

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

JESSYCA LUANA MELO COSTA SANTOS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO POR LED EM CULTURA
CELULAR**

**JATAÍ
2018**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

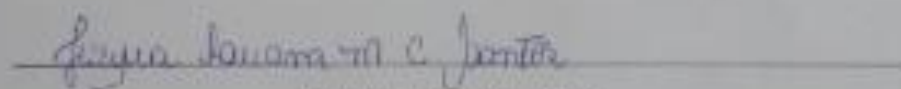
Nome completo do autor: Jessyca Luana Melo Costa Santos

Título do trabalho: Análise da influência da irradiação por LED em cultura celular

3. Informações de acesso ao documento:

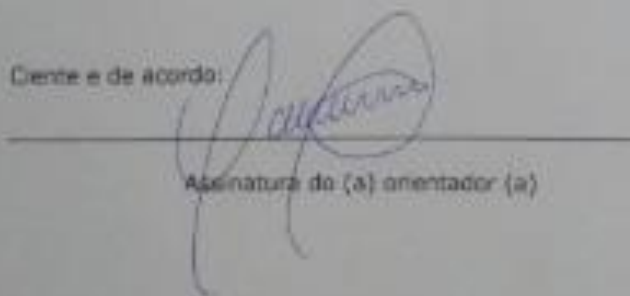
Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Ciente e de acordo:



Assinatura do (a) orientador (a)

Data: 06/ 06/ 2016.

² Neste caso o documento será divulgado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo ficará por critério da coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE**

JESSYCA LUANA MELO COSTA SANTOS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO POR LED EM CULTURA
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde

Orientador: Prof. Dr. Valcinir
Aloísio Scalla Vulcani

JATAÍ

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Jessyca Luana Melo Costa
ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO POR LED EM
CULTURA CELULAR [manuscrito] / Jessyca Luana Melo Costa
Santos. - 2018.
XXXVIII, 38 f.

Orientador: Prof. Valcinir Alóisio Scalla Vulcani .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências da Saúde, Jataí, Programa de Pós
Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde, Jataí, 2018.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Proliferação celular. 2. fibroblastos. 3. fotobiomodulação; . 4.
cultura de células.. I. , Valcinir Alóisio Scalla Vulcani, orient. II. Título.

CDU 615.8



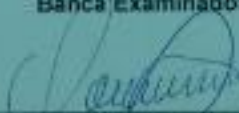
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS JATAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE
Rod. BR 366, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 - Jataí/GO - Brasil

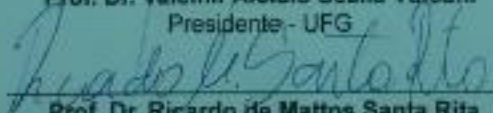
ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

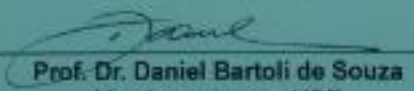
Aos três dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito às 14:00 horas no Auditório do Prédio da Pós-Graduação, Unidade Jatobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada "ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA IRRADIAÇÃO POR LED EM CULTURA CELULAR", de autoria da candidata: JESSYCA LUANA MELO COSTA SANTOS, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, em nível de Mestrado. A Comissão Examinadora foi constituída pelos professores: Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani (Presidente), Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita (membro interno) e Prof. Dr. Daniel Bartoli de Souza (membro externo). Foi concedido ao mestrando, um prazo máximo de 30 dias a partir da data de defesa para efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e entregar o trabalho em redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os membros da banca consideraram o discente: ☒ aprovada () reprovada

Banca Examinadora


Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani
Presidente - UFG


Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita
Membro interno - UFG


Prof. Dr. Daniel Bartoli de Souza
Membro externo - UFG

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a toda a minha família e amigos. Sem a paciência, amor e carinho de vocês, nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela vida, e por ter conduzido os meus caminhos e minhas escolhas para que eu pudesse chegar até aqui.

À toda minha família: minha mãe Raquel, meu pai Marcos, meu irmão Filipe, minhas irmãs Amanda e Aricia, por serem minha segurança, minha fonte de amor e de incentivo. Obrigada pela paciência que tiveram nos momentos difíceis, pelo carinho e por estarem presente na minha vida sempre, mesmo de longe, por entenderem a minha ausência, meu cansaço e meu mau humor. Amo vocês!

Aos meus avós, meus primos, meus tios, em especial à minha tia Angela, que sempre esteve presente na minha caminhada, me incentivando a estudar e dando palavras de conforto quando eu desanimava.

Ao João Batista, meu padrasto, que sempre demonstrou atenção e carinho, cuidando de mim e me incentivando nos estudos. Lembro que você deu a minha primeira caixa de lápis de cor e, sempre disse que um dia eu seria “Doutora”.

Ao meu orientador Valcinir Aloísio, pela oportunidade de caminhar junto comigo nesse processo, com muita paciência.

Ao professor Rodrigo Paschoal, que desde a graduação têm me auxiliado, com muita paciência e atenção, demonstrando sempre muita alegria em ajudar e fazer parte dessa etapa. Obrigada por compartilhar comigo o seu conhecimento, e por me despertar o interesse em estudar a fototerapia.

Aos professores do curso de fisioterapia que me prepararam para que eu chegasse aqui e que sempre demonstraram alegria em ver a evolução dos alunos.

Aos meus amigos que incentivaram com palavras de ânimo, e que tiveram muita paciência, aguentando os meus desabafos, choro, estresse e mau humor. Obrigada por serem parte da minha vida e por cuidarem de mim quando preciso, e principalmente, por me proporcionarem momentos de muita alegria.

À Giuliana, minha colega, companheira, que esteve comigo em todos os momentos. Obrigada por ter me ajudado quando tive dificuldade, por me aguentar estressada, por me fazer rir com seu jeitinho todo paciente.

Ao Laboratório de Citocinas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, sob orientação do Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira que abriu espaço e nos recebeu gentilmente para que pudéssemos realizar a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde da UFG, Jataí, que me proporcionou a oportunidade de aprender e evoluir como pessoa e profissionalmente, adquirindo mais conhecimento.

E a todos os meus pacientes e familiares que sempre foram compreensivos com as remarcações, ausência e agitação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Viabilidade de fibroblastos L929 após irradiações por LED.....	32
Tabela 2. Produção de nitrito por fibroblastos L929	33
Tabela 3. Produção de colágeno por fibroblastos L929	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de fibroblasto (esquerda) e fibrócito (direita).	21
Figura 2. Esquema representativo da distribuição das células na placa de 96 poços.	27
Figura 3. Esquema representativo da composição dos grupos experimentais.....	28
Figura 4. Esquema representativo do teste MTT.....	29
Figura 5. Esquema representativo da reação de diazotação com o reagente de Griess.....	30
Figura 6. Esquema representativo da adição do corante da avaliação da síntese de colágeno.	31

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DMEM	Meio essencial mínimo de Eagle, Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxidorribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
MTT	Teste de quantificação do metabolismo mitocondrial pelo tetrazolium
PBS	Solução salina de fosfato tamponada
MEC	Matriz Extracelular
TFBM	Terapia por Fotobiomodulação
UV	Ultra-violeta
NASA	Administração Nacional de Aeronáutica e Espacial
NO	Óxido Nítrico
RE	Retículo endoplasmático
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
cm ²	Centímetro quadrado
ml	Mililitros
mg	Miligramas
mW	MiliWatts
J	Joules
±	Mais ou menos

α	Alfa
μl	Microlitros
CO_2	Gás Carbônico
O_2	Oxigênio
rpm	Rotações por minuto
p	Nível de significância
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
>	Maior que
nm	Nanômetros
M	Molar
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
X	Veze

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Fotobiomodulação, LED e LASER	18
2.2 Tecido Conjuntivo	19
2.2.1 Fibroblastos	20
2.2.2 Fibras elásticas e colágenas.....	21
2.3 Reparo tecidual	22
2.4 Experimentação in vitro.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Cultivo celular.....	26
4.2 Irradiação com LED 630nm	27
4.3 Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT.....	28
4.4 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)	29
4.5 Avaliação da síntese de colágeno	30
4.6 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT.....	32
5.2 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)	32
5.3 Avaliação da síntese de colágeno	33
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

A luz vem é usada para tratamento desde os primórdios da civilização, considerada como uma das mais antigas modalidades terapêuticas. Hoje, existem modernos aparelhos como os LEDs e os lasers, que geram luz de baixa intensidade capazes de interagir com os tecidos biológicos desencadeando respostas celulares e aumento do metabolismo celular, necessárias para processo de reparação tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e atividade de fibroblastos após a irradiação com LED vermelho 630nm em diferentes potências e tempo fixo. Para o experimento foi feito o cultivo de fibroblastos de camundongo, linhagem L929 no meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, Hepes, 2Mercaptoetanol, estreptomicina e penicilina. Após a confluência adequada das células, iniciou-se a irradiação com tempo fixo de dez segundos, variando-se a potência de acordo com cada grupo: G50, potência de 50mW; G75, 75 mW e G100, 100mW e Grupo controle (GC), sem irradiação. O procedimento foi realizado em triplicata. As células foram submetidas ao teste de viabilidade celular MTT, à avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) e à avaliação da síntese de colágeno. Os valores foram verificados e analisados utilizando ANOVA ao nível de significância de 5%. Na avaliação da citotoxicidade não houve diferença significativa entre o grupo controle, G50, 75 e G100. Os resultados da produção de nitrito pelos fibroblastos demonstram que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo controle, e os grupos experimentais (G50, 75 e G100). Em relação à produção de colágeno, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos irradiados, mas não entre o (G50, G75 e G100). Neste trabalho concluiu-se que a irradiação da cultura de fibroblastos L929 por led vermelho 630nm, nas potências de 50mW, 75mW e 100mW durante dez segundos, não ocasiona morte celular, estimula a produção de óxido nítrico e colágeno.

Palavras Chave: Proliferação celular; fibroblastos; fotobiomodulação; cultura de células.

ABSTRACT

The light is used for treatment from the earliest days of civilization, considered as one of the oldest therapeutic modalities. Today, there are modern devices such as LEDs and lasers, which generate low-intensity light capable of interacting with biological tissues, triggering cellular responses and increased cellular metabolism necessary for the tissue repair process. The objective of this study was to evaluate the viability and activity of fibroblasts after irradiation with red LED 630nm in different potencies and fixed time. For the experiment, mouse fibroblast, L929 strain in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, Hepes, 2Mercaptoethanol, streptomycin and penicillin were cultured. After adequate confluence of the cells, the irradiation with fixed time of ten seconds was initiated, the power being varied according to each group: G50, power of 50mW; G75, 75 mW and G100, 100 mW and Control group (GC), without irradiation. The procedure was performed in triplicate. The cells were submitted to the MTT cytotoxicity test, evaluation of nitric oxide production (NO) and evaluation of collagen synthesis. Values were checked for normal distribution and, after failing to meet the assumptions (Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.05$), were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests at a significance level of 5%. In the evaluation of cytotoxicity there was no significant difference between the control group, G50, G75 and G100. The results of nitrite production by fibroblasts show that there was a significant difference ($P < 0.05$) between the control group and the experimental groups (G50, G75 and G100). Regarding the production of collagen, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and the irradiated groups, but not between (G50, 752 and G100). In this study it was concluded that the irradiation of the L929 fibroblast culture by red led 630nm, at 50mW, 75mW and 100mW potentials for ten seconds, does not cause cell death, stimulates the production of nitric oxide and collagen.

Keywords: Cell proliferation; fibroblasts; photobiomodulation; cell culture

1. INTRODUÇÃO

As lesões musculares, ósseas, ligamentares e dermatológicas têm sido um grande desafio na prática clínica do profissional fisioterapeuta na tentativa de estimular o reparo tecidual de maneira eficaz. A partir dessa problemática, surge a necessidade de buscar novas modalidades terapêuticas que sejam eficientes, melhorando a qualidade nos atendimentos e acelerando o processo de cura dessas lesões. Entre esses tratamentos coadjuvantes, a fototerapia através da Terapia de Fotobiomodulação (TFBM), é uma técnica alternativa que traz resultados clínicos promissores.

Neste contexto, a (TFBM) laser e LED vem demonstrando bons resultados em tratamentos com o objetivo de promover analgesia local, reduzir o edema, proporcionando ao organismo melhor resposta à inflamação, promovendo efeitos bactericidas e antifúngicos através da terapia fotodinâmica, e melhora da vascularização local pela angiogênese, além de estimular a cicatrização tecidual e promover efeitos bioquímicos e celulares (LINS., et al 2010; ALMEIDA, 2016).

Segundo, Thomas et al (1995), Mcdougall et al (2006), Medrado et al (2003) apud Gonçalves (2015, p. 31), estudos *in vitro* com Lasers de baixa energia demonstraram que induzem efeitos bioestimulatórios em cultura celular, e estimulam fatores de crescimento associados à produção de pró-colágeno e colágeno. Outro estudo, *in vitro*, utilizando o laser 660 nm com densidade de energia 3 J/cm² e cultura celular de fibroblastos, no qual o objetivo foi avaliar a viabilidade de fibroblastos associados com laserterapia e medicamentos intracanaís em diferentes tempos de exposição, foi observado que todos os medicamentos testados foram citotóxicos, porém, quando associado ao laser houve aumento significativo da viabilidade celular (LIMA, 2015). Ainda sobre fibroblastos em cultura, Almeida (2016), demonstrou efeitos positivos da laserterapia de baixa potência, 660 nm, no qual observou aumento da atividade celular, *in vitro*.

Sousa et al., 2011 e Volpato et al., 2011 avaliaram a efetividade da fotobiomodulação do LED em fibroblastos *in vivo* e *in vitro*, em condições diferentes, obtendo resultados promissores. Estes dois estudos, apesar de feitos em condições celulares distintas, demonstraram que o LED foi capaz de produzir proliferação e efeitos positivos sobre os fibroblastos, assim como vem demonstrando a maior parte dos estudos feitos com o LED.

Neste trabalho, foi considerada a experimentação *in vitro* com intuito de compreender a influência do LED na atividade e viabilidade dos fibroblastos, e seus efeitos sobre o processo de cicatrização. Estudos têm obtido resultados satisfatórios da ledterapia, mas a dificuldade ainda é saber quais os melhores parâmetros a serem irradiados para a ativação celular sem danos.

Em realidade, essas são algumas das respostas que buscamos com a experimentação *in vitro*, podendo melhorar futuramente os protocolos de atendimento nos serviços de saúde, a partir de dados científicos obtidos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Há milhares de anos, 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),

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 (Ultra-violeta). 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).

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 aquelas 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).

Apesar de ser um processo fisiológico, a reparação tecidual é demorada, envolvendo respostas sistêmicas e locais que dependem do tipo de tecido acometido, da condição sistêmica do paciente, entre vários outros fatores (DOURADO et al., 2011). Porém, pode-se hoje, intervir juntamente a esse tipo de condição acelerando o processo por meio de recursos específicos. 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 (CANNEVALLI, 2001).

Trazendo novas perspectivas, a terapia por fotobiomodulação (TFBM) aumenta a atividade metabólica das células, e outros fatores primordiais acelerando o processo de

cicatrização (MICHEL, 2016), e despertando o interesse na avaliação da eficácia das diferentes fontes de luz.

2.1 Fotobiomodulação, LED e laser

A TFBM, ou terapia de baixa potência, é a utilização da luz de baixa intensidade não térmica com intuito de alterar a função celular. Os emissores de luz, lasers ou LEDs, têm sido fontes de luz efetivas para a TFBM, demonstrando que não é o tipo da luz, mas os parâmetros de tratamento que determinam o sucesso terapêutico (WUNSCH; MATUSCHKA, 2014), somado à características do tecido alvo, como a presença de cromóforos (BASSO, 2013), elementos teciduais capazes de absorver os fótons convertendo em energia fotoquímica (MENEGUZZO, 2007).

O laser é um aparelho capaz de produzir luz, através da energia elétrica que excita os átomos do meio condutor, ou meio ativo, constituído por materiais, sólidos, gasosos, líquidos, ou uma combinação de materiais (SOARES, 2013), estimulando a emissão de fótons que se deslocam em várias direções dentro da cavidade óptica (tubo reto onde fica o meio condutor), amplificando a luz e gerando o feixe luminoso (ALMEIDA, 2016). Pode ser classificado em duas categorias: laser de alta potência ou cirúrgico, com efeito térmico e lesivo ao tecido humano, e laser de baixa potência ou terapêutico, com propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e bioestimulatórias (GARCIA, 2015).

A luz do laser possui propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento científico e de suporte a saúde (GARCIA, 2015). Comparada à luz comum, o “raio laser”, apresenta características específicas: a monocromaticidade, a coerência e a colimação. Definida como uma radiação eletromagnética, a luz é classificada pelo espectro eletromagnético, que divide os tipos dos feixes de luz de acordo com o seu comprimento de onda medido em nanômetros (nm), podendo variar do ultra-violeta ao infra-vermelho (não visíveis), passando por variadas cores (visíveis), (ALMEIDA, 2016).

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 a depender do chip semicondutor, 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).

O primeiro LED foi criado no ano de 1962, apesar de não promover efeitos biológicos relevantes, inviabilizando sua aplicabilidade clínica. Anos depois, na década de 90, a NASA (Administração Nacional de Aeronáutica e Espacial) permitiu as primeiras aplicações clínicas do LED, ao produzir pares dentro de um estreito espectro que se desenvolvem até os dias de hoje (WUNSCH; MATUSCHKA, 2014).

Apesar da semelhança significativa entre o LED e o laser, as diferenças desses aparelhos 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 hoje, 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 TFBM. Entretanto, a hipótese de que o LED não produziria efeitos benéficos para a TFBM pela incoerência da luz, tem sido descartada (MICHEL, 2016).

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., 2011; 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 TFBM nos serviços públicos e privados de saúde (DOURADO et al., 2011).

2.2 Tecido Conjuntivo

Os organismos animais são compostos por quatro tipos de tecidos básicos que se combinam para compor tecidos mais complexos e órgãos, sendo eles: tecido epitelial, tecido conjuntivo, tecido muscular e tecido neuronal (KIERSZENBAUM, 2012).

O tecido conjuntivo, fornece sustentação e proteção aos tecidos, e é responsável pela manutenção da forma corporal. Constituído por três componentes: células, fibras e substância fundamental MEC (matriz extracelular), o tecido conjuntivo, pode apresentar variações na sua composição, dependendo da localização e função que exerce. Além disso, contém uma considerável quantidade de moléculas que desempenham funções biológicas importantes

(JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), diversificando funcional, estrutural e patologicamente o tecido conjuntivo.

O tecido conjuntivo é denominado de propriamente dito quando apresenta, dentre outras funções, a capacidade de conexão, sustentação e preenchimento junto a outros tecidos e, de especializado quando ocorrem diferenciações, gerando o tecido sanguíneo, cartilagenoso ou ósseo. A composição do tecido conjuntivo propriamente dito inclui abundância de matriz extracelular, células mesenquimais, fibroblastos, plasmócitos, macrófagos e mastócitos (PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2.1 Fibroblastos

Os fibroblastos são as principais células do tecido conjuntivo, responsáveis pela homeostase tecidual e pela produção da MEC (Matriz extracelular), como as proteoglicanas, glicosaminoglicanas, glicoproteínas, elastina e colágeno. Desempenham um papel importante na manutenção e reabsorção da MEC, cicatrização de feridas, inflamação e fibrose. Auxiliam estes vários papéis biológicos e respondem a uma ampla gama de sinais parácrinos e autócrinos, como as citocinas e fatores de crescimento, capazes de controlar o crescimento e a diferenciação celular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014; MIRANDA, 2015).

Segundo Almeida (2016), os fibroblastos possuem a forma fusiforme, com prolongamentos celulares, núcleo com cromatina pouco densa e nucléolo evidente. Seu citoplasma é rico e com o retículo endoplasmático (RE) granular e aparelho de Golgi desenvolvidos, pela intensa síntese proteica. Na sua forma inativa é chamado de fibrócito com dimensão menor, de aspecto fusiforme, núcleo menor e mais escuro e citoplasma com reduzida quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figura 1).

Estas, são células mesenquimais derivadas do tecido embrionário mesodérmico, não diferenciados totalmente. Elas podem ser ativadas por uma variedade de sinais químicos que promovem a proliferação e a diferenciação celular para formar miofibroblastos. A ativação de fibroblastos desempenha um papel vital na cicatrização de feridas, no entanto, em alguns casos e por razões ainda não conhecidas totalmente, sua ativação promove uma resposta fibrótica patológica que ocasiona múltiplas doenças e afeta órgãos (KENDALL; FEGHALI-BOSTWICK, 2014), que não serão discutidos neste trabalho.

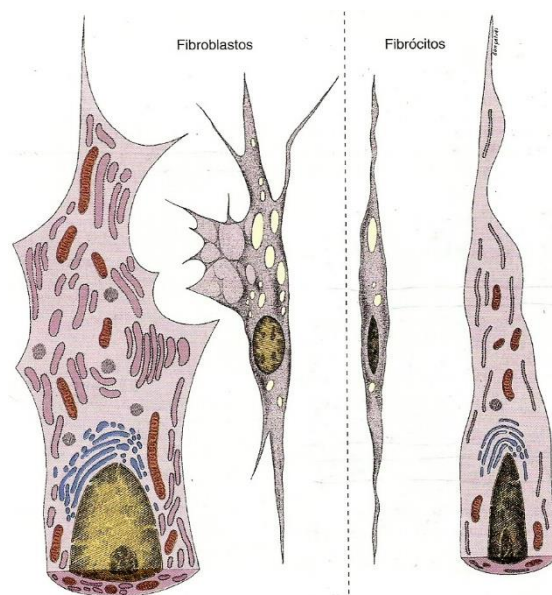


Figura 1. Esquema representativo de fibroblasto (esquerda) e fibrócito (direita).

Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

2.2.2 Fibras elásticas e colágenas

A fibras são proteínas polimerizadas e alongadas. As principais fibras do tecido conjuntivo são as colágenas, reticulares e elásticas. As fibras colágenas e as fibras reticulares são compostas pela proteína colágeno e as fibras elásticas pela proteína elastina. A disposição dessas fibras nos variados tipos de tecido conjuntivo é modificada, de acordo com a fisiologia tecidual (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O colágeno é uma proteína que desempenha diversificadas funções, e durante o processo de evolução foi se modificando, adquirindo rigidez, pouca elasticidade e força de tensão. É produzido com composição química, morfológicas e fisiológicas diferentes, sendo encontrado em abundancia no tecido conjuntivo, principalmente as fibras do tipo I (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; ROSS; PAULINA, 2012).

A síntese de colágeno é feita pelos fibroblastos. Na célula os genes codificadores das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são ativados e produzem o RNA mensageiro (RNAm). A tradução do RNAm ocorre no citoplasma e as cadeias polipeptídicas formadas são transportadas para o retículo endoplasmático (RE) para hidroxilação e glicosilação. No RE as cadeias α se organizam em três, formando o procolágeno, liberado para o meio extracelular, para que a enzima procolágeno peptidase forme as fibrilas de colágeno, a partir do pró-colágeno (ALMEIDA, 2016 apud MORISCOT; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2004, p. 22).

2.3 Reparo tecidual

O reparo tecidual é um processo que se inicia após uma injúria, automaticamente e convenientemente é dividido em três fases: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação (KUMAR et al., 2010).

A inflamação aguda, a primeira fase do processo, se refere a dilatação do calibre vascular, que leva ao aumento do fluxo sanguíneo e a saída de proteínas plasmáticas, juntamente, com leucócitos (neutrófilos e macrófagos), para combater o agente agressor (KUMAR et al., 2010). Esse processo só ocorre pela liberação de mediadores químicos, como a histamina, que promove a vasodilatação nas arteríolas e vênulas. Nesse momento, ocorre a saída de plaquetas para a formação do tampão homeostático rico em fibrina, que além de restabelecer a homeostasia, forma uma barreira contra a invasão de microorganismos e organiza a matriz para a migração celular. Essa matriz, também servirá como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados nas fases seguintes da cicatrização (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A segunda fase, é chamada também de fase proliferativa, caracterizada pela formação de tecido granuloso. Nesse momento, a lesão é preenchida por matriz extracelular, vasos sanguíneos e células, principalmente os fibroblastos e os macrófagos. É partir daí, que vai ocorrer a deposição das fibras colágenas e outros elementos da matriz extracelular, chegando a cura, pela formação de tecido conectivo vascularizado (KUMAR, et al., 2010).

Finalizando o reparo tecidual, a última fase é de remodelação, pelo fato de ocorrer a substituição do tecido de granulação por cicatriz, um tecido relativamente avascular e com poucas células. O equilíbrio entre a síntese e a degradação da matriz resulta no remodelamento do tecido conjuntivo, que cicatriza o local lesionado, restaurando a integridade anatômica e sua funcionalidade (ALMEIDA, 2016).

2.4 Experimentação in vitro

A experimentação é a base da ciência moderna. Questões éticas têm impossibilitado a investigação sobre a fisiologia e a aplicação de novos métodos terapêuticos em seres humanos. Diante disso, a experimentação animal tem proporcionado o desenvolvimento do conhecimento e de novos dispositivos médicos. Porém, as questões éticas sobre a utilização animal têm

crescido e respeitando as normas dos comitês de ética, os testes *in vitro* vêm sendo utilizados no meio da pesquisa pela capacidade de trazer inferências científicas relevantes para aplicação segura e eficaz na área médica, porém, não substituindo os testes *in vivo*, mas intervindo diretamente na diminuição da quantidade de animais submetidos aos testes em pesquisas científicas (FRESHNEY, 2005; FANG, 2017).

No entanto, 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 celular 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).

Para a avaliação quantitativa da viabilidade celular realiza-se métodos colorimétricos com uso de corantes como o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difenil-2-IL)-5difenil brometo de tetrazolio) e o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2IL)-5-(3-carboximetoxifenil)2H-tetrazólio). A avaliação quantitativa determina se ocorreu inibição do crescimento, proliferação ou morte celular. Com redução da viabilidade celular em mais de 30% já se conclui que existe um efeito citotóxico. A avaliação qualitativa é realizada pela avaliação microscópica das células usando colorações citogênicas, na qual observam-se alterações na morfologia celular como integridade de membrana, vacuolização, entre outras alterações morfológicas (FARIA et al., 2004; SEHNEM et al., 2012).

O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora, sintetizada a partir do aminoácido arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (Cco), que age nos sistemas nervoso, imunológico e circulatório. Existem duas propostas para explicar a capacidade da luz em aumentar a produção local e liberação de NO. Uma delas propõe que a luz possa impedir que o NO desloque o

oxigênio de Cco resultando em aumento da produção de ATP. A segunda propõe que ocorre aumento na produção de NO pela estimulação da luz (CHUNG, 2012).

A produção de óxido nítrico, por estar relacionada com o metabolismo celular, também está envolvido na produção de colágeno. Foi demonstrado relação com a quantidade de NO e colágeno sintetizados por fibroblastos (WITTE, 2000). No entanto, existe limitação na quantidade de NO produzido pelos fibroblastos, pois quantidades exacerbadas, apesar de não quantificada, são capazes de gerar efeito contrário, inibindo a produção de colágeno. De certa forma, é evidente que o fibroblasto é capaz de regular a produção de colágeno pelo NO produzido por outras células como o macrófago, ou produzido por ele mesmo (PARK, 2013).

A avaliação da produção de óxido nítrico pode ser realizada por métodos diretos como a espectrofotometria e cromatografia. No entanto, O NO, por ser produzido em pequenas quantidades e apresentar meia-vida curta, diminuem a praticidade destas técnicas. Por tanto, é possível utilizar a aferição indireta, como o método baseado na reação de Griess que se fundamenta na dosagem dos íons nitritos obtidos por redução quantitativa (maior de 90%) dos íons nitratos presentes na amostra. Este método apresenta características vantajosas em relação ao custo, simplicidade de execução e rapidez (ALMEIDA, 2014). O colágeno pode ser dosado pela colocação de corantes que se ligam a diversos tipos de colágeno no meio de cultura em contato com as células, como o Sirius Red, que permitem a quantificação por espectrofotometria (BARROS, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade e atividade de fibroblastos após a irradiação com LED vermelho 630nm em diferentes potências e tempo fixo.

3.2 Objetivos específicos

- 1 - Cultivar fibroblastos de camundongo, linhagem L929;
- 2 - Irradiar cultura de fibroblastos com LED vermelho 630nm e potência de 50 mW, 75 mW e 100 mW, no tempo fixo de 10 segundos.
- 3 - Avaliar a viabilidade (citototoxicidade) de fibroblastos irradiados nas diferentes potências do LED;
- 4 - Mensurar a produção de óxido nítrico por fibroblastos irradiados nas diferentes potências do LED;
- 5 - a produção de colágeno por fibroblastos irradiados nas diferentes potências do LED.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

Os ensaios de cultura celular foram realizados no Laboratório de Citocinas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, sob CO-orientação do Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira, seguindo o protocolo do laboratório de acordo com Pansani (2015). Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos de camundongos (L929), adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro. O meio de cultura utilizado para o cultivo celular foi o meio RPMI (Sigma-R6504) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion - FB 0010S®), L-glutamina (Gibco 100x®), Hepes (Sigma H0763®), 2Mercaptoetanol (Sigma M6250®), estreptomicina (Sigma P7794®) e penicilina (Sigma S9137®). As células permaneceram armazenadas em reservatório de nitrogênio líquido, congeladas em meio com DMSO 5% (Mallinckrodt®). Para o experimento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas rapidamente ao banho-maria para descongelar sob agitação. No fluxo laminar, preparado adequadamente para o uso, a amostra foi colocada em tubo tipo Falcon estéril e, em seguida, acrescentou-se o meio RPMI completo gota a gota sob agitação. O frasco foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, a 10°C, formando na parte inferior do frasco um pelete de células e na parte superior o meio de cultura sem células, o sobrenadante.

Em seguida foi desprezado o meio sobrenadante, vertendo rapidamente o tubo no descarte e feito a ressuspensão celular em 1 ml do meio até que a amostra ficasse homogênea. Na placa de seis poços estéril foi adicionado 3 ml de meio RPMI completo e adicionado a suspensão celular. As células foram mantidas em incubadora (Sanyo® Modelo COM - 5M) a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem a confluência desejada para o experimento (80-90%)

Após a cultura apresentar confluência, foi realizada a transferência das células para as placas de 96 poços, com densidade de 1×10^3 células/ml por poço e permaneceram em repouso por 24 horas para a sedimentação. As células foram inseridas nos poços, considerando-se as repetições dos grupos controles os três poços ocupados no quadrante superior esquerdo e as três repetições dos grupos experimentais os poços ocupados no quadrante inferior direito (Figura 2).

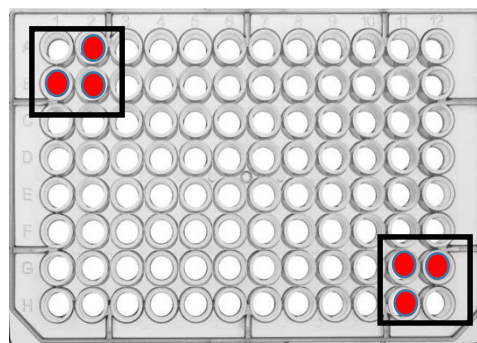


Figura 2. Esquema representativo da distribuição das células cultivadas na placa de 96 poços. No quadrante superior esquerdo, três poços ocupados, compondo as repetições dos grupos controles, cujas células não são irradiadas por LED. No quadrante inferior direito, três poços ocupados para compor as repetições dos grupos experimentais, cujas células são irradiadas. Fonte: Adaptado Arquivo Pessoal

4.2 Irradiação com LED 630nm

Após as 24 horas de sedimentação, iniciou-se a irradiação com tempo fixo de dez segundos, variando-se a potência de acordo com cada grupo: G50, potência de 50mW; G75, 75 mW e G100, 100mW (Figura 2). Para cada grupo foi realizada a irradiação em triplicata com três repetições e para o grupo controle não houve irradiação, mantendo-se, também em triplicata com três repetições. Para o momento da irradiação, o meio de cultura foi substituído por mesma quantidade (1ml) de tampão fosfato-salino (PBS), a fim de diminuir a interferência na absorção

da energia. A aplicação ocorreu em ambiente fechado, temperatura ambiente e com mínima luminosidade. Foi utilizado equipamento LINCE com ponteira de iluminação de arranjo de

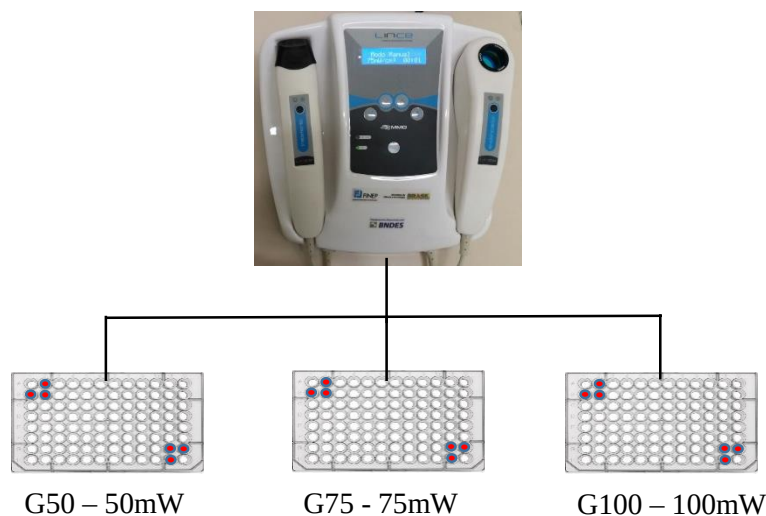


Figura 3. Esquema representativo da composição dos grupos experimentais. G50, irradiação com 50mW, G75, com 75mW e G100, com 100mW. Em todos os grupos o tempo de irradiação foi de dez segundos. Para cada grupo, realizou-se a experimentação em triplicata, com três repetições (poços preenchidos em vermelho no quadrante superior esquerdo). Os grupos controles estão no quadrante inferior direito (poços preenchidos em vermelho). Fonte: Arquivo Pessoal.

LED centrado em 630 nm, e área de 9,6 cm² (MMOptics, São Carlos, Brasil), na forma contínua, com feixe atingindo perpendicularmente a placa com a tampa fechada. Após as irradiações, retirou-se dos poços a solução tampão fosfato-salina, adicionou-se o meio de cultura e as células foram novamente incubadas nas mesmas condições descritas, por 24 horas. Posteriormente, as culturas de células foram avaliadas pelo método de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio]).

4.3 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT

O teste de avaliação da citotoxicidade foi realizado para os grupos experimentais e controles, 24 horas após o procedimento de irradiação de G50, G75 e G100. Para todos os

grupos foram realizadas três repetições e em triplicata. Para a realização do teste, preparou-se a solução de MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.), diluindo-se 5mg do sal em 1mL de PBS que foi posteriormente filtrada em filtro Millipore 0,22 μ m estéril. Em seguida, após a observação das placas de 96 poços ao microscópio invertido, e visualizadas as condições celulares, adicionou-se, em cada poço, 20 μ L da solução de MTT. As placas foram mantidas na incubadora por seis horas, em seguida foi adicionado em cada poço 60 μ L de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio) para a solubilização dos cristais formados. Após 24 horas da adição do SDS, as placas foram removidas da incubadora e o conteúdo dos poços transferidos para nova placa para a quantificação da densidade óptica em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm (Figura 4).

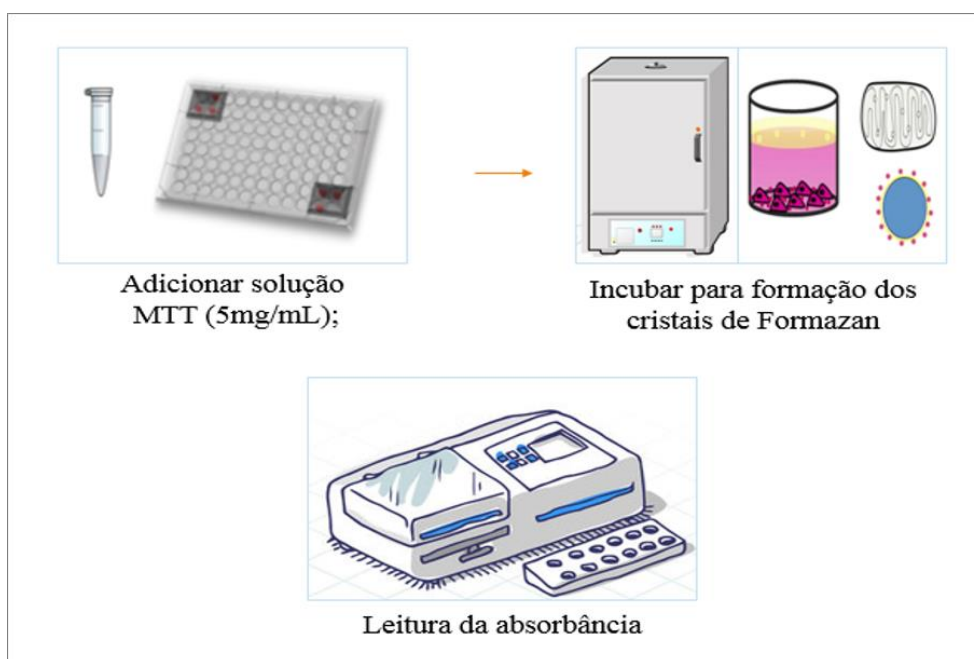


Figura 4. Esquema representativo do teste MTT. Fonte: Google Imagens

4.4 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

A quantificação de NO produzido pelas células foi determinada pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células por meio da reação de diazotização com o reagente de Griess (Sigma Aldrich). Para isto, foram transferidas alíquotas de 50 μ L do meio de cultura que estava em contato com as células em duplicata para outra placa de cultura de 96 poços, seguido pelo reagente de Griess (0,05% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 0,5% de

sufanilamida em 2.5% de ácido fosfórico) adicionado na mesma proporção. Após a incubação por dez minutos, em temperatura ambiente e ausência de luz, determinou-se a concentração de NO por meio de espectrofotometria a 550 nm (Synergy H1-Biotek). A concentração foi calculada a partir de curva padrão de nitrito de sódio (1,5625 μ M a 100 μ M). Para os grupos de células irradiadas, realizou-se a quantificação em triplicata, com três repetições e comparou-se com os grupos controles em triplicata e três repetições (PANSANI, 2015) (Figura 5).



Figura 5. Esquema representativo da reação de diazotação com o reagente de Griess. Fonte: Google Imagens.

4.5 Avaliação da síntese de colágeno

Para esta análise foram realizados os mesmos procedimentos de cultivo celular dos fibroblastos, e irradiação de G50, G75 e G100. Porém, após as irradiações, retirou-se a solução PBS e adicionou-se o meio de cultura sem soro fetal bovino e incubou-se as placas nas mesmas condições anteriores por sete dias, sem realização de troca de meio.

Os ensaios foram realizados em triplicata com três repetições e os grupos controles não sofreram irradiação. Em seguida, após o período de incubação, o meio de cultura foi coletado e armazenado a - 20°C para posterior análise. Para tanto, 500 μ L do meio de cultura em contato com as células foram transferidos para tubos contendo o mesmo volume da solução de Direct Red em ácido pícrico saturado (0,1%), e incubados por uma hora, sob agitação a 400 rpm em banho seco a 25° C. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos, o

sobrenadante descartado e adicionados 300 μ L de ácido clorídrico 0,01 M. Os tubos foram centrifugadas novamente (12.000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado e adicionado 30 μ L de hidróxido de sódio 0,5 M para solubilizar o material precipitado. Os espécimes foram submetidos à análise de absorvância em espectrofotômetro a 550 nm. A porcentagem de síntese de colágeno para cada amostra foi calculada com base nos valores médios de absorvância do grupo controle (BARROS, 2017) (Figura 6).



Figura 6. Esquema representativo da adição do corante da avaliação da síntese de colágeno. Fonte: Google Imagens.

4.6 Análise estatística

Os valores foram verificados e analisados utilizando ANOVA ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT

A avaliação da viabilidade pelo teste MTT demonstrou que o LED nas potências de 50, 75 e 100 mW, irradiado por 10 segundos, não proporcionou a morte dos fibroblastos L929, após 24, 48 e 72 horas da irradiação. Não houve diferença significativa entre o grupo controle, G50, G75 e G100 (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade de fibroblastos L929 após irradiações por LED

Viabilidade (%)				
Período	C	G50	G75	G100
24	98,01 ± 1,09 ^{Aa}	100,06 ± 1,00 ^{Aa}	99,50 ± 0,09 ^{Aa}	99,80 ± 0,74 ^{Aa}
48	99,00 ± 0,45 ^{Aa}	99,00 ± 1,00 ^{Aa}	100,00 ± 0,56 ^{Aa}	100,00 ± 0,41 ^{Aa}
72	99,79 ± 1,00 ^{Aa}	100,60 ± 0,97 ^{Aa}	99,00 ± 0,85 ^{Aa}	99,96 ± 0,85 ^{Aa}

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente. Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente.

5.2 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

Os resultados da produção de nitrito pelos fibroblastos demonstram que houve diferença significativa em 24, 48 e 72 horas entre o grupo controle e os demais grupos experimentais, que apresentaram médias superiores. No entanto, nos mesmos períodos não houve diferença significativa entre G50, G75 e G100. (Tabela 2).

Tabela 2. Produção de nitrito por fibroblastos L929

Período	Produção NO (%)			
	C	G50	G75	G100
24	100,00 ± 1,00 ^{Aa}	107,00 ± 1,92 ^{Ab}	110,00 ± 1,50 ^{Ab}	112,00 ± 0,71 ^{Ab}
48	99,00 ± 1,70 ^{Aa}	112,40 ± 0,94 ^{Ab}	114,00 ± 1,00 ^{Ab}	114,00 ± 0,99 ^{Ab}
72	101,09 ± 1,00 ^{Aa}	113,00 ± 1,07 ^{Ab}	115,23 ± 0,70 ^{Ab}	115,06 ± 0,45 ^{Ab}

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente. Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. (ANOVA, $p > 0,05$).

5.3 Avaliação da síntese de colágeno

Em relação à produção de colágeno, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos experimentais em 24, 48 e 72 horas. Os grupos irradiados apresentaram produções superiores ao grupo controle e diretamente proporcionais às potências utilizadas (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de colágeno por fibroblastos L929

Período	Produção de colágeno (%)			
	C	G50	G75	G100
24	100,00 ± 1,00 ^{Aa}	175,00 ± 1,00 ^{Ab}	189,00 ± 1,60 ^{Ac}	197,00 ± 1,50 ^{Ad}
48	102,05 ± 0,51 ^{Aa}	173,08 ± 1,30 ^{Ab}	188,00 ± 1,08 ^{Ac}	195,07 ± 1,20 ^{Ad}
72	105,00 ± 1,00 ^{Aa}	179,00 ± 0,98 ^{Bb}	193,00 ± 1,50 ^{Bc}	200,76 ± 0,25 ^{Bd}

Valores apresentados em média ± desvio padrão.

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente. Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente. (ANOVA, $p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O reparo tecidual é um processo contínuo onde as moléculas, células teciduais e sanguíneas se organizam tentando reestabelecer a homeostasia do tecido injuriado. Para que o processo seja um sucesso, é necessário que os eventos ocorram de forma coordenada (homeostasia, inflamação, proliferação, remodelação do tecido), finalizando com a reparação tecidual. A capacidade de reparo tecidual depende de fatores intrínsecos do tecido, como taxa de vascularização, de repitelização, de renovação do tecido conjuntivo, e a contribuição de fatores extrínsecos (PANSANI, 2015). Para auxiliar e potencializar principalmente como fator extrínseco, a fototerapia se tornou uma alternativa para os estudos *in vivo* e *in vitro*.

A TFBM é amplamente utilizada em diferentes tipos de culturas celulares como recurso biomodulatório, destacando entre seus efeitos a cicatrização de feridas e a estimulação celular, *in vitro*. A partir disso, nota-se a relevância dos estudos *in vitro*, trazendo como principal vantagem, o fato de poder isolar uma parte específica do processo (ALMEIDA, 2016).

A escolha do cultivo celular, utilizando-se da linhagem L929 de fibroblastos de camundongos, com respaldo na literatura científica, se mostrou de fácil cultivo, manejo e com custos acessíveis. Além disso, as normas laboratoriais, preconizadas como adequadas para o cultivo de células foram de grande valia para que houvesse confluência adequada sem contaminação, permitindo qualidade aos experimentos realizados. Os métodos de avaliação da interação da luz LED com fibroblastos foram de execução relativamente simples, demandando treinamento básico dos protocolos, bem como das normas do laboratório.

O equipamento utilizado para a irradiação é portátil, ocupa pouco espaço e não apresenta complexidade na programação dos parâmetros. Possui também, um dispositivo que permite aferir a potência selecionada, por meio de sensor, garantindo a qualidade do procedimento. É necessário ressaltar que sua utilização experimental ou clínica é plausível, uma vez que cumpre os requisitos de portabilidade, segurança e manuseio. A seleção dos parâmetros também se mostrou adequada, mesmo que não há na literatura parâmetros definidos em consenso pela experimentação por outros pesquisadores. Neste quesito, pode-se afirmar a positividade destes parâmetros pelos resultados que demonstraram que não houve citotoxicidade, bem como otimizou a produção de óxido nítrico e colágeno pelos fibroblastos.

Os aparelhos que emitem a luz LED vêm conquistando espaço no mercado e também 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.

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 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. Neste estudo, optamos pela utilização do LED, visando a obtenção de resultados que contribuam com 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 sugere os melhores parâmetros para obter respostas positivas nas células em cultura.

Em relação à aplicação do LED vermelho 630nm, com potências variando em 50, 75 e 100 mW, durante dez segundos, observou-se que não houve influência da irradiação e da potência na letalidade dos fibroblastos da linhagem L929, conforme demonstrado pelos ensaios de viabilidade celular pelo método MTT. Os resultados encontrados nos ensaios de viabilidade celular demonstraram que os fibroblastos irradiados cresceram normalmente como as células do grupo controle, não havendo morte e nem aumento da viabilidade celular relacionada à irradiação e nem a potência utilizada. 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 vermelha. Além disso, demonstra que os parâmetros selecionados, com aumentos crescentes da potência em tempo fixo de dez segundos não ocasionaram danos severos a ponto de matar às células.

Além de não serem letais aos fibroblastos irradiados, os parâmetros utilizados para o LED demonstraram interferência positiva na produção de óxido nítrico. Houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos irradiados, nos quais a irradiação promoveu

aumento na produção de NO. Porém, apesar de ocorrer maior produção de NO nos grupos irradiados em relação ao controle, não foi encontrada nenhuma interferência das potências utilizadas sobre a produção de NO entre os grupos irradiados, ou seja, o resultado foi independente da potência.

O óxido nítrico promove atenuação o processo inflamatório e acelera o processo de cicatrização estimulando a neovascularização e a cicatrização, por meio da produção de colágeno (PARIHAR, 2003). Neste sentido, foi demonstrado, anteriormente, que a inibição da síntese de NO proporciona redução acentuada da deposição de colágeno, consequentemente fragilizando o processo de cicatrização (SCHAFFER, 1997; RAY, 2006).

Os mecanismos envolvidos nas diversas ações do óxido nítrico ainda não são totalmente conhecidos, porém, em relação à sua ação no processo inflamatório está descrito que sua inibição promove nas células endoteliais, redução nos níveis de GMPc, interrompendo a defosforilação dependente de GMPc da cadeia de ocasionando contração das células endoteliais e aumento da permeabilidade microvascular. A inibição do NO também proporciona aumento nos níveis de oxidantes que ativam mastócitos a degranularem, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular. (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). No entanto, como descrito por Salvemini et al. (1996), o NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias. Apesar de contraditórios os efeitos do NO no processo inflamatório, há indícios de efeitos antagônicos dose dependentes (OBAYASHI et al., 2006).

Neste estudo, os resultados encontrados após as irradiações da luz vermelha LED, demonstram que, nos parâmetros selecionados, houve a estimulação dos fibroblastos L929 e uma tendência a estimular a produção de NO pelos próprios fibroblastos, indicando interferência metabólica nestas células.

Acreditamos que a ação do óxido nítrico nos fibroblastos também está relacionada com a produção de colágeno de acordo com os resultados de alguns estudos. Witte *et al.*, 2000 que obtiveram resultados onde a presença de óxido nítrico otimizou a produção de colágeno pelos fibroblastos.

A produção de colágeno também foi estimulada neste experimento, cujos resultados mostraram que a irradiação dos fibroblastos proporcionou aumento significativo em relação ao grupo controle, corroborando com os resultados de PARK; HONG, (2015). Além disso, a

produção de colágeno foi aumentando consideravelmente com o aumento da potência, sendo G100 o grupo que apresentou o resultado mais expressivo na produção de colágeno, quase 100 % maior que o grupo controle. Entretanto, todos os grupos irradiados produziram mais colágeno em relação ao grupo controle, e em relação ao grupo de menor potência, demonstrando que a produção de colágeno neste caso foi dependente da potência utilizada, quanto maior a potência maior a produção de colágeno.

A diferença significativa em relação à produção de colágeno também foi encontrada nos diferentes tempos após as irradiações. Neste caso, 72 horas após serem submetidas à ledterapia os fibroblastos produziram mais colágeno em relação à 24 e 48 horas depois. Esse resultado não foi encontrado no grupo controle, demonstrando influência positiva da luz LED sobre a produção de colágeno, principalmente 72 horas após as irradiações.

Apesar dos mecanismos de influência do NO na produção de colágeno não serem totalmente esclarecidos, bem como as quantidades e limites que causam efeitos contrários, inibindo a produção de colágeno foi atribuído o efeito do NO na otimização da etapa de pós-tradução do colágeno (WITTE et al., 2000; PARK et al., 2013 MAMALIS et al., 2016;).

Já se sabe que a luz vermelha de uma maneira geral tende a estimular tecidos e células, e por esse motivo é indicada para cicatrização tecidual com fortes evidências. Quando a interação da luz com as células ocorre de forma adequada, iniciam-se estímulos mitocondriais, síntese de ATP e produção de proteínas como colágeno e elastina (BUCHHOLZ; WALT, 2013). O que não sabemos ao certo, são os parâmetros a utilizar para que ocorra estímulos de crescimento e aumento do metabolismo celular sem provocar danos e morte das células. A partir destes resultados, podemos afirmar que os achados deste estudo são promissores, já que, além de aumentar a produção de NO e colágeno, interferência positiva no metabolismo celular, a luz LED vermelha nas potências utilizadas não causou danos às células.

7. CONCLUSÃO

Nas condições de realização deste trabalho conclui-se que a irradiação da cultura de fibroblastos L929 por LED vermelho 630 nm, nas potências de 50, 75 e 100 mW durante dez segundos, não ocasionou morte celular, estimulou a produção de óxido nítrico em 15% e do colágeno em 100% a mais que o grupo não irradiado com relação direta das potências utilizadas.

Neste sentido, apesar de serem necessários estudos adicionais para esclarecer os mecanismos bioquímicos envolvidos no estímulo da produção de óxido nítrico e colágeno, pode-se afirmar que houve aumento do metabolismo dos fibroblastos, com consequente aumento da síntese das moléculas estudadas.

8. REFERÊNCIAS

- 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.
- BARROS, S. A. de L. **Efeitos do recobrimento da zircônia por um biovidro: caracterização da superfície e avaliação de propriedades biológicas**. 2017. Dissertação (Mestrado). Araraquara.
- BASSO, F. G. **Avaliação in vitro da laserterapia de baixa intensidade sobre cultura de osteoblastos, fibroblastos e queratinócitos submetidos à terapia com ácido zoledrônico**. 2013. 138 páginas. Tese de doutorado - UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
- 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.
- BUCHHOLZ, J.; WALT, H.. Veterinary photodynamic therapy: a review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 4, p. 342-347, 2013.
- CHUNG, H. Y. et al. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. **Journal of dental research**, v. 90, n. 7, p. 830-840, 2011.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Nitric oxide. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002
- CALMON, W. J. **Verificação in vitro das temperaturas intra pulpares 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.
- 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.
- DAMANTE, C. A. **Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos**. 2007. 91 páginas. Tese de Doutorado - USP – Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia, São Paulo.
- 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.
- FANG, Y.; EGLEN, 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.
- FERREIRA, C. L. R.; NICOLAU, R. A.; OLIVEIRA, M. A.; COSTA, D. R.; JÚNIOR, A. C. G. Prianti. Efeito da terapia LED ($\lambda= 945\pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo. **Rev. bras. eng. biomed**, v. 29, n. 4, p. 404-413, 2013.
- FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 2005.
- 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.
- GONÇALVES, A. C. **Avaliação do efeito do laser terapêutico de 660nm na Leishmaniose Tegumentar experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de macrófagos**. 2015. 93 páginas. Dissertação de Mestrado - UFG – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, José. **Histologia básica: texto e atlas**. 12ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular**, 3ªed., Elsevier 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Robins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458p. LIRANI-GALVÃO, A.P.; JORGETTI, V.; SILVA, O.L. Comparative study of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone in rats. *Photomedicine and Laser Surgery*.2006; 24: 735 - 740

LIMA, G.N. **Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos**. 2015. 41 páginas. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

LINS, R. D. A. U; LUCENA, K. C. R; GRANVILLE-GARCIA, A. F; DANTAS, E. M. CATÃO, M. H. C. V; LUIZ NETO, G. C. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**. Vol. 85, nº 6, p. 849-855. Campina Grande, 2010.

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.

MAMALIS, A.; KOO, E.; GARCHA, M.; MURPHY, W. J.; ISSEROFF, R. R.; JAGDEO, J. High fluence light emitting diode-generated red light modulates characteristics associated with skin fibrosis. **Journal of biophotonics**, v. 9, n. 11-12, p. 1167-1179, 2016.

DE MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-262, 2009.

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.

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.

MIRANDA, R. B. **Produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 por fibroblastos estimulados por cimentos endodônticos e submetidos à terapia laser de baixa potência**. 2015. 70 páginas. Tese de Doutorado. UFRJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Faculdade de Odontologia, Rio de Janeiro.

OBAYASHI, K. et al. Exogenous nitric oxide enhances the synthesis of type I collagen and heat shock protein 47 by normal human dermal fibroblasts. **Journal of dermatological science**, v. 41, n. 2, p. 121-126, 2006.

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.

PARIHAR, A.S.; COGHLAN, M.J.; GOPALAKRISHNAN, M. and SHIEH, C.C. Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. **Eur. J. Pharmacol**. Vol. 471, p. 157-164, 2003.

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, J. E.; ABRAMS, M. J.; EFRON, D. T.; BARBUL, A. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 487-492, 2013.

PARK, J.; HONG, K. Effect of light-emitting-diode irradiation on the proliferation and migration in human gingival fibroblasts. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 37-42, 2015.

PEREIRA, P. R; PAULA, J. B. de; CIELINSK, J; PILONETTO, M; BAHTEN, L. C. V. Efeitos do laser de baixa intensidade em cultura bacteriana in vitro e ferida infectada in vivo. **Rev. Col. Bras.** vol. 41, nº 1, p. 049-045, Curitiba, PR. 2014.

RAY, C.J. and MARSHALL, J.M. The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium. **J. Physiol.** 570: 85-96, 2006.

ROSS, M. H.; PAWLINA, Wojciech. **Histologia: texto e atlas.** Em correlação com biologia celular e molecular. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

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.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British journal of pharmacology*, v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SEHNEM, D.P.; NENAMOR, L.; JESUS, L.S.; VALENTIM, R.M.; SOUZA, E.T.G.; ZAMBUZZI, W.F.; TAKAMORI, E.R. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. *Revista Rede de Cuidados em Saúde.* vol. 6, n. 2, p. 1-12.

SCHAFFER, M.; EFRON, P.; THORNTON, F.; KLINGEL, K.; GROSS, S.; BARBUL, A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 5, p. 2375-2381, 1997.

SOARES, D. M. **Influência da laserterapia na proliferação de células-tronco do ligamento periodontal humano.** 2013. 61 páginas. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

SOUZA, R. C.; LIMA, F. F.; FARACO-SCHWED, ALEGRETTI, C. E.; SCABAR, L. F.; MARTINS, R. B. Use photodynamic therapy as an adjuvante to periodontal treatment in patients with down syndrome – case report. **J Health Sci Inst.** Vol. 29, nº 2, p. 96-99, 2011.

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.

WITTE, M. B.; THORNTON, F. J.; EFRON, D. T.; BARBUL, A. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. **Nitric oxide**, v. 4, n. 6, p. 572-582, 2000.

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.