Irradiação controlada de cultura celular de macrófagos em estudos de bioestimulação

João C. A. Oliveira*, João H. Clerici, Aline S. Berti, Hernandes F. de Carvalho, Mônica A. Cotta.

Resumo

Este projeto teve como objetivo testar e sistematizar a irradiação controlada de culturas celulares de macrófagos da linhagem RAW 246,7 por luz advinda de LEDs com pico de emissão no infravermelho próximo, 850 nm. Foram feitos experimentos a partir de protocolos de irradiação, objetivando observar mudanças na atividade de mitocôndrias através de microscopia de fluorescência. Até o momento, porém, não foi observado nenhum tipo de bioestimulação das células com o único protocolo testado.

Palavras-chave:

Bioestimulação, LLLT, Macrófago.

Introdução

A fototerapia é uma forma de tratamento médico que consiste na irradiação de luz em tecidos biológicos. Em especial, a terapia com lasers e LEDs de baixa potência (LLLT) já é amplamente utilizada no meio médico e até fisioterápico, principalmente por ser uma técnica não invasiva e de fácil aplicação. Neste projeto foram irradiadas culturas celulares de macrófagos da linha RAW 246,7 (ATCC® TIB-71™) com o objetivo de analisar atividade de suas mitocôndrias e movimentação celular pós-irradiação, para assim determinar associação com possível estimulação decorrente da deposição de energia pela luz nas células.

Resultados e Discussão

A primeira parte deste projeto consistiu na familiarização com as diversas técnicas, de cultivo de células e de microscopia, além de pequenos ajustes realizados no equipamento desenvolvido em projeto de iniciação anterior, apresentado na Fig. 1. Na segunda foram planejados e realizados alguns experimentos com as células cultivadas e posteriormente analisados seus resultados. A irradiação foi realizada uma única vez, com base em protocolos observados na literatura [1], logo antes da análise e constituía de iluminar as células, em um campo com área de aproximadamente 0,5 cm², a 2 cm de distância da lente, com fluência energética de 3 J/cm², potência de 2 mW e tempo total de irradiação de 11 minutos.

Figura 1. Montagem óptica produzida por impressora 3D composta por um LED e uma lente plano-convergente durante irradiação.

Por fim, todos os experimentos realizados nesse projeto foram feitos no mínimo duas vezes com duplicata das células de controle e irradiadas. Foram feitos dois experimentos principais, o primeiro deles teve como propósito obter imagens de fluorescência das mitocôndrias e núcleos marcados, em vermelho e azul,

respectivamente, mostrada na Fig. 2(A), para a partir delas contar as mitocôndrias das células e obter uma análise estatística comparando as células irradiadas com o controle. O resultado dessa comparação para um número grande de células pode ser observado na Fig. 2 (B), que não apresenta diferença significativa, considerando a barra de erro das medidas.

Figura 2. À esquerda imagem de fluorescência dos macrófagos estudados obtida com o microscópio confocal invertido Zeiss LSM880 com Airyscan. À direita gráfico de intensidade relativa à contagem de mitocôndrias em unidades arbitrárias para células irradiadas e controle.

Já o segundo experimento consistia em fazer imagens de *time lapse* de aproximadamente um dia com um microscópio óptico invertido com o propósito de comparar reprodução celular e mobilidade celular das células irradiadas com as não-irradiadas. Porém esse experimento ainda não foi realizado com sucesso, pois não foram obtidas as condições ideais para controle da densidade de células na placa, importante para a análise comparativa que deve ser realizada.

Conclusões

Não foi possível observar efeitos de bioestimulação a partir dos experimentos realizados até então. Porém novos experimentos serão realizados para comparar a resposta das células ao longo do tempo após a irradiação. Subsequentemente serão variados alguns parâmetros da irradiação, como a potência, fluência energética e possivelmente aumentar o tempo de irradiação.

Agradecimentos

Agradecemos o Prof. Hernandes de Carvalho do Instituto de Biologia da Unicamp por ceder as células e a sala de cultivo delas para trabalho e ao INFABIC da Unicamp pela assistência e acesso aos equipamentos.

[1] Souza NHC, Ferrari RAM, et al. Effect of low-level laser therapy on the modulation of the mitochondrial activity of macrophages. *Braz J Phys Ther.* Vol.18, 308-314 (2014), <http://dx.doi.org/10.1590/bjpt-rbf.2014.0046>