UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELLY LORRAINE MONTINA CALOR

Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização cutânea: estudo in vitro

Ribeirão Preto

2021

DANIELLY LORRAINE MONTINA CALOR

Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização cutânea: estudo in vitro

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Médica -
Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey
Cipriani Frade

Ribeirão Preto
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Calor, Danielly Lorraine Montana

Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização cutânea: estudo in vitro. Ribeirão Preto, 2021.

109 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica: Investigação Biomédica.

Orientador: Frade, Marco Andrey Cipriani.

1. Cicatrização. 2. Fototerapia. 3. LED Âmbar. 4. LASER.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CALOR, Danielly Lorraine Montana

Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização cutânea: estudo in vitro

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Programa de Pós Graduação em Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico, em especial, para a minha avó paterna **Adilma Gaioli Calor** e tia **Vera Maria Calor** (*In memoriam*). Duas mães que Deus me deu de presente e que me amaram muito e me cuidaram. Também tive a honra de retribuir esse cuidado e amor, mas infelizmente durante a trajetória deste trabalho cumprimos lindamente sua missão neste plano e partiram para a luz. Sou grata pelo ser humano que me tornei através de tudo que fizeram por mim e levo vocês como minha força e inspiração para toda vida.

Aos meus pais, que sempre torceram e acreditaram em mim. Incentivaram sempre os meus estudos e me deram o melhor que podiam em todos os momentos da vida. Vocês são a minha paz, a minha força diária e a luz dos meus dias.

Ao meu avô **Euclides**, que sempre me incentivou a estudar e sempre se alegrou com as minhas conquistas. Fico feliz de poder dar orgulho à você com essa conquista.

“E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que derramou sobre minha vida nessa trajetória. Por seu infinito amor e misericórdia manifestados e pela força, coragem, fé e saúde para concluir este trabalho. **“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é dele a vitória alcançada em minha vida”**

Aos meus pais, **Wagner e Eliana**, que iluminam meu caminho com o coração cheio de amor e paciência, pela compreensão, por aceitarem e apoiarem a minha escolha neste caminho. As palavras não são suficientes para descrever todo o amor que sinto por vocês, muito obrigada por vocês sonharem comigo, acreditarem em mim. Por todas as orações e bênçãos que enviam diariamente. Amor e gratidão.

Ao meu esposo, namorado, amigo e confidente **Antônio Carlos**. Agradeço por todo apoio, paciência e incentivo. Você sempre me estimulou a acreditar que tudo daria certo e que tudo ficaria bem. Obrigada por seu amor e por todo reconhecimento. A vida fica mais leve quando amamos e somos amados.

Ao meu irmão **Danilo** por sempre querer o meu bem, me estimular a estudar e reconhecer as minhas conquistas.

Ao **Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade** por ter aceitado me orientar, me ouvir com paciência, ter confiado em mim e por juntos idealizarmos este projeto com questionamentos, opiniões e desafios. Obrigada pelas idéias, trocas, aprendizado e pelo entusiasmo com os resultados obtidos. Sempre nos incentivou a olhar para nosso trabalho com orgulho e ver a importância de se trabalhar com seriedade e ciência. É uma honra ser sua aluna e ser orientada por você.

A minha amiga e companheira de laboratório **Natália Aparecida de Paula** que foi o maior presente que pude receber de Deus para me apoiar, ajudar e incentivar durante toda a minha pesquisa. Gostaria de agradecer por nos fazer amar o nosso trabalho. Nos dias mais difíceis, você colocava brilho nos meus olhos. Sempre me incentivou a pensar, discutir possibilidades, olhar para as situações com

mais leveza e sempre foi muito presente em cada etapa me auxiliando em tudo que eu precisei. Minha menina “Eisten”, levarei você por toda vida em meu coração. Eu admiro muito você. Você fez os dias serem mais leves. Gratidão.

A minha amiga **Flávia Assunção** que sempre esteve presente em minha vida nos momentos mais difíceis com um sorriso no rosto, um abraço e muito incentivo. Obrigada por acreditar em mim, por todo companheirismo, dedicar seu tempo a me ajudar em tudo que precisei. Só agradeço por ter um ser humano tão especial em minha vida. Sua amizade é um presente de Deus.

A minha amiga **Gislaine Marques** que o mestrado me deu de presente para a vida. Sempre senti um carinho muito grande por você e que ao longo da caminhada se tornou amor. E amor de amigos nunca morre. Obrigada por todo apoio e incentivo, horas de conversas, por estar presente nos momentos difíceis e mesmo com a distância, fazer questão de ser presente.

Ao doutorando e amigo **Marcel Nani Leite** que foi sempre tão solícito em tudo que precisei durante toda a pesquisa. Que não mediu esforços para me ajudar e ensinar tudo que eu precisei e que me socorreu e ajudou nos meus dias mais difíceis. Serei eternamente grata por todo apoio e colaboração. Sem você esse trabalho não teria sido possível para mim pois através de tudo que me ensinou e ajudou é que fui capaz de concluir cada etapa.

A amiga e técnica do nosso laboratório **Maria Aparecida Nunes (Cici)** por sua inesgotável fonte de paciência, amor, incentivo, ajuda, apoio que sempre me fizeram seguir em frente e conseguir vencer cada etapa. Obrigada por ser tão presente, amorosa, carinhosa e como eu sempre digo “a mãe de todos nós” . Tudo que você ensina é com amor e humildade. Essa pesquisa não seria possível sem você ao meu lado me motivando, confiando em mim e me passando tranquilidade e tanto conhecimento. Você é um grande ser humano e eu vou ser grata e te amar sempre.

As companheiras de laboratório **Cynthia e Márcia**, que tornaram os dias mais alegres e leves com nossas conversas, risadas, apoio e incentivo mútuo.

A amiga **Francielle Guimarães** por todo incentivo e apoio em minha vida pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. **Luciano Backmann** do Laboratório de Dosimetria Óptica do Departamento de Física da FFCLRP por toda parceria e ajuda nas medidas e cálculos deste estudo.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento da Clínica Médica, por todo apoio e suporte que recebi desde meu processo seletivo, durante a etapa do mestrado até a conclusão. Agradeço, em especial a **Cris** secretária da Dermatologia e ao **Emérson** da secretaria da Pós Graduação por sempre serem solícitos, amáveis e dispostos a me ajudar e orientar em tudo que precisei.

A todos os meus amigos e familiares que de alguma forma me apoiaram e incentivaram meu sonho.

As instituições **CAPES/CNPQ e FAPESP** que financiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial - O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

CORA CORALINA

RESUMO

CALOR, Danielly Lorraine Montana. Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização cutânea: estudo in vitro. **2021. 109 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.**

Introdução: O processo de cicatrização cutânea consiste em um complexo evento que visa a restauração e homeostase teciduais. As úlceras crônicas constituem grande demanda no cotidiano clínico. A fototerapia por luzes de baixa potência (LASER) e não coerentes (LEDs) destacam-se como métodos bioestimuladores para o processo de cicatrização e reparo tecidual. Porém, encontramos poucas evidências científicas sobre a associação da fototerapia por LASER e LED.

Objetivo: avaliar a atuação da fototerapia LED Âmbar 590 nm e LASER Infravermelho 808 nm na cicatrização no modelo in vitro. **Métodos:** testes in vitro foram usados para avaliar a citotoxicidade da fototerapia isolada e associada em culturas de Fibroblastos NIH 3T3 e HaCaT (Queratinócitos humanos) pelo MTT (teste de citotoxicidade). Após o ensaio de *scratch assay* da fototerapia isolada e associada em fibroblastos e queratinócitos, dois grupos foram estabelecidos, sendo um submetido a estresse nutricional por baixa concentração de soro bovino fetal (2%) e outro sob condições normais (10%). Os resultados das culturas irradiadas com a fototerapia foram comparados aos das culturas não irradiadas. Foi padronizado um modelo de irradiação com fototerapia para os comprimentos de onda 590 nm e 808 nm de forma isolada e associada, seguindo todas as diretrizes atuais da WALT (Word association for photobiomodulation therapy). **Resultados:** O LED 590 nm isolado demonstrou melhor efeito na migração/proliferação no modelo *do arranhão* com queratinócitos HaCaT do que no modo associado. A fototerapia associada na cicatrização *in vitro* principalmente para célula HaCaT foi mais eficiente sobre as células em situação de estresse nutricional (soro bovino fetal a 2%). **Conclusão:** O comprimento de onda 590 nm (luz âmbar) estimulou migração/proliferação nas células irradiadas e demonstrou potencial de cicatrização principalmente nas culturas de queratinócitos tanto no modo isolado como associado.

Palavras-chave: Cicatrização; Fototerapia; LED Âmbar; LASER

ABSTRACT

CALOR, Danielly Lorraine Montana. Phototherapy 590 nm LED and 808 nm LASER in cutaneous healing: in vitro study. 2021. 109 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Introduction: The cutaneous healing process is a complex event aimed at tissue restoration and homeostasis. Chronic ulcers are in great demand in daily clinical practice. Phototherapy by low power (LASER) and non-coherent (LEDs) lights stand out as biostimulating methods for the healing process and tissue repair. However, we found little scientific evidence on the association of LASER and LED phototherapy.

Objective: to evaluate the performance of LED Amber 590 nm phototherapy and healing in the in vitro model. **Methods:** in vitro tests were used to evaluate the cytotoxicity of isolated and associated phototherapy in NIH 3T3 and HaCaT (Human Keratinocytes) Fibroblast cultures by MTT (cytotoxicity test). After the *scratch assay* of isolated and associated phototherapy in fibroblasts and keratinocytes, two groups were established, one submitted to nutritional stress due to a low concentration of fetal bovine serum (2%) and the other under normal conditions (10%). The results of cultures irradiated with phototherapy were compared to those of non-irradiated cultures. A model of irradiation with phototherapy was standardized for the wavelengths 590 nm and 808 nm in isolation and associated, following all current guidelines of the WALT (Word association for photobiomodulation therapy). **Results:** LED 590 nm alone showed better effect on migration/proliferation in the scratch model with HaCaT keratinocytes than in the associated mode. The associated phototherapy in in vitro healing mainly for HaCaT cells was more efficient on the cells under nutritional stress situation (fetal bovine serum at 2%) **Conclusion:** The wavelength 590 nm (amber light) stimulated migration/proliferation in irradiated cells and demonstrated healing potential mainly in keratinocyte cultures in both isolated and associated modes.

Keywords: Healing; Phototherapy; Amber LED; LASER

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem ilustrativa da epiderme	21
Figura 2- Imagem ilustrativa da derme e hipoderme	22
Figura 3- Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial	27
Figura 4- Espectro de Luz visível em nanômetros (nm)	35
Figura 5- Diferenças entre LED e LASER	36
Figura 6- Imagem ilustrativa da curva de dose-resposta- (Lei de Arndt Schultz)	37
Figura 7- Imagem Ilustrativa dos comprimentos de onda (nm) e a profundidade de ação nos tecidos.	38
Figura 8- Ação fotoquímica e foto-física do LASER.	46
Figura 9- Equipamento e aplicador do aparelho de fototerapia.....	48
Figura 10- Características técnicas aferidas dos comprimentos de onda 590 nm e 808 nm.	49
Figura 11- Medidas e Calibração do equipamento.....	50
Figura 12- Suporte de apoio padronizado para a manopla do equipamento.....	51
Figura 13- Modo de irradiação	52
Figura 14- Grupos, densidades de energia e tempos irradiados na fototerapia isolada.....	52
Figura 15- Grupos, densidades de energia e tempos irradiados fototerapia associada.....	53
Figura 16- Grupos das quantidades celulares testadas para viabilidade celular.....	54
Figura 17: Grupos das quantidades celulares testadas para teste de migração/proliferação.....	54
Figura 18- Esquema de quantificação da citotoxicidade.	57
Figura 19: Análise da interferência do meio de cultura DMEM X SALINA	60
Figura 20: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia isolada LED âmbar 590 nm sobre fibroblastos e queratinócitos.....	61
Figura 21: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia isolada LASER 808 nm sobre fibroblastos e queratinócitos.....	63
Figura 22: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia associada Led Âmbar 590 nm + Laser Infravermelho 808 nm sobre fibroblastos e queratinócitos.....	64

Figura 23: Migração/proliferação celular pelo método <i>Scratch Assay</i> com LASER Infravermelho 808 nm na 3T3	66
Figura 24- Imagens microscópicas fluorescente do ensaio <i>scratch assay</i> com Fibroblastos NIH-3T3 SBF 10%	66
Figura 25- Imagens microscópicas por fluorescência do ensaio <i>scratch assay</i> com Fibroblastos NIH-3T3 SBF 2%	67
Figura 26: Migração/proliferação celular pelo método <i>Scratch Assay</i> com LASER Infravermelho 808 nm no HaCaT	68
Figura 27- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com HaCaT SBF a 10%	68
Figura 28- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com HaCaT SBF a 2%	69
Figura 29- Migração/proliferação celular pelo método <i>Scratch Assay</i> com LED Âmbar 590 nm 3T3	70
Figura 30- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com fibroblastos 3T3 em SBF a 10%.....	70
Figura 31- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com 3T3 e SBF a 2%	71
Figura 32- Migração/proliferação celular pelo <i>scratch assay</i> com LED Âmbar 590 nm HaCaT	72
Figura 33- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com HaCaT SBF 10%	72
Figura 34- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com HaCaT SBF 2%	73
Figura 35- Migração/proliferação celular pelo <i>scratch assay</i> com fototerapia associada em 3T3	74
Figura 36- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com fototerapia Associada em 3T3 SBF 10%.....	74
Figura 37- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com fototerapia associada em 3T3 SBF 2%	75
Figura 38- Migração/proliferação celular pelo <i>scratch assay</i> com fototerapia associada HaCaT SBF 10%.....	76
Figura 39- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com fototerapia associada em HaCaT SBF 10%	77

Figura 40- Imagens microscópicas por fluorescência do <i>scratch assay</i> com fototerapia associada em HaCaT SBF 2%.....	77
Figura 41- Comparação da migração/proliferação celular pelo <i>scratch assay</i> em todos os grupos irradiados de forma isolada ou associada.....	78

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Principais fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial.....	29
---	----

LISTA DE SIGLAS

µl (microlitro)

µm (micrômetro)

ANVISA (Agência nacional de vigilância sanitária)

ATCC (*American Type of Culture Collection*)

ATP (adenosina trifosfato)

cm² (centímetros quadrados)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

CO₂ (dióxido de carbono)

COX (Citocromo C oxidase)

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO (dimetilsulfóxido)

DNA (Ácido desoxiribonucleico)

DE (densidade de energia)

FA (Fototerapia Associada)

EGF (*Epidermal Growth Factor*)

FGF (*Fibroblast Growth Factor*)

FMRP (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto)

HaCaT (Queratinócito Humano)

J (Joule)

LASER (Light Amplification Stimulated Emission Radiation)

LED (Light Emission Diodo)

LILT (LASER de baixa intensidade)

MEC (matriz extracelular)

mg (miligrama)

mL (mililitro)

mM (mili-molar)

mm² (milímetros quadrados)

MMP (Metaloproteinases)

NaCl (Cloreto de Sódio)

NI (Não irradiado)

NIH-3T3 (Fibroblastos)

Nm (nanômetro)

NO (Óxido nítrico)

OMS (Organização Mundial de Saúde)

°C (graus Celsius)

PBS (*Phosphate buffered saline*)

PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*)

PFA (Paraformoldeido)

pH (potencial hidrogeniônico)

RNA (ácido ribonucleico)

ROS (Espécies reativas derivadas de oxigênio)

RPM (Rotações por minuto)

TGF- α Fator de crescimento alfa)

TGF- β (Fator de crescimento beta)

TIMP's (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*)

TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

UFC (Unidade formadora de colônia)

USP (Universidade de São Paulo)

UV (Ultravioleta)

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Anatomia e morfofisiologia cutânea	20
2.2 Lesões cutâneas	23
2.3 Cicatrização.....	25
2.4 Cicatrização in vitro: cultura de células	30
2.5 Fototerapia	32
2.5.1 conceitos e parâmetros fundamentais da fototerapia	36
2.5.2 LED	38
2.5.3 LASER.....	39
2.5.4 Mecanismos moleculares e a fotobiomodulação.....	42
3. OBJETIVO	47
3.1 Objetivos específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Aspectos éticos	48
4.2 Equipamento	48
4.2.1 Características técnicas do equipamento.....	49
4.3 Padronizações.....	49
4.3.1 Fototerapia	49
4.3.2 Irradiação	50
4.3.3 Grupos irradiados e densidades de energia.....	52
4.3.4 A interferência do meio de cultura na receptividade da luz	53
4.3.5 Plaqueamento e quantidade de células.....	54
4.3.6 Estresse celular	55
4.4 Cultura celular	55
4.5 Atividade citotóxica.....	56
4.6 Avaliação da migração/proliferação celular – <i>scratch assay</i>	57
4.7 Análise estatística	59
5. RESULTADOS.....	60
5.1 Interferência do meio de cultura na receptividade da luz	60
5.2 Avaliação da viabilidade celular	61
5.2.1 Atividade citotóxica da fototerapia Isolada por LED Âmbar (590 nm) in vitro...61	
5.2.2 Atividade citotóxica da fototerapia Isolada por LASER Infravermelho (808 nm) in vitro.....	62
5.2.3 Atividade citotóxica da fototerapia Associada por LASER Infravermelho	

(808 nm) e LED Âmbar 590 nm in vitro	63
5.3 Avaliação da migração/proliferação celular – scratch assay	65
5.3.1 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de Fibroblastos 3T3 com LASER Infravermelho 808 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%.....	65
5.3.2 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de Queratinócitos HaCaT com LASER Infravermelho 808 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%.....	67
5.3.3 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de Fibroblastos 3T3 com LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%	69
5.3.4 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de Queratinócitos HaCaT com LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%.....	71
5.3.5 Avaliação da cicatrização após fototerapia Associada em cultura de Fibroblastos 3T3 com LASER Infravermelho 808 nm e LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%.....	73
5.3.6 Avaliação da cicatrização após fototerapia Associada em cultura de Queratinócitos HaCaT com LASER Infravermelho 808 nm e LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%.....	75
5.3.7 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada e associada em todos os grupos irradiados nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%	79
5.3.8 Avaliação da cicatrização após fototerapia associada em todos os grupos irradiados nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%	79
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÃO	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS.....	109
ANEXO 1-Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisado HCRP e FMRP-USP.....	109

*“Somente **você** pode tornar o sonho grande o bastante até que ele seja sua própria realidade”*

Raquel Vilela

1. INTRODUÇÃO

As principais funções da pele são proteção, regulação da temperatura corpórea e sensorial. Esse órgão extenso é composto por duas camadas, a epiderme e a derme. Logo abaixo dessa última tem-se a hipoderme, que embora não faça parte da pele confere a ela suporte e interação com os demais tecidos. (BARBOSA & LIMA, 2019).

A pele tem dentre suas principais funções a proteção dos tecidos subjacentes e a reserva de nutrientes (BAROLI, 2010).

Após sofrer algum tipo de lesão neste órgão, o organismo pode ficar susceptível à entrada de patógenos, às infecções e o desenvolvimento de úlceras crônicas de difícil tratamento (WERNER; GROSE, 2003; WARRINER, 2005).

Quando acontece uma lesão epitelial ocorre uma série de eventos que objetivam restabelecer a estrutura anatômica e a funcionalidade da região afetada. A reconstituição do tecido ocorre por eventos celulares promovendo a cicatrização e o reparo tecidual. Esses eventos podem ser classificados em: fase inflamatória, fase de proliferação e a fase de remodelagem (CARVALHO, 2003).

Na busca por novas formas tratamentos, a fototerapia tem se destacado como método fotobioestimulador para o reparo tecidual cutâneo e já é utilizada em tratamentos clínicos ou como suplemento de outros tratamentos (CAETANO *et al.*, 2009; KAVIANI *et al.*, 2011; MINATEL *et al.*, 2009). Porém, ainda não há relatos científicos do uso da fototerapia associada no modelo que este trabalho propõe nos comprimentos de onda 590 nm e 808 nm.

A fototerapia de baixa potência é um dos recursos para auxiliar a reparação tecidual, por meio de seus efeitos biomoduladores, considerando as variáveis presentes para este efeito, como, o comprimento de onda, fluência, densidade de energia, potência, tempo de tratamento e irradiância (TUNER; HODES, 2010).

A fotobiomodulação, ou terapia de baixa potência, é a utilização da luz de baixa intensidade não térmica com intuito de alterar e modular a função celular. Os emissores de luz, LASER ou LED, têm sido fontes de luz efetivas para a fotobiomodulação, demonstrando que não é somente o tipo da luz, mas os parâmetros de tratamento que determinam o sucesso terapêutico (WUNSCH; MATUSCHKA, 2014).

Desta forma, nesse estudo buscou-se avaliar a atuação da fototerapia isolada e associada (LED 590 nm e LASER 808 nm) avaliando citotoxicidade das densidades de energia (J/cm^2) e migração/proliferação celular no modelo in vitro, antecedendo sua aplicação e doses de energia seguras e eficazes para o uso na prática clínica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e morfofisiologia cutânea

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui como principal função isolar as estruturas internas do ambiente externo. A camada externa da pele é a epiderme, sendo avascular com espessura de 75 a 150 μm , sendo de 0,4 a 0,6mm de espessura na palma das mãos e planta dos pés, tendo como função principal, proteção contra agentes externos. Constituída de células epiteliais achatadas sobrepostas que as considerando de dentro para fora, estão dispostas em; germinativa ou basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (Figura 1) (DOMANSKY; BORGES, 2012). Cada estrato representa um estágio de diferenciação dos queratinócitos, que são as principais células que compõe a epiderme (LEITE, 2016).

É na camada mais interna que os queratinócitos se multiplicam na camada basal e migram para a superfície, processo que leva cerca de 30 dias, no qual as células vão sofrendo alterações e, em cada camada que passam, uma quantidade de queratina vai se acumulando, até perderem seu núcleo e, na altura do estrato córneo, onde as células são denominadas corneócitos sofrem seu processo de descamação natural (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

São vários os tipos de células que compõem a epiderme: os queratinócitos sintetizam queratina, proteína fibrosa filamentosa que dá firmeza à epiderme e a garante proteção, permeabilidade e a protege da desidratação, formando a camada córnea. Além dos queratinócitos, os melanócitos que são células responsáveis pela síntese de melanina, pigmento cuja função é proteção dos raios ultravioleta; as células de Langerhans, responsáveis pela ativação do sistema imunológico atuando como macrófagos contra partículas estranhas e microrganismos; e as células ou discos de Merkel, que estão presentes entre a epiderme e derme, ligando-se as

terminações nervosas sensitivas atuando como receptores de tato ou pressão (DOMANSKY; BORGES, 2012).

Figura 1- Imagem ilustrativa da epiderme

Fonte:(<http://angelicabeauty.blogspot.com/2008/11/epiderme-e-suas-camadas.html>).

A segunda camada da pele é a derme, sendo mais profunda, composta por tecido conjuntivo denso irregular. É uma camada cutânea presente entre a epiderme e o tecido subcutâneo, ricamente constituída por fibras de colágeno e elastina. É capaz de promover a sustentação da epiderme e tem participação nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo. A derme apresenta três regiões distintas: região superficial ou papilar, que mantém contato com a epiderme, é composta por tecido conjuntivo frouxo, com predominância de feixes de fibras colagenosas mais espessas, onduladas e em disposição mais vertical, possui pequenos vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, colágeno e elastina, corpúsculo de meissner, e tem função de fornecer nutrientes à epiderme; a segunda camada é a profunda ou reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras de colágeno mais espessas em disposições horizontais, formada pela base dos folículos pilosos, glândulas, vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, glicosaminoglicanas (GAGs), colágeno e elastina. Essa camada fornece oxigênio e nutrientes para a pele; e a terceira região é a adventicial, circundada por folículos pilossebáceos, glândulas e vasos, sendo

constituída por feixes finos de colágeno, e na derme estão presentes os anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, pelos e unhas (Figura 2) (OLIVEIRA, 2011; TASSINARY, 2019).

A hipoderme ou tela subcutânea, considerada um órgão endócrino, é formada principalmente por vasos sanguíneos e tecido adiposo. Constituídas por adipócitos, tem as funções de armazenar reserva energética, proteger contra choques, formar uma manta térmica e modelar o corpo (TASSINARY, 2019).

Pode-se observar, portanto, que cada camada tem sua própria relevância para a manutenção fisiológica geral do órgão (LEITE, 2016).

Figura 2- Imagem ilustrativa da derme e hipoderme

Fonte: (<https://afh.bio.br/sistemas/tegumentar/1.php>)

Qualquer evento que acarrete a perda da integridade da pele, caracterizando uma lesão, resulta no estímulo de mediadores celulares, bioquímicos e imunológicos que precisam agir harmoniosamente para restaurar o tecido lesionado (MASSON, 2011). Logo, o reparo cutâneo é essencial para sobrevivência do organismo e é realizado pelo processo de cicatrização cutânea.

2.2 Lesões cutâneas

Entende-se por lesões, a ruptura de tecido saudável, seja por meio de ação externa, como traumas ou cirurgias, ou ainda causas internas, como infecções e doenças crônicas. Acrescenta-se que, além de comprometer o funcionamento adequado da pele, elas podem afetar funções como a regulação da temperatura, o controle da perda de líquidos e a síntese de vitamina D (AGUIAR *et al*; 2015). Podem ser causadas também por alterações vasculares ou nervosas (O'TOOLE; MELLERIO, 2010). Lesões cutâneas também podem ser classificadas em relação ao agente etiológico, como traumas, práticas cirúrgicas, substâncias tóxicas, doenças autoimunes, infecções e isquemias, pressão, insuficiência arterial ou venosa (BARBOSA; LIMA, 2019).

As lesões cutâneas representam um problema de saúde pública significativo. Foram responsáveis por 8,5% de todas as mortes no mundo em 2015. Mundialmente, as lesões são a quarta principal causa de morte (11% do total de mortes), atrás apenas de doenças cardiovasculares, infecciosas e neoplásicas (JESCHKE *et. al*, 2020).

As exulcerações são úlceras de espessura parcial atingem somente a epiderme e parte da derme, enquanto as úlceras cutâneas propriamente ditas são as de espessura total que afetam a epiderme e toda a espessura da derme, podendo inclusive avançar até estruturas mais profundas, como os tecidos subcutâneo, muscular e ósseo (RITTIÉ, 2016).

Feridas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, o tecido de granulação. A epiteliação, base da cicatrização nas feridas de espessura parcial, acontece principalmente a partir das margens da ferida. (FAZIO, MJ *et al*; 2000).

As úlceras são classificadas em relação a fatores como: tempo de fechamento (aguda ou crônica), etiologia (venosas, arteriais, neuropáticas, diabéticas) e pela profundidade. Quanto à profundidade, quando a perda tecidual atinge epiderme e pontos superficiais da derme (grau 1), denominamos como erosão ou exulceração; quando acomete derme superficial e profunda denominamos úlceras de grau 2, úlceras subcutâneas de grau 3 e quando atinge músculo e outros tecidos, de grau 4 (BRYANT; NIX, 2012).

Ressalta-se que as lesões abrem acesso a patógenos que podem agravar o estado da lesão e a saúde geral do paciente. Descreve-se que pacientes que são

admitidos em instituições de saúde com lesões ou os que as adquirem durante o tempo de hospitalização estão mais susceptíveis a se infectarem, acarretando complicações a sua saúde e, muitas vezes, prolongando seu tempo de institucionalização. Além disso, as lesões podem apresentar característica visual e/ou olfativa repulsiva, o que desencadeia distúrbio da autoimagem e isolamento social. Entende-se que o emprego de tecnologias assistenciais como a fototerapia, podem auxiliar na reabilitação e recuperação do paciente que possui lesões cutâneas (RESENDE *et al*, 2017).

Entre as lesões cutâneas, as queimaduras destacam-se também como um grave problema de saúde pública. Em todo o mundo, estima-se que a incidência de queimaduras graves ocorrem o suficiente para exigir apresentação ambulatorial ou admissão hospitalar. Em 2015, o número de lesões por queimaduras foi de 31 milhões (JESCHKEN *et. al*, 2020).

As lesões por pressão tecidual, afetam milhares de pacientes e acarretam em custos globais que atingem a casa de bilhões de dólares por ano o (BANSAL *et. al*, 2005). No Brasil, afetam cerca de 1% da população adulta e 3 a 5% da população com idade superior a 65 anos (FONDER *et. al*, 2008).

No ambiente hospitalar, a prevalência de úlceras é extremamente alta, variando de 2,7% a 29,5%. De forma específica, analisando a lesão por pressão como uma comorbidade, tem-se que em pacientes tetraplégicos a incidência é de 60%. Em idosos com fraturas de colo de fêmur esse número chega a 66% e em pacientes criticamente doentes a incidência é de 33%. Pacientes com lesões medulares que completam o seu tratamento desenvolvem lesão por pressão em 40% dos casos (COSTA *et. al*, 2005).

Em países desenvolvidos, estima-se que 1 a 2% da população sofra uma ferida crônica no decorrer da vida, acarretando impactos significativos aos acometidos, pois essa patologia tem uma instalação silenciosa, o que repercute em limitações e incapacidade que levarão a perda da qualidade de vida e influenciarão nas questões psicológicas tais como depressão, ansiedade e angústia, além de ocasionar a restrição dos pacientes ao convívio social, fato este provocado pela dor, perda da função e de mobilidade (JÄRBRINK *et al*, 2016).

No Brasil, estudos em unidade de terapia intensiva estimam incidências de úlceras variando de 10% a 62,5%, variação essa que acompanha o nível social em que se encontra a unidade, corroborando com o fato de que a lesão por pressão é

um dano evitável. Em clínica médica, a incidência estimada é de 42,6% e em unidades cirúrgicas de 39,5% (ANSELMINI et. al, 2009).

As complicações do pé diabético são responsáveis por 40% a 70% do total de amputações não traumáticas de membros inferiores na população geral e 85% das amputações de membros inferiores em diabéticos são precedidas de ulcerações (BRASIL, 2016).

Estima-se que sejam realizadas 234 milhões de cirurgias de grande porte (amputações) anualmente no mundo e as infecções do sítio cirúrgico decorrentes de falhas de cicatrização são as complicações mais comuns, que ocorrem no pós-operatório em cerca de 3 a 20% dos pacientes. Além desses prejuízos, o atraso na cicatrização pode prolongar a estadia do paciente no leito e aumentar a chance de readmissão hospitalar e cirurgias adicionais (ANVISA, 2017).

2.3 Cicatrização

A cicatrização de feridas consiste em uma coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo complexo e dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportem de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular.

Quando acontece uma lesão epitelial, ocorre uma série de eventos que objetivam restabelecer a estrutura anatômica e a funcionalidade da região afetada. A reconstituição do tecido ocorre por eventos celulares promovendo a cicatrização e o reparo tecidual. Depois de uma lesão tecidual, há perda da homeostase e para o restabelecimento inicia-se um processo de cicatrização (CARVALHO, 2003).

Embora, didaticamente, o processo de cicatrização esteja dividido em três fases, na realidade elas não são estanques e sim interdependentes. Dessa forma, para a evolução de cada uma das fases ocorrem eventos celulares, como migração e transmigração celular tissulares, como vasoconstrição, vasodilatação, angiogênese e formação de tecido de granulação e metabólicos, como coagulação e deposição de matriz extracelular. Todos esses eventos ocorrem de maneira sobreposta e dinâmica (PEDROSO et al, 2019).

Na literatura, descreve-se as fases da cicatrização como: **injúria, coagulação, inflamação, formação tecidual e remodelagem tecidual**, entretanto,

há alguns autores que descrevem o processo apenas em 4 ou 3 fases (Figura 3) (WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017; GURTNER *et al*, 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; BARANOSKI; AYELLO, 2004).

A fase **inflamatória** ou também chamada de injúria tecidual, é a primeira fase da cicatrização e é definida como uma reação do tecido às agressões sofridas. A inflamação representa a reação do tecido vivo, vascularizado a uma agressão local. Esta serve para destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor pelo desencadeamento de uma série de processos biológicos que, tanto quanto possível, reconstituem o tecido lesado, estando intimamente relacionada com o processo de reparo, o qual se inicia durante as primeiras fases da influência agressora (COLLINS, 2000).

Durante a primeira fase, ocorrem hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual. Inicialmente, em resposta a agentes inflamatórios, há diminuição do afluxo sanguíneo pela vasoconstrição. Com extravasamento de sangue dos vasos lesionados, plaquetas são ativadas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular (LI, J *et al*; 2007).

Na fase de **coagulação**, o coágulo de fibrina no local da injúria ativa a cascata da coagulação onde a trombina induz a degranulação das plaquetas liberando PDGF, TGF β , fator de crescimento epidérmico (EGF), e TGF α , além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, importantes constituintes da matriz extracelular provisional. Além disso, o coágulo de fibrina formado age como uma matriz de colonização de células inflamatórias atraídas por quimiotaxia por meio da ação do PDGF e TGF α , principalmente neutrófilos (BARANOSKI; AYELLO, 2004; BEANNES *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2007).

O endotélio lesionado e as plaquetas, estimulam a cascata da coagulação. As plaquetas têm papel fundamental na cicatrização. A degradação do colágeno se inicia precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório. Visando a hemostasia, essa cascata é iniciada e grânulos são liberados das plaquetas, as quais contêm fator de crescimento de transformação beta - TGF- β (e também fator de crescimento derivado das plaquetas [PDGF], fator de crescimento derivado dos Fibroblastos [FGF], fator de crescimento epidérmico [EGF], prostaglandinas e tromboxanas), que atraem neutrófilos à ferida (tabela 1). O coágulo é formado por

colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a ferida). Neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração 24 horas após a lesão. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (BROUGHTON, 2006).

O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da adesão, agregação, ativação plaquetária e consequente liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários (PEDROSO *et al.*, 2019).

Figura 3- Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial

Fonte: Adaptado de Broughton *et al.* (2006).

Na fase de **proliferação**, ocorre a ativação de macrófagos e consequentemente a matriz extracelular pode começar a ser substituída por um tecido conjuntivo mais elástico e mais resistente. O tecido conjuntivo maduro é constituído de colágeno, o componente mais importante da cicatriz (KISNER; COLBY, 2005; CARDOSO, 2010).

A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o

término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (SCHREML *et al.*, 2010).

A proliferação é marcada nessa fase, por intensa atividade celular e migração de diferentes tipos celulares, com a finalidade de restabelecer a integridade da epiderme e derme. Nesta etapa, os eventos que se destacam são a formação de tecido de granulação, angiogênese e reepitelização. Este tecido de granulação, nome recebido devido a sua aparência granular, pode ocorrer através de dois mecanismos: formação de novos vasos (angiogênese) ou pela proliferação e migração de Fibroblastos (fibroplasia) no local da lesão (COALSON *et al.*, 2019).

Os novos capilares se ramificam e invadem a matriz provisória da ferida, que é substituída aos poucos por uma nova MEC (matriz extracelular) produzida e depositada por fibroblastos. A MEC emergente, na qual fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e macrófagos são incorporados, consiste em colágeno imaturo (tipo III), proteoglicanos, glicosaminoglicanos, fibrina, fibronectina e ácido hialurônico (TALLIMA *et al.*, 2018). Nesse contexto, a produção e a deposição de colágeno representam fatores fundamentais no processo de reparo, pois reconstituem o alinhamento e a integridade da pele (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (Tabela 1) (BROUGHTON, 2006). A migração dos queratinócitos e a contração da úlcera resultam na reepitelização da área lesada, o que é de suma importância para estabelecer o suporte necessário para restaurar o tecido lesado (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

A angiogênese e a síntese da MEC são processos interdependentes, pois novos vasos sanguíneos precisam de nova MEC como suporte tridimensional para seu crescimento, enquanto o metabolismo celular de, por exemplo, fibroblastos

precisa de novos vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e outros nutrientes. O fato das mesmas citocinas estimularem cada processo interliga essas etapas da cicatrização de feridas. As citocinas da superfamília de TGF- β , secretadas por fibroblastos e queratinócitos, desempenham o papel mais proeminente na formação de tecido de granulação. Moléculas de MEC como fibrinogênio, fibronectina, fibrina e vitronectina são interativas com tais citocinas e também regulam a diferenciação da proliferação e a migração de fibroblastos (EMING *et al.* 2007). Além disso, a epiderme influencia o processo de cicatrização produzindo VEGF, PDGF e TGF- β (KIERSZENBAUM, 2004; BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Tabela 1. Principais fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial

Fator de Crescimento	Origem	Função
TNF- α	Monócitos e linfócitos	Proliferação de fibroblastos. Quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos
TGF- α	Matriz extracelular da ferida cirúrgica	Proliferação celular Estimula a epitelização
TGF- β	Plaquetas, matriz extracelular da ferida cirúrgica	Mitogênicos para fibroblastos Formação de tecido de granulação
PDGF	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular
VEGF	Queratinócitos e macrófagos	Angiogênese e a proliferação de células endoteliais
IL-1	Mononucleares	Proliferação de fibroblastos

Legenda: TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TGF- α , fator de crescimento de transformação alfa; TGF- β , fator de crescimento de transformação beta; PDGF, fator de crescimento derivado das plaquetas; VEGF, fator de crescimento derivado do endotélio vascular; IL-1, interleucina 1

Adaptado de Broughton and Attinger, 2006¹².

Fonte: Adaptado de Broughton, Janis e Attinger, 2006.

A fase de **remodelagem tecidual** é quando ocorre a diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, além de perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz (GUIRRO; GUIRRO, 2002; KISNER; COLBY, 2005). Nessa fase, é através das collagenases que acontece o equilíbrio entre a formação do colágeno novo e a degradação do colágeno degradado com a finalidade de restaurar e reestruturar o tecido. Portanto, há o remodelamento da matriz extracelular, por meio das metaloproteinases (collagenases intersticiais, collagenases tipo IV e gelatinases). Esse período de fechamento da lesão pode levar meses ou anos, até que o tecido esteja cicatrizado, isto é, que ocorra a restauração do tecido.

(COALSON *et al*, 2019, KARUKONDA *et al*, 2000).

A característica mais importante desta fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior (BROUGHTON, 2006). Nessa fase, gradualmente, o colágeno provisório (tipo III) é substituído pelo colágeno tipo I mais estável, produzido por fibroblastos estritamente de forma oxigênio-dependente e depositado em um alinhamento fisiológico. Assim, a ferida cicatrizada ganha maior resistência à tração. As fibras de colágeno se contraem para que o tecido da ferida encolha. O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização (EMING;KRIEG; DAVIDSON, 2007).

2.4 Cicatrização in vitro: cultura de células

Existem diversos modelos experimentais aplicados e descritos na literatura, com a finalidade de investigar a fisiopatologia de doenças, compreender mecanismos de envelhecimento e do processo cicatricial, além de testar fármacos e novas terapias (MASSON- MEYERS *et al*, 2020; LEBONVALLET *et al*, 2010).

Modelos in vitro são caracterizados pelo cultivo de células em laboratório, possibilitando o estudo de vários aspectos, eventos e mecanismos celulares. Esses modelos são muito utilizados em decorrência da existência de metodologias bem estabelecidas, que permitem estudar a resposta celular, na qual as condições experimentais são mantidas por estar em um ambiente controlado, além de proporcionar um baixo custo. Cabe a esse modelo analisar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico de tecidos normais ou patológicos, além de ser capaz de fornecer resultados prévios aos experimentos in vivo (MASSON- MEYERS *et al*, 2020; FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

O estudo in vitro utilizando cultura de células tem sido muito utilizado devido à

facilidade da amostra, e a possibilidade de controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ que podem ser obtidos de maneira precisa, além de conseguir amostras totalmente homogêneas. As desvantagens desse método de estudo são, por exemplo, a necessidade de trabalhar-se em ambiente estéril e asséptico, o que limita algumas vezes seus protocolos. Além disso, exige prática por parte do pesquisador.

O uso de células isoladas, tecidos ou órgãos só podem ser cultivados *in vitro* quando mantidos em instalações adequadas, com temperaturas definidas e suplementados com meio preparado e específico. Além disso, o conhecimento de morfologia celular, procedimentos básicos de cultura celular e técnicas assépticas rigorosas são essenciais para a manutenção de células *in vitro* livre de qualquer tipo de contaminação (FRESHNEY, 2005; BRESLIN *et al.*, 2013).

Os testes *in vitro* que avaliam a citotoxicidade são para avaliar as modificações que ocorrem nas células, desde as mais brandas, como alterações das funções celulares até a morte celular. A morte celular é evidenciada por alterações na morfologia da célula, como o arredondamento das células e aumento da vacuolização do citoplasma; redução da adesão celular; ausência ou mudança na atividade metabólica; lise das células e proliferação celular diminuída. A viabilidade celular é demonstrada pela porcentagem de células vivas em relação à porcentagem de células do controle de citotoxicidade (ISO, 2009; WANG, 2015).

Os estudos sobre a cicatrização de lesões e as estratégias de substitutos cutâneos para ensaios pré-clínicos concentraram-se na intervenção de estágios da cicatrização normal da pele para observação do efeito dos tratamentos que se pretende investigar. Nesse sentido, o uso de culturas de monocamada *in vitro* de células da pele humana são comumente utilizados para compreensão dos mecanismos celulares envolvidos na cicatrização de feridas. Dentre os ensaios *in vitro* para tal finalidade, destacam-se o ensaio do “arranhão” (*scratch assay*) (AICHELE *et al.*, 2013; FRONZA *et al.*, 2009; JOHNSTON *et al.*, 2016; RIAHI *et al.*, 2012; UPTON *et al.*, 2011).

Tais estudos são relevantes para o entendimento da interação entre superfície celular e o tratamento aplicado e a intensidade com que ocorre a internalização de substâncias de interesse ou de um sistema de liberação pelas células estudadas. Com ensaios *in vitro* é possível obter, por exemplo, conclusões importantes sobre a concentração requerida de uma substância para se conseguir determinado efeito, e

influência do tratamento na expressão de moléculas de adesão na superfície celular. (DOBROVOLSKAIA, et al., 2008).

De acordo com Baserga (1990), células em cultura podiam crescer por aumento no tamanho da célula ou por aumento de seu número. A contagem de células em uma placa de Petri nos diz quanto a população celular cresceu, porém não informa se as células estão ou não proliferando. Quando desejamos determinar o efeito de qualquer alteração da proliferação celular no meio de cultura, ou seja, sua capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método mais indicado é contar o número de células antes e após o tratamento, de preferência a cada 24 horas.

Os estudos com cultura de células têm a vantagem de permitir a avaliação isolada de um componente do tecido ou parte de um processo, evitando variáveis individuais. A divulgação e comparação dos resultados para a clínica deve ser vista com cautela, porém podem ser utilizados como parâmetros ou guias para futuros estudos in vivo.

Ensaio envolvendo cultura de células também tem sido utilizados para avaliar efeitos biológicos desencadeados pela luz por LASER ou LED o que definimos por fototerapia.

O uso da fototerapia em feridas tem demonstrado uma das alternativas terapêuticas mais estudadas no processo de cicatrização por proporcionar potencial terapêutico, permitir a aceleração da cicatrização das úlceras durante reparo tecidual e ainda ser capaz de minimizar prejuízos secundários (RAWAT *et al*, 2012; DEMIR; BALAY; KIRNAP, 2004). A Laserterapia mostra-se efetiva na promoção da proliferação de diferentes células. (EDUARDO *et al*, 2008).

2.5 Fototerapia

Desde os primórdios da civilização, a luz vem sendo usada para tratamento, considerada uma das mais antigas modalidades terapêuticas. Os indianos, cerca de 1400 a.C., foram os primeiros a fazer o uso da fotoquimioterapia por meio dos extratos extraídos de plantas, que potencializavam a absorção dos raios solares, e assim, tratavam o vitiligo. Posteriormente, os egípcios, relataram a cura de doenças dermatológicas através da fototerapia solar (CALMON, 2006).

Em 1903, Niels Finsen recebeu o Prêmio Nobel pelo avanço no tratamento do Lúpus Vulgar utilizando fonte de luz ultravioleta. Por essa razão, alguns autores como AGGERBO em 1960 (*apud* RIGAU, 1996), consideraram Finsen como pai da

Foto-medicina moderna.

Em 1905 Albert Einstein formulou a teoria fotoelétrica que em 1916 culminou com o texto “Emissão Estimulada de ondas eletromagnéticas”, em que delineou os princípios que tornaram possível o desenvolvimento da tecnologia do LASER (OLIVEIRA, PEREZ, SOUZA, & VASCONCELOS, 2014).

Einstein postulou as bases teóricas sobre a manipulação controlada de ondas de luz, e publicou suas idéias em 1917. Esta teoria foi verificada por Landberg em 1928, mas somente entre 1933 e 1934 Townes e Weber falaram pela primeira vez em amplificação de micro-ondas. Nessa mesma época houve um grande avanço no desenvolvimento de fibras ópticas e material óptico de uma maneira geral. A teoria da amplificação da emissão estimulada foi patenteada em 1951 por Fabrikant, um físico russo e sua equipe, mas permaneceram sem publicá-la até 1959 e por isso não pôde influenciar os trabalhos que se desenvolviam nos Estados Unidos. O primeiro aparelho em que se usou emissão estimulada foi chamado de MASER (outro acrônimo inglês formado a partir de *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), construído por Townes em 1952. Em 1961 foi fundado por Leon Goldman, na Universidade de Cincinnati, o primeiro laboratório de LASER para aplicações médicas (GOLDMAN, 1981), onde as primeiras experiências em animais foram realizadas.

Em 1966, as primeiras aplicações clínicas com LASER operando em baixa potência foram relatadas por Endre Mester de Budapeste, Hungria, que apresentou os primeiros relatos de casos clínicos sobre Bioestimulação com LASER em úlceras crônicas de membros inferiores usando LASER de rubi e de argônio, tendo publicado seus primeiros artigos em 1966 (MESTER, 1966). Ele produziu um grande volume de trabalhos científicos, clínicos e experimentais, tendo o LASER de He-Ne como tema central.

Já no século XX, a fototerapia ganhou mais destaque, sendo estudada e aplicada em várias dermatoses. Esse avanço ocorreu, após Niels Finsen receber o prêmio Nobel pelo tratamento do lúpus com raios UV (Ultravioleta). Anos depois, durante a Primeira Guerra Mundial, a fototerapia foi usada com sucesso em tratamentos de úlceras traumáticas. Desde então, o número de doenças descritas como responsivas a esse tipo de terapia só cresceu (DUARTE; BUENSE; KOBATA, 2006).

A fototerapia é classificada como baixa potência ou baixa intensidade, o que

significa que não possui potencial destrutivo e lesivo, de acordo com seu efeito no tecido (VEÇOSO,1993; BAXTER,1994; OLIVEIRA *et al.*, 2008). O termo “terapia com *LASER* em baixa intensidade (LILT)” é o mais adequado e o que melhor exprime o tipo de tratamento. A denominação “*LASER* de baixa potência”, encontrada em muitos artigos, tem sido excluída pelo fato de ser possível fazer a fotobiomodulação com *LASERS* de alta potência no modo desfocado e afastado dos tecidos, conforme mostrado no estudo de Pourzarandian *et al.* (2005).

O que diferencia o tipo de radiação emitida são os comprimentos de onda, logo, para identificar em que parte do espectro está uma determinada radiação é necessário saber o comprimento de onda dessa radiação (ALMEIDA-LOPES; LOPES, 2006).

Entre as aplicações mais frequentes da fototerapia, especificamente, utilizando LED (*Light Emitting Diode*) e LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), a cicatrização de feridas cutâneas está entre as mais estudadas. Encontra-se um número expressivo de artigos sobre esse assunto, procurando explicar os mecanismos e os possíveis efeitos no reparo tecidual (MENEGUZZO, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014), que parece estar intimamente envolvido com a intensa atividade das células endoteliais, fibroblásticas, queratinócitos e células circulatórias, se tratando de um processo complexo e organizado, em nível celular e molecular, para restabelecer a funcionalidade do tecido comprometido, após a ocorrência de lesões (PANSANI, 2015).

No que se refere à fototerapia *in vitro*, os aspectos da cicatrização de úlceras que têm sido relatados em estudos *in vitro* utilizando a fototerapia são a proliferação de fibroblastos, (LUBART *et al.*, 1997; BOLTON *et al.*, 1995; WHELAN *et al.*, 2001; ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; KREISLER *et al.*, 2002), estimulação de macrófagos (YOUNG *et al.*, 1989, RAJARATNAM *et al.*, 1994), síntese de pró-colágeno (YAMAMOTO *et al.*, 2001, PEREIRA *et al.*, 2002) e estimulação de queratinócitos (YU *et al.*, 1994; GROSSMANN *et al.*, 1998).

LASER e LED estão muito próximos do ponto de vista da emissão de luz, ambos produzem uma banda espectral relativamente nítida, embora o LED tenha um espectro mais amplo. A importante diferença é sobre a luz do LED que não é colimada (linhas do feixe de luz) (Figura 5). Então, LED é uma boa alternativa em relação à intensidade baixa para promover a cicatrização de feridas (CORAZZA *et al.*,2007). LASER e LED com diferentes doses de energia produzem efeitos nos

vasos sanguíneos da pele. A fototerapia baseada na curva de Arndt-Shultz é utilizada para estimular a produção de células endoteliais e angiogênese, e a produção de fibroblasto e colágeno (REDDY,2003; PEREIRA *et al.*, 2002). De outra forma, alguns autores justificam sua utilização por elevação a fotobiomodulação da cicatrização de feridas (AL-WATBAN *et al.*, 1999).

Apesar da semelhança significativa entre o LED e o LASER, as diferenças entre eles devem ser pontuadas e consideradas. Primeiramente, o LASER emite luz através de emissão estimulada de radiação, enquanto o LED trabalha com a emissão espontânea de radiação (CALMON, 2006; ROSA, 2014). Na literatura, a utilização do LED em relação ao LASER é significativamente menor, pelo fato de, possuir a luz incoerente, que se acreditava inicialmente ser determinante nos bons resultados obtidos na Fotobiomodulação. Entretanto, a hipótese de que o LED não produziria efeitos benéficos pela ausência de coerência da luz, tem sido descartada (MICHEL, 2016). A complexa interação de luz e células já demonstrou que comprimento de onda, fluência, ciclo de trabalho de exposição e intervalos de exposição podem alterar as respostas celulares. Os autores Van Breugel e Bar (1992) comentam ser a causa dos resultados conflitantes desses estudos o grande número de variáveis utilizadas e sua pobre descrição.

Uma dificuldade encontrada ao tentar comparar estudos com *LASER* em baixa intensidade é a falta de informação sobre todos os parâmetros utilizados. E também há escassez de trabalhos que associem dois comprimentos de onda no modelo *in vitro* e *in vivo*.

Figura 4- Espectro de Luz visível em nanômetros (nm)

Fonte:researchgate.net

Figura 5- Diferenças entre LED e LASER

Fonte: a autora

2.5.1 Conceitos e parâmetros fundamentais da fototerapia

Alguns autores comparam os efeitos da “terapia por luz” com os efeitos de medicamentos. Em doses muito baixas, não têm efetividade, no entanto, em doses muito altas, o que era um remédio, pode ser tornar um veneno. Existe uma janela terapêutica, uma faixa de dosagem, onde os melhores efeitos são obtidos. O mesmo ocorre com a fotobiomodulação (Lei de Arndt-Schultz). A Lei de Arndt-Schultz descreve a chamada “janela terapêutica” (Figura 6).

As luzes são absorvidas pelos cromóforos. A primeira lei da fotobiologia afirma que, sem absorção, não pode haver reação. Então, o fóton incidente deve ser absorvido pelas células-alvo, para que qualquer reação ocorra. Quando um fóton é absorvido por uma célula, ele passa sua energia para a célula. A interação da radiação não ionizante com o tecido deve produzir uma mudança física e química, que resulte na resposta biológica desejada. Cromóforos são os fotorreceptores naturais do nosso corpo. Os pigmentos endógenos melanina e hemoglobina são os principais cromóforos excitados. A penetração da luz nos tecidos não depende somente das propriedades da fototerapia, mas esses efeitos vão depender da natureza e densidade do tecido. (AGNE, 2015).

Em relação à interação entre a luz e os tecidos, a profundidade da penetração da luz será proporcional ao comprimento de onda do aparelho: quanto maior o comprimento de onda, maior a profundidade de penetração (Figura 7) (GENOVESE, 2000).

Segundo a WALT (Word association for photobiomodulation therapy) as unidades de potência devem ser descritas em Watt (W) ou miliwatt (mW). O modo de estímulo pode ser contínuo ou pulsado. O comprimento de onda é dado em nanômetros (nm). Parâmetros da dose são: densidade de energia (J/cm^2), densidade de potência (W/cm^2), área tratada ou área irradiada (cm^2), tempo de aplicação em segundos (s). A técnica de aplicação da fototerapia pode ser no modo de aplicação pontual ou varredura.

A dose é um dos mais importantes parâmetros. O termo *dose*, tradicionalmente empregado na terminologia da área de bioestimulação à LASER, corresponde a grandeza física conhecida por fluência, ou seja, energia por unidade de área. Nada mais é do que a quantidade de energia em Joules aplicada sobre uma determinada área expressa em centímetros quadrados (cm^2). Utiliza-se este termo, entretanto, devido aos tempos envolvidos serem tipicamente longos (vários segundos) e pelo fato de se utilizar no cálculo da dose, a potência *média* do LASER (mesmo no caso de LASERs chaveados ou pulsados). A dose tem a mesma unidade da grandeza da fluência, sendo dada em J/cm^2 . Deve-se calcular o valor da dose multiplicando-se a intensidade, P/A (onde P é a potência em watts e A é a área em cm^2), pelo tempo em segundos: $D = P \cdot t / A$ (Dose é a potência multiplicada pelo tempo de irradiação, dividida pelo tamanho da área irradiada sendo seu resultado em J/cm^2) (PIRES-OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 6- Imagem ilustrativa da curva de dose-resposta- (Lei de Arndt Schultz)

Fonte: Ibramed, 2021.

De acordo Borges (2016), citado por (FREITAS & MEJIA, 2014), a densidade do aparelho é medida em $\text{Joules}/\text{cm}^2$ que corresponde a potencia (mw) do aparelho,

multiplicada pelo tempo em segundos, dividido pela superfície de emissão ao quadrado.

Em muitos estudos, estão ocultos os parâmetros, o que é fundamental para a análise, repetição e comparação entre os estudos. Todos os parâmetros deveriam ser descritos nos trabalhos para uma correta análise dos dados.

Figura 7- Imagem Ilustrativa dos comprimentos de onda (nm) e a profundidade de ação nos tecidos.

Fonte: Restore cosmetic & Skin Surgery

2.5.2 LED

LED (*Light Emitting Diode*) é um diodo semicondutor submetido à corrente elétrica que emite luz e é utilizado para fototerapia com diferentes comprimentos de onda entre 405nm (azul) a 940nm (infravermelho). A fotoestimulação por esta luz atua na célula e em sua permeabilidade e na estimulação mitocondrial, síntese de ATP, colágeno, proteínas e elastina. Esta luz também atua como estimuladora de reações antimicrobianas e anti-inflamatórias e por isso são indicados para diversas afecções inflamatórias (ABRAMOVITS; ARROZOLAP, 2005).

O LED, ou diodo emissor de luz, é um semicondutor complexo que converte corrente elétrica em feixe luminoso. A luz é produzida quando a eletricidade estimula o chip semicondutor da superfície refletora que gera um feixe luminoso com comprimento de onda determinado, podendo estar em porções do vermelho, verde, azul, amarelo e infravermelho, e a partir daí, penetrar mais ou menos nos tecidos, já que, o comprimento de onda determina a profundidade que a luz atinge nos tecidos (OPEL *et al.*, 2015).

Os emissores de LED produzem luz de baixa intensidade que pode aparentar

ser de uma só cor, mas não são coerentes nem monocromáticos. A luz emitida não é direcional e se espalha amplamente. O LED fornece luz mais difusa, que são mais adequadas para tratar áreas maiores e mais superficiais, com maior faixa de frequência. Possuem baixa intensidade individualmente (CAMERON, 2009; NUNO, 2009; KALIL, 2011). Guirro; Guirro (2004) e Magalhães (2014), relatam que outra característica importante é que o LED não causa aumento de temperatura significativa, não queima e não provoca danos à superfície da pele.

A ideia de utilizar o LED no processo de cicatrização foi baseada nos trabalhos que confirmam seus efeitos antibacteriano, anti-inflamatório e cicatrizante. Abramovits e Arrozolap (2005), mostram esta nova terapêutica, de diminuição da dor, tendo resultado rápido e que usava equipamentos muito simples. Sua ação não promove danos aos tecidos e ocorre através da estimulação direta intercelular, agindo especialmente nas mitocôndrias, reorganiza as células, inibe a ação de alguns grupos celulares e estimula outros. São diferentes efeitos biológicos e fisiológicos de acordo com cada comprimento de onda do LED.

O principal uso do LED como tratamento terapêutico é no auxílio na cicatrização por via local, aplicação de luz com comprimento de onda específico, potência irradiada e tempo determinado para aplicação local. O importante é obter o comprimento de onda desejado e a potência suficiente para atingir as partes mais profundas ou superficiais da pele (VINCK *et al.*, 2005). O uso do LED tem uma clara vantagem de oferecer luzes de cores diferentes para a área do tecido (NICOLAU, 2001; VINCK *et al.*, 2005). A aplicação de LED em tecido humano é indolor e não é um tratamento traumático, tendo uma boa resposta, pois realiza estimulação natural nas células (VINCK *et al.*, 2005).

2.5.3 LASER

O *LASER* representa um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa que produzem um feixe de luz, frequentemente denominado de “raio *LASER*”, quando excitadas por uma fonte de energia. Tal dispositivo pode ser classificado em duas categorias: *LASERS* de alta intensidade ou cirúrgicos, com efeitos térmicos apresentando propriedades de corte, vaporização e hemostasia, e *LASER* de baixa intensidade ou terapêuticos, apresentando propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e de bioestimulação. Incluem-se nesta

última categoria o *LASER* de hélio-neon (He-Ne), cujo comprimento de onda é 632nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha); o *LASER* de arsenato de galioaluminio (Ga-As-Al) ou *LASER* de diodo, cujo comprimento de onda se situa fora do espectro de luz visível (luz infravermelha), sendo, aproximadamente, 780-830nm, e o *LASER* combinado de hélio-neon diodo (SILVA *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2008)

Os princípios envolvidos na geração desse tipo de luz iniciaram-se com ALBERT EINSTEIN em 1917, mas foi em 1960 que THEODORE MAIMAN construiu o primeiro aparelho de *LASER* (*LASER* de Rubi) nos Estados Unidos (WATSON, 2009).

A energia emitida pelo *LASER* possui propriedades físicas que permitem que seja emitida uma radiação de grande energia e empregado um comprimento de onda específico de acordo com o objetivo terapêutico (BORGES & SCORZA, 2016).

Esse espectro é composto por radiações infravermelhas, radiações visíveis, radiações ultravioletas, radiações ionizantes (raios x e raios gama), além de outros tipos de radiação. Os *LASERS* utilizados para tratamento médico, odontológico e veterinário emitem radiações que estão situadas na faixa das radiações visíveis, infravermelhas e ultravioleta próximo, não ionizantes.

O *LASER* tem como característica alguns aspectos básicos. É monocromático, ou seja, tem uma só cor, emite onda eletromagnética de um único comprimento de onda, uma cor específica para cada tipo de *LASER*. Tem coerência, ou seja, a fase relativa entre as ondas de luz se mantém. O termo é usado para exprimir o grau de monocromia e colimação. Todas as ondas emergentes do *LASER* são altamente ordenadas no espaço e correlacionadas no tempo. A colimação significa que a luz é emitida em uma única direção, e as ondas são paralelas, com feixe estreito, que assim permanece à medida que se propaga (OLIVEIRA, PEREZ, SOUZA, & VASCONCELOS, 2014).

A coerência da luz perde-se nos primeiros estratos da pele, devido ao fenômeno de dispersão da luz, antes que se produza a absorção dos fótons por cromóforos como a melanina, hemoglobina, porfirinas, citocromo oxidase, entre outros, e não é essencial *in vivo*, como demonstraram Parrish, 1980; Jori, 1980; Anderson e Parrish, 1982; Mckinley *et al.*, 1988; Hazeki e Tamura 1989; Young *et al.*, 1989; Terribile *et al.*, 1992 e Lubart *et al.*, 1997. Dessa forma conclui-se que os efeitos biológicos dos *LASERS* de baixa intensidade dependem principalmente de

sua monocromaticidade (MESTER *et al.*, 1978; BERKI *et al.*, 1988; KARU 1987; KUBOTA *et al.* 1989; BIHARI e MESTER, 1989) e da fluência (SHIROTO *et al.*, 1989; LUBART *et al.*, 1992a; AL-WATBAN e ZHANG, 1999; WEI YU *et al.*, 1994; KARU, *et al.*, 1996), assim como da fase de crescimento celular em que as células receberam a irradiação (KARU *et al.*, 1995).

De acordo com as citações de Genovese (2000), os efeitos biológicos que o *LASER* de baixa intensidade provoca nos tecidos consistem em energia luminosa, que se deposita sobre os mesmos e se transforma em energia vital, produzindo, então, efeitos primários (diretos), secundários (indiretos) e terapêuticos gerais, os quais promovem ações de natureza analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante.

O *LASER* de baixa potência se difere do *LASER* de alta potência por não produzir nenhum efeito térmico considerável e suas reações são praticamente somente de fotobioestimulação celular (AGNE, 2015).

Como o *LASER* de baixa potência não produz efeito térmico, caso ocorra o aumento da temperatura local isso será consequência do aumento do metabolismo celular e da vasodilatação provocada na região. A fototerapia com *LASERs* de baixa potencia produz efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos (RIBEIRO & ZECELL, 2004).

Entre os efeitos bioestimulantes mediados pelo *LASER* de baixa potência no processo de reparo tecidual, destacam-se: a indução da atividade mitótica das células epiteliais e dos fibroblastos, o incentivo à produção de colágeno por estas últimas células, a inibição secretória de alguns mediadores químicos, a modificação da densidade capilar e o estímulo à microcirculação local (SILVA *et al.*, 2007; MALUF *et al.*, 2006; CONLAN *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 1997).

O mecanismo de interação do *LASER* em nível molecular, foi descrito primeiramente por Karu (1988). Os incrementos de ATP mitocondrial que se produzem após a irradiação com *LASER*, favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular (PASSARELA *et al.*, 1984; POURREAU-SCHNEIDER *et al.*, 1989; FRIEDMANN *et al.*, 1991). Em estados patológicos, o *LASER* interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (KARU *et al.*, 1991a; YOUNG *et al.*, 1990; LUBART, *et al.*, 1992b; LOEVSCHALL E ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LUBART *et al.*, 1996; LUBART *et al.*, 1997).

A energia dos fótons de uma radiação *LASER* absorvida por uma célula será transformada em energia bioquímica e utilizada em sua cadeia respiratória. Tina

Karu em 1988, descreveu um mecanismo de ação diferente para os LASERS emitindo radiação na região do visível e do infravermelho. A luz LASER visível induz a uma reação foto-química, ou seja, há uma direta ativação da indução de síntese de enzimas (BOLOGNANI *et al.*, 1993; OSTUNI *et al.*, 1994; BOLTON *et al.*, 1995), e essa luz tem como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células.

As organelas não absorvem luz infravermelha, apenas as membranas apresentam resposta à este estímulo. As alterações no potencial de membrana causadas pela energia de fótons no infravermelho (PASSARELA *et al.*, 1984) induzem a efeitos foto-físicos e foto-elétricos, causando o choque entre células que se traduz intracelularmente por um incremento na síntese de ATP (COLLS, 1986).

Conhecendo a capacidade do *LASER* de proporcionar ao organismo uma melhor resposta a inflamação, com consequente redução de edema, minimização da sintomatologia dolorosa e bioestimulação celular, a terapia a *LASER* apresenta-se como uma alternativa para processos que apresentem reação inflamatória, dor e necessidade de regeneração tecidual (MALUF, 2006).

2.5.4 Mecanismos moleculares e a fotobiomodulação

A fotobiomodulação tem sido amplamente utilizada para estimular a capacidade de regeneração tecidual. Esse efeito tem sido atribuído ao aumento da proliferação e do metabolismo celular, e também na expressão de vários genes, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que está fortemente relacionado ao processo de reparação tecidual (BASSO, *et al.*, 2012).

Karu, (1988) propôs a teoria de que a luz LASER é absorvida na mitocôndria, por seus componentes, que resulta na ativação da cadeia respiratória e consequentemente promove alterações no estado redox da mitocôndria e citoplasma. Essas mudanças afetam a permeabilidade da membrana, aumentando assim os níveis intracelulares de cálcio. Esse, por sua vez, está envolvido na produção de nucleotídeos cíclicos que controlam a síntese de DNA e RNA e por fim a proliferação celular. Esse mesmo efeito altera a atividade elétrica do tecido, promovendo a degranulação das células na fase aguda pós-lesão e inibindo a fase inflamatória pela produção de mediadores químicos que ativam a proliferação de fibroblastos (PIRES-OLIVEIRA, *et al.*, 2009).

Frente à fotobiomodulação, os mecanismos a nível molecular têm

demonstrado diversas respostas celulares e teciduais. Karu, em 1989, publicou um artigo de revisão sobre a fotobiologia dos efeitos do LASER de baixa intensidade. Neste trabalho são compilados numerosos estudos quantitativos de efeitos provocados por luz monocromática visível, em baixa intensidade, sobre *Escherichia Coli*, fermentos, fibroblastos de hamsters chineses e linfócitos humanos. Condições ideais de irradiação (comprimento de onda, dose e intensidade) que conduzem à estimulação da atividade desejada, são apresentadas. As conclusões foram: a bioestimulação LASER é um fenômeno fotobiológico, os fotoaceitadores primários são componentes da cadeia respiratória. Isso explicaria a universalidade dos efeitos com LASER de baixa densidade de potência. Além disso, a energia da luz é somente um desencadeador para a regulação do metabolismo celular. Isso justifica as baixas doses e intensidades necessárias. Em baixas doses, a irradiação causa regulação das reações do metabolismo celular e com altas doses ocorrem danos fotodinâmicos. A magnitude do efeito de bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação, o que explica porque o efeito nem sempre é possível.

Smith (1991), propôs uma modificação do modelo de Karu para explicar os efeitos produzidos por luz visível e infravermelha. No modelo de Karu, a luz visível produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas), que finalmente conduzem à foto-resposta (biomodulação). Quanto a luz visível provavelmente inicia a cascata de eventos na cadeia respiratória das mitocôndrias, através de eventos fotoquímicos (provavelmente a fotoativação de enzimas). Smith sugere que, devido as propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais Cálcio), conduzindo à mesma resposta final. Segundo Kamikawa e Ohnishi (1992), (que estão de acordo com Smith), a ação fotoquímica do LASER sobre os cromóforos é importante para iniciar o efeito terapêutico (Figura 8).

Tina Karu (2010) relatou em seus estudos que as mitocôndrias funcionavam como fotoreceptores primários nas células, e que o citocromo C oxidase é a molécula responsável da cadeia respiratória mitocondrial, visto que os fótons interagem com o tecido e se transformam em energia bioquímica, que será utilizada na cadeia respiratória mitocondrial. A citocromo C oxidase tem dois picos de

absorção, nos espectros vermelho e infravermelho. A fotobiomodulação aumenta a disponibilidade de elétrons para a redução do oxigênio molecular, aumentando os níveis de ATP, NO (óxido nítrico) e ROS (espécies reativas de oxigênio), energizando a célula e favorecendo a atividade celular.

O mecanismo de ação difere entre os comprimentos de ondas que situam na região de luz visível e do infravermelho. Com a luz visível, a fotobiomodulação pode ativar este mecanismo via mitocôndria, que por sua vez passa a produzir moléculas sinalizadoras que promovem uma cascata de reação intracelular. A fototerapia com LED âmbar 590 nm por exemplo, tem com sua faixa espectral um pico de absorção pelo citocromo C oxidase (POYTON,2011).

Os mecanismos de ação diferem entre os comprimentos de onda vermelho e infravermelho após a ação da luz na molécula do COX (citocromo c oxidase), a excitação dessa molécula desencadeia o metabolismo celular, por meio de cascatas de reações, denominada sinalização mitocondrial retrógrada ou sinalização celular (KARU, 2010).

Esse conceito da sinalização mitocondrial retrógrada permitiu compreender como a exposição à luz pode ter efeitos no organismo que durem por horas, dias ou semanas, no qual essa via permite enviar informações ao núcleo sobre mudanças no estado funcional das mitocôndrias (HAMBLIN, 2016; KARU, 2008).

A citocromo C oxidase tem dois picos de absorção, nos espectros vermelho e infravermelho e o mecanismo de ação difere entre os comprimentos de ondas que situam na região visível e do infravermelho. Nesses comprimentos de onda, a fotobiomodulação pode ativar este mecanismo via mitocôndria, que por sua vez passa a produzir moléculas sinalizadoras que promovem uma cascata de reação intracelular. A fototerapia com LED âmbar 590 nm por exemplo, tem com sua faixa espectral um pico de absorção pelo citocromo C oxidase (POYTON,2011).

A excitação do COX, desencadeia o metabolismo celular, por meio de cascatas de reações, denominada sinalização mitocondrial retrógrada (KARU, 2010). Esse conceito da sinalização mitocondrial retrógrada permitiu compreender como a exposição à luz pode ter efeitos no organismo que durem por horas, dias ou semanas, no qual essa via permite enviar informações ao núcleo sobre mudanças no estado funcional das mitocôndrias (HAMBLIN, 2016; KARU, 2008).

Outra via de sinalização envolvendo as mitocôndrias está relacionada à adenosina trifosfato (ATP), que implica em todas as reações biológicas, pois

pequenas alterações a nível ATP podem ocasionar mudanças metabólicas significantes no organismo. Isso permite explicar a versatilidade dos efeitos do uso na luz LASER (KARU, 2010).

Em suma, as células absorvem fótons e os transformam em adenosina trifosfato (ATP), que será utilizado nos processos metabólicos como: síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, enzimas e outros produtos necessários para o reparo tecidual e restauração da homeostase (LEITE, *et al*, 2015; PRINDEZE; MOFFATT; SHUPP, 2012; KARU; PYATIBRAT, 2011; KARU *et al* 2005; KARU, 1999).

Os efeitos biológicos do LASER utilizado para bioestimulação ocorrem de diferentes maneiras, seja através da atividade mitótica das células epiteliais, modificação da densidade capilar, estimulação da microcirculação ou, principalmente, devido ao aumento da síntese de colágeno. Levando a estimulação do metabolismo celular e da regeneração tecidual, além de seus efeitos antiinflamatórios, analgesia e vasodilatação (MESTER *et al.*, 1985; CONLAN *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 1996; ALBERTINI *et al.*, 2001)”

Os efeitos da irradiação LASER estão relacionados com a estimulação do metabolismo celular e da regeneração tecidual, além de seus efeitos antiinflamatórios, analgesia e vasodilatação (CONLAN *et al.*, 1996).

O mecanismo de ação difere entre os comprimentos de ondas que situam na região visível e do infravermelho. Nessa região, a fotobiomodulação pode ativar este mecanismo via mitocôndria, que por sua vez passa a produzir moléculas sinalizadoras que promovem uma cascata de reação intracelular. A fototerapia com LED âmbar 590 nm por exemplo, tem com sua faixa espectral um pico de absorção pelo citocromo C oxidase (POYTON, 2011).

Além disso, a fototerapia promove nos tecidos biológicos os efeitos tróficos, anti-inflamatório, analgésico, estimulador da microcirculação e sistema linfático local. Ainda, estimula a proliferação de células epiteliais e fibroblastos, aumentando a síntese e remodelação do colágeno, aceleração da divisão celular, aumento dos leucócitos que participam da fagocitose, regeneração dos vasos linfáticos, favorecendo o desenvolvimento do tecido de granulação (MAEDA, K, 1997).

É importante ressaltar que , a fototerapia pode agir tanto estimulando quanto inibindo os processos biológicos (MUSSTTAF; JENKINS; JHA, 2019; HAMBLIN, 2016; KUFLER, 2016).

Figura 8- Ação fotoquímica e foto-física do LASER.

Modelo de Karu modificado por Smith. Ação fotoquímica do LASER visível na cadeia redox da mitocôndria. Ação foto-física do LASER infravermelho na membrana celular. Ambos desencadeiam respostas celulares, que geram uma cascata bioquímica de reações.

Assim, diante do grande problema em saúde pública e incapacidade que as úlceras cutâneas podem gerar, as dificuldades de terapêuticas que acelerem o processo de cicatrização e a infinidade de variações da fototerapia envolvendo diferentes comprimentos de onda em LASER e LEDs, torna-se interessante avaliar os efeitos biológicos da fototerapia considerando a associação LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização no modelo in vitro pré-clínico.

3. OBJETIVO

Avaliar a atuação da Fototerapia LED 590 nm e LASER 808 nm na cicatrização em modelo in vitro.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar in vitro a atividade citotóxica da fototerapia isolada e associada do LED âmbar 590 nm e do LASER Infravermelho 808 nm em culturas de fibroblastos e queratinócitos;
- Avaliar in vitro a migração/proliferação da fototerapia isolada e associada do LED âmbar 590 nm e do LASER Infravermelho 808 nm em culturas de fibroblastos e queratinócitos;
- Avaliar no modelo in vitro de estresse nutricional a atividade proliferativa da fototerapia isolada e associada do LED âmbar 590 nm e do LASER Infravermelho 808 nm em culturas de fibroblastos e queratinócitos;
- Analisar se o meio de cultura com fenol influencia na receptividade da luz nas culturas de fibroblastos e queratinócitos;
- Padronizar os parâmetros da fototerapia 590 nm e 808 nm para o modelo in vitro;
- Padronizar plaqueamento e irradiação no modelo in vitro do *scratch assay*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo processo (n°5922/2018)-CEP/FMRP– CAAE: 89239118.7.0000.5440 conforme Parecer Consubstanciado do CEP 2.690.278.

4.2 Equipamento

Para realizar os experimentos com irradiação, a fototerapia foi realizada com o equipamento Elite da DMC Equipamentos LTDA®. O aparelho possui dois aplicadores, um com os comprimentos de onda LED 490nm e LASER 660nm e o outro aplicador com LED 590 nm e LASER 808 nm. O equipamento totaliza 4 comprimentos de ondas diferentes (450nm, 660nm, 590 nm e 808 nm). A potência útil emissor LASER infravermelho: 100 mW $\pm$ 20 %.

Os dois aplicadores ou também chamados “peças de mão”, possuem 8 pontos de emissão de LED e 2 pontos de emissão de LASER (Figura 9).

Figura 9- Equipamento e aplicador do aparelho de fototerapia.

Equipamento e aplicador do aparelho de fototerapia com 8 pontos de emissão de LED e 2 pontos de emissão de LASER e o tamanho das respectivas áreas do aplicador.

4.2.1 Características técnicas do equipamento

Seguindo as normas da WALT (Word association for photobiomodulation therapy), este trabalho respeitou a medida e descrição de todos os parâmetros fundamentais para a realização da fototerapia. As características técnicas do equipamento e o cálculo das densidades de energia foram aferidas e conferidas para os comprimentos de onda utilizados 590 nm e 808 nm pelo no Laboratório de Dosimetria Óptica do Departamento de Física da FFCLRP (Figura 10,12 e 15), sob a orientação do Prof. Dr. Luciano Backmann

Figura 10- Características técnicas aferidas dos comprimentos de onda 590 nm e 808 nm.

Comprimento de onda	590nm	808nm
Potência	2 diodos 0,01 W 2 diodos 0,06 W	2 diodos 0,1 W (100 mW)
Área	2 diodos 0,78 cm ² 2 diodos 0,31 cm ²	2 diodos 0,017 cm ²
Densidade de potência irradiada na placa	11,22 mw/cm ²	20 mW/cm ²

Fonte: tabela da autora

4.3 Padronizações

4.3.1 Fototerapia

Primeiramente foram realizadas medidas de irradiância, potência do LASER infravermelho 808 nm (para confirmar os dados contidos no manual do fabricante) e a calibração do equipamento. A calibração do equipamento foi realizada antes e durante toda a pesquisa para garantir a densidade de energia e potência.

As medidas para o LED foram: medida da irradiância espectral empregando um espectroradimetro modelo USB2000+ da empresa OceanOptics, USA, e foi calibrado na região espectral de 400-800nm. O espectrômetro está acoplado a uma

fibra óptica e um sensor que captou a luz do LED. O programa utilizado para o gerenciamento do espectralímetro e aquisição dos espectros de irradiância espectral é SpectraSuite da oceanoptics. A irradiância espectral mensura a densidade de potência por unidade de comprimento de onda, e tem unidade de $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$. Ao integrar a irradiância espectral se obteve a irradiância total emitida pelo LED, com unidade de $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, dividindo por 1000 passamos para a unidade de mW/cm^2 e depois procedemos com o cálculo da densidade de energia.

As medidas para o LASER determinaram a potência total emitida com um power meter modelo LM-2-Vis calibrado da empresa Coherent. Este sensor foi acoplado a um medidor de potência modelo FildMaxII da empresa Coherent. Esta potência foi empregada para calcular a densidade de potência empregada na irradiação com o LASER. Posteriormente, a posição das medidas: foram realizadas na mesma distância onde se encontram as amostras (2cm a partir da superfície da sonda).

As medidas foram realizadas no Laboratório de Dosimetria Óptica do Departamento de Física da FFCLRP e pelo departamento de Física da empresa DMC (Figura 11).

Figura 11- Medidas e Calibração do equipamento

(A) Medida de potência e calibração do aparelho LASER infravermelho no comprimento de onda de 808 nm. **(B e C)** Medidas de irradiância com e sem distanciamento de 2 cm.

4.3.2 Irradiação

O modo de aplicação foi padronizado no modo contínuo, em ponto fixo e a forma de aplicação pontual. Todas as irradiações foram realizadas dentro do fluxo

laminar.

A irradiação à 2 cm da placa de cultura foi padronizada para evitar contato direto do aplicador do equipamento com a placa de Petri e possível contaminação. Alguns trabalhos com fototerapia utilizam irradiação à distância para evitar aquecimento e contaminação (POURZARANDIAN *et al.*, 2005). Para que a distância e irradiação em ponto fixo fosse padronizada para todas as placas, foi construído um Suporte de Apoio padronizado pela oficina de Precisão da Prefeitura do Campus USP-Ribeirão Preto (Figura 12).

O equipamento utilizado neste estudo para irradiar o LED Âmbar tem operação neste comprimento de onda, no modo contínuo, por apenas 1 minuto. Foi realizada uma adaptação na indústria fabricante do equipamento (DMC São Carlos) para que o equipamento pudesse emitir a luz âmbar em modo contínuo por mais tempo. O tempo total de acionamento conseguido foi de 5 minutos.

Figura 12- Suporte de apoio padronizado para a manopla do equipamento.

A irradiação com fototerapia foi realizada na sala de cultura, dentro do fluxo laminar. O aplicador do equipamento tem uma área de cluster grande e se fossem irradiadas duas placas ao mesmo tempo, a energia poderia dispersar ou até mesmo ser acumulada. Foi adotado a irradiação em placas individuais para garantir a padronização da energia depositada na placa. Para isso, somente meio aplicador do equipamento foi utilizado cobrindo a área da placa. A cobertura adotada foi camada tripla de esparadrapo para garantir que não haveria escape de luz dos clusters

isolados seguindo a metodologia do trabalho de cobertura e transmissividade das luzes (DE OLIVEIRA GUIRRO EC, 2010) (Figura 13).

Figura 13- Modo de irradiação

(A) Cobertura esparadrapo meio aplicador (B) Irradiação em hemiapplicador (C) irradiação em fluxo laminar à 2 cm da placa com hemiapplicador padronizado.

4.3.3 Grupos irradiados e densidades de energia

Os grupos testados foram divididos em fototerapia isolada e fototerapia associada. Primeiramente foi avaliada a citotoxicidade da fototerapia isolada e posteriormente associada. Foi avaliado depois, a migração/proliferação dos mesmos grupos. Os tempos das densidades de energia irradiadas de forma isolada e associada, foram calculados com base nas características técnicas do equipamento (Figura 14 e 15).

Figura 14- Grupos, densidades de energia e tempos irradiados na fototerapia isolada.

Densidade de Energia 590nm	Tempo	Densidade de Energia 808nm	Tempo
2 J/cm ²	191 seg	0,4 J/cm ²	20 seg
4J/cm ²	386 seg	0,6J/cm ²	30 seg
6J/cm ²	578 seg	0,8J/cm ²	40 seg
8J/cm ²	778 seg	1,2J/cm ²	60 seg
11J/cm ²	996 seg	1,6J/cm ²	80 seg
		2J/cm ²	100 seg
		6J/cm ²	300 seg
		12J/cm ²	600 seg

Fonte: tabela da autora

Figura 15- Grupos, densidades de energia e tempos irradiados fototerapia associada. A (LED Âmbar 590 nm) e I (LASER Infravermelho 808 nm)

Densidade de Energia (J/cm ²)	Tempo (seg)
A2+ I 0,8	231
A2+ I 1,6	271
A4+ I 0,8	426
A4+ I 1,6	466

Fonte: tabela da autora

4.3.4 A interferência do meio de cultura na receptividade da luz

O meio de cultura com fenol, que é um reagente indicativo de alteração de pH durante o cultivo, é comumente usado na rotina de cultivo do laboratório, para diferentes linhagens celulares.

Ao programar a irradiação do experimento, foi considerado se a cor do meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com fenol (cor rosa) poderia interferir na receptividade da luz do LED Âmbar 590 nm (cor laranja).

Para realizar a avaliação da possível interferência da cor do meio de cultura, foi realizado o teste de viabilidade celular MTT (método colorimétrico 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio). As células testadas foram Fibroblastos (NIH-3T3), que foram plaqueados em placas de *Petri* (35 mm de diâmetro), na densidade de $0,3 \times 10^5$ células/mL (volume de 1000 µL), em triplicata. Não foi adotado o uso da placa de cultura de 96 poços, pois o objetivo era que na irradiação com fototerapia não houvesse a passagem da luz de um poço para o outro e nem doses acumulativas. O grupo 1 foi irradiado com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com fenol e o grupo 2 irradiado com salina (solução fisiológica, estéril). As densidades de energia irradiadas foram 2 J/cm², 4 J/cm² e 6 J/cm². As placas de *Petri* foram irradiadas individualmente e isoladas em fluxo laminar, para garantir a entrega da energia irradiada (J/cm²).

4.3.5 Plaqueamento e quantidade de células

Para a irradiação, foram escolhidas e padronizadas placas de cultivo celular da marca Kasvi 35mm Código K13-0035. Não encontramos na literatura referencial de quantidade celular para este tamanho de placa e tipos celulares utilizados no modelo deste trabalho. Portanto, a quantidade de células ideal para o tamanho desta placa, foi testada para ser padronizada tanto para o teste de viabilidade celular quanto para o teste de migração/ proliferação celular. Para isso, grupos com quantidades celulares foram testados e avaliados para cada teste (Figuras 16)

Figura 16- Grupos das quantidades celulares testadas para viabilidade celular.

$0,2.10^5$	$0,3.10^5$	$0,4.10^5$	$0,5.10^5$
$0,6.10^5$	$0,7.10^5$	$0,8.10^5$	1.10^5

Fonte: tabela da autora

Figura 17: Grupos das quantidades celulares testadas para teste de migração/proliferação.

$0,2.10^5$	$0,7.10^5$	$1,6.10^5$
$0,3.10^5$	$0,8.10^5$	$1,8.10^5$
$0,4.10^5$	1.10^5	2.10^5
$0,5.10^5$	$1,2.10^5$	$2,4.10^5$
$0,6.10^5$	$1,4.10^5$	$2,6.10^5$

Fonte: tabela da autora

Ao final do teste a quantidade de células escolhida para testar a viabilidade celular foi de $0,3.10^5$ e para a migração/proliferação foi de $2,4.10^5$.

4.3.6 Estresse celular

O soro bovino fetal (SBF) é um suplemento composto por ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas, adicionado ao meio de cultura, normalmente usado a 10%.

Os grupos irradiados foram divididos em dois, um tratado com meio DMEM com 10% SBF e o outro com 2% de SBF para simular uma condição de estresse para as células e poder comparar o impacto do estresse gerado. A diminuição da concentração de soro bovino fetal no meio de cultura, mimetiza in vitro, a condição de estresse que feridas apresentam, como carência nutricional, estresse oxidativo e fatores que dificultam a chega de nutrientes na área de lesão.

Para simular condição de estresse celular, propusemos um modelo no qual o cultivo estivesse privado parcialmente de nutrientes, ou seja, estivesse em meio DMEM com quantidade insatisfatória de fatores de crescimento.

4.4 Cultura celular

Os fibroblastos de comundongos NIH-3T3 foram adquiridos da *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A) e os queratinócitos humanos foram utilizados a partir do banco de células do Laboratório de Cicatrização e Hanseníase do Anexo B da FMFP-USP sob supervisão do Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade (ANEXO B).

Sob condições estéreis, fibroblastos NIH-3T3 e queratinócitos humanos, criopreservados em soro bovino fetal (SBF) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), foram descongelados em banho-maria à 37°C e transferidos para tubos cônicos tipo *falcon* contendo 10 mL meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA) gelado e centrifugados a 1000 rpm com temperatura baixa (10°C) por 10 minutos para diluir o DMSO (Sigma-Aldrich Co. LLC.). De cada *falcon* o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 8 mL de meio de cultura DMEM (Fibroblastos) e meio específico para Queratinócitos, ambos suplementados com 10% SBF, 1% de solução de L-glutamina e 1% solução de antibiótico e antimicótico (penicilina 10.000 U, estreptomicina 10.000 µg e 25 µg de anfotericina B) (GIBCO – Invitrogen Corporation – Grand Island, NY, EUA), e cultivadas em garrafas de 75 cm² a 37°C em incubadora com 5% de CO₂.

Após atingir 80% de confluência, para o descolamento das células aderidas, foi adicionado à cultura 4 mL de solução de tripsina 0,05% (GIBCO – Invitrogen Corporation Grand Island, NY, EUA) e incubada à 37°C por 5 minutos. Findado o tempo foi adicionado 5 mL de meio de cultura DMEM completo, para parar a reação. O volume foi então transferido para um tubo cônico de 15 mL e centrifugado à temperatura ambiente a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de meio de cultura. Em seguida as células foram contadas em Câmara de *Neubauer* após coloração com azul de trypan para utilização no ensaio de citotoxicidade e migração/proliferação (FRONZA *et al.*, 2009; MASSON-MEYERS *et al.*, 2013).

4.5 Atividade citotóxica

Para avaliar a possível atividade citotóxica da fototerapia isolada e associada nas células cutâneas foi realizado estudo da viabilidade celular que foi aferida pelo método colorimétrico 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio MTT, que é baseado na capacidade de células vivas reduzirem o sal tetrazólio em cristais de formazan com coloração púrpura.

Fibroblastos (NIH-3T3) e HaCaT (queratinócitos humanos) foram plaqueados em placas de *Petri* (35 mm de diâmetro), na densidade de 3×10^4 células/mL (volume de 1000 μ L), em triplicata.

As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ para aderência e confluência. Após este período, foram irradiadas as densidades de energia isoladas e associadas uma única vez. Para o controle positivo de viabilidade foi usado apenas meio de cultura DMEM e para controle negativo meio de cultura DMEM acrescido 50% de DMSO (parâmetro positivo de citotoxicidade celular). As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante os tempos de 24 e 48 horas. Após os tempos de incubação, foram retiradas todas as soluções das placas de *Petri* individuais e transferidas para a placa de 96 poços. Foi adicionado 20 μ L da solução estoque de MTT (Sigma-Aldrich Co. LLC.) (5 mg/mL em PBS), associada a meio de cultura DMEM (sem vermelho de fenol) (180 μ L) e as placas foram incubadas sob as mesmas condições anteriores durante 3 horas. Em seguida foi retirada a solução de cada poço e adicionado 200 μ L de DMSO para solubilizar os sais de formazan e então, procedeu-se com a leitura da absorbância a 570 nm. O

experimento foi realizado em triplicata (KRISHNAN *et al.*, 2014, MOHAMMADI *et al.*, 2015, QIAO *et al.*, 2014).

O resultado foi expresso em percentagem de citotoxicidade, que foi determinado por meio da relação entre a densidade ótica (DO) das diferentes densidades de energia irradiadas (J/cm²) pela DO do controle positivo, multiplicado por 100 (KRISHNAN *et al.*, 2014, MOHAMMADI *et al.*, 2015, QIAO *et al.*, 2014).

Figura 18- Esquema de quantificação da citotoxicidade.

$$\% \text{ Citotoxicidade} = \frac{\text{DO diferentes concentrações do soro} \times 100}{\text{DO controle positivo}}$$

4.6 Avaliação da migração/proliferação celular – *scratch assay*

O *Scratch Assay* é um ensaio de cicatrização de feridas, ou seja, uma técnica realizada no laboratório para estudar *in vitro* a migração/proliferação celular. Também chamado de ensaio do “arranhão” pois é feito um risco em uma monocamada de células. Este ensaio permite analisar a interação de recursos com a célula nesse processo de migração celular (AICHELE *et al.*, 2013; FRONZA *et al.*, 2009; JOHNSTON *et al.*, 2016; RIAHI *et al.*, 2012; UPTON *et al.*, 2011).

Para avaliar a atuação da fototerapia na migração/proliferação de células cutâneas, Fibroblastos (NIH-3T3) e Queratinócitos humanos dois grupos receberam o *scratch assay* e foram irradiados (Grupo 1 com soro bovino fetal 10% e grupo 2 com 2%). O plaqueamento e cultivo celular de todas as placas foi realizado com meio de cultura contendo 10% de soro bovino fetal, a condição de estresse diminuindo a quantidade de SBF para 2%, foi realizada após a realização do “arranhão” na monocamada celular.

Sob condições estéreis, foram plaqueados em placas de *Petri* (35 mm de diâmetro) de fundo plano, na densidade de $2,4 \times 10^5$ células (volume de 1000 µL), por poço, em triplicata. As placas foram incubas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ para aderência e confluência. Com auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL foi criado um “arranhão” (*scratch*) na monocamada de células e retirado todo o volume do meio de

cultura. Em seguida adicionou-se 5mL de salina (cloreto de sódio 0,9% estéril) e irradiou-se uma única vez os poços com as densidades de energia definidas para fototerapia isolada e associada. Os poços considerados como controles basais e negativos não receberam irradiação, porém foram mantidos fora da estufa pelo mesmo tempo da irradiação. Além disso, das placas consideradas controles negativos, foi retirado 50% do meio de cultura e acrescido em DMSO. Como queríamos submeter todas as placas às mesmas condições de estresse, mantivemos todos os grupos fora da estufa, dentro do fluxo laminar. Enquanto cada placa era irradiada individualmente, as outras placas eram mantidas dentro do fluxo laminar isoladas para não receberem luz com uma barreira de isopor encapado com papel alumínio.

Após a realização do “arranhão” (scratch) e irradiação, a salina foi removida das placas e o grupo 1 recebeu meio de cultura DMEM com 10% de soro bovino fetal e o grupo 2 com 2% de soro bovino fetal. As placas foram incubadas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante os tempos de 24 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS uma vez, foi adicionado 200 µL de paraformoldeído 4% por 20 minutos, lavou-se novamente com PBS uma vez e foi adicionado 200 µL do marcador nuclear DAPI (2 gotas/ mL de PBS), aguardou-se a reação por 25 minutos no escuro. Em seguida foram feitas fotos em microscópio invertido com fluorescência com lente objetiva 0,5x totalizando 10 fotos por poço.

As imagens foram transferidas para um computador e primeiramente trabalhadas no programa Photoshop® CS6 no qual as fotos foram medidas a partir do controle negativo (sem migração). As demais fotos foram cortadas utilizando 80% do total da medida do controle negativo para ter a certeza de que todas as células quantificadas foram as que migraram. Em seguida, as imagens cortadas foram analisadas pelo *software* ImageJ 1.46 disponível gratuitamente na rede e desenvolvido por Wayne Rasband do *Research Services Branch, National Institutes of Health - NIH* (Bethesda, Maryland, EUA).

O resultado foi expresso em percentagem de migração celular, que foi determinado por meio da relação entre a quantidade de células que migraram na presença da fototerapia pela migração na ausência da fototerapia (controle basal), multiplicado por 100 (FRONZA *et al.*, 2009; FRONZA *et al.*, 2014; MASSON-MEYERS *et al.*, 2013).

4.7 Análise estatística

Os dados foram expressos com o valor médio $\pm$ erro padrão das médias (EPM). A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 8.0, usando One-Way ANOVA seguida por Teste de Tukey, para as comparações entre três ou mais grupos e teste *t student* entre dois grupos com intervalo de confiança de 95% e o valor de p significativo $p < 0,05$.

Foi utilizado o software GraphPad Prism 8.0 para a confecção dos gráficos.

5. RESULTADOS

5.1 Interferência do meio de cultura na receptividade da luz

Para testar se havia interferência da cor do meio de cultura na receptividade da luz, do ponto de vista de viabilidade celular, foram analisados dois grupos. O grupo 1 foi irradiado com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com fenol e o grupo 2 irradiado com salina (solução fisiológica, estéril). As densidades de energia irradiadas foram 2 J/cm^2 , 4 J/cm^2 e 6 J/cm^2 . Pelo teste de viabilidade celular foram analisados os tempos de 24 e 48 horas pós irradiação. Não houve diferença entre os grupos DMEM e Salina (Figura 19). Porém para evitar qualquer possibilidade de interferência da receptividade da luz em densidades de energia não testadas, para os demais testes adotou-se a salina na placa de cultura no momento da irradiação.

Figura 19: Análise da interferência do meio de cultura DMEM X SALINA

Análise das células 3T3-NIH irradiadas com LED Âmbar 590 nm dos grupos DMEM e Salina através do teste de viabilidade celular nos tempos de 24 e 48 horas. Os valores representam as médias $\pm$ EPM ($n=3$). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

5.2 Avaliação da viabilidade celular

5.2.1 Atividade citotóxica da fototerapia Isolada por LED Âmbar (590 nm) in vitro

Após realizar a escolha das densidades de energia do LED Âmbar 590 nm que seriam irradiadas, buscamos conhecer qual delas não apresentariam risco de danos às células. As densidades de energia de 2, 4, 6, 8 e 11J/cm² foram utilizadas para avaliar a atividade citotóxica do LED Âmbar. Estas densidades de energia foram comparadas ao controle não irradiado (basal) e o controle negativo (com a adição de DMSO à cultura). Os testes foram feitos em culturas de fibroblastos (NIH-3T3) e queratinócitos humanos.

Após 24 horas de incubação com as densidades de energia irradiadas, os fibroblastos (3T3) e queratinócitos humanos, apresentaram viabilidade mantida quando comparadas com o controle não irradiado (100%) (Figura 20 A e 20 C).

No tempo de 48 horas, os fibroblastos (3T3) e queratinócitos humanos, após irradiação e incubação, obtiveram o mesmo perfil do gráfico de 24 horas, com percentual de viabilidade mantido para todas as densidades de energia (Figura 20 B e 20 D), o que demonstra a segurança do uso dessas densidades de energia nas células.

Nas doses de 2, 4, 6 e 8J/cm² foi observado um aumento da absorbância/porcentagem em relação ao controle, que pode estar relacionado ao aumento de metabolismo celular/proliferação celular.

Figura 20: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia isolada LED âmbar 590 nm sobre fibroblastos e queratinócitos

Percentual de viabilidade dos Fibroblastos NIH-3T3 e HaCaT Queratinócitos humanos em relação à cultura controle não irradiado (correspondente a 100% células viáveis), pelo método MTT, distribuídos em várias densidades de energia (J/cm²) do tratamento com LED Âmbar 590 nm por **(A)** 24 horas 3T3, **(B)** 48 horas 3T3, **(C)** 24 horas HaCaT e **(D)** 48 horas HaCaT. Os valores representam as médias $\pm$ EPM ($n=3$). * Corresponde à diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

5.2.2 Atividade citotóxica da fototerapia Isolada por LASER Infravermelho (808 nm) in vitro

Após realizar a escolha das densidades de energia para o LASER Infravermelho 808 nm, também buscou-se conhecer qual delas também não apresentariam risco de danos às células. As densidades de energia de 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6, 2, 6 e 12J/cm² foram utilizadas para avaliar a atividade citotóxica do LASER Infravermelho. Estas densidades de energia foram comparadas ao controle não irradiado (basal) e o controle negativo (com a adição de DMSO à cultura). Os testes foram feitos em culturas de Fibroblastos (NIH-3T3) e Queratinócitos humanos (HaCaT).

Após 24 horas de incubação com as densidades de energia irradiadas, os Fibroblastos (3T3) e Queratinócitos humanos, apresentaram viabilidade mantida quando comparadas com o controle não irradiado (100%) (Figura 21 A e 21 C).

No tempo de 48 horas, os Fibroblastos (3T3) e Queratinócitos humanos

(HaCaT), após irradiação e incubação, obtiveram o mesmo perfil do gráfico de 24 horas, com percentual de viabilidade mantido para todas as densidades de energia (Figura 21 B e 21 D), o que demonstra a segurança do uso dessas densidades de energia nas células.

Figura 21: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia isolada LASER 808 nm sobre fibroblastos e queratinócitos

Percentual de viabilidade dos Fibroblastos NIH-3T3 e HaCaT Queratinócitos humanos em relação à cultura controle não irradiado (correspondente a 100% células viáveis), pelo método MTT, distribuídos em várias densidades de energia (J/cm²) do tratamento com LASER Infravermelho 808 nm por **(A)** 24 horas 3T3 , **(B)** 48 horas 3T3 , **(C)** 24 horas HaCaT e **(D)** 48 horas HaCaT. Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

5.2.3 Atividade citotóxica da fototerapia Associada por LASER Infravermelho (808 nm) e LED Âmbar 590 nm in vitro

Após avaliar os resultados da citotoxicidade das densidades de energia irradiadas de forma isolada do LASER Infravermelho 808 nm e do LED Âmbar 590 nm, foram escolhidas as densidades de energia (J/cm²) para o modo associado.

A escolha das doses que foram irradiadas no modo associado, levou em consideração a viabilidade e o tempo de aplicação. Quando as densidades de energia mantiveram viabilidade semelhante, optou-se por aquela que demandava

tempo menor de irradiação pensando no conceito deste estudo ser pré clínico e viabilizar menor tempo de aplicação clínica.

Para a irradiação da fototerapia associada, também era importante avaliar se essa associação de doses não seria citotóxica. Foram avaliadas as densidades de energia associadas de (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²); (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²); (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²) e (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²). Estas densidades de energia foram comparadas ao controle não irradiado (basal) e o controle negativo (com a adição de DMSO à cultura). Os testes foram feitos em culturas de Fibroblastos (NIH-3T3) e Queratinócitos humanos (HaCaT).

Após 24 horas de incubação com as densidades de energia associadas irradiadas, os fibroblastos (3T3) e queratinócitos humanos, apresentaram viabilidade mantida quando comparadas com o controle não irradiado (100%) (Figura 22 A e C).

No tempo de 48 horas, os fibroblastos (3T3) e queratinócitos humanos, após irradiação e incubação, obtiveram o mesmo perfil do gráfico de 24 horas, com percentual de viabilidade mantido para todas as densidades de energia (Figura 22 B e 22 D), o que demonstra a segurança do uso dessas densidades de energia nas células.

Figura 22: Medida da citotoxicidade pelo MTT após 24 e 48 horas da fototerapia associada Led Âmbar 590 nm + Laser Infravermelho 808 nm sobre fibroblastos e queratinócitos

Percentual de viabilidade dos fibroblastos NIH-3T3 e HaCaT queratinócitos humanos em relação à cultura controle não irradiado (correspondente a 100% células viáveis), pelo método MTT, distribuídos em A2+ I 0,8 (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²); A2+ I 1,6 (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²) ; A4+ I 0,8 (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²) e A4+ I 1,6 (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²) **(A)** 24 horas 3T3 , **(B)** 48 horas 3T3 , **(C)** 24 horas HaCaT e **(D)** 48 horas HaCaT. Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa (p<0,05) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

5.3 Avaliação da migração/proliferação celular – *scratch assay*

Para compreender a atuação da fototerapia na cicatrização cutânea, foi avaliada a migração/proliferação celular de fibroblastos e queratinócitos in vitro, utilizando o modelo de *Scratch Assay* no modo fototerapia isolada e associada. As porcentagens de migração/proliferação celular comparadas ao grupo não irradiado e entre os grupos, foram expressas em gráficos. As imagens das células foram expressas em fotos evidenciadas com marcador nuclear DAPI.

5.3.1 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de fibroblastos 3T3 com LASER Infravermelho 808 nm nas concentrações de soro bovino fetal a 10% e 2%

Ao observar as porcentagens de migração (Figura 23) e as pranchas com as imagens das culturas de Fibroblastos 3T3 (Figura 24 e 25), nota-se que ocorreu aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em quase todas as densidades de energia de fototerapia quando comparadas ao controle basal (linha tracejada), exceto as densidades de energia de 6J/cm² e 12J/cm², que se mantiveram semelhantes ao Scratch não irradiado (SNI) quando a concentração de soro bovino fetal foi de 10% (Fig. 24). Já no grupo irradiado com soro bovino fetal à 2% pode-se observar que todas as densidades de energia foram superiores ao controle basal (Scratch não irradiado), porém não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 23: Migração/proliferação celular pelo método *Scratch Assay* com LASER Infravermelho 808 nm na 3T3

Migração/proliferação celular pelo método *Scratch Assay*. Percentual de migração dos fibroblastos em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) comparado as doses de 0,6J/cm², 0,8J/cm², 1,6J/cm², 6J/cm² e 12J/cm² (LASER Infravermelho 808 nm). Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Figura 24- Imagens microscópicas fluorescente do ensaio *scratch assay* com Fibroblastos NIH-3T3 SBF 10%

A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com

soro bovino fetal a 10%.

Figura 25- Imagens microscópicas por fluorescência do ensaio *scratch assay* com Fibroblastos NIH-3T3 SBF 2%

A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%.

5.3.2 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de queratinócitos HaCaT com LASER Infravermelho 808 nm nas concentrações de soro bovino fetal a 10% e 2%

Observando as porcentagens de migração (Figura 26) e as pranchas com as imagens das culturas de Queratinócitos HaCaT (Figura 27 e 28), nota-se que ocorreu aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em todas as densidades de energia de fototerapia quando comparadas ao controle basal (linha tracejada) no grupo irradiado com soro bovino fetal a 10%. No grupo de estresse da concentração de soro bovino fetal 2%, somente a densidade de energia de 1,6J/cm² mostrou aumento da porcentagem de migração/proliferação celular. As densidades de energia 0,6J/cm², 0,8J/cm², 6J/cm² e 12J/cm² permaneceram semelhantes ao scratch não irradiado (SNI) (Figura 28). Não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 26: Migração/proliferação celular pelo método *Scratch Assay* com LASER Infravermelho 808 nm no HaCaT

Migração/proliferação celular pelo *scratch assay*. Percentual de migração dos queratinócitos em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) comparado as doses de 0,6J/cm², 0,8J/cm², 1,6J/cm², 6J/cm² e 12J/cm² (LASER Infravermelho 808 nm). Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Figura 27- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com HaCaT SBF a 10%

A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com diferentes densidades de energia do LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 10%.

Figura 28- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com HaCaT SBF a 2%

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com queratinócitos HaCaT. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratada com as densidades de energia do LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%

5.3.3 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de fibroblastos 3T3 com LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal a 10% e 2%

Analisando as porcentagens de migração (Figura 29) e as pranchas com as imagens das culturas de fibroblastos 3T3 (Figura 30 e 31), nota-se que ocorreu aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em todas as densidades de energia de fototerapia com LED Âmbar 590 nm, quando comparadas ao controle basal (linha tracejada) (Figura 29) e scratch não irradiado (Figura 30 e 31). O comportamento de migração/proliferação celular nas concentrações de soro bovino fetal a 2% e a 10% foram muito semelhantes, exceto para a densidade de energia 4 J/cm^2 que mostrou-se mais proliferativa no grupo SBF 10%. Nos dois grupos, a fototerapia com LED âmbar 590 nm mostrou-se mais efetiva na proliferação celular nas densidades de energia 2 e 4 J/cm^2 .

Não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 29- Migração/proliferação celular pelo método *Scratch Assay* com LED Âmbar 590 nm 3T3

Migração/proliferação celular pelo *Scratch Assay*. Percentual de migração dos fibroblastos em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) comparado as doses de 2J/cm², 4J/cm² e 8J/cm² (LED Âmbar 590 nm). Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Figura 30- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fibroblastos 3T3 em SBF a 10%

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fibroblastos NIH-3T3. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LED Âmbar 590 nm em meio de cultura com soro bovino fetal à 10%.

Figura 31- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com 3T3 e SBF a 2%

Imagens microscópicas fluorescente do ensaio *scratch assay* com Fibroblastos NIH-3T3. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LED Âmbar 590 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%

5.3.4 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada em cultura de queratinócitos HaCaT com LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%

Observando as porcentagens de migração (Figura 32) e as pranchas com as imagens das culturas de queratinócitos HaCaT (Figura 33 e 34, observa-se que houve aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em todas as densidades de energia de fototerapia com LED Âmbar 590 nm nos dois grupos com SBF a 2% e a 10%), quando comparadas ao controle basal (linha tracejada). Porém, o comportamento de migração/proliferação celular nas concentrações de soro bovino fetal 10% foram maiores nas densidade de energia $2\text{J}/\text{cm}^2$ e $4\text{J}/\text{cm}^2$, as quais se mostraram mais proliferativas quando comparadas ao controle não irradiado e no *scratch* não irradiado do grupo SBF 2%, provavelmente relacionado à situação de estresse gerada nos queratinócitos pela baixa de SBF. A densidade de energia $4\text{J}/\text{cm}^2$ no grupo SBF 10% foi bastante proliferativa, levando ao fechamento do

“arranhão”.

Não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 32- Migração/proliferação celular pelo *scratch assay* com LED Âmbar 590 nm HaCaT

Migração/proliferação celular pelo *scratch assay*. Percentual de migração dos queratinócitos em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) comparado as doses de 2J/cm², 4J/cm² e 8J/cm² (LED Âmbar 590 nm). Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Figura 33- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com HaCaT SBF 10%

Imagens microscópicas fluorescente do ensaio *scratch assay* com Queratinócitos HaCaT. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LED Âmbar 590 nm em meio de

cultura com concentração de soro bovino fetal à 10%.

Figura 34- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch* assay com HaCaT SBF 2%

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch* assay com Queratinócitos HaCaT. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia do LED Âmbar 590 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%.

5.3.5 Avaliação da cicatrização in vitro após fototerapia associada em cultura de fibroblastos 3T3 com LASER Infravermelho 808 nm e LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%

Analizando as porcentagens de migração (Figura 35) e as pranchas com as imagens das culturas de Fibroblastos NIH-3T3 (Figura 36 e 37), pode-se observar que houve aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em todas as densidades de energia de fototerapia associada com LASER Infravermelho e LED Âmbar 590 nm nos dois grupos (SBF 2% e 10%), quando comparadas ao controle basal (linha tracejada) (Figura 35) e scratch não irradiado (Figura 36 e 37). Porém, o comportamento de migração/proliferação celular nas concentrações de soro bovino fetal 10% são maiores nas densidades de energia LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm² (A2+ I 1,6).

No grupo SBF 2%, o comportamento das densidades de energia associadas aparentam ser semelhantes quando comparadas, porém, as densidades de energia

LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm² (A2+ I 1,6) foi mais proliferativa e mostrou maior diminuição do “arranhão” do que LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm² (A4+ I 0,8) (Figura 37).

Não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 35- Migração/proliferação celular pelo *scratch assay* com fototerapia associada em 3T3

Migração/proliferação celular pelo *scratch assay*. Percentual de migração dos fibroblastos NIH-3T3 em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) com os grupos comparativos com densidades de energia associadas A2+ I 1,6 (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²) e A4+ I 0,8 (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²). Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por teste *t student*.

Figura 36- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fototerapia Associada em 3T3 SBF 10%.

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fibroblastos NIH- 3T3. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia associadas do LED Âmbar 590 nm e LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 10%.

Figura 37- **Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fototerapia associada em 3T3 SBF 2%**

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fibroblastos NIH- 3T3. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia associadas do LED Âmbar 590 nm e LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%.

5.3.6 Avaliação da cicatrização após fototerapia associada em cultura de queratinócitos HaCaT com LASER Infravermelho 808 nm e LED Âmbar 590 nm nas concentrações de soro bovino fetal a 10% e 2%

Observando as porcentagens de migração (Figura 38) e as pranchas com as imagens das culturas de Queratinócitos HaCaT (Figura 39 e 40), verificou-se que houve também o aumento da porcentagem de migração/proliferação celular em todas as densidades de energia de fototerapia associada com LASER Infravermelho e LED Âmbar 590 nm nos dois grupos (SBF 2% e 10%), quando comparadas ao controle basal (linha tracejada) (Figura 38) e scratch não irradiado (Figura 39 e 40). Notou-se comportamento de migração/proliferação celular nas concentrações de

soro bovino fetal 10% maiores nas densidades de energia LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm² (A4+ I 0,8). A densidade de energia LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm² (A4+ I 0,8) foi bastante proliferativa, o que levou ao fechamento do “arranhão” (Figura 39).

No grupo SBF 2%, o comportamento de proliferação das densidades de energia associadas foram semelhantes (Figura 40).

Não houve diferença estatística significativa entre os valores das porcentagens de migração/proliferação celular entre as densidades de energia.

Figura 38- Migração/proliferação celular pelo *scratch* assay com fototerapia associada HaCaT SBF 10%.

Migração/proliferação celular pelo *scratch* assay. Percentual de migração dos queratinócitos HaCaT em relação ao meio de cultura basal não irradiado (representado por 100%) com os grupos comparativos com densidades de energia associadas A2+ I 1,6 (LED Âmbar 2J/cm² e LASER Infravermelho 1,6J/cm²) e A4+ I 0,8 (LED Âmbar 4J/cm² e LASER Infravermelho 0,8J/cm²). Os valores representam as médias ± EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa (p<0,05) entre os grupos por teste t student.

Figura 39- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fototerapia associada em HaCaT SBF 10%.

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com queratinócitos HaCaT. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia associadas do LED Âmbar 590 nm e LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal à 10%.

Figura 40- Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch assay* com fototerapia associada em HaCaT SBF 2%.

Imagens microscópicas por fluorescência do *scratch* assay com queratinócitos HaCaT. A migração celular no “arranhão” foi observada em resposta a uma lesão artificial tratadas com as densidades de energia associadas do LED Âmbar 590 nm e LASER Infravermelho 808 nm em meio de cultura com soro bovino fetal a 2%.

5.3.7 Avaliação da cicatrização após fototerapia isolada e associada em todos os grupos irradiados nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%

A comparação foi realizada em todos os grupos irradiados (isolados e associados com SBF 2% e 10%) expressa em porcentagem de migração/proliferação celular para avaliar o impacto do estresse nutricional gerado nas células. Os Queratinócitos HaCaT quando comparados aos fibroblastos NIH-3T3, foram menos proliferativos no grupo SBF 2% tanto para o LED Âmbar 590 nm, quanto para o LASER Infravermelho 808 nm.

Figura 41- Comparação da migração/proliferação celular pelo *scratch* assay em todos os grupos irradiados de forma isolada ou associada.

Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Em relação aos fibroblastos, o estresse gerado como SBF a 2% não proporcionou diferenças quanto à proliferação independente da fototerapia aplicada comparando-se às culturas celulares tratada com SBF a 10%.

Em relação às culturas de queratinócitos, observamos maior efeito proliferativo da fototerapia quando em SBF a 10%, no entanto, quando SBF a 2%, essa capacidade proliferativa se manteve apenas frente à luz LED âmbar 590 nm tanto isolada quanto associada.

5.3.8 Avaliação da cicatrização após fototerapia associada em todos os grupos irradiados nas concentrações de soro bovino fetal 10% e 2%

Objetivando avaliar a influência da fototerapia associada frente as diferentes situações nutricionais com SBF a 10% e a 2%, todos os grupos irradiados com densidades de energia associadas expressa em porcentagem de migração/proliferação celular foram distribuídos no gráfico abaixo (Figura 42) para avaliar seus respectivos efeitos na cicatrização. Observa-se que os queratinócitos HaCaT foram mais proliferativos nas densidades de energia associadas quando comparados ao fibroblastos 3T3, capacidade essa que se manteve independente do status nutricional das culturas.

Figura 42: Comparação entre a migração/proliferação celular pelo *scratch assay* entre todos os grupos irradiados com 590 nm.

Os valores representam as médias $\pm$ EPM (n=3). * Corresponde à diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos por análise One-Way ANOVA seguida por pós-teste de Tukey.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos irradiados da célula HaCaT nas concentrações de 10 e 2% de soro bovino fetal, ou seja, a luz manteve proliferação de até 200% dos queratinócitos mesmo em situação de déficit nutricional.

6. DISCUSSÃO

Mesmo com grandes avanços nas pesquisas voltadas ao processo de cicatrização, as feridas cutâneas têm alta prevalência e incidência na população, acarretando em altos custos para a saúde pública e provocando uma alta demanda hospitalar. Por isso, novas possibilidades terapêuticas para a cicatrização cutânea, como a fototerapia, tem sido um recurso amplamente pesquisado.

Apesar de ser um processo fisiológico, a reparação tecidual é complexa, envolvendo respostas do organismo e locais que dependem do tipo de tecido acometido, da condição sistêmica do paciente, entre vários outros fatores (DOURADO *et al.*, 2012). No intuito de aumentar a resposta ao tratamento, o profissional da saúde tem buscado novos procedimentos que estimulem a melhora clínica do paciente lesionado através da cicatrização, evitando efeitos deletérios aos tecidos circunvizinhos (CARNNEVALLI, 2001).

Há vários modelos e métodos na literatura para avaliar a cicatrização de feridas crônicas que têm auxiliado na compreensão do reparo tecidual, mesmo se tratando de um processo fisiológico considerado complexo, dinâmico e multifatorial por envolver uma série progressiva de eventos celulares, reações moleculares e bioquímicas (COALSON *et al.*, 2019; WILHELM; WILHELM; BIELFELDT, 2017). O conhecimento adquirido nesses ensaios tem permitido a busca por novas técnicas e tecnologias.

A escolha do cultivo celular neste trabalho, utilizando-se da linhagem fibroblastos (NIH- 3T3) de camundongos e queratinócitos (HaCaT) mostrou-se de fácil cultivo, manejo e com custos acessíveis. Além disso, as normas laboratoriais que foram seguidas em descongelamento, plaqueamento e para o cultivo de células foram de grande valia para que houvesse confluência adequada sem contaminação das amostras, permitindo qualidade aos experimentos realizados.

Os estudos *in vitro* têm mostrado efeitos positivos da fototerapia de baixa intensidade nos diversos mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas. A grande vantagem dos estudos com cultura de células é poder estudar isoladamente os tipos celulares envolvidos na cicatrização de feridas, observando como se comportam dentro de um mecanismo mais complexo, como ocorre no organismo (FRESHNEY, 2005).

Estudos realizados *in vitro* fornecem informações acerca da resposta celular

após interação com diferentes fontes de luz e doses, com grande controle de variáveis como por exemplos nutrientes (HARRY et al., 2001).

Muitas vezes, nos diversos estudos com culturas de células, os passos para o subcultivo, tais como tripsinização, troca do meio, troca dos componentes do soro e variações de temperatura, também podem influenciar na sensibilidade celular à irradiação em baixa intensidade (KARU, TI 1989). Por esse motivo, neste trabalho utilizamos padronizações importantes, triplicatas e até quadruplicatas nos experimentos para evitar ao máximo estas influências.

O propósito desse experimento foi de encontrar a dose ideal da fototerapia para bioestimulação *in vitro*, e confirmar, ou não, a existência de doses inibitórias. Não encontramos na literatura, estudos que avaliaram o efeito citotóxico da fototerapia no comprimento de onda de 590 nm que pudessem nortear densidades de energia (J/cm^2).

O interesse da pesquisa na área da fototerapia de baixa potência tem crescido muito no que se refere aos seus efeitos sobre os diversos tecidos. Vários estudos vêm sendo realizados experimentalmente com a finalidade de observar os efeitos provocados nas células irradiadas com comprimentos de onda, doses e potência variados. A fototerapia por luzes coerentes (*LASER*) destaca-se como um bioestimulador para o reparo tecidual, aumentando a circulação local, a proliferação celular e a síntese de colágeno (SMITH, 2005; DESMET, 2006).

As densidades de energia, ou fluências (J/cm^2) escolhidas neste trabalho, basearam-se na literatura e diversos estudos *in vitro*, de diversos comprimentos de onda que utilizaram densidades de energia proliferativas em cultura celular, principalmente as já testadas para o LASER infravermelho 808 nm de forma isolada. Para o comprimento de onda 590 nm, a literatura é escassa em densidades de energia testadas e no modelo deste trabalho nenhuma foi encontrada. Da menor a maior densidade de energia escolhida e irradiada neste trabalho para 590 nm, todas foram definidas, portanto, baseadas em dados da literatura de outros comprimentos de onda descritos como proliferativas.

Há grande variação de parâmetros na literatura, tais como: comprimento de onda, fluência, irradiância, tempo de aplicação, quantidade e frequência dessas aplicações. Sabemos também que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos em mesmas condições. Apesar disso, a maioria dos trabalhos *in vitro*

utilizaram fibroblastos obtidos a partir de amostras de pele humana, ou de animais, pela praticidade de se trabalhar com fibroblastos de linhagens já estabelecidas, menos sensíveis a variações e que se podem adquirir no mercado.

Os aparelhos que emitem a luz LED vêm conquistando espaço na área médica, odontológica e estética. Cada vez mais têm-se discutido sobre as diferenças entre o LASER e o LED, já que, a fotobiomodulação por estes dois emissores de luz apresenta resultados semelhantes e promissores. Diante disso, vários estudos vêm comparando a eficácia desses dois tipos de luz, de acordo com suas características específicas. Alguns justificando a utilização do LED devido ao menor custo, portabilidade e segurança.

Trabalhos encontrados na literatura evidenciam que o LASER de baixa potência possui efeitos mais eficazes sobre órgãos e tecidos enfraquecidos, como por exemplo em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional (RIBEIRO & ZECELL, 2004).

De acordo com Karu *et al.* (2001 e 2004) o mecanismo de atuação de terapia LASER de baixa intensidade, em níveis celulares, baseia-se no aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial, causado por uma excitação dos componentes da cadeia respiratória. Para o comprimento de onda do LED Âmbar 590 nm, Meyer *et al.* (2015) encontraram efeitos de estímulo do colágeno maduro em cicatrizes de ratos wistar, com maior ação no processo de cicatrização tardio.

Considerando a escassez de estudos envolvendo LEDs, a obtenção de protocolos aplicados a estudos *in vitro* ou *in vivo* também é um fator complicador. Os protocolos de terapia com LASER de baixa potência têm sido aplicados para terapia com LEDs com o intuito de comparar os efeitos entre estas modalidades terapêuticas (KARU, 2005).

Verificado os resultados satisfatórios do LED na aplicação fototerapêutica, pode-se hoje citar algumas vantagens na utilização desse tipo de aparelho, como: emissão de luz no espectro desejado, menor tamanho, quase nenhum efeito térmico, maior durabilidade, menor consumo de energia (DOURADO *et al.*, 2012; MARTINS, 2006), menor custo, capacidade de estimular tecidos biológicos sem efeitos colaterais, facilitando a aquisição e aplicabilidade, permitindo a maior parte da população também receba os benefícios da fotobiomodulação nos serviços públicos e privados de saúde (DOURADO *et al.*, 2012).

Oliveira *et al.* (2012), realizou um estudo comparando LASER e LED, no qual

utilizaram como modelos experimentais ratos anêmicos e saudáveis distribuídos em grupos a serem submetidos à irradiação de luz vermelha 630nm LASER e LED. Ao final do estudo, os resultados demonstraram que o LASER promoveu melhor resposta nos fibroblastos de ratos saudáveis, enquanto a luz LED promoveu melhores resultados nos fibroblastos de ratos anêmicos. No entanto, para o comprimento de onda 590 nm não se encontram estudos que testaram essa variação de doses que este trabalho propôs.

Outros autores observaram efeitos semelhantes da luz de LED vermelho sobre fibroblastos, onde variações da potência não foram citotóxicas nos cultivos celulares, mas estimularam a proliferação celular (VOLPATO, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013). Michel (2016), em uma pesquisa onde comparou os efeitos da fotobiomodulação LASER e LED em fibroblastos gengivais oriundos de pacientes com síndrome de Down, o LED 637 nm utilizado para as irradiações também não causou a morte dos fibroblastos em questão. Assim, os resultados deste trabalho corroboram com outros pesquisadores, reafirmando a manutenção da viabilidade dos fibroblastos submetidos à luz LED.

Segundo estudo realizado por Neiburger (1996), a radiação a LASER apresenta efeito bioestimulatório em tecidos vivos, com ou sem substâncias que auxiliem na aceleração de cicatrização de feridas. Esta radiação foi mostrada para estimulação de rápida epitelização, aumento de fibroblastos ou colágeno, proliferação produção em animais e cultura de tecidos humanos. Esses efeitos não ocorrem em todos os casos irradiados, mas é extremamente dependente da densidade de potência e o tipo de LASER utilizado, ou seja, o comprimento de onda.

Os autores VAN BREUGEL e Bar (1992) utilizaram fluências entre 1 e 12 J/cm², doses estas consideradas estimulantes para proliferação celular. Muitos autores como Mester, acreditam que não se deve ultrapassar uma densidade de energia de 12J/cm², pois então poderíamos causar um efeito inibidor ao invés de estimulante ou proliferativo (TUNÉR,1999).

Muitos autores como Mester, acreditam que não se deve ultrapassar uma densidade de energia de 12J/cm², pois então poderíamos causar um efeito inibidor (TUNÉR,1999). Baseado nessas informações, não escolhemos para manter nas irradiações, densidades de energia até 12J/cm², o que corroborou em não termos nenhuma resposta inibitória. Em geral, os estudos utilizam fluências entre 1 e 12 J/cm², doses estas que também foram testadas neste estudo.

Utilizando cultura de fibroblastos humanos, Van Breugel e Bar (1992) testaram a proliferação celular e a produção de colágeno tipo I, variando a potência e o tempo de exposição durante a aplicação de um *LASER* 630nm. Seus resultados mostraram que potências abaixo de 2,91 mW intensificaram a proliferação celular, ao passo que as mais altas não produziram efeito algum, revelando uma produção de colágeno inversamente proporcional à proliferação celular. Estes estudos que relatavam suas proliferações celulares em doses baixas com o *LASER*, nos levou a utilizar e testar, portanto, doses como 0,4, 0,6, 0,8 J/cm² para o comprimento do *LASER* infravermelho 808 nm.

O *LASER* infravermelho tem sido citado por vários autores como responsável pelo aumento do número de fibroblastos (ELKE *et al.*, 2003; NEMETH *et al.*, 1993; WEBB *et al.*, 1998; LOESVSCHALL *et al.*, 1994), aumento da atividade metabólica celular (CARNEVALLI *et al.*, 2003) e aumento de gradiente iônico transmembrana (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Loevschall e Arenholt-Bindslev (1994) realizaram um trabalho in vitro com cultura de fibroblastos da mucosa bucal de humanos. O *LASER* de 812 nm foi aplicado. O grupo que mostrou melhores resultados foi o que recebeu 0,4 J/cm². Esta última dose também foi testada e irradiada neste estudo no comprimento de 808 nm, porém sua proliferação foi menor que 0,6 J/cm².

Azevedo *et al.* (2006) realizaram um estudo para avaliar o efeito de diferentes densidades de potência (mW/cm²) na fotobiomodulação de fibroblastos gengivais humanos. O *LASER* utilizado foi 830nm, com 2 J/cm² de densidade de energia. O grupo de 10 mW apresentou maior crescimento celular durante todo o experimento, levando à conclusão de que quanto menor a densidade de potência, maior o crescimento celular.

A densidade de energia de 1,6J/cm² testada e irradiada neste estudo, também foi testada por (BRAVERMAN 1989) que submeteu coelhos, com feridas cirúrgicas em cada lado do dorso, a três tipos diferentes de radiação. Um grupo recebeu *LASER* (632,8 nm) na dose de 1,6J/cm², em outro grupo foi aplicado *LASER* infravermelho na dose de 8J/cm², um terceiro número de sujeitos recebeu os dois tipos de *LASER* em doses acumuladas, em todos os animais as feridas irradiadas foram somente as do lado esquerdo, enquanto as outras serviam de controle. Os resultados evidenciaram aumento da tensão de tecido, da área de colágeno, espessura da epiderme e cicatrização da ferida em todos os grupos em relação ao

controle, sem diferenças significativas entre os diferentes tipos de aplicação. No nosso estudo, a dose de $1,6\text{J}/\text{cm}^2$ no comprimento de 808 nm, foi a mais proliferativa entre todas as densidades de energia testadas.

Embora desconsiderando o efeito parácrino da fototerapia, Kana *et al*, estudaram 96 ratos com feridas cirúrgicas, uma de cada lado do dorso, quando da aplicação de LASER 632,8 nm e 514 nm nas doses de 4, 10 e $20\text{J}/\text{cm}^2$, apenas as úlceras do lado esquerdo foram tratadas, enquanto as do lado direito passaram a ser controle. Todas as feridas, de ambos os grupos, cicatrizaram até o final do período proposto, apresentando processo cicatricial otimizado com LASER na dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$. Essa densidade de energia também se mostrou uma das mais proliferativas em nosso estudo, no grupo LED Âmbar 590 nm no modo isolado e associado.

Na literatura, encontramos vários trabalhos que demonstram que, em condições de homeostase (tecido íntegro), não se observa efeito após a irradiação de LASER nesses tecidos, porém, esse feito é frequentemente observado quando o tecido está submetido à alguma condição de estresse e lesão. A ação da fototerapia com LASER em baixa intensidade sobre células mesenquimais, em especial fibroblastos, está bem estabelecida. Ela tem efeito de estimular o crescimento destas células, particularmente evidente se estas estiverem com suas funções debilitadas. Em cultivo celular isso pode ser conseguido quando usamos as células em déficit nutricional. Cada linhagem apresenta uma concentração ideal de soro fetal bovino (SFB) para responder à fototerapia com LASER em baixa intensidade. Algumas células apresentam crescimento com a metade do SFB que normalmente elas necessitam para seu crescimento característico (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2006; FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006).

Os fibroblastos crescem e desenvolvem-se otimamente *in vitro* quando estão em condições ideais de temperatura, pressão e fatores nutricionais e de crescimento; o meio de cultivo ideal para fibroblastos é aquele cuja concentração de soro fetal bovino seja de 10% (PAUL, 1993). Em nosso estudo foram testadas duas concentrações do SBF (2% e 10%) buscando colocar as células em déficit nutricional, para avaliar os efeitos da fototerapia isolada ou associada nas distintas condições nutricionais das células .

A escolha da quantidade de SBF à 2% para gerar estresse nas células, baseou-se em uma revisão de literatura. Por exemplo a tese de doutoramento

intitulada “Análise in vitro da fototerapia com lasers em baixa intensidade (660nm e 780nm) sobre a ação do vírus herpes tipo I em células epiteliais de macacos (Vero)” comparou os crescimentos celulares com 2 e 5% de soro bovino fetal e analisou as curvas de crescimento. Com 2 e 5 % de SBF, as culturas de células apresentaram crescimentos semelhantes e significativamente menores que aqueles das células controle, ou seja, crescidas em meio com 10 % de SBF. Por essa razão, optamos por trabalhar nas fases de estresse nutricional com a suplementação do meio de cultivo com apenas 2 % de soro bovino fetal.

Almeida-Lopes *et al.*(2001) aplicou a fototerapia (*LASER*) em diferentes comprimentos de onda (670nm, 692nm 780nm, 786nm), porém com a mesma fluência de 2 J/cm², em cultura de fibroblastos em dois meios de cultivo celular, meio ideal para proliferação celular (10% de soro bovino fetal) e meio com situação de estresse, apresentando déficit nutricional (5% de soro bovino fetal). Os resultados mostraram que as células em meio com déficit nutricional, apresentaram crescimento celular significativamente menor que as células no meio ideal de crescimento. No entanto, quando irradiadas, as células em meio com deficiência nutricional apresentaram crescimento similar ou maior que as células cultivadas em condições ideais para o crescimento. Esses achados corroboram com os resultados que encontramos em nosso trabalho quando submetemos as culturas de fibroblastos e queratinócitos ao soro bovino fetal a 2%.

No plaqueamento e cultivo, foram mantidas as concentrações de 10% SBF, mas para os protocolos de *scratch assay*, foi gerado o estresse celular no momento do “arranhão”. Testes iniciais foram realizados na intenção de se cultivar as células com SBF 2%, desde o plaqueamento, porém, o desenvolvimento celular e confluência nas placas foi comprometido e por isso não foi adotado.

Neste estudo, utilizamos tanto a fototerapia isolada quanto associada visando a obtenção de resultados que contribuam com a comunidade científica inerentes à parâmetros do aparelho, já que, existe ainda, uma escassez considerável de trabalhos que melhorem os protocolos de irradiação das culturas in vitro e que sugerem os melhores parâmetros para obter respostas positivas nas células em cultura.

Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho pesquisar interações em nível molecular, a literatura estabelece a fotobiomodulação com LED de 590 nm eficaz para alterar a expressão gênica, síntese de colágeno e redução da expressão

de MMP-1 in vitro e demonstrou por meio de coloração imunofluorescente um aumento no colágeno I e uma diminuição na MMP-1 após o tratamento com fotomodulação LED 590 nm (MC DANIEL DH, 2010). Kipshidze (2001) desenvolveu cultura de células e irradiou LASER 630nm com potência de 5 mW sobre as placas de cultura. Havia exposições radiantes de 0,1 J/cm², 0,3 J/cm², 0,5 J/cm² e 6,3 J/cm². Obteve como resultado, aumento na produção de VEGF e TGF- β estimulando a proliferação de células endoteliais. O LASER na luz visível tem efeito nas mitocôndrias. Assim, quando estimuladas pela fototerapia com LASER em baixa intensidade essas mitocôndrias liberam mais ATP para a célula que leva a um aumento da taxa de proliferação.

Quando os experimentos são feitos in vitro, por exemplo em cultura de células cujos cultivos apresentem-se em monocamadas como no *scratch assay*, a luz LASER incide e conserva sua polarização e coerência. Ali sim, esses fatores podem ser determinantes nos resultados biológicos gerados. A absorção de fótons por parte da célula, seja diretamente por captação pelos cromóforos mitocondriais ou por ação em sua membrana celular, produz estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas. Estas ações determinam alterações fotodinâmicas em cascatas de reações e em processos fisiológicos com conotações terapêuticas (FUNK *et al.*, 1992; LOEVSCHELL e ARENHOLT-BINDSLEV *et al.*, 1994; LUBART *et al.*, 1997).

A fototerapia por LED pode induzir uma cicatrização mais rápida por conseguir modular o processo inflamatório e desta forma controlar o dano tecidual que pode ser causado pela inflamação exacerbada. Ainda, a fototerapia por LED estimula a atividade dos fibroblastos através da modulação da função mitocondrial destes, aumentando assim, a síntese de colágeno. Além disso, há evidências que este tipo de fototerapia consegue acelerar o processo de cicatrização de úlceras crônicas, incluindo úlceras venosas, de diabéticos, arteriais e por pressão (OLIVEIRA SAMPAIO *et al.*, 2013; PARK, K. Y. *et al.*, 2013)

Corroborando com a literatura, trabalhos de Minatel *et al.* (2009) realizados em nosso serviço, demonstraram que a fototerapia associada (LED 660/808 nm) acelera a cicatrização de úlceras crônicas em pacientes diabéticos.

Na revisão da literatura verificamos claramente a necessidade de standardização de modelos e fixação de parâmetros de trabalho. Os efeitos do laser sobre a proliferação celular são extensamente pesquisados e amplamente

conhecidos. Entretanto há controvérsias sobre a melhor potência de trabalho, bem como a fluência e irradiância ideais para se obter o resultado desejado, ou para a maximização desses resultados. Existe ainda a possibilidade de que haja doses inibitórias, ainda que poucos trabalhos na literatura tenham conseguido provar esse efeito. Em nosso trabalho não obtivemos efeitos inibitórios frente as diferentes doses e comprimentos de ondas irradiados.

No modelo de cicatrização cutânea *in vitro* vimos que a fototerapia, em especial a fototerapia associada, demonstrou potencial para acelerar este processo por estimular a migração/proliferação principalmente dos queratinócitos, os quais possuem fundamental papel na cicatrização e no fechamento da ferida, células que podem também estar relacionadas ao fenômeno de contração na fase de remodelagem tecidual.

A participação de queratinócitos na remodelagem da ferida foi levantada por SOUREN *et al.* (1989), quando relataram que géis colágenos poderiam ser rearranjados se queratinócitos fossem semeados sobre suas superfícies, efeito que não era observado se as células fossem semeadas no interior do gel.

Isaac *et al.* (2011) mostraram dados em seu estudo, que sugerem que alguns conceitos sobre as fases proliferativa e contrátil de cicatrização da ferida precisam ser revistos. A maioria dos especialistas considera que fibroblastos são os únicos responsáveis pela contração da ferida e pelo rearranjo do colágeno. No entanto, os autores sugerem uma colaboração clara dos queratinócitos nesse sentido. Os mecanismos exatos dessa participação, porém, devem ser mais bem compreendidos pois os queratinócitos têm papel importante na reorganização da matriz extracelular.

Apesar dos nossos dados não apresentarem diferença estatisticamente significantes quando comparados ao valor basal, eles mostraram grande tendência de estímulo à cicatrização pela fototerapia.

Há muito que ser pesquisado ainda na área de fototerapia por LASER/LED em baixa intensidade, mas acreditamos poder beneficiar os pacientes com esta modalidade terapêutica, desde que haja critérios sérios e bem definidos para sua indicação, assim como uma avaliação criteriosa quanto às contraindicações e cuidados nas aplicações.

É com base nesses estudos que será possível esclarecer os mecanismos de ação da fototerapia de baixa intensidade na cicatrização de feridas e determinar protocolos seguros e eficazes.

7. CONCLUSÃO

- A fototerapia Isolada com LED âmbar 590 nm mostrou-se mais efetiva na proliferação de queratinócitos HaCaT nas densidades de energia 2 e 4 J/cm²;
- O LASER Infravermelho 808 nm estimulou migração/proliferação de forma isolada e associada ao LED 590 nm em ambas as células;
- A fototerapia associando LED âmbar 590 nm e LASER infravermelho 808 nm demonstrou potencial de migração/proliferação maior nos queratinócitos HaCaT no modelo *in vitro* de scratch;
- O fenol associado ao meio de cultura DMEM não interferiu na receptividade da luz LED Âmbar 590 nm pelos testes de citotoxicidade;
- O estresse nutricional celular utilizando soro bovino fetal a 2% alterou a ação da fototerapia na cicatrização *in vitro* mantendo-se atividade proliferativa principalmente dos queratinócitos HaCaT sob LED âmbar 590 nm isolado ou associado.
- O LED Âmbar 590 nm demonstrou-se seguro e com potencial de cicatrização no modelo *in vitro* nas doses avaliadas no estudo;

Sugere-se que novos estudos sejam realizados com o intuito de testar o potencial de cicatrização do LED 590 nm em tecidos humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITS, W; ARRAZOLA P; GUPTA, AK Terapia Baseada em Diodo Emissor de Luz. **Derm. Clin.**, Pág. 38-40, 2005.

AGNE, J. E. (2015). **Eletrotermofototerapia**. Santa Maria.

AGUIAR JUNIOR AC, ISAACC, NICOLSI JT, MEDEIROS MMM, PAGGIARO AO GEMPERLI R. Analysis of the clinical care of patients with chronic ulcers of the lower limbs. **Revista Brasileira Cirurgia Plástica**. 2015 Apr; 30(2):258-63. DOI: 10.5935/2177-1235.2015RBCP0146.

AICHELE, K. et al. Oberringer Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 386, p. 853–863, 2013.

ALBERTINI, R et al. Comparação do efeito antiinflamatório dos lasers de baixa potência AsGa e GaAlAs. In: Encontro de Iniciação Científica, 5., 2001, São José dos Campos/ Encontro de Pós-Graduação da UNIVAP, 1., 2001, São José dos Campos. **Anais., São José dos Campos: UniVap**, 2001b, p. 307-09.

ALMEIDA, J. S. de. **Avaliação de células fibroblásticas submetidas à terapia LASER de baixa potência**. 2016. 62 páginas. Dissertação de Mestrado - Universidade Norte do Paraná, Londrina.

ALMEIDA-LOPES L.; LOPES A. **Atualização clínica em odontologia: Técnica de drenagem linfática ativada por laserterapia**. São Paulo: Artes Médicas, p. 327-340. 2006.

ALMEIDA LOPES L, RIGAU J, ZANGARO RA, GUIDUGLI-NETO J, JAEGER MM. Comparison of the low level LASER therapy effects on cultured human gingival Fibroblastos proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surg Med**. 2001;29:179-84.

AL-WATBAN, FAH; ZHANG, XY A aceleração da cicatrização de feridas não é atribuída à transmissão da pele do LASER. **LASER**, v. 11, n. 1, pág. 6-10, 1999.

ANDERSON, R. R; PARRISH, J. A. Optical properties of human skin. In: REGAN, J. D.; PARRISH, J. A. (Ed.). **The Science of Photomedicine**. New York: Plenum, p.147-195, 1982.

ANSELM, M. L.; PEDUZZI, M.; FRANÇA JUNIOR, I. Incidência de úlcera por pressão e ações de enfermagem. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 257–264, jun. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-21002009000300004&lng=pt&tlng=pt>.

ANVISA. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde 4. **Anvisa**, v. 2a EDIÇÃO, n. Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde Medidas, p. 122, 2017.

AZEVEDO, H. L., et al . Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. **Lasers Med Sci.** v.21, n.3, p.86–89, 2006.

AZEVEDO LH, EDUARDO F DE P, MOREIRA MS, EDUARDO CP, MARQUES MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. **Lasers Med Sci** 2006; 21(2):86-9

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, mar. 2005.

BANSAL, C.; SCOTT, R.; STEWART, D.; COCKERELL, C. J. Decubitus ulcers: A review of the literature. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 10, p. 805–810, 2005.

BARANOSKI, S.; AYELLO, E.A. Wound Care Essentials. In.: **Advances in skin & Wound Care**. 1st ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, p. 364-373, 2004.

BARBOSA, M. T. A.; LIMA, Y. A. **ANÁLISE TEMPORAL DA MORBIDADE HOSPITALAR DE LESÕES DE PELE NO BRASIL**. 2019. Universidade Tiradentes, 2019.

BARRIENTOS S, STOJADINOVIC O, GOLINKO MS, BREM H, TOMIC-CANIC M. **Growth factors and citokines in wound healing. Wound repair regen.** 2008;16(5):585-601.

BAROLI, BIANCA MARIA. **Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality?** **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21-50, 2010.

BARROS FC, ANTUNES SA, FIGUEREDO CMS, FISCHER RG. LASER de baixa intensidade na cicatrização periodontal. **Med Biol.** 2008;7:85-9.

BASERGA, R. **Cell growth and division - a practical approach**. Philadelphia: I R L Press, p.1-16, 1990.

BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; TURRIONI, A.P.; BAGNATO, V.S.; HEBLING, J.; COSTA C.A.S. In vitro wound healing improvement by low-level LASER therapy application in cultured gingival fibroblasts. **International Journal of Dentistry**. 2012; 2012: 1-6.

BAXTER,G.D., “Therapeutic lasers: theory and practice”.New York: Churchill Livingstone 1994.

BEANNES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF – β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-11, 2003.

BERKI, T. Biological effect of low-power helium Neon (HeNe) laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v.3, p. 35, 1988.

BIHARI, J.; MESTER, A. R. 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.

BOLOGNANI, L.; MAJNI, G.; COSTATO, M.; MILANI, M. ATPase and ATPsynthetase activity in myosin exposed to low power laser and pulsed electromagnetic fields. **Bioelectrochem Bioenergetics**, v.32, p.155-164, 1993.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human fibroblasts in vitro. **Laser Therapy**, v.7, p.55-60, 1995.

BORGES, F. S., & SCORZA, F. A. (2016). **Terapêutica em Estética: Conceitos e Técnicas**. São Paulo: Phorte.

BRASIL. **Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. 2016 [s.l: s.n.]

BRAVERMAN B, MCCATHY RJ, IVANKOVICH AD. Effect of Helium-Neon and Infrared LASER Irradiation on Wound Healing in Rabbits. **Laser in Surgery and Medicine** 1989;9:50-58.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 18, n. 5, p. 240-249, 2013.

BROUGHTON G, 2ND, JANIS JE, ATTINGER CE. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg** 2006; 117(7 Suppl):12S-34S.

BRYANT, R. A.; NIX, D. P. **Wound Healing Physiology: Acute & Chronic Wounds: Current Management Concepts**. 2012, p. 63-82.

CAETANO, K. S. et al. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers Surg Med**, v. 41, n. 6, p. 433-41, Aug 2009.

CALMON, W. J. **Verificação in vitro das temperaturas intra pulpareas geradas pelo clareamento dental com o fotopolimerizador, laser de argônio, laser de diodo de baixa potência e LEDs com laser**. 2006. 65 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba – Instituto de pesquisa e desenvolvimento, São José dos Campos.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; ROSSI, M.T.; ARONSON, E.; SALA, R. A retrospective analysis of real-life practice of off-label photodynamic therapy using methyl aminolevulinate (MAL-PDT) in 20 Italian dermatology departments. Part 1: inflammatory and aesthetic indications, **Photochem Photobiol Sci**. 12: 148-157, 2013.

CAMERON, M. **Agentes físicos na reabilitação**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq.Bras. Cir. Dig**. v.20 (1): 51-58, 2007.

CARDOSO, C.R. et al. Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: A new approach for skin repair. **Immunobiology** (2010), doi:10.1016/j.imbio.2010.06.007.

CARNEVALLI, C., M , PACHECO, R SOARES, RENATO A Z, PINHEIR.,A L. B. O, SOARES N LASER Light Prevents Apoptosis on Cho K-1 Cell Line **Journal of Clinical J. Clin. LASER. Med. Surg.** August, 21(4): 193-196. 2003.

CARNEVALLI, C. M. M. **Efeitos da radiação do diodo laser (Comprimento de onda = 830 nm) em cultura de fibroblastos (CHO-K1).** 2001. 69 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

CARVALHO, S. **Análise histológica nas diferentes fases de cicatrização induzida por radiação LASER Diodo GaAs de 904 nm.** 2003; São José dos Campos.

CASALECHI, H. L.; NICOLAU, R. A.; CASALECHI, V. L.; SILVEIRA, L. J. R.; PACHECO, M. T. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. **Lasers Med Sci.** DOI 10.1007/s10103-008-0607-6,2008.

COALSON , E. et al. Stem cell therapy for chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside, **Genes Dis**, 17;6(4):342-358, Sep 2019.

COLLINS T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN K,ROBBINS C, ABBAS AK, KUMAR V, FAUSTO N. **Patologia estrutural e funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 44-78.

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

CONLAN M J, RAPLEY JW, COBB CM. Biostimulation of wound healing by low-energy LASER irradiation. *J Clin Periodontol.* 1996;23:492-6.

CORAZZA, A. V. et al. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomed. Laser Surg.**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

COSTA, M. P.; GUSTAVO, S.; FABIO, P.; MARCUS, C.; TARCISIO, B. O Riginal a Rtitle Epidemiological Profile and Treatment of Pressure Sores : Experience With 77 Cases. v. 13, n. 3, p. 124–132, 2005.

DALL-AGNOL, M. A.; NICOLAU, R. A.; LIMA, D. E.; MUNIN, E. Comparative analysis of coherent light action (LASER) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers Med. Sci.** Feb 24. DOI: 10.1007/s10103-009-0648-5, 2009.

DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. **Journal of Rehabilitation Research and Development.** Mar/Abr, v.41, n.2, p. 147–54, 2004.

DE OLIVEIRA GUIRRO EC, de Lima Montebelo MI, de Almeida Bortot B, da Costa Betito Torres MA, Polacow ML. Effect of LASER (670nm) on healing of wounds covered with occlusive dressing: a histologic and biomechanical analysis. *Photomed LASER Surg.* 2010 Oct;28(5):629-34.

DESMET KD, PAZ DA, CORRY JJ, EELLS JT, WONG-RILEY MT, HENRY MM, et al. Clinical and experimental applications of NIR-LED photobiomodulation. *Photomed LASER Surg.* 2006;24:121-8.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; AGGARWAL, P.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Preclinical Studies to Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 487–495, 30 ago. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp800032f>>.

DOMANSKY, C.R; BORGES, L.E. **Manual para prevenção de lesões de pele. Recomendações baseadas em evidências.** Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

DOURADO, K, V, B. Ledterapia: Uma nova perspectiva terapêutica ao tratamento de doença de pele, cicatrização de feridas e reparação tecidual. **Ensaio e Ciência**. Vol. 15, nº 6, p. 231-248. São Paulo, 2012.

DUARTE, I.; BUENSE, R.; KOBATA, C. Fototerapia. **Na Bras Dermatol**. Vol. 81, nº 1, p. 74-82, 2006.

EDUARDO FP, BUENO DF, FREITAS PM, MARQUES MM, Passos-Bueno. Stem cell proliferation under low intensity LASER irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med.** 2008; 40(6):433-8.

ELKE, M.; VINCK, A. E.; BARBARA, J.; CAGNIEMARIA, J.; CORNELISSEN, Æ., HEIDI, A.; DECLERCQDIRK, C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power LASER irradiation. *Lasers. Med. Sci.* v.18, n.3, p.95–99, 2003.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**. Mar, 127(3):514-25, 2007.

FANG, Y.; EGLIN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. **SLAS DISCOVERY: Advancing Life Sciences R&D**, v. 22, n. 5, p. 456-472, 2017.

FARIA, M.H.G.; PESSOA, C.O.; MORAES, M. O. Avaliação da citotoxicidade in vitro

e da toxicidade aguda in vivo de extratos da *Phyllanthus amarus*. **Pesquisa Médica**. vol. 2, n. 7, p.26-29, 2004.

FAZIO MJ, ZITELLI JA, GOSLEN JB. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. Cirurgia Cosmética - **Princípios e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000:18-23

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir Bras**, v. 2, p. 28-34, 2005.

FERREIRA, M.A.A., LAVOR, M., CARVALHO, G.M., GUIMARÃES, A.C., SILVA, V.G., PASCHOAL, J.R. Paralisia Facial Periférica e Gestação: abordagem e tratamento. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**, Rio de Janeiro, 2013 Aug; 35(8):368- 72.

FONDER MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:185-206.

FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. A. M. de; AGUIAR, A. F. C. L.; GUEDES, F. A.; LEITE, M. N.; PASSOS, W. R.; COELHO, E. B.; DAS, P. K. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 347–350, jun. 2015.

FREITAS, R. D., & MEJIA, D. M. (2014). **Laser como recurso terapêutico para amenizar a cicatrização hipertrófica**: uma revisão bibliográfica.

FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 2005.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v. 11, p. 87-95, 1991.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126. p. 463-467, 2009.

FRONZA, M. et al. Hyaluronidase modulates inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112297, 2014.

FUJIHARA NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. **Lasers Surg Med**. In press 2006.

FUNK, O. J.; KRUSE, A.; KIRCHNER, H. Cytokine production after heliumneon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.16, p.347-355, 1992.

GARCIA VG, Okamoto T, Kina JR. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP** 1996; 25(1):37-48.

GARCIA, H. V. **Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED**. 2015. 120 páginas. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

GENOVESE JW. LASER de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: **Lovise Ltda**; 2000.175p.

GOLDMAN, L. **The biomedical laser: technology & clinical applications**. New York: Springer Verlag, p.5-25, 1981.

GROSSMAN, N.; SCHNEIDE, N.; DEUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v.22, p.212-218, 1998.

GUIRRO E GUIRRO. **Fisioterapia dermato-funcional**. 3. ed. São Paulo. 2002; Manole.

GUIRRO, E. C. O, GUIRRO, R. R. J. **Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos e patologias**. 2. ed. São Paulo: Manole; 2004.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound Repair and Regeneration. **Nature**. v. 453, p. 314-21, 2008.

HAMBLIN, M.R. Photobiomodulation or low-level laser therapy. **J Biophotonics**, 9(11-12): 1122–1124, 2016.

HARRY, T. Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. **J. Clin. Laser. Med. Surg**. v.19, n.6, p.305-314, 2001.

HAZEKI, O.; TAMURA, M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of the rat head. **Adv Exper Med Biol**, v. 248, p.63, 1989.

HAWKINS, D.H.; ABRAHAMSE, H. The role of LASER fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following Helium-Neon LASER irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**.2006; 38: 74-83.

ISAAC, CÉSAR et al. Papel do queratinócito na contração da ferida: avaliação de impacto usando um modelo de matriz de colágeno povoada por fibroblastos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica** [online]. 2011, v. 26, n. 3.

INTERNATIONAL ORGANIZATION for STANDARDIZATION. **ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, 2009. 24p.

JÄRBRINK, K.; NI, G.; SÖNNERGREN, H.; SCHMIDTCHEN, A.; PANG, C.; BAJPAI, R.; CAR, J. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**. 5(1): 152, 2016.

JESCHKEN, M. G.; WOLF, S. E. **Handbook of Burns Volume 1**. [s.l: s.n.]v. 1, 2020.

JETT, M.; WHELAN, H.T.; BUCHMANN, E.V.; DHOKALIA, A.; KANE, M.P.; WHELAN,N.T.; WONG-RILEY, M.T.; EELLS, J.T.; GOULD, L.J.; HAMMAMIEH,R.; DAS,R. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **J. Clin. Laser. Med. Surg.** v.21, n.2, p.67-74, 2003.

JOHNSTON, S. T. et al. Quantifying the effect of experimental design choices for in vitro scratch assays. **Journal of Theoretical Biology**, v. 400, p. 19-31, 2016.

JORI, G. The molecular biology of photodynamicaction. In: R. Prati y C. A. Sacchi. (Eds). **Lasers in photomedicine and photobiology**. Springer Verlag, p.58-60, 1980.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed., p.359, 2004.

KALIL, C. L. P. V. **LASER e outras fontes de luz na dermatologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

KAMIKAWA,K.; OHNISHI,T. Essential mechanisms of low power Laser effects. In: LASER Applications in Medicine and Surgery. **Monduzzi, Bologna**, p.11-18,1992.

KANA JS, HUTSCHENREITER R. Effect of Low- Power Density LASER Radiation on healing of Open Skin Wounds in Rats. **Arch Surg** 1981;116.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics QE-23**, v.10, p.1703-1717, 1987.

KARU, T. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity LASER radiation. **lasers and the Life Science**. v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

KARU TI. Photobiology of low-power LASER effects. *Health Phys* 1989; 56(5):691-704.

KARU, T. I.; SMOLYANINOVA, N. K.; ZELENIN, A. V. Long-term and shortterm responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.4, n.3, p.167, 1991a.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.27, p.219-223, 1995.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S.; ESENALIEV, R. O. Effects of monochromatic low - Intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. **Lasers Surg Med**, v.18, p.171-177, 1996.

KARU T. Primary and secondary machanisms of action of visible to near - IR

radiation on cells. **J Photochem Photobiol Biol** 1999; 49: 1-17.

KARU, T. I.; AFANASYEVA, N. I.; KOLYAKOV, S. F.; PYATIBRAT, L. V e WELSER, L. Changes in absorbance of monolayer of living cells induced by LASER radiation at 633, 670 and 820 nm. **Lee J Sel Top Qusntum Electron**, v. 7, n. 6, p. 982 – 988, November/December, 2001.

KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V; AFANASYEVA, N. I. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. **J Photochem Photobiol**, v. 80, p. 366-372, 2004.

KARU, T.I. LASER (and LED) Therapy Is Phototherapy. *Photomed.* **Laser Surg.** . v.23, n.1, p.78-80, 2005.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.V.; KOLYAKOV, S.F.; AFANASYEVA, N.I. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **J Photochem Photobiol B**, v.81, p.98-106, 2005.

KARU, T. I., & Kolyakov, S. F. (2005). Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomedicine and LASER Surgery**, 23(4), 355-361. doi:10.1089/pho.2005.23.355.

KARU, T. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol**. 84 : 1091-1099, 2008.

KARU, T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. **Photomedicine and LASER Surgery**. Apr;28(2):159-60, 2010.

KARU, T.; PYATIBRAT, L. Gene expression under LASER and light-emitting diodes radiation for modulation of cell adhesion: Possible applications for biotechnology. **Life**. v,63. n.9,p. 747- 753,2011.

KARUKONDA, S.R.K.; FLYNN, T.C.; BOH, E.E.; MCBURNEY, E.I.; RUSSO, G.; MILIKAN, L.E. The effects of drugs on wound healing: part 1. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v.39, p. 250-257, 2000.

KAVIANI, A. et al. A randomized clinical trial on the effect of low-level LASER therapy on chronic diabetic foot wound healing: a preliminary report. **Photomed LASER Surg**, v. 29, n. 2, p. 109-14, Feb 2011.

KIERSZENBAUM AL. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.168-70.

KIPSHIDZE, N. et al. (2001). Low-power helium:neon LASER irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial

cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v.28, n.4, p.355-364, May.

KISNER, C.; COLBY, L. **Exercícios terapêuticos**. 4. ed. São Paulo. 2005; Editora Manole.

KREISLER M, CHRISTOFFERS AB, AL-HAJ H, WILLERSHAUSEN B, D'HOEDT B. Low level 809-nm diode LASER induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med** 2002; 30:365-9.

KRISHNAN, K.; MANI, A.; JASMINE, S. Cytotoxic Activity of Bioactive Compound 1, 2- Benzene Dicarboxylic Acid, Mono 2- Ethylhexyl Ester Extracted from a Marine Derived Streptomyces sp. VITSJK8. **Int J Mol Cell Med**, v. 3, n. 4, p. 246-254, 2014.

KUBOTA, J.; OHSHIRO, T. The effects of diode laser low reactive level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.127, 1989.

KUFFLER, D. P. (2016). Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative Medicine*, 11(1), 107–122. doi:10.2217/rme.15.82

LEBONVALLET, N. et al. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **Eur J Dermatol**. v. 20, p. 671-84, 2010.

LEE, Y. S. et al. Wound Healing in Development. **Birth Defects Research**, v. 96, p. 213-222, 2012.

LEITE, S.N.; LEITE, M.N.; CAETANO, G.F.; OVIDIO, P.P.; JORDÃO JÚNIOR, A.A.; FRADE, M.A. Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet. **Lasers Med Sci**. Jul; 30(5):1481-8, 2015

LEITE, M. N. **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO MARCEL NANI LEITE Eficácia do soro do látex natural da seringueira**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016.

LI J, CHEN J, KIRSNER R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.

LOEVSCHELL H, ARENHOLT-BINDSLEV D. Effect of low-level diode LASER irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med** 1994; 14:347-54.

LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.12, p.305-310, 1992a.

LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYAKOV, M.; SHIMAN, A.; GROSSMAN, N.; ADAMEK, M.; SHAINBERG, A. The effect of He :He Laser (633 nm) radiation on intracellular Ca²⁺ concentration in fibroblasts. **Laser Therapy**. v.9, p.115-120, 1997.

MAEDA K, FAR Infrared- treatment and medical revolution. Tokyo: **Toppan Insatsu Kabushiki**, 1997.

MAGALHÃES, C. **Fototerapia: luz para rejuvenescer**. Disponível em: <<http://ne10.uol.com.br/coluna/questao-de-pele/noticia/2013/02/04/fototerapia-luz-para-rejuvenescer-397333.php>>. Acesso em 31 mai. 2014.

MALUF AP, UGHINI GC, MALUF RP, PAGNONCELLI RM. **Utilização de LASER terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores**. RGO. 2006;54:182-4.

MARQUES MM, PEREIRA NA, FUJIHARA NA, NOGUEIRA FN, EDUARDO CP. Effect of low-power LASER irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. **Lasers Surg Med** 2004; 34(3):260-5.

MARTINS, B. M. R. **Avaliação da eficácia terapêutica de uma nova modalidade usando fototerapia utilizando diodo emissor de luz – LED**. 2006. 84 páginas. Dissertação de Mestrado – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MASSON, D. dos S. **Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas**. 2011. Universidade de São Paulo, 2011.

MASSON-MEYERS, D.S.; ANDRADE, T.A.M.; CAETANO, G.F.; GUIMARAES, F. R.; LEITE, M.N.; LEITE, S.N.; FRADE, M.A.C. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **Int. J. Exp. Pathol.** 101, 21-37, 2020.

MASSON-MEYERS, D. S. et al. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **International Journal of Natural Product Science**, v. 3, n. 3, p. 10-20, 2013.

MC DANIEL DH, WEISS RA, GERONEMUS R, WEISS MA, MAZUR C, WILSON S. Led Photomodulation II: Effect of Energy Fluence on Procollagen Products of Human Skin Fibroblasts. **ASLMS Annual Conference** Volume 42 Supplement 22, April 2010 page 55.

McKINLEY, A. F.; HARLEN, F.; WHILLOCK, M. J. Biological interactions of optical radiations. In: HILGER, A. (Ed). **Hazards of optical radiation**, p.12-23, 1988.

MENEGUZZO, D. T. **Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com o LASER de baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana**. 2007. 134 páginas. Dissertação de mestrado - USP – Universidade de São Paulo -Faculdade de Odontologia, São Paulo.

MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orv Hetilap**, v.107, p.1012, 1966.

MESTER, E., NAGYLUSKAY, S.; WAIDELICH, W.; TISZA, S. Auswirkungen direkter laserbestrahlung auf menschliche Lymphocyten. **Arch Dermatol Res**, v.263, p.241, 1978.

MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. Biomedical effects of laser application. **Lasers Surgery and Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MICHEL, R.C. **Efeitos com fotobiomodulação do laser e LED na proliferação e migração de fibroblastos gengivais de pacientes com e sem Síndrome de Down**. 2016. 122 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Bauru, São Paulo.

MINATEL D. G.; FRADE M. A.; FRANÇA S. C.; ENWEMEKA C. S. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, n. 6, 433-41, 2009.

MOHAMMADI, E, VATANPOUR, H, SHIRAZI, F. H. Immunomodulatory effects of bee venom in human synovial fibroblast cell line. **Iran J Pharm Res**, v. 14, n. 1, p. 313-320, 2015.

MUSSTTAF RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology*. 7:1-24; 2019 Jan.

NARA Y , MATOMOT S, MORIOKA T. Regulatory action of low intensity LASER on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. **Surg Med Sci**. V.13, p.293-298, 1991.

NEIBURGER, E. J. Does LASER therapy enhance wound healing? **Journal of the Massachusetts Dental Society**, 1996, p. 24.

NEMETH AJ. Keloids and hypertrophic scars. **J Dermatol Surg Oncol**. V.19.,pp.738–746. 1993.

NICOLAU, A. Tendências no uso de protozoários na avaliação do tratamento de águas residuais. *Res. Microbiol.*, V. 152, n. 7, pág. 621-30, 2001.

NUNO, O. **LASER em dermatologia: conceitos básicos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2009.

OLIVEIRA, A. L., PEREZ, E., SOUZA, J. B., & VASCONCELOS, M. (2014). **curso didático de estética 2** (2 ed.). são caetano do sul, sp: yendis.

OLIVEIRA, B. G. R. B. et al. **Caracterização dos pacientes com úlcera venosa acompanhados no Ambulatório de Reparo de Feridas**. Revista Eletrônica de Enfermagem, Goiânia, v. 14, n. 1, p. 156-63, mar. 2012. ISSN 1518-1944.

OLIVEIRA R. F. et al. Comparison between the effect of low level LASER therapy and low intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. **Photomedicine and LASER Surgery**, v.26,p.6-9,2008

OLIVEIRA SAMPAIO, S. C. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 3, p. 799-806, May, 2013.

OLIVEIRA, Z.; Prevenção e cuidados com a pele da criança e do recém-nascido. An. Bras. Dermatol. vol.86 no.1 Rio de Janeiro Jan./Fev. 2011.

OPEL, D. R.; AGNSTROM, E.; PACE, A. K; SISTO, K; HIRANO-HALI, S. A.; DESAI, S.; SWAN, J. Lighemitting Diodes: A Brief Review and Clinical Experience. **J clin aesthet Dermatol**. Vol. 8, nº.6, p. 36-44, 2015.

OSTUNI, A.; PASSARELLA, S.; QUAGLIANIELLO, E. The energy dose dependence of the activity of glutamate de hydrogenase irradiated with helium neon laser. **Laser Technol**, v.4, n.1/2, p.13-16, 1994.

O'TOOLE, E.A.; MELLERIO, J.E. **Wound Healing**. In: BURNS, T.; BREATHNACH, S.; COX, N.; GRIFFITHS, C. (Ed.). Rook's Textbook of Dermatology. 8th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 14, p. 14.1-14.27.

PANSANI, T. M. **Resposta de Fibroblastos da Gengiva de Pacientes Jovens e Idosos e Efeito da Laserterapia de Baixa Potência e de Fator de Crescimento sobre Estas Células**. 2015. 77 páginas. Dissertação de Mestrado - UNESP – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Araraquara.

PARK, K. Y. et al. The Effects of 830 nm Light-Emitting Diode Therapy on Acute Herpes Zoster Ophthalmicus: A Pilot Study. **Ann Dermatol**, v. 25, n. 2, p. 163-7, May, 2013.

PARRISH, J. A. Photomedicine: potentials for lasers. In: PRATESI, R.; SACCHI, C. A. (Eds). **Lasers in photomedicine and photobiology**. Springer Verlag, p.3-20, 1980.

PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon láser. **Febs Letters** , v.175, n. 1, p. 95, 1984.

PAUL, J. Behaviour of cells in culture. In: PAUL, J. **Cell and tissue culture**. Great Britain: Churchill Livingstone, p.20-30, 1993.

PEDROSO, ANA CAROLINA B. R., SOUZA, JOEL P. C., JÚNIOR MARCOS L., MOURA, VERIDIANA MARIA B. D., BRANDESTETTER, LUCIANA R. G.. Plasma rico em plaquetas e cicatrização. **Investigação**, v. 18, n. 1, p. 35-44, 2019.

PEREIRA, AN Efeito da irradiação com LASER de baixa potência no crescimento celular e pro colágeno síntese de Fibroblastos cultivados. **Lasers Surg. Med.**, V. 31, p. 263-267, 2014.

PEREIRA A.N.; EDUARDO C.P.; MATSON E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers Surg Med.** 31 (4): 263-267, 2002.

PIRES-OLIVEIRA, D.A.A.; OLIVEIRA, R.F.; MAGINI, M.; ZANGARO, R.; PACHECO SOARES, C. Assessment of cytoskeleton and endoplasmic reticulum of fibroblast cells subjected to low-level LASER therapy and low-intensity pulsed ultrasound. **Photomedicine and LASER Surgery**. 2009; 27(3): 461-466.

PORREAU-SCHNEIDER N, SOUDRY M, REMUSAT M, FRANQUIN JC, MARTIN PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon LASER treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence Int** 1989; 20:887-93.

POURZARANDIAN A, WATANABE H, RUWANPURA SMPM, AOKI A, ISHIKAWA I. Effect of low-level Er:YAG LASER irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **J Periodontol** 2005; 76(2):187-93.

POYTON, R. Oç Ball, K. A. Therapeutic photobiomodulation nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome C oxidase. *Discov. Med.*, v11, n. 57, p. 154-9, Feb., 2011.

PRINDEZE, N.J.; MOFFATT, L.T.; SHUPP, J.W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 237, n. 11, p. 1241-8, Nov, 2012.

QIAO, J. et al. Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 11, n. 3, p. 290-299, 2014.

RAJARATNAM, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. **Laser Therapy**, v.6, p.107- 112, 1994.

RAWAT, S.; SINGH, R.; THAKUR, P.; KAUR, S.; SEMWAL, A. Wound healing agents from Medicinal Plants: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S1910-S1917, 2012.

REDDY, GK Comparação dos efeitos fotoestimuladores de He-Ne visível e Ga-infravermelho Como lasers na cicatrização de feridas de ratos diabéticos. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 33, n. 5, p. 344-351, 2003.

RESENDE NM, NASCIMENTO TC, LOPES FRF, PRATES JUNIOR AG, SOUZA NM. Care of people with chronic wounds in Primary Health Care. **J Manag Prim Heal Care.** 2017 July/Sept; 8(1)99-108. DOI:10.14295/jmphc.v8i1.271.

RIAH, R. et al. Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. **J. Lab. Automat.**, v. 17, n. 1, p. 59-65, 2012.

RIBEIRO, M. S., & ZECELL, D. (2004). *LASER de baixa intensidade*. Acesso em 15 de 05 de 2018, disponível em www.ipen.com.br: RIBEIRO, Martha Simões; ZECELL, Denise Maria. *LASER de baixa intensidade*. **A Odontologia e o LASER**. São Paulo: Quintessense, 2004.

RIGAU, J. Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. **Tese** (Doutorado em Histologia) - Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, Reus, 1996.

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication of Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103-120, 2016.

ROSA, C. B. **Efeito da fotobiomodulação LASER ou LED na formação óssea após disjunção da sutura palatina mediana**. 2014. 116 páginas. Tese de Doutorado - UFBA – Universidade Federal da Bahia. Salvador, BA.

SCHREML, S.; SZEIMIES, R. M.; PRANTL, L.; KARRER, S.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. Oxygen in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 2, p. 257–268, 15 abr. 2010.

SHIROTO, M. C.; SUGAWARA, K.; KUMAE, T.; SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Effect of diode laser radiation in vitro on activity of human neutrophils. **Laser Therapy**, v.1, n. 3, p. 135-140, 1989.

SILVA EM, GOMES SP, ULBRICH LM, GIOVANINI AF. Avaliação histológica da Laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Ver Sul-Bras Odontol.* 2007;4:29-35.

SOUDRY M, FRANQUIN JC, PORREAU-SCHNEIDER N, MARTIN PM. Effect of a helium-neon LASER on cellular growth: an in vitro study of human gingival fibroblasts. **J Biol Buccale** 1988; 16(3):129-35.

Souren JM, Ponc M, van Wijk R. Contraction of collagen by human fibroblasts and keratinocytes. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1989;25(11): 1039-45.

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

SMITH KC. LASER (and LED) therapy is phototherapy. *Photomed LASER Surg.* 2005;23:78-80.

STRONCEK, J.D.; BELL, N.; REICHERT, W.M. Instructional powerpoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.90, p.1230-1238, 2009.

TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 33–41, maio 2018.

TASSINARY, J. Raciocínio clínico aplicado á estética facial. Ed. Estética experts, 2019. 32-42 p.

TERRIBILE W. M. V.; CORTI, L.; VELUSSI, C.; CECCHERELLI, F.; BOSO, C.; BELFONTALI, S. Experimental wound healing with coherent and noncoherent radiation. **Laser Technol**, v.2, n.3, p.121-134, 1992.

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.

TÚNER, J. and HODE, L. **Low Level LASER Therapy**. Sweden: Prima Books,1999.

TUNÉR, J.; HODE, L. **The New Laser Therapy Handbook**. Prima Books AB, Tallinn, Estônia, 2010.

UPTON, Z. et al. Human pilot studies reveal the potential of a vitronectin: growth factor complex as a treatment for chronic wounds. **Int. Wound J**, v. 8, n. 5, p. 522–532, 2011.

VAN BREUGEL HHFI, BÄR D. Power density and exposure time of He-Ne LASER irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med** 1992; 12:528-37.

VEÇOSO, M.C., “Laser em fisioterapia”. São Paulo: Lovise 1993.

VINCK, E. et al. Evidência de alterações na condução do nervo sural mediada por emissão de luz irradiação de diodo. **Lasers Med. Sci.** v. 20, n. 1, pág. 35-40, 2005.

VOLPATO, L. E.; DE OLIVEIRA, R. C. ESPINOSA, M. M.; BAGNATO, V. S.; MACHADO, M. A. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with laser red, infrared and red light emitting diode. **J Biomed Opt**, vol. 6, nº 7, p. 075004, 2011.

WALSH LJ. The current status of low level LASER therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Austr Dental J**. 1997;42:247-54.

WANG, J et al. Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. **Acta Biomaterialia**, v.21, p.237-249, 2015.

WARRINER, R.; BURRELL, R. Infection and the chronic wound: a focus on silver. **Adv Skin Wound Care**, v. 18 Suppl 1, p. 2-12, Oct 2005.

WATSON, T. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 349p

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. P. Stimulatory effect of 660 nm low level Laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts. **Lasers. Surg. Med.** v.22, p.294–301, 1998.

WEISS RA, McDaniel DH, Geronemus RG, Munavalli GM, Bellew SG. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg* 2005a; 31: 1199–1205.

WEI YU; NAIM, J. O; LANZAFAME, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v. 59, n. 2, p.167-170, 1994.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 835-70, Jul 2003.

WHELAN HT, Smits Jr RL, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg* 2001;19:305-14.

WILHELM, K.P.; WILHELM, D.; BIELFELDT, S. Models of wound healing: an emphasis on clinical studies, **Skin Res. Technol.** Feb;23(1):3-12, 2017.

WUNSCH, A.; MATUSCHKA, K. A **Controlled Trial to Determine the Efficacy of Red and Near-Infrared Light Treatment in Patient Satisfaction, Reduction of Fine Lines, Wrinkles, Skin Roughness, and Intradermal Collagen Density Increase**. *Photomed Laser Surg. Vol. 32, nº 2, p. 93-100, 2014.*

YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 Gene Expression in Osteoblast by Low Level Laser irradiation. **Lasers Med Sci**, 16:213-217, 2001.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med**, v. 9, p.497-505, 1989.

YOUNG, S. R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. **Laser Therapy**, v.2, n.2, p.53-57, 1990.

YU W, NAIM JO, LANZAFAME RJ. The effect of LASER irradiation on the release of BFGF from 3T3 fibroblasts. **Photochem Photobiol** 1994; 59(2):167-70

ANEXOS

ANEXO 1-Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisado HCRP e FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 06 de junho de 2018.

Ofício nº 1464/2018
CEP/MR

PROCESSO HCRP nº 5922/2018

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado "A ATUAÇÃO DA FOTOTERAPIA COMBINADA (LED 590nm e LASER 808nm) NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO IN VITRO" – Projeto de Pesquisa Versão 2018, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 3 datada de 22/02/2018.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto foi encaminhado para apreciação e aprovação via Plataforma Brasil.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

PROF. DR. MARCELO RIBERTO
VICE-COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

DANIELLY LORRAINE MONTINA CALOR

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE (ORIENTADOR)

Depto. de Clínica Médica – Divisão de Dermatologia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto – SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016)3602-2228/ e-mail cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br