

AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR SOB ESTRESSE NUTRICIONAL E APLICAÇÃO DA BIOESTIMULAÇÃO

Karina Carvalho de Oliveira¹, **Ana Paula Legnaro Furcin**², **José Fabio Gimenez Moraes Rodrigues**³, **Luis Gustavo Zamarrenho**⁴, **Bruno Gonçalves de Oliveira**⁵, **Antônio Balbin Villaverde**⁶, **Cristina Pacheco Soares**⁷
Marcos Tadeu Tavares Pacheco⁸

¹ - Faculdade de Ciências da Saúde – FCS, Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12244-000- São José dos Campos – SP. Rua Santa Fé, 153 – Vista Verde, 12223-340 – São José dos Campos – SP, karina@univap.br

²⁻⁵ - Faculdade de Ciências da Saúde -FCS , Universidade do Vale do Paraíba. Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, 12244-000- São José dos Campos – SP – Brasil – aninha@univap.br, ze_ana@hotmail.com, gu_tf@bol.com.br, bruno.gon@bol.com.br

⁶⁻⁸ - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D. Universidade do Vale do Paraíba, Av. Shishima Hifumi, 2911- Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos - SP- Brasil – balbin@univap.br, cpsouares@univap.br, mtadeu@univap.br

Palavras-chave: Espectrofotometria, Laser de Baixa Potência, Técnica de MTT.

Área do Conhecimento: Ciência Biológicas

Resumo - A espectrofotometria nos permite realizar leitura em microplacas de cultura celular e tem como sua auxiliar a técnica de MTT um teste que avalia a atividade mitocondrial de células viáveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o limiar de sobrevivência da linhagem celular Hep-2 em diferentes concentrações de SFB, um dos fatores de crescimento celular, e realizar a bioestimulação com laser de baixa potência. Foram cultivadas 3 microplacas de 96 poços suplementado com diferentes concentrações de SFB, uma das placas teve sua leitura em 24hs e as duas outras em 48hs de estresse nutricional sendo uma delas irradiada pelo laser de baixa potência. Os resultados demonstram que em 24hs ocorreu o início do ciclo celular, em 48hs houve uma proliferação celular até a concentração de 2% de (SFB), e na placa irradiada após 48hs de estresse nutricional observou-se uma otimização na proliferação celular em relação ao grupo controle. As células incubadas em concentrações decrescentes de soro apresentaram uma sobrevida, com proliferação celular considerada ótima, até a concentração de 2% de (SFB). As células bioestimuladas com laser de baixa potência, obtiveram uma atividade mitocondrial maior.

Introdução

1. Espectrofotômetro

Um espectrofotômetro é um aparelho que faz passar um feixe de luz monocromática através de uma solução, e mede a quantidade de luz que foi absorvida por ela, uma vez que a quantidade de luz absorvida está relacionada com a concentração da substância.[1]

O aparelho separa a luz em feixes com diferentes comprimentos de onda. Pode-

se assim fazer passar através da amostra um feixe de luz monocromática. O espectrofotômetro permite-nos saber que quantidade de luz é absorvida a cada comprimento de onda, onde baseia-se na absorção da radiação nos comprimentos de onda entre o ultravioleta e o infravermelho.[2]

2. Laser

Para compreender a interação da radiação laser com o tecido biológico é

necessário levar em consideração as propriedades ópticas do tecido, o comprimento de onda da radiação de excitação, a densidade de potência (irradiância) e de energia (fluência) entregues a este tecido. Com estes parâmetros, todos os possíveis efeitos causados pela radiação no tecido podem ser previstos através de modelos físicos e matemáticos levando-se em consideração as principais variáveis biológicas tais como, tipo de célula, perfusão sanguínea, condução térmica, entre outras.[3]

O estudo *in vitro*, utilizando cultura de células primárias tem apresentado resultados satisfatórios, embora a quantidade de material em cultura seja pequena. Através da observação da morfologia celular, dos efeitos na membrana, da atividade celular e do índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular. Além destas vantagens, a realização de ensaios em culturas de células apresenta os seguintes recursos: resposta imediata ou de curto prazo, tais como alterações na permeabilidade de membrana ou perturbação de vias metabólicas; e sobrevivência em longo prazo.[4]

A célula possui um limiar de sobrevivência, que depende de sua linhagem e do seu estado fisiológico. Quando se trabalha respeitando o limiar de determinada célula, oferecendo uma baixa intensidade de potência do laser, a energia fornecida será utilizada pela própria célula de maneira a estimular sua membrana ou suas mitocôndrias. Desta forma, a célula será induzida a biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, a isso se denomina Laser Terapia de Bioestimulação, com Laser de Baixa Potência.[4]

3. MTT

Medidas da viabilidade das células e formas de proliferação é base para inúmeros ensaios *in vitro* da resposta aos fatores externos da população celular. A redução dos saltos do tetrazolium é amplamente aceito como um caminho de confiança para examinar a proliferação celular. O tetrazolium MTT amarelo (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) é reduzido ativando metabolicamente as células, parte pela enzima desidrogenase para gerar reduções equivalentes tanto no NADH

quanto no NADPH. O resultado intracelular roxo pode ser solubilizado e quantificado por meio de um espectrofotômetro.[5]

O reagente MTT permite baixos valores de absorvância na ausência de células. Para cada tipo de célula a relação linear entre número de células e o sinal produzido são estabelecidos, isto permite uma quantificação de mudança nas taxas de proliferação celular.[5]

Valores de absorvância que são mais baixas do que o controle de células indica a redução da taxa de proliferação celular. Ao invés disso, alta taxa de absorvância indica um crescimento na proliferação celular. Raramente um crescimento na proliferação pode ser por morte celular; uma evidência da morte celular é a transformação morfológica.[5]

OBJETIVO

Utilizar o método de diagnóstico Espectrofotometria para avaliar a curva de crescimento celular, verificando o limiar de sobrevivência dessa linhagem em diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (SFB) e realizar a bioestimulação com laser de baixa potência, nestas células aplicando a técnica de MTT.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultura de Células

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi Hep-2 (carcinoma de laringe humana). Foram cultivadas 3 microplacas de 96 poços em meio de cultura Mínimo Essencial – MEM (Gibco) suplementado com diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino – SFB, 1% de antibiótico *Antibiotic Antimycotic* (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C (estufa de CO₂ marca Forma Scientific).

1.1 Manutenção da Cultura Celular

Foram plaqueadas 3 microplacas de cultura, contendo 1ml de cultura de células (10⁶ células/ml), adicionando-se 2 ml de meio de cultura MEM, enriquecido com 10% SFB. As células foram mantidas na estufa com controle automático de temperatura 37°C. O crescimento celular foi acompanhado por

meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40.

Após 24 horas as células receberam diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (10%; 7,5%; 5%; 3,5%; 2%; 0,5%), voltando a serem incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por mais 24 horas.

1.2 Irradiação

As células Hep-2 de uma das placas foram irradiadas no escuro, utilizando um aparelho clínico portátil diodo laser 685 nm semiconductor Thera Lase – DMC, com meio ativo de fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAIP). Incubou-se as células após a irradiação por mais 24 horas.

Parâmetros	Valores para placa de 96 poços
Comprimento de Onda	685 nm
Aparelho	Thera Lase – DMC
Dose de Energia	0,5 Jcm ²
Densidade de Potência	20 mW
Área	0,8 cm ²
Tempo	21 segundos
Distância da fibra	1cm

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para irradiação.

1.3 Teste de MTT

Após o período de incubação as células foram submetidas ao tratamento de MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) onde se adicionou 1ml, uma concentração final de 0,5 mg/ml de MTT-formazana deixando-as incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ no escuro. Sobre os precipitados de formazana adicionou-se o solvente orgânico DMSO (1ml) em cada poço. A placa foi mantida sob agitação para a solubilização dos cristais de formazana por 30 minutos. A leitura foi feita após um período de 24 horas em uma microplaca de cultura e após 48 horas nas duas outras microplacas sendo uma delas a irradiada pelo laser de baixa potência

A leitura da absorbância, foi realizada no leitor de ELISA Spectra Count, que emite os dados em tempo real, tira a média da absorbância dos poços.

Após este tratamento os resultados foram plotados no programa GraphPad Prism com média e desvio padrão.

RESULTADOS

Observa-se pelo gráfico que após 24 horas de cultivo as células estão iniciando seu ciclo celular e após o período de 48 horas observou-se proliferação celular até a concentração de 2% de Soro Fetal Bovino.

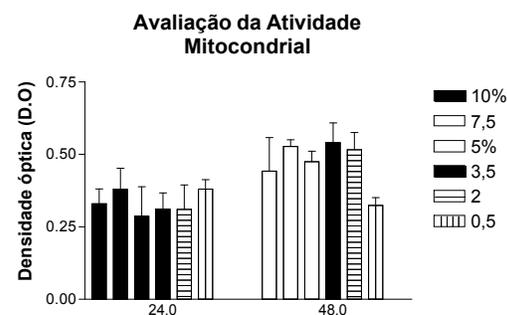


Gráfico 1 – Leitura espectrofotométrica de células após 24 e 48 horas de estresse nutricional.

Neste gráfico o resultado dos grupos irradiados demonstra que na concentração de 0,5% de soro concentração houve uma otimização na proliferação celular em relação ao grupo controle.

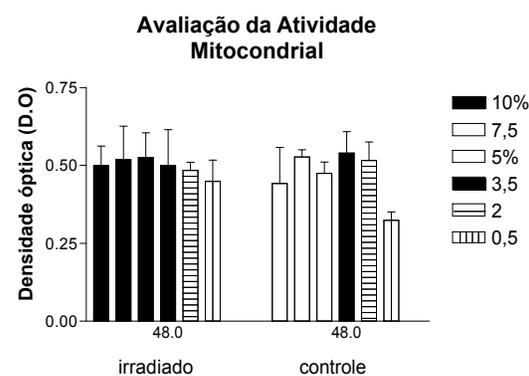


Gráfico 2 – Leitura espectrofotométrica de células irradiadas e não irradiadas após 48 horas de estresse nutricional.

Discussão e Conclusão

Com a utilização da Espectrofotometria e através da técnica do MTT, um teste que avalia a atividade mitocondrial de células viáveis, pode-se analisar o tempo de sobrevida da linhagem celular Hep-2, sob estresse nutricional com deprivação de soro fetal bovino, um dos fatores de crescimento celular.

As células incubadas em concentrações decrescentes de soro apresentaram pelo teste do MTT uma sobrevida, com proliferação celular, considerada ótima, até a concentração de 2%, havendo um declínio na concentração de 0,5% como mostra o gráfico 1. Quando as células são submetidas ao stresse nutricional e bioestimuladas com laser de baixa potência, podemos observar uma otimização na proliferação celular na concentração de 0,5% de soro (gráfico 2). Tal resultado vem demonstrar que se trabalharmos com concentrações muito baixas de soro, poderemos obter melhores resultados no processo de bioestimulação, obtendo uma atividade mitocondrial maior em relação a concentrações de 10 a 2% de soro.

As diferenças observadas nestas concentrações em relação ao grupo não irradiado, demonstram que as células frente a uma concentração de soro maior que 0,5% são bioestimuladas também, porém a bioestimulação é mais evidente em 0,5% de SFB. Assim para avaliação da bioestimulação *in vitro* de células Hep-2 a melhor concentração de soro é 0,5%.

Avaliações de outras linhagens são necessárias uma vez que cada tipo celular apresenta características próprias e podem não responder tão bem quanto a linhagem Hep-2.

Referências

- [1] "Photographic Chemistry Laboratory: 5 Spectrophotometry and Beer's Law": - http://www.rit.edu/~bekpph/Chemistry/5_Spectrophotometry.html (teoria e prática da espectrofotometria quantitativa) Acessado em 24/06/2004.
- [2] "Spectrophotometry": Disponível em: <http://fig.cox.miami.edu/~ddiresta/bil256/Lab1.htm> .Acessado em 15/06/2004.
- [3] LUBART, R., et al. Effets of visible and near-infrared lasers on cell culture. J. Photochem. Photobiol. B: Biol 1. v. 12, p.305-310, 1992.
- [4] MARTINES, N.S. Avaliação do Processo de Morte Celular Após Terapia Fotodinâmica. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.
- [5] Técnica de MTT . Disponível em: <http://www.atcc.org/searchcatalogo/ALLcollections.cfm> Acessado em 20/06/2004.