

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Kátia Vale Monteiro de Moura

O Efeito da Luz Polarizada (λ 400-2000nm) sobre Cultivos de
Células Hep.2 e L929: Estudo por MTT

São José dos Campos, SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

KÁTIA VALE MONTEIRO DE MOURA

**O Efeito da Luz Polarizada (1 400-2000nm) sobre Cultivos de
Células Hep.2 e L929: Estudo por MTT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP.

2006

M887e

Moura, Kátia Vale Monteiro de
O Efeito da Luz Polarizada (λ 400-2000nm) sobre
Cultivos de Células Hep.2 e L929: Estudo por MTT / Kátia Vele
Monteiro de Moura. São José dos Campos: UniVap,2006.
1 disco laser, color

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Técnicas de Cultura de Células 2. Microscopia de Polarização
I. Pinheiro, Antonio Luiz Barbosa, Orient. II. Soares, Cristina Pacheco,
Co-Orient. III. Título

CDU:57.086.83

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial
ou total desta Dissertação, desde que citada a fonte.

Aluna: *Katallya Monteiro de Moura*

Data: 6 de dezembro de 2006.

**“O Efeito da Luz Polarizada (λ 400-2000nm) sobre Cultivos de
Células Hep.2 e L929: Estudo por MTT”**

Kátia Vale Monteiro de Moura

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **ALDO BRUGNERA JUNIOR** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **ANTONIO LUIZ BARBOSA PINHEIRO** (UNIVAP) _____

Prof^a. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP) _____

Prof^a. Dra. **FÁTIMA ANTONIA APARECIDA ZANIN** (UNICASTELO) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

DEDICATÓRIA

À Deus por iluminar meus caminhos e me conceder mais esta vitória.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e José Eduardo por tudo, sempre. Amor, apoio, incentivo e força incondicionais.

Aos meus irmãos, Flávia e Eduardo por toda ajuda, compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, pela dedicação, disponibilidade e paciência, segura orientação na transmissão do conhecimento e toda atenção que me foi dispensada.

À Prof. Dra. Cristina Pacheco Soares, pela colaboração, transmissão do conhecimento e por permitir que eu realizasse todos os experimentos em seu laboratório.

À Prof. Dra. Cibelle Barbosa Lopes, pela grande ajuda, atenção, disponibilidade e carinho com que me recebeu.

À Rúbia Gravito Carvalho Gomes pela disponibilidade, incentivo, colaboração e carinho. Por ser uma amiga importante nas horas em que mais precisei, jamais esquecerei.

À minhas queridas amigas, Lúcia e Tereza pela imensa força que me transmitiram.

À Rosângela Regis Cavalcanti pela gentil colaboração e atenção que me dispensou na reta final deste trabalho.

Aos grandes amigos Ricardo, Vicente e Julio por todo o incentivo durante o período de pesquisa.

À Lili e Fernanda do Laboratório de Células pela ajuda durante os experimentos realizados.

“Muitos homens devem a grandeza de sua vida
aos obstáculos que tiveram que vencer”.

Charles Spurgeon

O Efeito da Luz Polarizada (1 400-2000nm) sobre Cultivos de Células Hep.2 e L929: Estudo por MTT

RESUMO

Recentemente se tornou grande o interesse pela propagação e efeitos da luz polarizada em tecidos biológicos e células devido ao seu alto potencial de aplicações, particularmente na área biomédica. Neste trabalho foram utilizadas duas culturas formadas por células de linhagem fibroblástica (L929) e células provenientes de carcinoma de laringe humano (Hep.2), que permitisse o estudo de aspectos de seu crescimento, quando submetidas à iluminação com o Sistema de luz polarizada. Ainda não foram localizadas na literatura pesquisas relacionadas ao uso deste novo Sistema de luz polarizada em culturas neoplásicas. Por se tratar de um trabalho absolutamente inédito, com perspectivas bastante promissoras, vem à concretização da justificativa de sua realização. Esta pesquisa teve como objetivo o estudo do efeito proliferativo de culturas de células Hep.2 e L929, com um Sistema de luz polarizada (λ 400-2000nm), foco do aparelho com 5cm de diâmetro, potência de 40mW e dose de 9,6J/cm². A viabilidade celular, através da atividade mitocondrial, foi verificada através do método de MTT pela espectrofotometria, sendo as leituras efetuadas nos períodos de T0 equivalente ao tempo após a primeira iluminação, T6, T12, T24, T48 e T72 horas, subsequentemente ao T0. As iluminações foram efetuadas com a distância de 1cm entre a placa com as amostras e o foco do aparelho nos tempos de T0 (24 horas após plaqueamento das células) e T48 (equivalente a 48 horas após a primeira iluminação). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do programa Instat[®]. Os resultados demonstraram que o fator tempo influenciou significativamente na viabilidade das culturas não-iluminadas L929 (**P=0,0014**), e nas iluminadas L929 com luz polarizada (**P=0,0035**). A influência do tratamento foi também significativa quando comparados os resultados observados nos grupos iluminados Hep.2 (**P=0,0001**) e não iluminados (**P=0,0001**). A influência do tratamento no resultado final, ou seja, na viabilidade celular de ambas as culturas iluminadas quando comparadas às respectivas culturas não iluminadas foi também considerada significativa, Hep.2 (**P=0,0001**) e L929 (**P=0,0002**). Concluiu-se que o uso da luz polarizada em cultivos celulares de células Hep.2 e L929 resultou em um efeito fotobiológico, que, contudo, necessita de maior esclarecimento quanto aos mecanismos envolvidos, vez que, este trabalho é o primeiro a ser realizado com a metodologia.

Palavras-chave: luz polarizada; método MTT; cultura celular

The Effect of Polarized Light (λ 400-2000nm) on Hep.2 and L929 cells: MTT Study

ABSTRACT

Recently there has been increased interest in the propagation of polarized light in randomly scattering media, such as biological tissues, because of its potential applications, particularly in biomedical area. The aim of this study was to evaluate the proliferative effect of Hep.2 cells, originate from laryngeal carcinomas and L929 cells, originate from a fibroblasts line, submitted or not to polarized light in wavelength of λ 400-2000nm with a energy density of 40mW, 5cm of diameter and dose of 9,6J/cm². The cellular viability by mitochondrial activity was assessed using MTT spectroscopy at the following times T0 ,T6 ,T12 ,T24 ,T48 ,T72 subsequently to T0. The illuminations were done at the T0 times (24 hours after handling the cells) and T48 (equivalent to 48 hours after the first illumination). The results were analysed by the InStat[®] program. After data analysis the time had influenced the cellular viability of L929 no illuminated group (**P=0,0014**) and illuminated one(**P=0,0035**). Statistically it was found a significant difference between the no illuminated Hep.2 group (**P=0,0001**) and illuminated group (**P=0,0001**). It was also observed that there was a significant difference between the two used kinds of illuminated cells when compared with respectives no illuminated groups, Hep.2 (**P=0,0001**) and L929 (**P=0,0002**).The use of polarized light in Hep.2 and L929 cells resulted on photobiological effects that needs further information about all the mechanisms involved, since the present study is the first one done with the methodology.

Key words : polarized light; MTT spectroscopy; cell culture

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Garrafa plástica para o cultivo de culturas celulares (Moura, 2006)	22
Figura 2 - Laboratório de Cultura de Células da Univap : observar 1 - microscópio invertido; 2 - fluxo laminar; 3 - estufa microbiológica (Moura, 2006)	23
Figura 3 - Bioptron® (AG Suíça, Moura, 2006)	25
Figura 4 - MTT (Spectra Count, Packard, USA, Moura, 2006)	26
Figura 5 - Comportamento das culturas de células Hep.2 não iluminadas (Moura, 2006)	28
Figura 6 - Comportamento das culturas de células Hep.2 iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)	29
Figura 7 - Comportamento das culturas de células Hep.2 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)	30
Figura 8 - Comportamento das culturas de células L929 não iluminadas (Moura, 2006)...	31
Figura 9 - Comportamento das culturas de células L929 iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)	32
Figura 10 - Comportamento das culturas de células L929 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)	33
Tabela 1- Protocolo de Iluminação (Moura, 2006)	24
Tabela 2 - Resultado médio das análises dos espectros das leituras realizadas pelo Método calorimétrico MTT de culturas de células da Linhagem Hep.2 (Moura, 2006)	27
Tabela 3 - Resultado médio das análises dos espectros das leituras realizadas pelo Método calorimétrico MTT de culturas de células da Linhagem L929 (Moura, 2006)	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Termo de consentimento e pesquisa	21
3.2 Linhagens celulares	21
3.2.1 Cultura de células	21
3.2.2 Sub-cultivo celular	22
3.2.3 Plaqueamento.....	23
3.2.4 Iluminação com luz polarizada	24
3.3 Método de avaliação	25
3.3.1 Avaliação dos resultados da viabilidade celular com Método Colorimétrico MTT...	25
3.4 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Análise estatística	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	47

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 25 anos pesquisas *in vitro* têm se tornado um dos métodos mais utilizados para experimentos laboratoriais tendo em vista as restrições legais impostas pela legislação brasileira com relação a experimentação envolvendo seres humanos e também devido ao sucesso alcançado em estudos envolvendo interações com drogas; procedimentos anti-tumorais; e recentemente com a luz laser. Além disso, este método permite o estudo das reações de vários componentes celulares de diferentes origens, assim como o uso da Fotobiomodulação (FBM) em diferentes linhagens de células (LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002a).

O uso da Fotobiomodulação Laser (FBML) tem crescido significativamente nas últimas duas décadas. Seu sucesso tem sido alcançado tanto na Odontologia como em aplicações médicas através da luz vermelha ou visível ou em ambos comprimentos de ondas. A grande maioria dos estudos utiliza comprimentos de onda entre $\lambda 635$ e $\lambda 830\text{nm}$. (PINHEIRO et al., 2002a; PINHEIRO et al., 2002b; CASTRO et al., 2005; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005; WERNECK et al., 2005).

Os efeitos da FBML são divididos em primários, secundários e terapêuticos (RIGAU, 1996; TUNER; HODE, 1998; KARU, 2000):

- Efeitos primários: bioquímico (estímulo à liberação de substâncias, como bradicinina, histamina e serotonina); bioelétrico e bioenergético.
- Efeitos secundários: estímulo ao trofismo celular e à microcirculação. O estímulo ao trofismo celular consiste na aceleração da velocidade da reprodução celular, devido a maior produção de ATP (adenosina trifosfato). O estímulo à microcirculação consiste na ação da radiação sobre os esfíncteres pré capilares, que, provavelmente devido a

liberação de histamina pela luz laser, sofrem paralisia, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo.

- Efeitos terapêuticos:
 - Efeito analgésico - alívio da dor pela interferência na mensagem elétrica durante o impulso doloroso ou ainda agindo direto na liberação de endorfinas e encefalinas.
 - Efeito antiinflamatório - apresenta-se na interferência da síntese de prostaglandinas e estimulação da microcirculação.
 - Efeito cicatrizante e antiedematoso - é semelhante aos efeitos secundários da radiação laseres.

O uso da FBML é capaz de acelerar a cicatrização em úlceras e feridas (NASCIMENTO et al, 2004; RIBEIRO; SILVA; ARAUJO, 2004), otimizar o processo inflamatório (PINHEIRO et al, 2002a; PINHEIRO et al, 2002b; GERBI et al, 2005) e também promover aumento no processo de divisão celular (CARNEVALLI et al, 2003). Sua utilização produz um efeito positivo também na neoformação óssea (WALKER et al, 2000; DÖRTUBUDAK; HAS; MAILATH-POKORNY, 2000; TORRICELI et al., 2001; SILVA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2003; GERBI et al., 2005; PINHEIRO; GERBI, 2006). Isso se dá devido a um aumento nos níveis de fatores de crescimento ósseo. Em ossos que estão em processo de cicatrização, quando irradiado pela luz laser, a proliferação de fibroblastos é aumentada gerando um aumento na síntese e secreção de matriz óssea. Isso gera uma aceleração no processo de reparação do osso, já que a FBML aumenta também a vascularização, melhorando a resposta inflamatória (SILVA et al., 2002; GERBI et al., 2005; PINHEIRO; GERBI, 2006).

Estudos demonstram que a ação da FBML em culturas celulares e tecidos biológicos, no que diz respeito à proliferação celular ainda são controversos, devido a diferentes protocolos de irradiação utilizados em pesquisas. A proliferação celular pode ser inibida ou

estimulada, de acordo com a dose de irradiação aplicada e o comprimento de onda. (KIPSHIDZE et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; GERBI et al., 2005; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005).

A luz laser ao incidir sobre tecidos desdobra-se, sendo uma parte refletida e a outra absorvida. Ao serem irradiados com laser, os tecidos biológicos recebem energia que é utilizada e transformada para seu consumo. A dose de irradiação e a densidade de energia são os parâmetros mais importantes na FBML. Se a dose for muito alta pode se ter um resultado negativo, não estimulatório ou, até mesmo, inibitório. Devido a estes efeitos inibitórios, o termo bioestimulação foi substituído por “biomodulação” (SCHINDL et al. 2000).

Outros parâmetros como comprimento de onda da radiação, densidade de potência e as propriedades ópticas do tecido vão determinar a interação laser-tecido e a magnitude de proliferação celular (TUNER; HODE, 1998; PINHEIRO et al., 2002a; PINHEIRO et al., 2002b; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005). A estimulação ou inibição das funções dos fotorreceptores, que fazem parte da cadeia respiratória celular, determina a magnitude da proliferação das células (CARNEVALLI et al., 2003). De acordo com absorção da luz laser pelos cromóforos da cadeia respiratória, nota-se efeitos fotofísicos e fotoquímicos que aumentam a estimulação celular à nível de membrana mitocondrial interferindo assim em seu metabolismo. Isso aumenta o potencial da membrana alterando suas propriedades ópticas, aumentando o consumo de oxigênio, a produção de ATP (adenosina trifosfato), RNA (ácido ribonucleico) e síntese protéica (KARU, 1999; DEDOV; COX; ROUFOGALIS, 2001; CARNEVALLI et al., 2003; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; WERNECK et al., 2005; GERBI et al., 2005; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

A ação da FBML em nível de mitocôndria promove inicialmente um aumento da transferência eletrônica na cadeia respiratória, resultando numa foto-excitação dos elétrons. Posteriormente, durante a excitação dos elétrons pela luz, parte da energia é convertida em

calor, induzindo um aumento na temperatura dos cromóforos. Isso resulta numa alteração estrutural com estimulação bioquímica, como ativação ou inibição de enzimas (RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; WERNECK et al., 2005) causando um aumento da energia celular e da ativação da síntese de ácidos nucléicos, o que é essencial para a reparação de feridas (TUNÉR; HODE, 2004; PINHEIRO et al., 2005). Segundo Karu (1987), o efeito em curto prazo da FBML é a estimulação mitocondrial, enquanto em longo prazo são resultados na estimulação e/ou inibição da transcrição e replicação do DNA (ácido desoxirribonucleico).

A maior absorção da luz laser em estruturas celulares, ocorre nos comprimentos de onda vermelho ou visível. A luz vermelha atua, também, em filamentos intermediários que são componentes importantes do citoesqueleto celular. Estes filamentos estabilizam organelas como o núcleo ou estão envolvidos em funções especializadas de junções celulares (DIAKONOVA; BOKOCH, SWANSON, 2002; CARNEVALLI et al., 2003). Estudos relatam que, em culturas irradiadas, ocorre a despolarização e desorganização dos filamentos intermediários do citoesqueleto. Este fato é observado 48h após a irradiação com a luz laser. Em culturas não irradiadas, os filamentos intermediários permanecem perfeitamente bem organizados e paralelos (SUND; AXELROD, 2000; DIAKONOVA et al., 2002; CARNEVALLI et al., 2003).

A despolarização e a desorganização do citoesqueleto precedem à divisão celular. Como a FBML influencia o metabolismo da célula, em culturas irradiadas observam-se estas alterações que precedem a divisão celular, fato não observado em culturas não irradiadas (RUSAN; FAGERSTROM; WADSWORTH, 2001; JOMARA; FUNCHS, 2002; CARNEVALLI et al., 2003).

É de grande importância o entendimento da ação da luz laser em células malignas devido a sua possibilidade de exposição durante o tratamento clínico (PINHEIRO et al., 2002a; 2002b). A utilização deste tipo de terapia em culturas celulares tumorais demonstrou

que a luz do laser em $\lambda 635\text{nm}$ não estimula significativamente a proliferação celular em doses de 0,04 a $0,485/\text{cm}^2$. Entretanto, com a irradiação a laser em $\lambda 670\text{nm}$ houve aumento na proliferação celular quando comparado com células irradiadas com laser em $\lambda 635\text{nm}$. A redução da quantidade de energia tem influência positiva no metabolismo celular, sendo que seu aumento, assim como sua intensidade, resultam em danos na foto-sensitização celular (PINHEIRO et al., 2002a).

Vários estudos têm demonstrado que a linhagem celular Hep.2 proveniente de carcinoma de laringe humano, tem apresentado aumento de proliferação quando irradiadas sob alguns comprimentos de onda de luz laser (PINHEIRO et al., 2000, 2002a, 2002b; WERNECK et al., 2005). As células Hep.2 têm sido utilizadas em experimentos laboratoriais desde 1955 (MOORE; SABACHEWSKY; TOOLAN, 1955). Células malignas têm um alto potencial de energia devido ao fato de seu metabolismo ser alterado (WERNECK et al., 2005).

Vários estudos já foram realizados também utilizando culturas de fibroblastos, como as células L929-CLLINCTC clone 929, que são provenientes da linhagem de fibroblastos de fibrossarcoma, utilizada como padrão em testes de viabilidade (ISO10993-5, 1998; TAKEMA et al., 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001; ORTIZ et al, 2001; KREISLER et al., 2001; KREISLER et al., 2002).

É sabido que lasers que operam em diferentes comprimentos de onda e diferentes doses de energia produzem diferentes efeitos nos fibroblastos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Estudos comparativos entre a luz vermelha e infravermelha, demonstram que melhores resultados são obtidos quando o comprimento de onda da luz está entre $\lambda 600\text{-}700\text{nm}$, que corresponde a região do vermelho (PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005), e quando a fluência de $2\text{J}/\text{cm}^2$ é utilizada (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). A FBML atua aumentando a proliferação de fibroblastos *in vitro*. Isso ocorre tanto quando utiliza-se o comprimento de

onda de $\lambda 670\text{nm}$ como quando o comprimento de onda de $\lambda 780\text{nm}$ é empregado, mantendo-se a mesma fluência de $2\text{J}/\text{cm}^2$ para ambos os comprimentos de onda (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Recentemente se tornou grande o interesse pela propagação e efeitos da luz polarizada em tecidos biológicos e células devido ao seu alto potencial de aplicações, particularmente na área biomédica (DOULE et al., 2000; XUEDING; LIHONG, 2002, 2003). Estudos recentes têm evidenciado que a luz polarizada pode ocasionar respostas biológicas similares à luz laser; é uma tecnologia de fácil manuseio e baixo custo e pode ser uma opção para o futuro (XUEDING; LIHONG, 2003).

De acordo com Iordanov et al (2002) e Miodrag et al. (2004), os efeitos favoráveis da luz polarizada foram descobertos em 1981 por um grupo de físicos húngaros, que provaram que esta luz tinha um efeito estimulante no sistema imunológico e reparação das funções do organismo (KERTESZ et al., 1982). Em contato com células e tecidos, a luz polarizada mostra novas propriedades biológicas, como aumento da atividade energética da membrana celular, estimulação de processos regenerativos e aumento da formação de adenosina trifosfato (ATP).

A luz polarizada tem produzido efeitos favoráveis também na biomodulação tecidual, acelerando os processos de cicatrização, pois minimiza a formação de exudato, melhora a deposição e organização das fibras colágenas, acelera a epitelização e fechamento das feridas, aumenta a oxigenação dos tecidos através da alteração da vasodilatação, além de promover o aumento do número de miofibroblastos (IORDANOV et al., 2002; MONSTREY et al., 2002a, 2002b; TUNÉR; HODE, 2004; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005). Estudos relacionados à cicatrização concluíram que um número menor de miofibroblastos está relacionado a uma menor contração das feridas durante a cicatrização (PINHEIRO, 1993; FREITAS; PINHEIRO; OLIVEIRA, 2002). Então, quanto maior o

número de miofibroblastos, maior a contração das feridas, o que anteriormente não era desejável. Entretanto, a contração das feridas pode favorecer o processo de cicatrização já que este fenômeno ajuda a acelerar o fechamento das mesmas, como nos casos de ulcerações e queimaduras extensas (TUNÉR; HODE, 2004; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

A luz polarizada apresenta ainda um efeito particular na camada bilipídica da membrana celular fazendo com que os lipídios sofram rotação (inversão) dentro da cadeia eletrônica alterando sua estrutura. Essa luz interage com as extremidades polares da camada dupla de lipídios da membrana da célula onde proteínas biologicamente ativas são incorporadas à ela. Devido a interação com a luz polarizada, alterações estruturais ocorrem, promovendo uma reorganização da superfície da membrana celular, modificando a conexão lipídio-proteína. Estas alterações influenciam os processos celulares relacionados à membrana da célula: função receptora, produção e transferência de energia, resposta imunológica e reação enzimática (IORDANOV et al., 2002; MONSTREY et al., 2002a; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005). Com relação aos efeitos da luz polarizada na proliferação celular, estudos relatam que esta é mais intensa após 24 horas de irradiação, depois começa a diminuir (72 horas) (KREISER et al., 2002; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

A propagação da luz polarizada num meio tecidual depende de alguns parâmetros como: tamanho, forma, densidade da partícula; propriedades do meio ao redor da partícula de espalhamento e estágios de polarização da luz incidente. Já é notório que os estágios de polarização são alterados ou enfraquecidos depois que os fótons de luz sofrem espalhamento por pequenas partículas presentes no meio (JACQUES; ROMAN; LEE, 2000; JIÃO; YAO; WANG, 2000; XUEDING; LIHONG, 2003).

A luz polarizada é policromática, com o comprimento de onda girando em torno de 400-2000nm, o que significa que está dentro do espectro da luz vermelha (400-780nm) e também dentro do espectro de radiação infravermelha (780-1.500 IRA e 1.500 - 3.400 IRB).

A radiação ultravioleta é eliminada por um filtro especial. O fato da luz polarizada apresentar um amplo espectro, faz com que seu efeito nos tecidos biológicos apresentem características de ambos os comprimentos de onda (vermelho e infravermelho) simultaneamente (SIMIC et al., 2001; MONSTREY et al., 2002; MIODRAG et al., 2004; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

É importante ressaltar que a utilização de luz coerente e incoerente resulta em diferentes efeitos nos tecidos, sendo que o uso de luz coerente implica em melhores resultados. A luz polarizada (incoerente) tem efeitos mais benéficos em lesões mais superficiais. Os efeitos da luz laser (coerente) tem resultados na membrana celular em até 4cm de profundidade a mais do que a luz polarizada (TUNÉR; HODE, 2004; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

Em vários trabalhos envolvendo cultura de células, o método de análise MTT foi utilizado com sucesso (ALMEIDA-LOPES, 2001; LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002a; PINHEIRO et al., 2002b; CASTRO et al., 2005; WERNECK et al., 2005).

A utilização do método MTT oferece grande vantagem por sua capacidade de fornecer quantitativamente a proliferação celular de uma cultura tratada tornando possível uma comparação com uma cultura não irradiada ou não iluminada. O MTT (Brometo de (3-(4,5-dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido, Sigma) é um teste calorimétrico, onde o componente amarelo do MTT é reduzido pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial, para o componente formazana azul, dependendo da viabilidade das células. Em células que se proliferam ativamente, um aumento na conversão do MTT é quantificado espectrofotometricamente (DOYLE; GRIFFTHS, 1998).

Neste trabalho utilizou-se duas culturas formadas por células de linhagem fibroblástica (L929) e células provenientes de carcinoma de laringe humano (Hep.2), que permitisse o estudo de aspectos de seu crescimento, quando submetidas à iluminação com o

Sistema de luz polarizada. Em recentes trabalhos realizados por Doule et al (2000), Xueding e Lihong (2002), (2003), evidenciou-se grande semelhança entre resultados obtidos com o emprego da luz laser e da luz polarizada, por isso, seria de grande valia a observância dos efeitos obtidos com a utilização deste Sistema de luz polarizada, por se tratar de uma tecnologia de fácil manuseio e baixo custo. Ainda não foram localizadas na literatura pesquisas relacionadas ao uso deste novo Sistema de luz polarizada em culturas neoplásicas. Devido a isso, seria interessante que se iniciassem novos estudos, dentro desta linha de pesquisa, proporcionando assim, possibilidades de avanço no tratamento e prevenção de doenças, trazendo inúmeros benefícios a área biomédica. Por se tratar de um trabalho absolutamente inédito, com perspectivas bastante promissoras, vem à concretização da justificativa de sua realização. Desse modo, a proposta deste estudo foi avaliar os efeitos de um sistema de luz polarizada (λ 400 a 2000nm) sobre culturas de células neoplásicas (Hep.2) e não neoplásicas (L929).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Comparar, através do uso do método de MTT, os efeitos de um Sistema de luz polarizada (λ 400 a 2000nm) sobre culturas celulares de carcinoma de laringe humano (Hep.2) e uma linhagem de fibroblastos (L929-CLLINCTC clone 929).

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a influência da variável tempo no processo proliferativo de células de carcinoma de laringe humano (Hep.2) e uma linhagem de fibroblastos (L929-CLLINCTC clone 929) submetidas ou não à iluminação com a luz polarizada com uma mesma dose de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$ utilizando a determinação da viabilidade celular pelo método do MTT;
2. Avaliar a influência do tratamento com o Sistema de luz polarizada no processo proliferativo de células de carcinoma de laringe humano (Hep.2) e uma linhagem de fibroblastos (L929-CLLINCTC clone 929) submetidas à iluminação com a luz polarizada com uma mesma dose de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$ utilizando a determinação da viabilidade celular pelo método do MTT.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Termo de consentimento e pesquisa

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVAP sob o número A014/2006/CEP (Anexo A). As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

3.2 Linhagens celulares

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes culturas celulares: L929-CLLINCTC Clone 929 (Linhagem de fibroblastos de fibrossarcoma) e Hep.2 (Carcinoma de laringe humano). As linhagens foram adquiridas no Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As linhagens foram mantidas congeladas em ampolas de congelamento a uma temperatura de -190°C (MOORE et al., 1955).

3.2.1 Cultura de células

O meio de cultura utilizado foi o Meio Mínimo Essencial (MEM, Invitrogen), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco), 1% de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco).

Foi utilizada uma concentração de 20% de SFB logo após o descongelamento com a finalidade de manter o pH correto, adicionou-se também uma solução de 10% de NaHCO_3 objetivando-se manter o pH em torno de 7.2; As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C (estufa microbiológica de CO_2 marca Forma Scientific), em garrafas plásticas Nunc de 25cm^2 , a fim de proporcionar o ambiente de desenvolvimento ideal para o crescimento celular.



Figura 1 - Garrafa plástica para o cultivo de culturas celulares (Moura, 2006)

3.2.2 Sub-cultivo celular

O transplante celular foi realizado duas vezes por semana ou quando o número de células por garrafa estivesse muito alto. Antes de todos os procedimentos com as culturas, as células foram observadas em microscópio invertido Olympus CK40, para verificar-se o aspecto do meio das culturas celulares, a necessidade da troca do meio e/ou do transplante das células. Quando as células se apresentaram mal adaptadas ou não houve o crescimento celular esperado foi feita simplesmente à troca do meio, promovendo mais nutrientes para induzir o desenvolvimento celular.

Estas células foram sub-cultivadas após tripsinização, quando a densidade celular

formava uma monocamada confluenta. Após o período de três minutos com 2ml de Tripsina (Sigma) retirou-se a mesma, adicionando-se 3ml de meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, usou-se jatos fortes com o auxílio de pipetador automático. Deste volume foram retirados alíquotas de 1ml e passados para novas garrafas, adicionando-se mais 2ml de meio MEM e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.



Figura 2 - Laboratório de Cultura de Células da Univap : observar 1 - microscópio invertido; 2 - fluxo laminar; 3 - estufa microbiológica de cultura (Moura, 2006)

3.2.3 Plaqueamento

As células foram plaqueadas (5×10^4 células/ml) em placas de 96 poços, com meio de cultura MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino - SFB para adesão das células em estufa de CO₂ 5% e temperatura 37 °C incubadas *overnight*. Todo material necessário foi devidamente esterilizado em autoclave (Fanem). Esta suspensão celular foi disposta na placa de forma que se obtivesse um poço com células e o poço seguinte permanecesse vazio, com o objetivo de prevenir que qualquer tipo de iluminação chegasse até o poço vizinho. Deste modo, foi preparada uma placa para cada tratamento e uma placa para cada grupo não

iluminado onde cada placa contivesse seis amostras para cada tempo. Durante o experimento, procedeu-se à troca do meio de cultura MEM após o tempo de 24 horas, mantendo-se a concentração de 10% de soro fetal bovino com o intuito de promover os nutrientes necessários às células.

3.2.4 Iluminação com luz polarizada

Para a iluminação das culturas, um Sistema de luz polarizada, Biopton® (AG Suíça) com comprimento de onda de $\lambda 400\text{nm}$ a $\lambda 2000\text{nm}$, foco do aparelho com 5cm de diâmetro, potência de 40mW e dose de $2,4\text{J}/\text{cm}^2$ por minuto foi utilizado. A dose foi de $4,8\text{J}/\text{cm}^2$ por iluminação, resultando em uma dose total de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$. As iluminações foram realizadas com intervalo de tempo de 48 horas, com distância de 1cm entre o foco do aparelho e a placa com as amostras. Para que o foco do equipamento fosse ajustado para o diâmetro de cada poço (com 6mm de diâmetro), foi confeccionado um dispositivo que permitiu a focagem do aparelho evitando a dispersão de luz para outros poços.

Os tempos de iluminação das células para o experimento estão apresentados na **Tabela 1**. A **Figura 3** mostra a luz polarizada utilizada neste estudo.

Tabela 1- Protocolo de Iluminação (Moura, 2006)

Tempo em horas	Iluminação $\lambda 400\text{-}2000\text{nm}$
Tempo 0	Sim - todos os grupos
Tempo 6	Não
Tempo 12	Não
Tempo 24	Não
Tempo 48	Sim - o grupo T= 72
Tempo 72	Não



Figura 3 - Bioptron® (AG Suíça, Moura, 2006)

3.3 Método de avaliação

3.3.1 Avaliação dos resultados da viabilidade celular com Método Colorimétrico MTT

A viabilidade celular das células foi determinada pelo método colorimétrico de contagem celular com a solução MTT (3-(4,5-dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)(Sigma). O método MTT foi descrito por Mosmann (1983), e baseia-se na capacidade que as células vivas possuem de reduzirem o Sal Tetrazólio (Sigma), de cor amarela, em forma insolúvel, de cor azul e que se precipita graças à ação da enzima mitocondrial Succinil Desidrogenase, a qual é ativa apenas em células vivas. A solução do Sal Tetrazólio foi preparada, logo antes de ser utilizada, com 5mg/ml diluídos em salina tampão fosfato- PBS. As células previamente plaqueadas nas placas de 96 poços contendo meio MEM, tiveram este meio removido dos poços e então receberam uma quantidade de 20µl de MTT e 80µl de PBS em cada

poço. As placas foram incubadas em estufa biológica a 37°C por uma hora no escuro e após este período de incubação foram lavadas duas vezes cada poço com 100µl de dimetilsulfóxido DMSO[®] (Synth) por poço, no intuito de dissolver-se o diformazam formado. Após isso, 100µl de DMSO foram adicionados e permaneceram em cada poço. Os resultados foram expressos em densidade óptica, sendo que esta foi determinada com a espectrofotometria de absorção usando-se um espectrofotômetro (Spectra Count, Packard, USA) como mostrado na **Figura 4** juntamente com o PC para armazenamento dos dados. Avaliou-se a emissão da colorimetria do MTT por um espectro emitido pelo aparelho no comprimento de onda de 570nm.



Figura 4 - Espectrofotômetro (Spectra Count, Packard, USA) (Moura, 2006)

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa Instat[®]. Inicialmente foi verificada a normalidade dos dados. Devido ao pequeno número da amostra optou-se pela utilização do método não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi considerado com o significante **p<0,05**.

4. RESULTADOS

Os resultados das médias das absorvâncias obtidas através do teste de viabilidade celular utilizando o MTT podem ser vistos nas **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 2 - Resultado médio das análises dos espectros das leituras realizadas pelo Método calorimétrico MTT de culturas de células da Linhagem Hep.2 (Moura, 2006)

Tempo (h)	Luz polarizada	Não iluminada
0h	0,79 ± 0,12	0,76 ± 0,23
6h	0,63 ± 0,14	0,50 ± 0,13
12h	0,88 ± 0,14	0,89 ± 0,06
24h	0,71 ± 0,29	0,87 ± 0,21
48h	0,97 ± 0,08	0,84 ± 0,28
72h	1,04 ± 0,09	1,07 ± 0,07

Tabela 3 - Resultado médio das análises dos espectros das leituras realizadas pelo Método calorimétrico MTT de culturas de células da Linhagem L929 (Moura, 2006)

Tempo (h)	Luz polarizada	Não iluminada
0h	0,50 ± 0,08	0,45 ± 0,13
6h	0,29 ± 0,03	0,31 ± 0,03
12h	0,65 ± 0,07	0,91 ± 0,08
24h	0,63 ± 0,09	0,48 ± 0,15
48h	0,71 ± 0,15	0,62 ± 0,16
72h	0,71 ± 0,06	0,64 ± 0,13

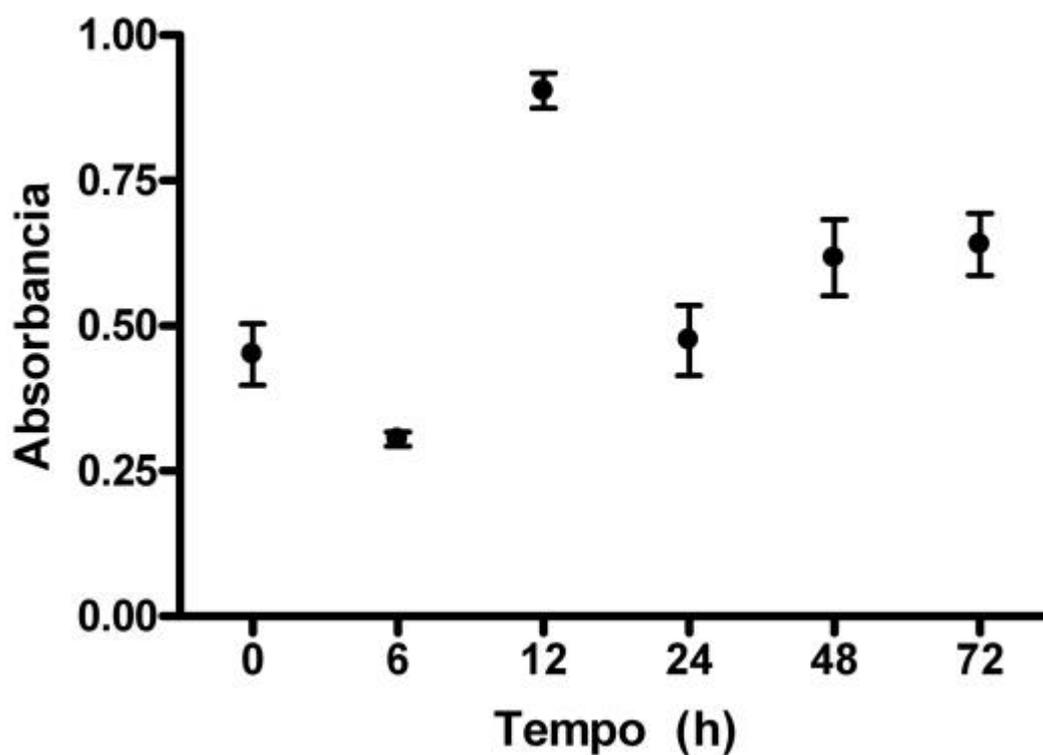


Figura 5 - Comportamento das culturas de células Hep.2 não iluminadas (Moura, 2006)

A **Figura 5** mostra o comportamento das culturas celulares Hep.2 não iluminadas. Observou-se que ocorreu uma diminuição discreta da proliferação celular nas primeiras seis horas após o transplante inicial seguida por um aumento acentuado na proliferação nas seis horas subsequentes. Após 12 horas ocorreu nova queda na proliferação celular a qual foi seguida por um acréscimo na viabilidade celular a partir das 24 horas. Do período de 48 horas até 72 horas a proliferação das células manteve-se estável.

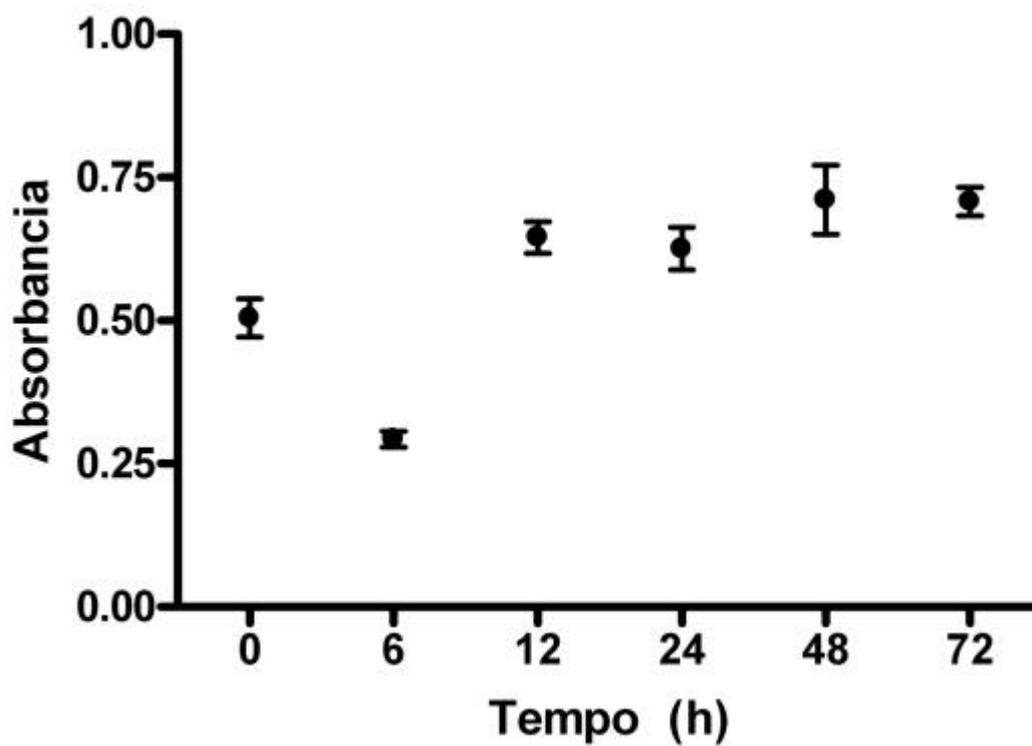


Figura 6 - Comportamento das culturas de células Hep.2 iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)

Nas culturas celulares Hep.2 iluminadas com a luz polarizada, observou-se uma alteração na proliferação celular nas primeiras 12 horas. Houve uma diminuição da viabilidade celular nas primeiras seis horas seguida de um aumento até o período de 12 horas. Após 12 horas, observou-se uma queda na proliferação das células com nova tendência a aumento após 24 horas. Após 48 horas, a viabilidade celular manteve-se estável até o período final de 72 horas (**Fig. 6**).

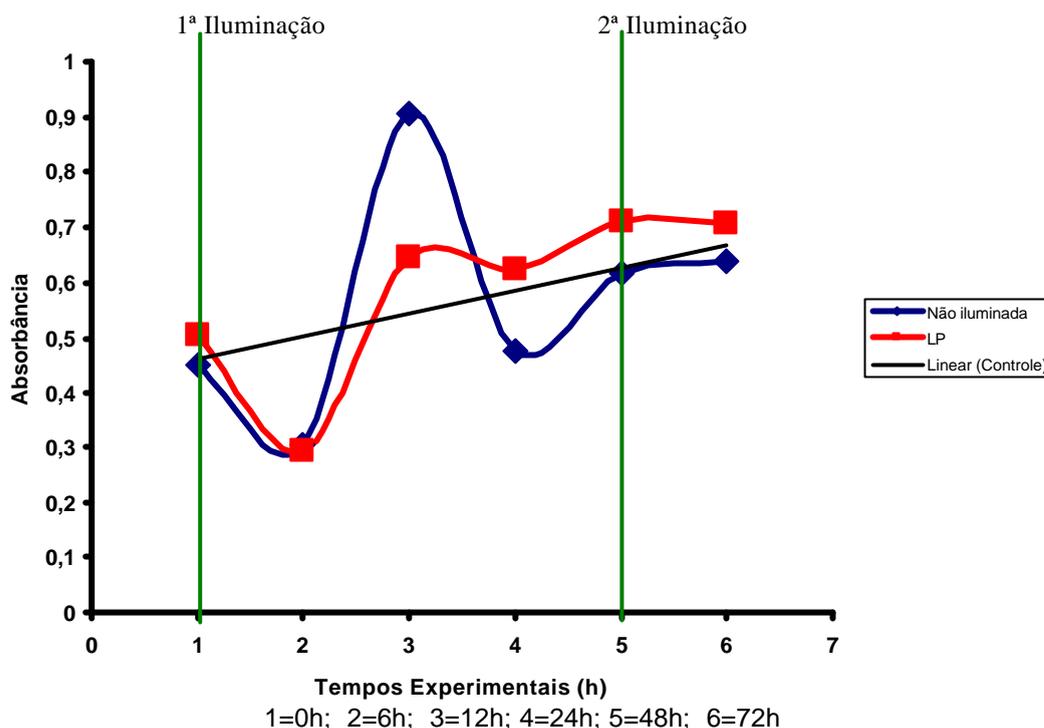


Figura 7 - Comportamento das culturas de células Hep.2 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)

Quando os grupos não iluminados e iluminados da linhagem Hep.2 foram simultaneamente comparados, observou-se uma coincidência no tocante a diminuição da viabilidade celular dentro das primeiras seis horas. Foi também observado que no adiantar das seis horas, ocorreu um aumento da população celular em ambos os grupos (não iluminado e iluminado). Após o período de 12 horas, observou-se nova coincidência entre os grupos não iluminados e iluminados, com queda na proliferação celular seguida por aumento da viabilidade após 24 horas. A diferença entre ambos os grupos após o período de 12 horas se deve ao fato de que a queda do número de células no grupo não iluminado foi mais acentuada do que no grupo iluminado, promovendo uma inversão de população entre os grupos. Após o tempo de 24 horas o número de células no grupo iluminado foi maior. Observou-se que a proliferação celular nos grupos não iluminado e iluminado se mantiveram estáveis após o tempo experimental de 48 horas até o final do experimento em 72 horas. Coincidentemente ao término do período experimental as culturas celulares Hep.2 não iluminada e iluminada apresentaram a mesma tendência, ou seja, um discreto aumento na viabilidade celular (**Fig. 7**).

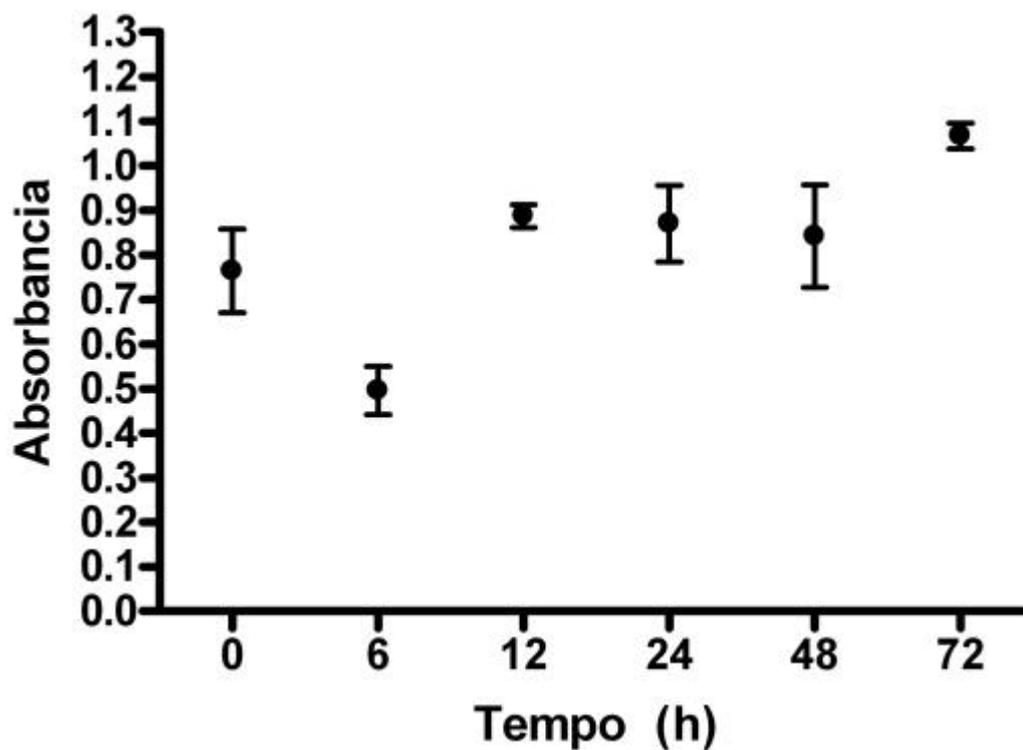


Figura 8 - Comportamento das culturas de células L929 não iluminadas (Moura, 2006)

A **Figura 8** mostra o comportamento das culturas celulares L929 não iluminadas. Observou-se que ocorreu uma queda na proliferação celular nas primeiras seis horas após o transplante inicial. Após o período de seis horas houve um aumento do número de células até o tempo experimental de 12 horas. Do período de 12 horas até 48 horas houve um decréscimo progressivo da viabilidade celular, que apresentou aumento após 48 horas até 72 horas.

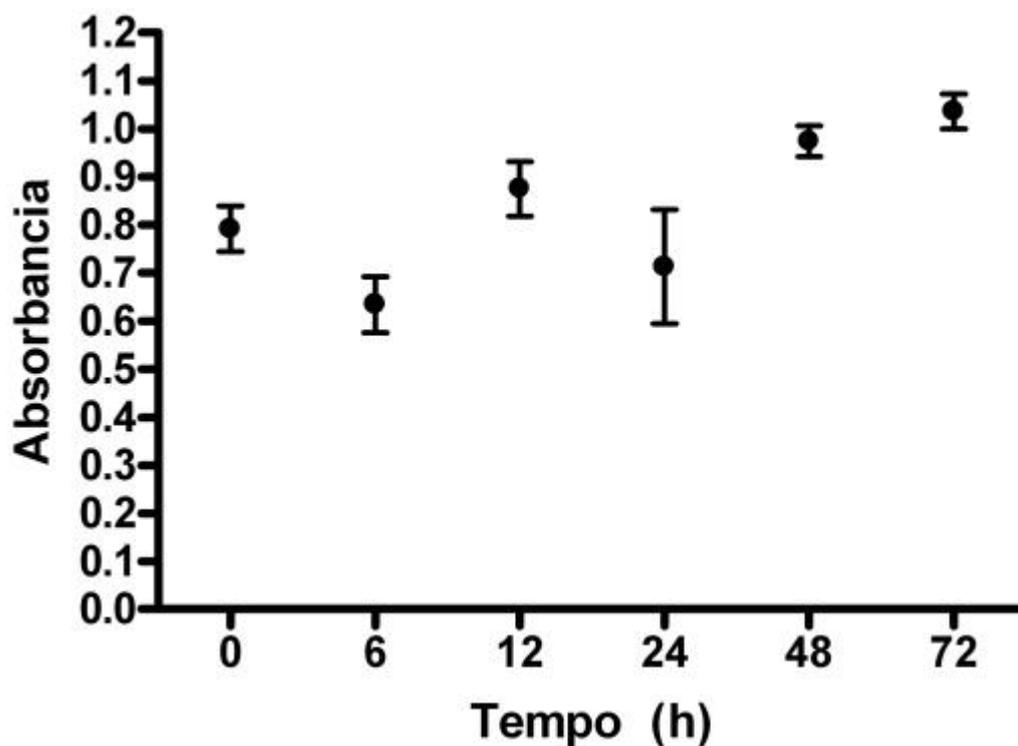


Figura 9 - Comportamento das culturas de células L929 iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)

Nas culturas celulares L929 iluminadas com a luz polarizada, ocorreu uma diminuição na proliferação das células nas primeiras seis horas seguida por um aumento do número celular até o tempo experimental de 12 horas. Após o período de 12 horas, observou-se nova queda na proliferação até o período de 24 horas, quando ocorreu o aumento progressivo da viabilidade celular até o tempo de 72 horas. Foram observados períodos de oscilação entre acréscimo e decréscimo da proliferação celular, constatando-se, finalmente, um aumento da viabilidade das células no final do experimento (**Fig. 9**).

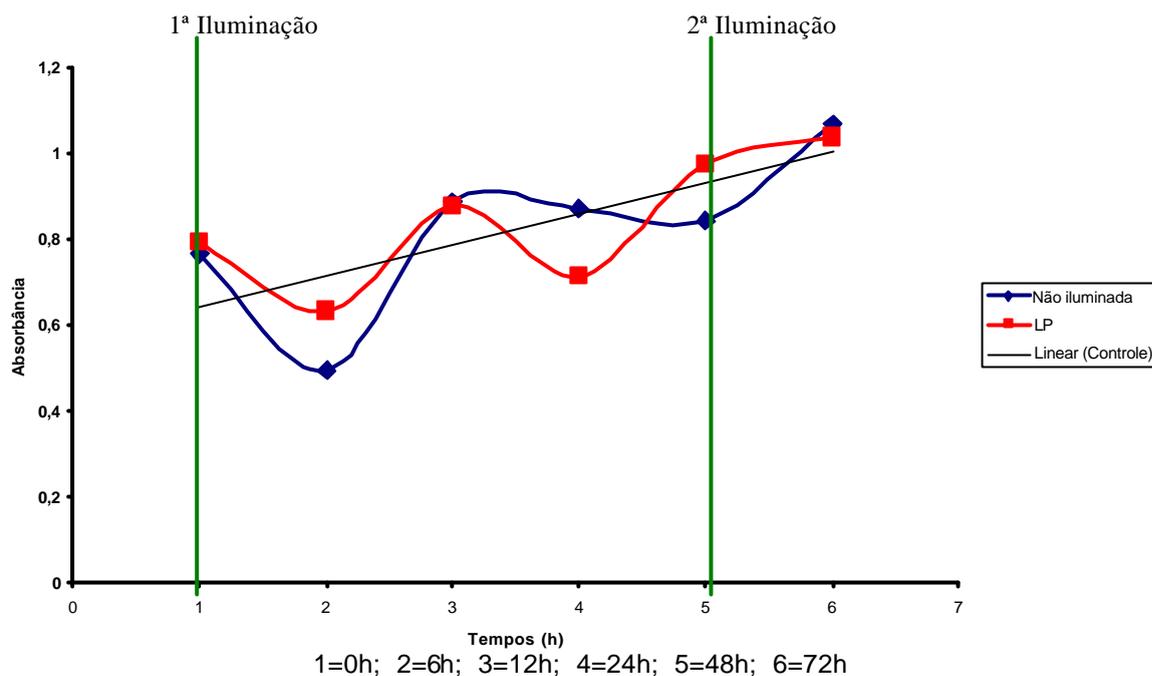


Figura 10 - Comportamento das culturas de células L929 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada (Moura, 2006)

Quando os grupos não iluminados e iluminados da linhagem L929 foram simultaneamente comparados, observou-se uma coincidência com relação à queda da viabilidade celular em ambos os grupos (não iluminado e iluminado) nas primeiras seis horas. Contudo, esta queda foi mais acentuada nas culturas não iluminadas. Após o período de seis horas, notou-se um aumento na proliferação celular até o período de 12 horas, seguido por nova diminuição no número de células até o tempo de 24 horas para ambos os grupos. Após o tempo de 48 horas observou-se que as culturas não iluminadas sofreram aumento na proliferação e as culturas iluminadas também apresentaram acréscimo na viabilidade celular. Coincidentemente, observou-se ao final do experimento (72 horas), que o aumento da proliferação das culturas celulares L929 não iluminada e iluminada foi praticamente igual (Fig.10).

4.1 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através do programa Instat[®]. Para a análise foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis devido ao pequeno número da amostra. Os resultados obtidos demonstraram que o fator tempo influenciou significativamente na viabilidade das culturas não-iluminadas L929 (**P=0,0014**), e nas iluminadas L929 com luz polarizada (**P=0,0035**). A influência do tratamento foi também significativa quando comparados os resultados observados nos grupos iluminados Hep.2 (**P=0,0001**) e não iluminados (**P=0,0001**). A influência do tratamento no resultado final, ou seja, na viabilidade celular de ambas as culturas iluminadas quando comparadas às respectivas culturas não iluminadas foi também considerada significativa, Hep.2 (**P=0,0001**) e L929 (**P=0,0002**).

5 DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo células têm se tornado um dos métodos mais utilizados para experimentos laboratoriais. Inúmeros estudos já foram realizados utilizando-se a FBM em culturas de diferentes linhagens (MOORE; SABACHEWSKYL; TOOLAN, 1955; SUND; AXELROD, 2000; NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001; ORTIZ et al., 2001; KREISLER et al., 2001; LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; DIAKONOVA; BOKOCH; SWANSON, 2002; KREISLER et al., 2002; CARNEVALLI et al., 2003; CASTRO et al., 2005; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005; WERNECK et al., 2005). Ainda existem controvérsias com relação aos efeitos do uso da FBM nos tecidos biológicos tendo em vista a existência de resultados conflitantes na literatura no que diz respeito à proliferação celular (PINHEIRO et al., 2000; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; PINHEIRO et al., 2005a, 2005b; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005). Por outro lado, sabe-se que a FBM trás efeitos benéficos para os tecidos e para o organismo de modo geral (SILVA et al., 2002; CARNEVALLI et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2004; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; GERBI et al., 2005; PINHEIRO; GERBI, 2006). Em vários trabalhos envolvendo cultura de células, o método de análise MTT para verificação de proliferação celular foi utilizado com sucesso (ALMEIDA-LOPES, 2001; LOPES et al., 2001; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; CASTRO et al., 2005; WERNECK et al., 2005; KOUTNAM et al., 2003). As células Hep.2 têm sido utilizadas em pesquisas há 50 anos, fornecendo parâmetros importantes para o entendimento do comportamento e proliferação de culturas celulares neoplásicas (MOORE; SABACHEWSKYL; TOOLAN, 1955; PINHEIRO et al., 1998, 2000, 2002a, 2002b; WERNECK et al., 2005). Vários estudos já foram realizados também utilizando linhagens de

fibroblastos (HRNJAK et al., 1995; TAKEMA et al., 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; NOMURA; YAMAGUCHI; ABIKO, 2001; ORTIZ et al., 2001; KREISLER et al., 2001; KREISLER et al., 2002; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005).

Segundo Werneck et al. (2005), evidências indicam que a luz laser tem a mesma sensibilidade de absorção tanto para células neoplásicas como não neoplásicas, sendo que para os dois tipos celulares, a proliferação pode ser estimulada dependendo dos parâmetros de utilização do laser. Tanto a luz vermelha com comprimento de onda de $\lambda 685\text{nm}$, que promove uma resposta mais rápida por ser absorvida pela membrana mitocondrial, como a luz infravermelha com comprimento de onda de $\lambda 830\text{nm}$, que é absorvida na membrana celular promovem um efeito estimulatório significativo na viabilidade celular. Porém, um stress nutricional, no caso de células neoplásicas, pode causar uma maior absorção da luz laser. Como as células malignas têm intensa atividade metabólica, elas se encontram em constante stress nutricional. Isso é um fator importante, já que estudos relatam que um stress nutricional pode levar a um aumento da atividade proliferativa de células cancerosas (PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005).

No presente experimento, procurou-se avaliar a influência da luz polarizada no processo proliferativo de células Hep.2 e L929 submetidas a iluminação com luz polarizada ($\lambda 400$ a 2000nm) com dose de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$ numa potência de 40mW , utilizando-se a determinação da viabilidade celular pelo método MTT. Na atual pesquisa optou-se por denominar as aplicações de luz como iluminações, em função das mesmas terem sido efetuadas com o Sistema de luz polarizada e não com a utilização de lasers, que teriam suas emissões de luz denominadas como irradiações. Pesquisas realizadas utilizando-se do termo iluminação como referência à emissão de luz pela luz polarizada já podem ser encontradas (PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005; PINHEIRO et al., 2006).

Ainda não foram localizadas referências na literatura no que diz respeito à utilização

da luz polarizada em culturas de células neoplásicas, por isso a importância de que novas pesquisas sejam realizadas nesse campo. Utilizou-se como referência para efeito comparativo, estudos realizados com a luz laser e luz polarizada nas mesmas linhagens ou similares, *in vitro* ou *in vivo*.

No atual experimento, ambas as culturas receberam a dose total de $9,6\text{J}/\text{cm}^2$, dose esta considerada baixa já que estudos relatam que dosagens aplicadas em até $20\text{J}/\text{cm}^2$ são consideradas baixas (KARU, 1996; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005). Ao comparar-se a dose utilizada na presente pesquisa com as doses utilizadas em pesquisas anteriores com a luz polarizada, observou-se que a quantidade de energia usada neste experimento foi mais baixa do que as demais. Isso se deu pelo fato de que esta pesquisa ocorreu *in vitro* e não *in vivo*, sendo que nesta última, a dose deve ser mais alta para que os resultados sejam satisfatórios (IORDANOV et al., 2002; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005). Além disso, como a luz polarizada utilizada neste estudo tem o comprimento de onda girando em torno de $400\text{-}2000\text{nm}$, o que significa que está dentro do espectro da luz visível ($400\text{-}780\text{nm}$) e também dentro do espectro de radiação infravermelha ($780\text{-}1.500\text{IRA}$ e $1.500\text{-}3.400\text{IRB}$), optou-se por utilizar dose semelhante às doses utilizadas em culturas irradiadas com luz laser em ambos comprimentos de onda, que foram mais baixas para que bons resultados fossem obtidos (PINHEIRO et al., 1998, 2000, 2002a, 2002b; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005).

Com relação a periodicidade com a qual foram feitas as iluminações no presente experimento, observou-se que o protocolo utilizado não seguiu as recomendações do fabricante, que orientava iluminações diárias. Na atual pesquisa as iluminações se procederam com intervalo de 48 horas, isso se justifica devido ao fato de que as linhagens celulares necessitam de um intervalo de tempo maior para que respondam melhor ao tratamento e não tenham sua proliferação inibida por um excesso de energia aplicada. (KIPSHIDZE et al.,

2001; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b; RIBEIRO; SILVA; ARAÚJO, 2004; GERBI et al., 2005; WERNECK et al., 2005; CASTRO et al., 2005).

Werneck et al. (2005) realizaram um estudo com células Hep.2 utilizando-se da FBML, nos comprimentos de onda de $\lambda 685$ e $\lambda 830$ nm com a dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ com o intuito de se verificar a influência do tempo e comprimento de onda na viabilidade celular desta linhagem através do método MTT. Observou-se que o tempo tem efeito significativo na proliferação celular no grupo irradiado com comprimento de onda de $\lambda 685$ nm, mas não com $\lambda 830$ nm e não irradiado. Concluiu-se também que o comprimento de onda exerceu influência significativa na proliferação celular, pois a luz vermelha que é absorvida pelos cromóforos mitocondriais, leva a uma ativação e resposta celular mais rápida do que a luz infravermelha que é absorvida na membrana da célula. Os pesquisadores constataram que nas primeiras 12 horas após irradiação com comprimento de onda de $\lambda 685$ nm houve um pico de proliferação celular. Contudo, quando foi utilizado o comprimento de onda de $\lambda 830$ nm, observou-se um pequeno acréscimo na proliferação das células após seis horas de irradiação, com aumento mais significativo após 48 horas. Isso pode ser explicado justamente pelos diferentes níveis de absorção da luz laser pelos vários tipos de cromóforos que se localizam em estruturas específicas das células.

Observou-se nestes resultados uma situação diferente da relatada no experimento anteriormente citado. Para a linhagem celular Hep.2 a luz polarizada também promoveu um aumento na viabilidade celular até o período de 12 horas, porém, após a segunda iluminação que ocorreu no período de 48 horas, não houve aumento na proliferação celular em ambos os grupos, ocorrendo uma estabilização. Após 48 horas manteve-se o ciclo celular padrão para esta linhagem.

O efeito proliferativo em linhagens de células Hep.2 utilizando-se da FBML, nos comprimentos de onda de $\lambda 670$ nm com dosagens variando de $0,04\text{J}/\text{cm}^2$ a $4,8\text{J}/\text{cm}^2$ foi

observado em alguns estudos. (PINHEIRO et al., 1998; PINHEIRO et al., 2000; PINHEIRO et al., 2002a, 2002b). Os autores concluíram que a dosagem e o comprimento de onda são fatores que podem influenciar no processo proliferativo das células Hep.2, haja vista que o comprimento de onda de $\lambda 670\text{nm}$ com as respectivas doses utilizadas mostraram aumento no efeito proliferativo das células. Estes resultados corroboraram com o presente experimento no sentido de que se observou um aumento na viabilidade ao final da experimentação.

A comparação da viabilidade celular de culturas Hep.2 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada mostra que o tratamento significativamente influenciou na viabilidade celular. Nas culturas não iluminadas apenas o tempo exerceu influência na proliferação das células, enquanto nas culturas iluminadas com a luz polarizada ocorreu um aumento da proliferação celular nas primeiras 12 horas. Nas culturas tratadas houve uma estabilização do número de células após o período de 48 horas, quando ocorreu a segunda iluminação, concluindo-se que o segundo tratamento não influenciou na proliferação celular. Essa estabilização ocorreu em função do seguimento do ciclo celular normal deste tipo de célula.

Outras linhagens de células neoplásicas foram utilizadas por pesquisadores com o objetivo de verificar a proliferação celular frente à ação da FBML. Em experimentos realizados com células de carcinoma KB por Castro et al. (2005) e por Karu (1989) em células HeLa utilizando-se a FBML, os autores observaram também que a viabilidade celular nas células irradiadas foi considerada significativa, ou seja, o tratamento com o laser exerceu influência na proliferação, assim como no presente experimento.

Karu et al. (1987), observaram o crescimento exponencial de células HeLa com a utilização do laser de He-Ne com fluência em $100\text{J}/\text{cm}^2$. Constatou-se que durante as primeiras três e quatro horas após irradiação houve um aumento do número de células seguido por diminuição para o nível de células não irradiadas. Este fato não corroborou com as presentes observações quando evidenciou-se neste experimento a diminuição da proliferação

celular na linhagem Hep.2 em ambos os grupos (iluminado e não iluminado) nas primeiras seis horas com subsequente aumento nas próximas seis horas. Isso provavelmente ocorreu devido às diferenças das doses aplicadas.

Hrnjak et al. (1995) e Almeida-Lopes et al. (2001) realizaram estudos utilizando-se culturas de fibroblastos gengivais tratados com a FBML, com fluência de $2\text{J}/\text{cm}^2$, para observação da proliferação. Concluiu-se que a fluência de $2\text{J}/\text{cm}^2$, tanto quando utiliza-se a luz vermelha ($\lambda 670\text{nm}$) ou a infravermelha ($\lambda 780\text{nm}$), é capaz de estimular a proliferação de fibroblastos. Estes resultados coincidem com o atual experimento, já que a linhagem L929 teve aumento de sua proliferação com o emprego de baixa dose de energia e a luz polarizada está dentro do espectro de ambos comprimentos de onda. Com relação aos efeitos da luz polarizada na proliferação de fibroblastos, estudos relatam que esta é mais intensa após 24 horas de iluminação, depois começa a diminuir (72 horas) (KREISER et al., 2002; PINHEIRO; POZZA; OLIVEIRA, 2005). No presente experimento, verificou-se que a luz polarizada também promoveu o aumento da proliferação das células L929 (grupo iluminado) após 24 horas, concordando com os resultados anteriores.

A comparação da viabilidade celular de culturas L929 não iluminadas e iluminadas com a luz polarizada mostra que o tratamento exerceu influência na viabilidade celular, sendo que o fator tempo foi mais significativo dentro de cada grupo, não iluminado e iluminado, para aumentar a proliferação das células. Nas primeiras 12 horas observou-se que a iluminação com a luz polarizada promoveu um acréscimo no número de células. Após 48 horas, tempo correspondente à segunda iluminação, a viabilidade celular do grupo iluminado aumentou. O grupo não iluminado, que não sofreu tratamento, também apresentou acréscimo do número de células após 48 horas. A viabilidade de culturas celulares L929 não iluminadas e iluminadas foi quase a mesma ao final do experimento.

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada no presente estudo, é lícito concluir que o uso da luz polarizada em cultivos celulares de células Hep.2 e L929 resultou em um efeito fotobiológico, que, contudo, necessita de maior esclarecimento quanto aos mecanismos envolvidos, vez que, este trabalho é o primeiro a ser realizado com a metodologia.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 179-184, Feb. 2001.
- CARNEVALLI, C. M. M. et al. Laser light prevents apoptosis on cho-1 cell line. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 21, n. 4, p. 193-196, 2003.
- CASTRO, J. L. F. et al. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an *in vitro* study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 6, p. 586-589, 2005.
- COLIN, J.; FUNCHS, E. Intercellular adhesion, signaling and the cytoskeleton. **Nature Cell Biol**, v. 4, p. 101-108, Apr. 2002.
- DEDOV, V. N.; COX, G. C.; ROUFOGALIS, B. D. Visualization of mitochondria in living neurons with single and two-photon fluorescence laser microscopy. **Micron**, v. 32, p. 653-660, 2001.
- DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J. A. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fc receptor-mediated phagocytosis in swanson. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 402-411, 2002.
- DÖRTBUDAK, O.; HASS, R.; MAILATH-POKORNY, G. Bioestimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. **Clin. Oral Impl. Res.**, v. 11, p. 540-545, 2000.
- DOULE, C. et al. Video rate depth-resolved two-dimensional imaging through turbid media by femto-second parametric amplification. **Opt. Lett**, v. 25, p. 353-355, 2000.
- DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and tissue culture laboratory procedures in biotechnology**. Chichester: John Willey and Sons, 1998. 332p
- FREITAS, A. C.; PINHEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, M. G. Assessment of the behavior of myofibroblasts on scalpel and CO₂ laser wounds: a immunohistochemical study in rats. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, v. 20, p. 221-225, 2002.
- GERBI, M. E. M. et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 4, p. 382-388, 2005.
- HRNJAK, M.; KULJIC-KAPULICA, N.; BUDISIN, A.; GISER, A. Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts *in vitro*. **Vojnosanit Pregl**, v. 52, n. 6, p. 539-546, Nov./Dec. 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices**. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva, 1999.

IORDANOV, P. et al. Effect of polarized light in the healing process of pressure ulcers. **Intern. J. of Nursing Practice**, v. 8, p. 48-55, July 2002.

JACQUES, S. L.; ROMAN, J. R.; LEE, K. Imaging Superficial Tissues with Polarized Light. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 119-129, 2000.

JIÃO, S.; YAO, G.; WANG, L. V. Depth-resolved two-dimensional stokes vectors of backscattered light and Mueller matrices of biological tissue measured with optical coherence tomography. **Appl. Opt.**, v. 39, p. 6318-6324, 2000.

KARU, T. I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys**, v. 56, p. 691-704, 1989.

KARU, T. **Lasers in medicine and dentistry**: basic science and up-to-date clinical application of Low Energy-Level Laser Therapy - LLLT . Croatia: Vitagraf, 2000. 530 p.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low power therapy. **IEEE j. Quantum Elect.**, v. 23, n.10, p.1703, 1987.

KARU, T. Effects of visible (laser) radiation on cultured cells. **Photochem. Photobiol.**, v. 52, p. 1089-1099, 1996.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near - IR radiation on cells. **J Prothrochem Photobiol**, v. 49, p. 1-17, 1999.

KARU, T.; BAKEEVA, L. E.; MANTEIFEL, V. M. **Could irradiation with monochromatic light of visible spectral region cause genetic effects?** 2003. Disponível em: <<http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/karu/index.html>>. Acesso em: 20 jul. 2006.

KERTESZ, I.; FENYO, M.; MESTER, E.; BATHORY, G. Hypothetical physical model for laser bioestimulation. **Optics Laser Technol.**,v. 14, p. 31-32, 1982.

KIPSHIDZE, N. et al. Low-power helium:neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells *in vitro*. **Lases Surg. Med.**, v. 28, p. 355-364, 2001.

KOUTNAM, M.; JANISCH, R.; VESELSKA, R. Effects of low-power-laser irradiation on cell proliferation. **Scripta Medica (BRNO)**, v. 76, n. 3, p. 163-172, June 2003.

KREISLER, M. Effect of diode laser irradiation effects on the attachment rate of periodontal ligament cells: an *in vitro* study. **J. Periodontol**, v. 72, p. 1312-1317, 2001.

KREISLER, M. et al. Low-level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg. Med**, v. 30, p. 365-369, 2002.

LOPES, L. A. et al. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and some fluence. **Lasers Surg Med**, v. 29, p. 179-184, 2001.

MIODRAG, M. C. et al. The use of polarized light in Asthetic Surgery. **Aesth Plast Surg**, v. 28, p. 324-327, 2004.

MOLECULAR PROBE. **MitoTracker and MitoFluor mitochondrion selective probes**. Eugene (OR): Molecular Probes, 2002. (MP07510).

MONSTREY, S. et al. A conservative approach for deep dermal burns wounds using polarized-light therapy. **British J. of Plast. Surg**, v. 55, p. 420-426, Apr. 2002b.

MONSTREY, S. et al. The effect of polarized light on wound healing. **Eur. J. Plast. Surg**, v. 24, p. 377-382, Nov. 2002a.

MOORE, A. E.; SABACHEWSKYL, L.; TOOLAN, H. W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. **Cancer Research Philod**, v. 15, p. 598-602, 1955.

MOSNANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

NASCIMENTO, P. M., et al. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 6, p. 513-518, 2004.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of interleukin-1 β production and gene expression in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 16, p. 218-233, 2001.

ORTIZ, M. C. S., et al. Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os tecidos biológicos - parte 2. **Fisioter. Brasil**, v. 2, n. 6, p. 337-352, 2001.

PINHEIRO, A. L. B. **Comparison of tissue damage and healing in scalpel and CO₂ laser mucosal wounds**. (Doctoral dissertation). Birmingham, UK: University of Birmingham, 1993.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effects of LLLT on the proliferation of Hep-2 cells: study *in vitro*. **Lasers Dent**, v. 6, p. 75-81, 2000.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effects of Low Level Laser Therapy on Malignant cells: In vitro study. **Journal of Clinical Laser Medicine e surgery**, v. 20, n. 1, p. 23-26, 2002b.

PINHEIRO, A. L. B., et al. Does LLLT stimulate laryngeal carcinoma cells? An in vitro study. **Braz Dent. J.**, v. 13, n. 2, p. 109-112, 2002a.

PINHEIRO, A. L. B.; LIMEIRA JÚNIOR, F. A.; GERBI, M. E. M. Effect of 830 nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v. 21, n. 6, p. 383-388, 2003.

PINHEIRO, A. L. B.; POZZA, D. H.; OLIVEIRA, M. G. Polarized light (400 - 2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 2, n. 5, p. 485-492. 2005.

PINHEIRO, A. L. B.; GERBI, M. E. M. Photoengineering of bone repair processes. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 2, p. 169-78, 2006.

PINHEIRO, A. L. B.; SILVA MEIRELES, G.C.; CARVALHO, C.M.; VIEIRA, A.L.; SANTOS, J.N.; RAMALHO, L.M. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 116-24, 2006.

RIBEIRO, M. S.; SILVA, D. F. T.; ARAÚJO, C. E. N. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns. **A Light Microscopy Study**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2004.

RIGAU, I.; MAS, J. **Accion de la luz laser a baja intensidad**. Referências en la modulacion de la function celular. Virginia: Universitat Rovira, 1996. 211p.

RUSAN, M. N.; FAGERSTROM, A. M. C.; WADSWORTH, P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein- β tubulin. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, p. 971-980, 2001.

SCMINDL, A. et al. Low intensity laser therapy: a review. **J. Inv. Med.**, v. 48, n. 5, p. 312-326, 2000.

SILVA JÚNIOR, A. N. et al. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 20, p. 83-87, 2002.

SIMIC, A. Importance of Bioptron light therapy in the treatment of surgical incisions. BALKAN CONGRESS FOR PRAS AND BIOPTRON SATELLITE SYMPOSIUM, Second. Belgrade, 24-26 May 2001.

SUND, S. E.; AXELROD, D. Actin dynamics at the living cell submembrane imaged by total internal reflection fluorescence photobleaching. **Biophys J.**, v. 79, p. 1655-1669, 2000.

TAKEMA, T.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Reduction of plasminogen activator activity stimulated by lipopolysaccharide from periodontal pathogen in human gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v. 15, p. 35-42, 2000.

TORRICELLI, P. et al. Laser bio-stimulation of cartilage: *in vitro* evaluation. **Biomed. Pharmacother**, v. 55, p. 117-120, 2001.

TUNER, J.; HODE, L. It's all in the parameters: a critical analysis of some well-known negative studies on low-level laser therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

TUNER, J.; HODE, L. **Laser therapy**: clinical practice and scientific background. Tallinn: Prima Books, 2004.

WALKER, M. D. et al. Effect of low intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation - impaired wound - healing model in human skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 41-47, 2000.

WERNECK, C. E. et al. Laser light is capable of inducing proliferation of carcinoma cells in culture: a spectroscopic in vitro study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 3, p. 300-303, 2005.

WILDIN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to mitochondrial energy transfer. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 16, p. 159-165, 1998.

XUEDING, W.; LIHONG, V. W. Polarized light propagation through scattering media: time-resolved Monte Carlo simulations and experiments. **Journal of Biomedical Optics**, v. 8, n. 4, p. 608-17, Oct. 2003.

XUEDING, W.; LIHONG, V. W. Propagation of polarized light in birefringent turbid media: a Monte Carlo study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 7, n. 3, p. 279-90, July, 2002.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo n.º A014/2006/CEP, intitulado “Efeito de um sistema de luz polarizada (400 a 2000 nm) sobre culturas celulares neoplásicas e não neoplásicas”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Luiz B. Pinheiro, está de acordo com a Lei 11977/2005 (SP), os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/1991), e as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais (Lei 6638/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 20 de junho de 2006.

PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)