda de 630nm.

Curvas de Crescimento do Mieloma murino NS1

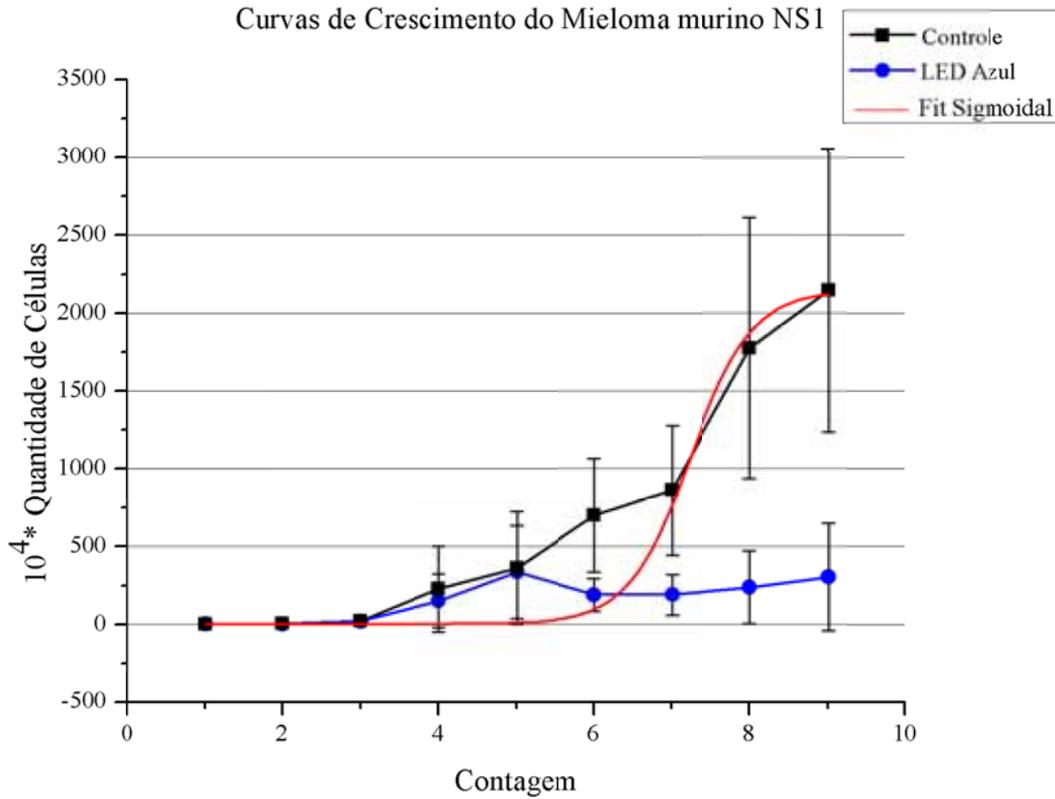


Gráfico 2. Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no comprimento de onda de 475nm.

Curvas de Crescimento do Mieloma murino NS1

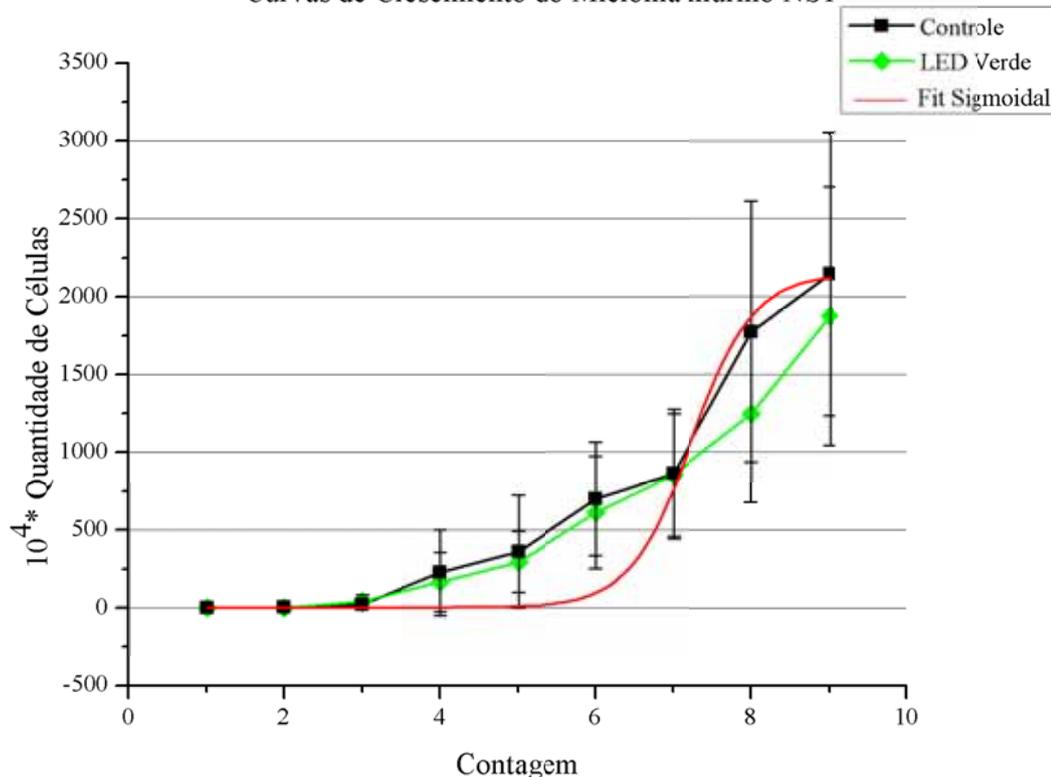


Gráfico 3. Comparação entre as Curvas de Crescimento Controle e LED no comprimento de onda de 530 nm.

Analisando os resultados estatísticos observou-se que o uso do LED no comprimento de onda 435 nm, ou cor azul, está totalmente contra-indicado dentro da tecnologia de hibridomas, pois apresentou um efeito inibitório na proliferação celular do Mieloma múltiplo murino-NS1. Este efeito pode ser resultante do comprimento de onda ser muito próximo ao comprimento de onda do UV, o que poderiam acarretar danos irreparáveis ao DNA das células, os quais poderia ser confirmado com um teste Cometa cujo não foi realizado neste trabalho. Outra hipótese seria que o comprimento de onda 475 nm inibe sinais, através do efeito fotoquímico, para produção de proteínas específicas que promovem a ativação da única via de salvamento conhecida para as células de Mieloma múltiplo murino – NS1, induzindo a células a apoptose ou necrose. Estudos posteriores devem basear a análise de viabilidade em técnicas precisas utilizando citometria de fluxo e análise dos índices de apoptose e necrose celular.

Como haveria de se esperar, o valor do contingente celular do grupo irradiado com LED nos comprimentos de onda de 630 nm e 530nm foi sensivelmente parecido com o grupo controle. Há que se destacar que as células mielomatosas possuem um gene hipermetilado com processo de divisão celular muito acelerado, identificado pelas curvas de crescimento celular da presente monografia. O maior ganho, portanto da utilização de LED deve ficar no domínio do estímulo à síntese protéica dos hibridomas. Submetendo os clones produzidos à luminosidade ao comprimento de onda 630 nm e 530 poder-se-á conseguir uma maior produção de imunoglobulinas através da atuação no processo de síntese celular. Estes experimentos não foram possíveis de serem realizados

no tempo de conclusão do curso e deverão ser estabelecidos em um novo protocolo quantificando a produção de imunoglobulinas pela expansão clássica *versus* aquela implementada com a irradiação.

<i>Contagem</i>	<i>Média Controle</i>	σ <i>Controle</i>	<i>Média λ 630 nm</i>	σ <i>λ 630 nm</i>	<i>Média λ 475 nm</i>	σ <i>λ 475 nm</i>	<i>Média λ 530 nm</i>	σ <i>λ 530 nm</i>
1	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
2	98,88	1,74	100,00	0,00	97,07	2,67	99,78	0,53
3	94,78	5,73	95,77	6,58	91,70	6,50	95,62	5,08
4	97,20	3,91	96,72	3,59	91,39	4,38	94,91	4,14
5	97,30	3,59	98,10	1,97	86,76	8,81	92,38	6,34
6	94,32	7,22	94,44	5,06	80,15	5,71	91,74	5,62
7	91,07	4,35	87,95	4,94	55,88	34,10	88,75	3,98
8	87,89	4,30	83,66	4,49	53,83	38,50	82,81	6,51
9	82,88	5,55	84,89	3,42	52,49	33,77	84,55	2,98

Tabela 3. Resultados da análise de variância; Médias e desvio padrão das viabilidades dos Grupos em estudo.

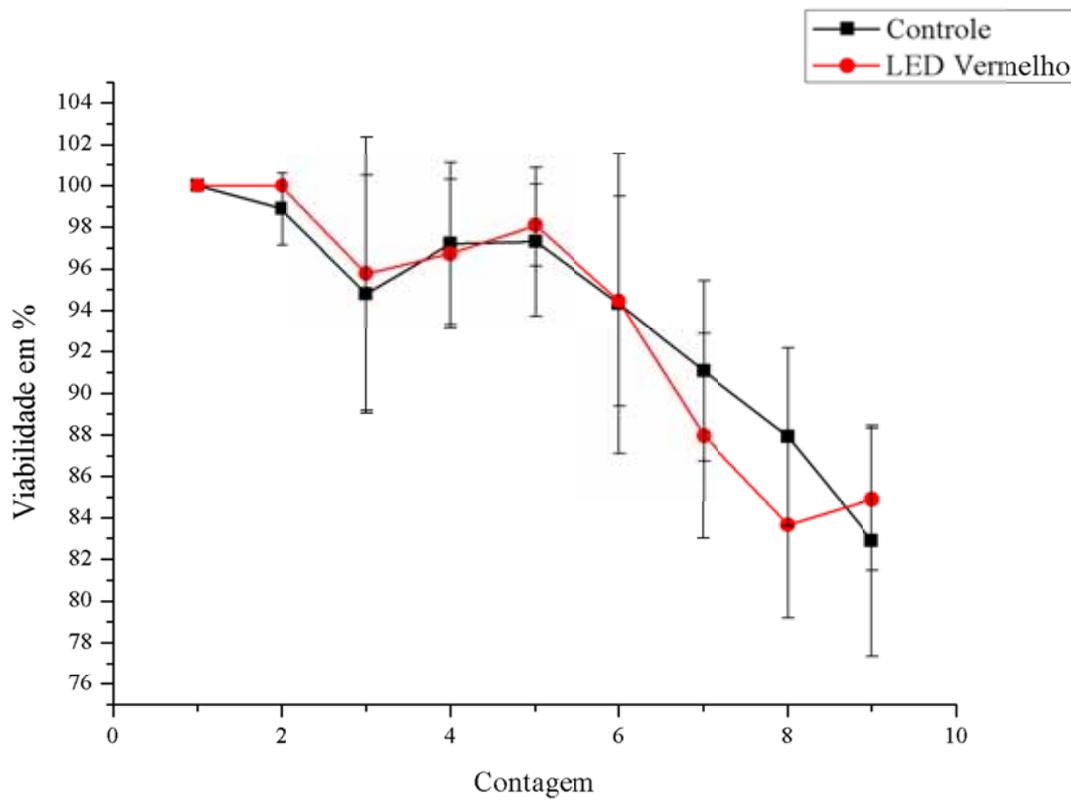


Gráfico 4. Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 630 nm.

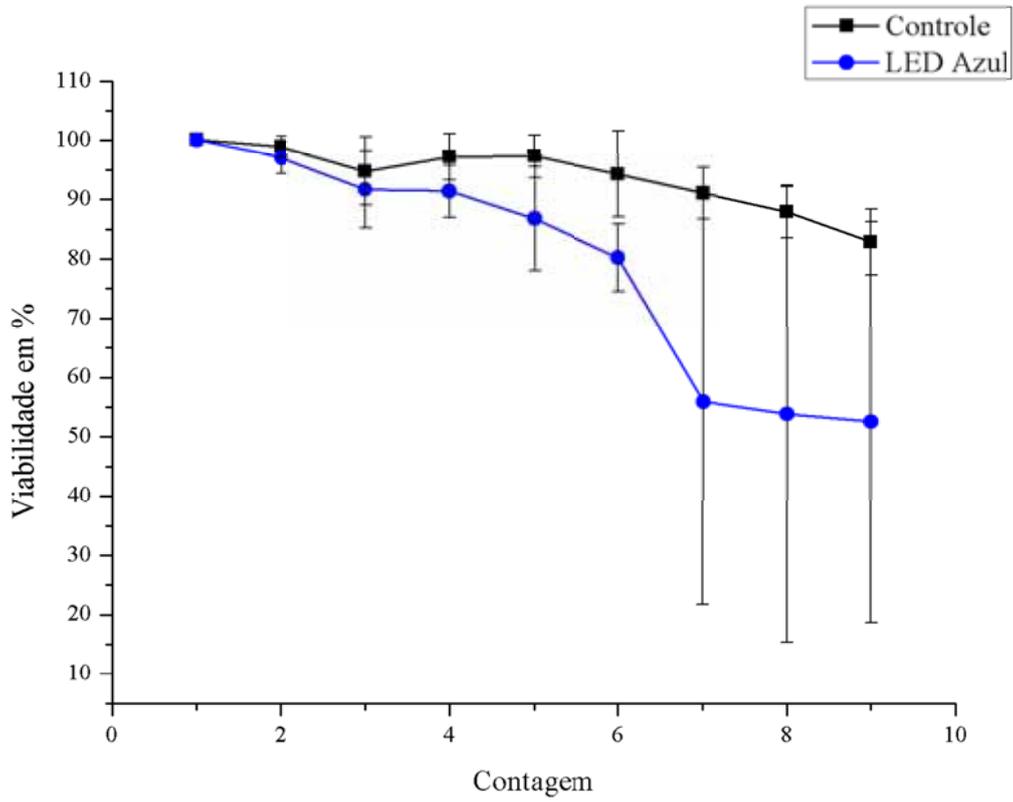


Gráfico 5. Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 475 nm.

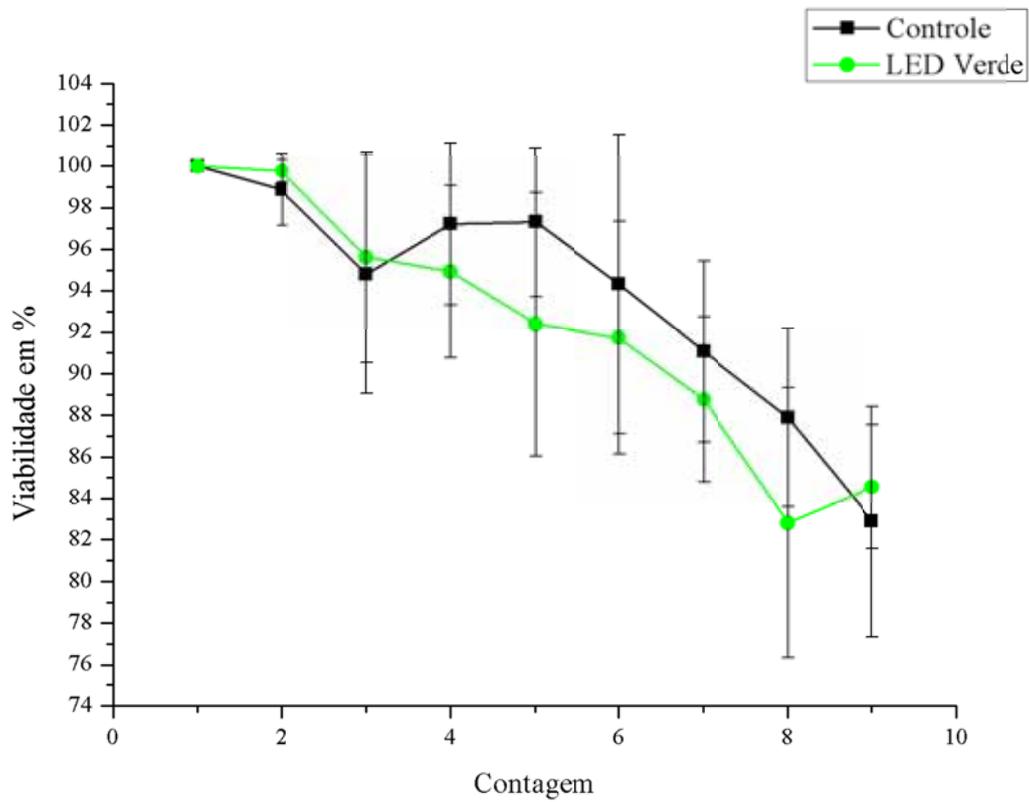


Gráfico 6. Comparação entre Viabilidade do grupo Controle e grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 530 nm.

Os resultados obtidos referentes às viabilidades dos grupos em estudo demonstraram que em ambiente nutricional mais favorável e espaço a viabilidade mantém-se satisfatória até o quinto dia, menos para o grupo irradiado com LED no comprimento de onda de 475 nm, que atinge o nível de tolerância de $95 \% \pm 3\%$, para células de Mieloma múltiplo murino - NS1, no terceiro dia, o que permite reafirmar os resultados encontrados pelos testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney em relação a efetividade da irradiação com comprimento de onda de 475 nm na inibição a taxa de proliferação da células de Mieloma múltiplo murino-NS1.

Após o quinto dia de cultura das células observa-se uma queda generalizada em todos os grupos analisados, independentemente do fornecimento nutricional adequado. Deste momento em diante o espaço tornou-se fator limitante para manutenção da viabilidade satisfatória. No presente experimento não se utilizou da técnica de repicagem, ou seja, retirada de parte de células e transpostas para outro recipiente com a mesma quantidade de meio e condições, gerando uma interferência subjetividade da técnica de contagem com azul de trípano

Conclusão

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho estabeleceu a curva padrão da taxa de proliferação do mieloma múltiplo murino – NS1 assim como as curvas das taxas de proliferação das culturas submetidas à influência da luz LEDs nos comprimentos de onda de 630 nm, 475nm e 530nm, respectivamente comparadas à curva padrão. O mesmo procedimento foi realizado para as curvas de viabilidade.

O LED no comprimento de onda de 475 nm não deve ser utilizado nos processos de produção de anticorpos monoclonais murinos uma vez que a diferença estatística é significativa no sentido de inibição na taxa de proliferação celular do Mieloma múltiplo murino-NS1. A conclusão foi reconfirmada quando se analisou a viabilidade para o mesmo grupo.

Os LEDs com comprimentos de onda de 630 nm e 530 nm apesar de terem determinado diferenças gráficas nas curvas de crescimento em relação ao controle, este resultado não se mostrou estatisticamente significativo.

Quanto à viabilidade da cultura celular conclui-se que a ação do espaço como fator limitante pode ter gerado uma interferência subjetividade da técnica de contagem com azul de tripano.

6. TRABALHO APRESENTADO

Parte dos resultados deste trabalho foi apresentado em um evento:

1. V Congresso de Física Aplicada a Medicina, 2009, Botucatu, com o trabalho intitulado *Emprego da luz LED na cultura de células Mieloma murino – NS1 in vitro*. Apresentado sob a forma oral pelo aluno de iniciação científica Woner Mion e cujo resumo consta nos anais do evento.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KARU T. I.; et al., Action of low intensity copper laser radiation on HeLa cell culture. *Journal of Quantum Electron.* v. 12, p 141-144, 1982
2. KARU, T.I Photobiological fundamentals of low-power Laser therapy. *Journal of Quantum Electron.* v.QE-23, n 10, p 1703-1717, 1987.
3. NIEMZ, M.H., Laser Tissue Interactions Fundamentals and Applications Third, Enlarged Edition. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. Cap 2, p. 9-41. Cap 3, 52-75.
4. ROUNDS, D.E.; et al. the effect of intense visible light on cellular respiration. *Life Sci.* v.6, p. 222-271, 1984.
5. 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.
6. 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.
7. IGNATIEVA, N. Y.; et. al. Molecular processes and structural alterations. *Laser Physics*, v.4, n.10, p.749-753, 2007.
8. MORGADO, A.M.; et. Al. Utilização segura de LASERs 2002. 55f. Dissertação (Mestrado em Física)-Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Portugal. 2001.
9. LIEVENS, P. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY, n.4, 1986, Bologna, Itália, p.171-174.
10. LIEVENS, P. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. *Journal Eur Med Laser Ass.* v.1, n. 2, p.12, 1988.
11. 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.
12. SOUZA, M.O. Determinação de padrões citogeneticos em clones de mieloma múltiplo murino (plasmocitoma NS1), utilizados na tecnologia de obtenção de anticorpos monoclonais. 2007. 123 f. (Mestrado profissional em Biomedicina) -Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2007.
13. FRANCO, E. B.; LOPES, L. G. Conceitos atuais na polimerização de sistemas restauradores resinosos. *Biodonto*, v. 1, n. 2, 2003.

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

15. GODING, J.W., Monoclonal Antibodies: Principles and practice Second Edition. San Diego: Academic Press-Harcourt Brace Jovanovich, 1986. Cap 2, 5-42. Cap 3, p. 59-43.