



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

GIULIANA THAÍSE ARAÚJO DA SILVA

**INFLUÊNCIA NA VARIAÇÃO DA POTÊNCIA DE
IRRADIAÇÃO POR LED COM TEMPO FIXO EM CULTURA
FIBROBLÁSTICA L929**

**JATAÍ
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
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:

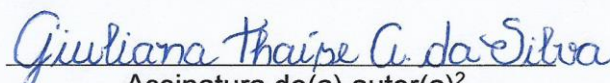
Nome completo do autor: Giuliana Thaíse Araújo da Silva

Título do trabalho: Influência na variação da potência de irradiação por LED com tempo fixo em cultura fibroblástica L929

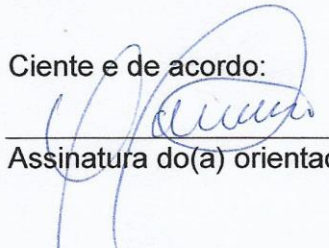
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

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)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 28 / 05 / 18

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

GIULIANA THAÍSE ARAÚJO DA SILVA

**INFLUÊNCIA NA VARIAÇÃO DA POTÊNCIA DE
IRRADIAÇÃO POR LED COM TEMPO FIXO EM CULTURA
FIBROBLÁSTICA L929**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Saúde da Universidade Federal
de Goiás, Regional Jataí, 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.

SILVA, Giuliana Thaíse Araújo da

Influência na variação da potência de irradiação por LED com tempo fixo
em cultura fibroblástica L929 [manuscrito] /Giuliana Thaíse Araújo da Silva.
- 2018.

LXIII, 66 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloísio 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, fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. LED. 2. Fotobiomodulação. 3. Fibroblastos. I. VULCANI, Valcinir Aloísio
Scalla, 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 364, km 192, n. 3800, Setor Industrial
75.801.615 – Jataí/GO- Brasil

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

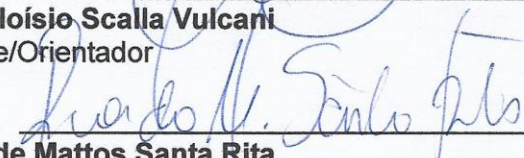
Ao terceiro dia do mês de maio do ano de dois mil e dezoito às 08:30 horas na Sala 08 do Prédio da Pós-Graduação, Unidade Jatobá, Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação, intitulada “INFLUÊNCIA NA VARIAÇÃO DA POTÊNCIA DE IRRADIAÇÃO POR LED COM TEMPO FIXO EM CULTURA FIBROBLÁSTICA L929”, de autoria da candidata: **GIULIANA THAÍSE ARAÚJO DA SILVA**, 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/Orientador), Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita (Membro Interno) e Profª. Drª. Julia de Miranda Moraes (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 a discente: (X) aprovada () reprovada

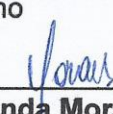
Banca Examinadora



Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani
Presidente/Orientador



Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita
Membro Interno



Profª. Drª. Julia de Miranda Moraes
Membro Externo

GIULIANA THAÍSE ARAÚJO DA SILVA

INFLUÊNCIA NA VARIAÇÃO DA POTÊNCIA DE IRRADIAÇÃO POR LED COM
TEMPO FIXO EM CULTURA FIBROBLÁSTICA L929

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Goiás para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Aplicadas à Saúde.

Aprovada em: 03 de maio de 2018

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a). Júlia de Miranda Moraes

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Prof Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita

Instituição: Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIA

Mais do que dedicar, quero dividir a conquista do presente trabalho com meu pai, herói e exemplo, Francisco Gonçalo, que sempre me guia e apoia nas escolhas da minha vida. Eu te amo! É para o senhor!

EPÍGRAFE

“Pode um homem tornar-se culto pela cultura dos outros, mas só se torna sábio pelas suas próprias experiências.”

Mansour Chalita

“Não, não.

Não posso parar. Se eu paro eu penso.

Se eu penso eu sento. Se eu sento eu deito.

Se deito eu durmo. Se eu durmo eu morro.

Não, não. Não posso parar.”

Canções de Treinamento Físico Militar

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, e ao meu **Anjo da Guarda**, pela vida, por toda a proteção, colo, força, direção e crescimento espiritual e intelectual. Sinto-me abençoada por ter vivido essa experiência, tudo o que pude aprender e as pessoas que tive a oportunidade de conhecer. Obrigada por tudo!

Aos meus pais, **Antônia Oliveira e Francisco Gonçalo**, cujas horas de saudade tiradas de seus convívios se transformaram em incentivo e inspiração. Tudo o que sou, eu devo a vocês. Obrigada pelo amor incondicional, por alimentar meus sonhos, pela dedicação, educação, por colocar meus pés no chão, pelas ajudas desde como fazer uma comida realmente sozinha até nos reparos de um portão, pelo discernimento e pela sabedoria para enfrentar qualquer situação. A finalização desta etapa é quase que exclusivamente devido ao suporte amoroso, financeiro, firme e de muita paciência de vocês dois. Eu amo vocês infinitamente. Obrigada! É para vocês!

À minha única irmã, **Juliana Daíse Araújo da Silva**. É quem conhece todos os meus jeitos e eu sei que torce realmente para o meu sucesso. Muito obrigada por toda a preocupação, comidinhas e carinho. Acredite, eu amo você de verdade e muito. Vamos vencer! Você irá vencer todas as batalhas. Eu acredito em ti. Os irmãos são para sempre!

Eu sei que posso e devo agradecer aos meus filhos de patas, **Ricardo Enrique (Rick)**, **Cristal Jerimum**, **Sharlo** e minha **Emilly Cristina**; bem como todos os que quero levar escondidos para casa, aos que passaram na minha vida e/ou os que conversam comigo diariamente. Os olhos de vocês me transmitem paz, cada movimento e recepção enche meu coração de amor. Vocês me dão extrema alergia, sim alergia, forças e me ensinam a leveza de viver. Amo vocês muito!

Ao meu namorado, **Ronny Gleiber Santos Rezende**, eu nem consigo imaginar como teria sido sem você, com certeza, mais árduo. Quero realmente te agradecer. Você foi a minha base de equilíbrio e desequilíbrio emocional. Você nunca me deixou desanimar, me obrigou a estudar quando faltou vontade, que me ajudou em todas, digo

todas as sobrecargas de atividades, sem importar se eram domésticas, mecânicas, de informática, em horários improváveis; ou em dedicações para me ouvir falar sem fim. Obrigada pela vibração, descontração, viagens, caronas e risadas; por entender minha ausência, meu cansaço, meu mau humor e falta de paciência que só você e meus pais conhecem; minhas manias de limpeza, acompanhar minhas fomes infinitas, experiências e surtos de alegria. Você me conhece de todas as formas. Você tem uma história incrível. Você veio para me mostrar que a vida nem sempre é leve e bonita, mas podemos respirar e vencer. Você foi parte fundamental para essa conquista e esse estudo representa o fim de um ciclo nesta cidade e/ou o começo de outro. Obrigada! Vamos vencer! Eu acredito em você e te admiro muito. Seja vitorioso e muito, mais muito feliz.

Ao meu amigo, **Rodrigo Oliveira Barros**, que me acompanhou desde a primeira inscrição que resolvi fazer nesta cidade. O que posso discorrer é que meu coração está sempre perto, mesmo que geograficamente longe. Quando a saudade, novidades ou desesperos chegam, eu me lembro dos inúmeros momentos que tivemos e te passo as informações, grande parte por telepatia (lógico). Obrigada por cada conselho e risos eternos, mesmo quando deveria ser trágico. Drigo, você é a melhor pessoa. Seremos sempre parceiros. Seja feliz e saudável... que venha o sucesso!

À **Thaywanne Wemille Eloy Silvério**, a minha segunda família durante todo este período, seguramos barras, convivemos, dividimos diversos momentos; a casa, afazeres, imagens na internet, milhares de comidas, histórias, estórias e bichinhos de todos os gêneros e lugares. Você não tem noção do quanto me ensinou sobre a vida, do que eu quero ou não, do certo ou errado, sem precisarmos falar nada. Além das experiências de aprendizado que tivemos juntas: economia, culinária, administração, direito, segurança, marketing e entretenimento. Eu me preocupo com você e só desejo o seu bem. Você é grande! Eu espero realmente para você uma vida leve, brilhante e feliz. Desculpa por qualquer coisinha. Todos falaram que nem íamos conseguir juntas, mas vencemos com glamour. Obrigada por tudo, de todo meu coração.

À **Pollyana Guimarães de Oliveira**, que me apresentou um breve mundo no laboratório; dispôs de seu tempo, empenho e paciência para me ensinar e ajudar no que podia, de como tudo funcionava. Você teve um papel importante na execução deste

trabalho. Você é uma profissional incrível e dedicada, que transmite firmeza. Sucesso! Muito obrigada mesmo.

Ao professor, Prof. Dr. **Milton Adriano Pelli de Oliveira**, por ter me recebido em seu laboratório durante alguns meses para iniciação do experimento deste trabalho e **toda equipe do IPTSP**, da **UFG** e ao **Laboratório de Citocinas** pelo suporte prestado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Valcinir Aloísio Scalla Vulcani**, o grande responsável por este trabalho, por ter me oferecido a oportunidade e me orientar sempre tão disposto e humilde. Eu sempre ouvi somente elogios e gostaria de ter me dedicado extremamente mais, para poder representar o profissional que se tornou. Senhor é um grande professor. Meu carinho, respeito e meu muito obrigada.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo. Expresso os meus sinceros agradecimentos.

Obrigada!

RESUMO

SILVA, Giuliana Thaíse Araújo da. **Influência na variação da potência de irradiação por LED com tempo fixo em cultura fibroblástica L929**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

O Diodo Emissor de Luz (*Light Emitter Diode* - LED) é um dispositivo semicondutor que emite fonte de luz e pode ser usado como modelador tecidual por meio da transformação de fótons recebidos. A fotobiomodulação (*Photobiomodulation therapy* - PBMT) é um termo específico para aplicação terapêutica da luz e atua como analgesia e anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho foi de verificar a efetividade do LED em tempo fixo na estimulação de fibroblastos. Para tanto, utilizou-se a linhagem celular L929 submetida à irradiação LED (630 nm), em triplicata, nas potências de 50, 75 e 100 mW, por cinco segundos e comparou-se com grupo controle não irradiado. Em seguida, observou-se a viabilidade celular, proliferação, produção de óxido nítrico e síntese de colágeno. Os resultados revelaram que não houve citotoxicidade após 24, 48 e 72 horas de irradiação; houve aumento na produção de nitrito entre o grupo de 72 horas e os outros grupos experimentais e aumento na síntese de colágeno, diretamente proporcionais às potências utilizadas. Assim a irradiação possibilitou a estimulação fibroblástica com aumento de sua atividade no processo de cicatrização.

Palavras-chave: LED. Fotobiomodulação. Fibroblastos.

ABSTRACT

SILVA, Giuliana Thaíse Araújo da. **Influence of variation of irradiation potency by LED at fixed time in L929 fibroblast culture.** Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2018.

The Light Emitting Diode (LED) is a semiconductor device that emits light source and can be used as a tissue modeler by means of the transformation of received photons. Photobiomodulation therapy (PBMT) is a specific term for the therapeutic application of light and acts as therapy, analgesia and anti-inflammatory. The objective of this work was to verify the effectiveness of LED at fixed time in the stimulation of fibroblasts. For this purpose, the L929 cell line submitted to LED irradiation (630 nm) was used, in triplicate, at the potency of 50, 75 and 100 mW, for five seconds and compared with non-irradiated control group. Next, cell viability, proliferation, nitric oxide production and collagen synthesis were observed. The results revealed that there was no cytotoxicity after 24, 48 and 72 hours of irradiation; there was an increase in the production of nitrite between the group of 72 hours and the other experimental groups and increase in the synthesis of collagen, directly proportional to the potencies used. Thus the irradiation allowed the fibroblastic stimulation with increased activity in the healing process.

Keywords: LED. Photobiomodulation. Fibroblasts.

SUMÁRIO

FIGURAS E TABELAS	XV
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XVII
INTRODUÇÃO	19
1 REVISÃO DA LITERATURA	20
1.1 DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs)	20
1.1.1 Aspectos Históricos	20
1.1.2 Definição.....	21
1.1.3 Diferença do LED para o <i>laser</i>	22
1.1.4 Fotobiomodulação	24
2 TECIDO CONJUNTIVO E CICATRIZAÇÃO	27
2.1 FIBROBLASTOS	27
2.1.1 Composição das Fibras Colágenas	29
2.2 REPARAÇÃO TECIDUAL.....	29
2.2.1 Fase Inflamatória	30
2.2.2 Fase Proliferativa	31
2.2.3 Fase de Remodelação	32
3 EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>	33
3.1 ESTUDOS EM CULTURA CELULAR.....	33
3.2 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	34
3.3 ÓXIDO NÍTRICO E SÍNTESE DE COLÁGENO	35

4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo geral	37
4.2	Objetivos específicos.....	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	Cultivo celular	38
5.2	Irradiação com LED 630 nm	40
5.3	Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT	41
5.4	Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	42
5.5	Avaliação da síntese de colágeno	43
5.6	Análise estatística	44
6	RESULTADOS.....	45
6.1	Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT	45
6.2	Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	46
6.3	Avaliação da síntese de colágeno	47
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo de fibroblastos e fibrócito	28
Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas	30
Figura 3 - Esquema representativo da cultura de fibroblastos L929	39
Figura 4 - Cultura de fibroblastos L929	39
Figura 5 - Esquema representativo da distribuição das células	40
Figura 6 - Esquema representativo da composição dos grupos experimentais	41
Figura 7 - Esquema representativo do ensaio pelo teste de MTT	42
Figura 8 - Preparo para ensaio da produção de Óxido Nítrico	42
Figura 9 - Esquema representativo do ensaio de produção de NO	43
Figura 10 - Esquema representativo do ensaio de colágeno	44

TABELAS

Tabela 1 - Viabilidade fibroblástica L929 pelo método MTT*	45
Tabela 2 - Produção de nitrito produzida por fibroblastos L929*	46
Tabela 3 - Produção de colágeno por fibroblastos L929*	47

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.	Antes de Cristo
ATP	Trifosfato de adenosina
CO ₂	Dióxido de carbono
DioC6	(3,3'- Dihexyloxacarbocyanine Iodide)
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
Dr (a).	Doutor(a)
Elisa	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	E outros; colaboradores
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
G50	Grupo 1
G75	Grupo 2
G100	Grupo 3
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
L929	Linhagens celulares de fibroblastos de camundongos
<i>Laser</i>	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	<i>Light emissor diode</i>
LINCE	Equipamento de Terapia Fotodinâmica
MTS	(3-(4,5-dimetiltiazol-2IL)-5-(3-carboximetoxifenil)2H-tetrazólio)
MTT	(Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol)- 2,5-difeniltetrazólio])
NASA	<i>National Aeronautics and Space Administration</i>
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBMT	<i>Photobiomodulation therapy</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
Prof (a).	Professor(a)
RNA	Ácido ribonucleico

RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
Rpm	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Docedil sulfato de sódio
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Ultra violeta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
8 MOP	<i>8-methoxypsoralen</i>

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
\pm	Desvio Padrão
°C	Graus Celsius
cm ²	Centímetro quadrado
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mW	MiliWatt
nm	Nanómetro
α	Alfa
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar

INTRODUÇÃO

O reparo tecidual consiste em diversos fenômenos e reações locais; para recuperar células e estruturas teciduais danificadas. Neste sentido, após a atuação de células específicas no processo inflamatório, os fibroblastos iniciam a produção de matriz extracelular, fibras de colágeno, entre outras substâncias para a composição do novo tecido (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

A terapia de luz vem sendo aplicada na fisioterapia com bons resultados na estimulação tecidual e no metabolismo celular com custos relativamente baixos. Na aplicação da técnica, deve-se observar parâmetros de irradiações essenciais como comprimento de onda, densidade da potência, potência de saída, energia depositada, modo de aplicação (pulso/contínuo) e os mecanismos de ações celulares para que seja alcançado resultados positivos (AGNE, 2011).

A aplicação da técnica em cultivos de células é importante para a compreensão das ações fotobiológicas e dos mecanismos celulares e bioquímicos; envolvidos no processo cicatricial e para a determinação de parâmetros ideais nas diversas fases do processo inflamatório e de cicatrização. Tem-se observado a produção de alguns trabalhos científicos controlados, com a aplicação de variados tipos de *lasers* cuja sigla em inglês refere-se a *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação) e LEDs designação de *Light Emitter Diode* (*Diodo Emissor de Luz*) em cultivos celulares, mas que ainda não definem, por completo, os melhores parâmetros como dose, potência e tempo de exposição à luz. Em função de compreender diversos efeitos, estudos em testes de citotoxicidade *in vitro* com variadas células têm sido elaborados, e o uso das mesmas transformou-se em um dos principais modelos para pesquisas em substituição aos animais, no qual abrange proteção, diminuição do uso inadequado e melhor análise dos processos de reparos dos mesmos (LIMA, 2015).

Embora o uso da laserterapia, seja um tema estudado em pesquisas dos últimos anos, McDougall *et al* (2006), Medrado *et al* (2003) citados por, Gonçalves (2015, p. 31), os estudos *in vitro* com *laser* de baixa energia induzem efeitos bioestimulatórios em cultura celular e estimulam os fatores de crescimento.

No entanto, existe escassez na literatura quanto ao uso do LED, no que se refere aos seus benefícios nos processos de reparos e o consenso de uso para uma boa determinação de dados. É necessária a investigação de mais protocolos e análise das variedades dos parâmetros, bem como das técnicas de detecção dos efeitos da luz em culturas celulares, para subsidiar as aplicações clínicas em humanos e animais, a fim de justificar o emprego deste recurso (MATOS, 2016).

Diante dessa lacuna sobre os melhores parâmetros de utilização do LED em processos reparatórios teciduais, este trabalho pretende descrever o LED de baixa potência em cultivo de fibroblastos, com parâmetros de dose e potência, ainda não explorados por outros pesquisadores, em cultura de fibroblastos e analisar os seus possíveis efeitos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs)

1.1.1 Aspectos Históricos

Os seres humanos vêm utilizando a luz para tratamentos desde os tempos remotos. Os princípios envolvidos na descrição da fototerapia, fotoquimioterapia ou fotobiomodulação, datam de 1400 a.C. na Índia, pelos hindus, e dizem respeito ao uso dos extratos de plantas medicinais a fim de intervir no vitiligo em conjunto à exposição solar (DOGRA, 2004; DUARTE *et al.*, 2006; KOBATA, 2016).

No final do século XVIII, o médico Niels Rybers Finsen foi o pioneiro no uso de radiação UV para tratar diversas doenças. As investigações desenvolveram quando se percebeu que poderia obter melhorias na sua qualidade de vida se recebesse contato com a luz solar, mas para isso precisaria de bases científicas. Encontrou então, tratamento da varíola na luz vermelha (1893) e posteriormente do lúpus vulgar (1895). O sucesso das demonstrações dos resultados bactericidas e estimulação tecidual como recurso

terapêutico para o lúpus culminou no prêmio Nobel de medicina e fisiologia (1903), que marca o início dos estudos e práticas em várias dermatoses (NIELS, 2018).

Durante a Primeira Guerra Mundial (1914 - 1918) usou-se a fotobiomodulação e luz solar no tratamento de úlceras traumáticas de perna. Em 1925, foi a vez da combinação de coaltar e radiação ultravioleta em psoríase por Goeckeman. Já em 1948, Mofty relatou os efeitos com 8 - MOP no vitiligo. Desde então, uma série de doenças apresentaram-se responsivas à terapia com luz (ROELANDTS, 2002).

O segundo marco começou com a criação do *laser* de rubi para acelerar a cicatrização de feridas em ratos (1960). O professor Endre Mester observou a aceleração no crescimento de cabelo promovido pela recuperação do organismo, observação essa denominada de “Bioestimulação a *laser*”, renascendo o interesse e aplicações de luz aos tecidos. Pesquisas sobre parâmetros ideais e seus efeitos que auxiliaram no reconhecimento da utilização na terapia com luz para a atualidade (CHUNG, 2012; ANDERS, 2015).

1.1.2 Definição

A sigla LED é a abreviação da designação, na língua inglesa, de Diodo Emissor de Luz (*Light Emitter Diode*). Os equipamentos denominados LEDs, possuem um diodo composto por material semicondutor, formado pelas junções P-N (P – Positivo; N – Negativo) capaz de emitir luz quando energizado. A combinação P-N polarizada diretamente, exige que a energia do elétron possa ser liberada, o que ocasiona recombinações de lacunas na forma de fótons de luz ou de calor (SCHUBERT, 2003; CORAZZA, 2007).

As fontes de luz não são coerentes e nem colimadas com produção de espectro eletromagnético. Quando aplicada a difusão de luz de uma fonte elétrica de energia denomina-se eletroluminescência. O LED apresenta uma faixa de emissão mais estreita em relação as lâmpadas convencionais, medida em graus, no qual, os fótons se repartem em uma superfície maior. Portanto, a superposição da luz é uma combinação linear em termos de intensidade. Antes de sair do chip, ela se propaga através de várias dimensões (CORAZZA, 2005; PARISER, 2008; RITTER, 2010).

Os primeiros LEDs emitiam vermelho de baixa intensidade ao invisível. As versões modernas disponibilizam do ultra vermelho e infravermelho até a claridade elevada. A tecnologia passou a oferecer ao longo do tempo LED azul, amarelo, verde, laranja, âmbar e vermelhos cada vez mais potentes e brilhantes que podem ser encontrados em vários modelos. Essas cores de luzes são determinadas pelo espaço de energia do semicondutor que geralmente é de pequena área e os componentes ópticos podem ser usados para padrão de radiação (BERNITZ, 2006; MORENO, 2008; MEYER, 2010).

Dependendo do comprimento de onda, a luz do LED age como agente anti-inflamatório e antimicrobiano, sem causar dano tecidual baseado na fototermólise que pode atuar na reorganização das células, na síntese de ATP e proteínas, bem como na inibição e estimulação dos efeitos da fotobiomodulação (FAILACHE, 2006).

Esse comprimento pode variar de 405 nm, que é o azul com efeito bactericida, a 940 nm que é o infravermelho. O comprimento médio de 630 nm (vermelho) é ideal para ativação do fotossensibilizante e aumento do metabolismo dos fibroblastos, sem causar os efeitos contrários dos comprimentos de ondas mais fortes. A luz vermelha do LED ajuda na multiplicação celular e efeitos anti-inflamatórios (DOVER, 1989; PARISER, 2008; RITTER, 2010).

Os avanços mais importantes estão impactando áreas variadas quanto a saúde: possa ser na fisioterapia, medicina e odontologia e/ou até mesmo na arquitetura e agricultura. Os LEDs são considerados de baixo custo e mais seguros por oferecer manuseio fácil e dose contínua com boa intensidade. Mesmo com uma aplicação, o LED pode atingir grandes áreas devido a maior superfície de emissão de luz com densidade e intensidade energéticas homogêneas. Por esse motivo o terapeuta pode cobrir um maior espaço com o aplicador fixo sem movimentação (PARISER, 2008; MEYER, 2010; RITTER, 2010).

1.1.3 Diferença do LED para o *laser*

Novos estudos proporcionam cada vez mais alternativas e credibilidade ao uso de diversos equipamentos. Apesar do LED e o *laser* serem bem indicados com

semelhanças significativas é necessário pontuar as diferenças entre eles. Ambos possuem formação da luz diferenciadas. A luz do diodo de um *laser* está presente dentro de uma cavidade de ressonância, na qual, os fótons são idênticos, ampliados por estímulos que se propagam em trajetórias paralelas. Os feixes de luz são coerentes e as ondas que compõem os fótons coincidem em termos de amplitude, direção e fases com um único comprimento de onda e cor. A composição da luz do *laser* é colimada e por outro lado, o LED não possui essa cavidade óptica, só produz uma banda de espectro eletromagnético próxima ao do *laser*. Assim, o *laser* fornece luz por radiação estimulada, quanto o LED emite luz através de radiação espontânea (CALMON, 2006; CORAZZA, 2007; VOLPATO, 2009).

Outro fator representativo é a potência de saída de cada um. No LED, o pico máximo que é medido em milésimos de um watt, no *laser* é em watt. O que não proporciona ao LED energia para danificar o tecido, e sim, apenas o suficiente para uma resposta celular no processo de tratamento. Já a potência do *laser* possibilita uso em recurso ablativo para meio cirúrgico (BAGNATO, 2005).

Na escolha para a aplicação terapêutica devem ser observadas as vantagens e desvantagens entre LED e *laser*. O LED apresenta como benefícios o estímulo natural ao tecido de forma menos invasiva, disponibilidade de diversas cores, menor custo com relação ao *laser*, pode ser aplicado no corpo todo e é adequado tanto para condições crônicas quanto agudas. Já como desvantagens o LED não é coerente, dispõe de menor precisão e os efeitos possuem resultados gradativos, pois a terapia é mais lenta devido ao comprimento de onda (MORENO, 2008; CHUNG, 2012).

O *laser* é pontual e coerente, o efeito é visualizado rapidamente, a terapia é rápida e apresenta maior precisão no comprimento de onda. No entanto, o seu custo do tratamento é mais elevado, pode ser invasivo por não proporcionar estímulos naturais, o tempo de cura é menor, oferece pouca variedade de cores, não é apropriado para todo o corpo e sua escolha depende do tipo de lesão que geralmente é mais específico (MUTHU, 2002; ALMEIDA, 2014; LUMILEDS, 2018).

A introdução dos LEDs em terapias com luz proporcionou o aumento nos debates entre diferenças dos aparelhos. Karu *et al.* 1983, compara os resultados das diferentes fontes de luz sob aspectos clínicos e demonstra que não pode concluir maior efetividade terapêutica do LED com relação ao *laser*. A luz coerente e não coerente em

estudos a nível celular com a mesma intensidade, duração, tempo de irradiação e comprimento de onda resultaram em efeitos biológicos aproximados.

Um dos principais interesses das pesquisas é especialmente ao grande potencial de ação com custos menores (PONTINEN, 1996). Análises das diferenças do comprimento de onda, coerência ou não, apresentam características importantes para os efeitos biomoduladores. Não foi determinado se existe de fato discordância nos resultados, quer na monocromoidade da luz *laser*, como a amplitude da luz LED. Além disso são poucos os estudos publicados e dados conclusivos sobre a terapia de luz com LED e o uso da sua radiação óptica (SMITH, 2005; AGNOL, 2009).

1.1.4 Fotobiomodulação

A terapia de fotobiomodulação ou *photobiomodulation therapy* (PBMT) é um termo específico para aplicação terapêutica da luz. A PBMT é definida como uma terapia que utiliza formas não ionizantes de fontes de luz, incluindo LEDs e *lasers*, capaz de provocar eventos fotofísicos e fotoquímicos em várias escalas biológicas (ANDERS *et al.*, 2015).

É uma modalidade não invasiva e de baixo custo utilizada amplamente em variadas afecções por fisioterapeutas, dentistas, terapeutas, dermatologistas, reumatologistas e médicos veterinários (KULEKCIOGLU, 2003; VLADIMIROV, 2004). A técnica com o uso do LED surgiu em meio de pesquisas pela NASA, a Food and Drug Administration (FDA) através de testes na cicatrização de feridas em humanos (WHELAN, 2001).

A fotobiomodulação resulta em benefícios nos seus efeitos para analgesia, ação anti-inflamatória e cicatrização. A terapia com luz emitida por equipamentos de LED atua no metabolismo das células alvo que consequentemente produz eventos vasculares e celulares de possível interferência no reparo tecidual (LINS, 2010).

A absorção da luz em meios biológicos ou por células ocorre por fotorreceptores moleculares, denominados cromóforos, que podem ser enzimas, membranas celulares, pigmento heme, mioglobina, melanina e pigmento citocromo na mitocôndria. A interação adequada da luz com os fotorreceptores pode promover nas células, proliferação e

aumento do metabolismo, culminando na redução do processo inflamatório, aumento na deposição de colágeno e aceleração da cicatrização tecidual (KARU, 1989).

Esses efeitos biológicos no tecido são recorrentes da energia luminosa depositada. A mesma é transformada em energia vital de ação primária com resposta direta e ação secundária de maneira indireta, bem como nos resultados terapêuticos gerais (GENOVESE, 2000). A luz quando utilizada nas células ou tecidos na dose adequada pode estimular os linfócitos, aumentar a produção de ATP mitocondrial, ativar mastócitos e a proliferação celular (CATÃO, 2004).

Em nível celular, a aceleração do metabolismo pela absorção da luz ocorre devido ao estímulo dos fotorreceptores na cadeia mitocondrial respiratória, na liberação dos fatores de crescimento, mudanças nos níveis de ATP celular e a síntese de colágeno. A luz do LED age na maturação e proliferação, na quantidade de tecidos de granulação produzida, na redução dos mediadores inflamatórios e nas alterações bioelétricas, bioquímicas e bioenergéticas o que induz o processo da cicatrização (KREISLER, 2003; POSTEN, 2005; BOURGUIGNON, 2005).

As atividades anti-inflamatórias são decorrentes da aceleração do processo de microcirculação, ou seja, mudanças na pressão hidrostática capilar, reabsorção do edema e diminuição nos metabólicos intermediários acumulados (CAMELO, 2007).

Já no mecanismo de indução da atividade mitótica dos fibroblastos há estimulação da produção do fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb). Este possui um polipeptídeo multifuncional que induz a proliferação e as diferenciações dos fibroblastos. Assim as células imunes que secretam citocinas e outros fatores regulatórios do crescimento fibroblástico são afetadas (WALSH, 1997).

A irradiação com melhores resultados são aquelas oriundas de espectro vermelho e infravermelho. Karu, 2003 relata que as fontes mais utilizadas são o *laser* de hélio neon (He Ne) (632,8 nm), o *laser* de alumínio gálio (Ga Al) (630 685 nm), o *laser* de arseniato de hélio neon (He Ne As) (780 870 nm) e o arsenato de gálio *laser* (Ga As) (904 nm), assim como os LEDs cuja banda de emissão se encontra numa ampla região do espectro.

A utilização do LED tem despertado interesse para a finalidade experimental e clínica, em virtude de resultados promissores alcançados tanto pela sua aplicação, quanto pelo uso de *lasers*. Efeitos benéficos da interação da luz LED já foram documentados em

culturas de fibroblastos, em modelos animais e humanos (WEBB *et al.*, 1998; BAROLET *et al.*, 2009; AGNOL *et al.*, 2009; PIRES-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

EL SAYED & DYSON (1990) analisaram o material de uma ferida de 1 cm² em ratos Wistar feitas com um bisturi. As feridas foram tratadas e depois do animal eutanasiado, o material foi encaminhado para degranulação de mastócitos e análise em microscopia de luz. Os testes foram individuais em uma única fonte de energia com diversos comprimentos de onda (1 *laser* de 820 nm e LEDs de 660, 870, 880, 940 e 950 nm). Como resultados, os mastócitos que receberam conjunto múltiplo de diodos monocromáticos apresentam alta degranulação.

WHELAN *et al.* (2001) observaram em feridas os níveis dos fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nos dias 0, 4, 7 e 14. Como método foi realizado o ELISA e irradiação com LED (880 nm) de potência 4 J/cm². Quando comparada aos grupos controles os resultados foram positivos, os mesmos com aumento da taxa de crescimento da cicatrização. Em todos os dias de análise observada, os níveis de FGF-2 apresentavam índices significativos, em especial no 4º dia. Entretanto, os níveis de VEGF resultaram em semelhanças ao controle.

Em outra pesquisa de Whelan *et al.* (2003), relataram os efeitos da expressão gênica em um procedimento cirúrgico após irradiação com LED (670 nm) e potência de 4 J/cm². No segundo dia de tratamento, os fatores de crescimento fibroblástico 7 e 12 mostraram-se regulados pelo LED. O gene Galactina-7 (subtipo de queratinócitos), também era regulado e elevado até o 14º dia de tratamento com o LED. Como consequência, ação na cicatrização de ferida, possível modulação da dor e dos genes reguladores do cálcio (Calpactinas), quando analisados em relação ao grupo controle.

AGNOL (2009) utilizou o LED para tratamentos de diversas complicações relacionadas ao diabetes e associação a interação da luz em trinta e seis ratos com lesões cirúrgicas no dorso. A justificativa de escolha do método foram a coerência da luz, o baixo custo e fácil manuseio. Os grupos experimentais receberam uma irradiação por LED 640 nm ou *laser* 660 nm com duração de 30 minutos após a lesão. Depois, quantificados os parâmetros histomorfológicos e histomorfométricos. Os resultados do *laser* para o LED foram semelhantes por um período de 168 horas após as feridas. Nos grupos de animais diabéticos, observou-se que a fotobiomodulação com LEDs 72 horas

após a criação da lesão foi mais eficiente que a do *laser* para resultados de redução nos diâmetros das feridas.

CHUNG, *et al.*, 2012, expõe a carência de estudos que evidenciem a influência das técnicas de fotobiomodulação. O grande número de parâmetros utilizados e que nem sempre os mesmos são citados para a realização adequada da modalidade, dentre a complexidade na correlação do comprimento de onda da luz, densidade de energia e potência, tempo de irradiação, intervalo de tratamento e as respostas bifásicas das doses. Esses dados justificam a aplicação da fotobiomodulação com LED em fibroblastos.

2 TECIDO CONJUNTIVO E CICATRIZAÇÃO

Os organismos são compostos por quatro tipos de tecidos básicos que se combinam para compor tecidos mais complexos e órgãos. Nesta classificação, que se baseia em aspectos morfológicos e funcionais, encontra-se o tecido conjuntivo, tecido epitelial, tecido muscular e tecido neuronal (KIERSZENBAUM, 2012).

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, cartilaginoso ou ósseo. A composição do tecido conjuntivo propriamente dito inclui abundância de matriz extracelular, células mesenquimais, fibroblastos, plasmócitos, macrófagos e mastócitos (ROSS, PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

2.1 FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são alongados ou estrelados, com núcleo eucromático e um ou dois nucléolos proeminentes. Apresenta retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos, pois sintetizam fibras colágenas, fibras reticulares, fibras elásticas e a substância fundamental que compõem a matriz extracelular. Sua forma

inativa é denominada de fibrócito, com dimensão menor, de aspecto fusiforme, núcleo menor e mais escuro e citoplasma com reduzida quantidade de retículo endoplasmático rugoso (Figura 1) (KIERSZENBAUM, 2012).

Os fibroblastos se apresentam no tecido conjuntivo normal com baixa taxa de proliferação, baixa atividade metabólica e estado de repouso. Ocorre uma alteração fenotípica dos fibroblastos em repouso para as células que estão em proliferação e, em seguida, para células em migração. Isso gera produção de matriz estacionária com capacidade de reparar o tecido, induzir a deposição de matriz extracelular e proteínas na adesão celular, de maneira que, os fibroblastos migrem para o centro da ferida (HAEKKINEN *et al.*, 2000).

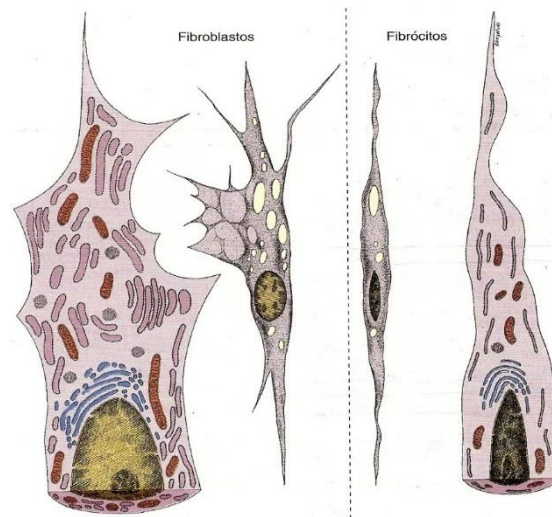


Figura 1 - Esquema representativo de fibroblasto (esquerda) e fibrócito (direita). Observa-se maior volume citoplasmático e de organelas nos fibroblastos. Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

Na contração da ferida em uma representação fenótipo contrátil, os fibroblastos se diferenciam a partir dos miofibroblastos, que são células intermediárias entre fibroblastos e as células musculares lisas. Harris *et al.*, 1980 relata que eles exercem essa função por encurtamento, como as células musculares e/ou por mecanismo estacionário.

As células fibroblástica podem ser consideradas como a principal no tecido conjuntivo, mas em adultos, elas não se dividem com tanta frequência, apenas quando existe lesão ou uma sobrecarga funcional (MORISCOT *et al.*, 2004).

2.1.1 Composição das Fibras Colágenas

As fibras de colágeno são compostas por subunidades filamentosas denominadas fibrilas de colágeno, cujas moléculas estão dispostas em hélice tripla e são formadas predominantemente pelos aminoácidos glicina, prolina e lisina. Estas fibras são os componentes estruturais mais abundantes do tecido conjuntivo. Existem aproximadamente 29 tipos de colágeno, diferenciados pela complexidade e pela considerável diversidade em sua estrutura e função. O colágeno do tipo I é o mais abundante, correspondendo a cerca de 90% e é encontrado em diversos órgãos como ossos, tendões, pele, ligamentos, córnea, pulmão e tecido vascular e desempenha papel fundamental na cicatrização tecidual (ROSS, PAWLINA, 2012).

Durante a síntese do colágeno, pelos fibroblastos são ativados os genes codificadores das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ no núcleo, a produção o RNA mensageiro (RNAm) e a tradução no citoplasma com a expressão das cadeias polipeptídicas que são internalizadas no retículo endoplasmático, onde sofrerão hidroxilação dos aminoácidos e glicosilação. No retículo endoplasmático as cadeias α se organizam em grupos de três formando as moléculas precursoras e denominadas procolágeno, que serão secretadas para o meio extracelular. Os fibroblastos secretam a enzima procolágeno peptidase no meio extracelular, que cliva as moléculas de procolágeno e se associam espontaneamente para compor as fibrilas de colágeno (KIERSZENBAUM, 2012; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2013).

2.2 REPARAÇÃO TECIDUAL

O reparo tecidual é um processo dinâmico, organizado e complexo, que consiste em uma coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem entre si, para ocorrer a reconstituição tecidual (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

Este fenômeno começa logo após ocasionada a ferida e pode durar até anos. A ferida é cada ruptura tecidual com perda consecutiva de função. A cicatrização pode ser afetada quando acontece falta ou desequilíbrio dos elementos biológicos, porém pode ser

compensada por outros mediadores de forma a dar continuidade no reparo (REINKE, 2012; COELHO, 2012).

Fibroblastos, células endoteliais, células circulatórias, os queratinócitos, moléculas e citocinas participam de vários elementos fundamentais para a recuperação tecidual. Os fibroblastos atuam através da função de proliferação, migração e preenchimento da lesão que durante o reparo ficam expostos a diversas moléculas da matriz extracelular e dos fatores de crescimentos (HAEKKINEN *et al.*, 2000).

O processo pode ser dividido em três fases: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação (Figura 2) (LAUREANO & RODRIGUES, 2011; ZACHARY & McGAVIN, 2013).

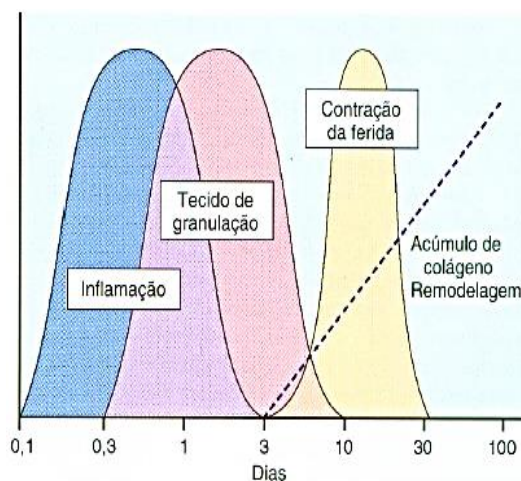


Figura 2 - Fases da cicatrização de feridas. Fonte: Robbins (2001).

Os efeitos temporais estabelecem a duração de cada etapa. No entanto, não é exato o intervalo de tempo, devido as características de cada situação para reparo e a sobreposição de cada fase em relação a outra (REED, 1995).

2.2.1 Fase Inflamatória

Quando detectado o dano tecidual, a fase inflamatória age como consequência direta e de grande importância para o começo do reparo. Seu objetivo é recuperar o tecido de maneira funcional e morfológica. Além de agir na eliminação dos microrganismos e

das bactérias contaminantes, caso não ocorra essa descontaminação, pode atrasar o processo de reparação (PANSANI, 2015).

A fase inflamatória é caracterizada por fenômenos vasculares, coagulação, e mecanismos celulares. Os primeiros tipos celulares a predominarem no sítio da lesão são os neutrófilos, em seguida os monócitos que se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos coordenam o processo de reparo, pois realizam fagocitose de microrganismos, debris teciduais e neutrófilos senis, contribuindo para a progressão da fase proliferativa, por meio da indução da angiogênese e formação de tecido de granulação. São também responsáveis pela produção e liberação de diversos fatores de crescimento, como PDGF, TGF- α , TGF- β , VEGF e FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

Assim, do primeiro ao décimo dia, através das alterações vasoativas é liberado para periferia da lesão os fagócitos circulantes. Nesta fase, quando aplicado a fotobiomodulação pode resultar em otimização da cicatrização devido ao crescimento fagocitário e movimento de células, ou pela secreção de histamina e serotonina dos mastócitos estimulados pela permeabilidade da membrana da plaqueta e reação dos macrófagos (MORTIMER & DYSON, 1988; JOZSA & KANNUS, 1997; CORAZZA, 2007).

2.2.2 Fase Proliferativa

A fase proliferativa caracteriza-se pela ocorrência de angiogênese e fibroplasia, com a proliferação de fibroblastos e consequentemente aumento da produção de matriz extracelular e colágeno do tipo III (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

Tem início três dias após a lesão e até cinco dias organiza a trama de granulação com a deposição da matriz extracelular. Esta fase é marcada por fibroblastos, miofibroblastos e endoteliais na área lesionada. A migração destas células, são mediadas pelos fatores de crescimento dos macrófagos teciduais e das plaquetas, o que permite a síntese de colágeno e a deposição (MAXWELL, 1992; JOZSA & KANNUS, 1997; ALBUQUERQUE, 2010).

O processo de fibroplasia é observado a partir da produção de colágeno com a formação de novo tecido (granulação). A partir disto, observa-se fibroblastos

neoformados, colágeno, macrófagos, os micros vasos permeáveis e a substância matricial. A fotobiomodulação nesta etapa estimula a produção de colágeno, pela motilidade fibroblástica e devido a atividade celular gera aumento do fluxo de íons de cálcio (DE OLIVEIRA, 2014).

2.2.3 Fase de Remodelação

Esta é a maior, terceira e última fase do processo de reparo. Pode ser denominada também de fibrose ou maturação. Seu início é em média da segunda semana da cicatrização e pode durar até anos de acordo com cada lesão. A ferida madura é caracterizada como avascular e acelular (REINKE, 2012).

Durante a remodelação, os fibroblastos produzem colágeno do tipo I, que se apresenta mais organizado e substitui o colágeno do tipo III. Neste realinhamento, os feixes de colágeno ficam mais fortes, espessos e elásticos com o objetivo de recuperar a função inicial (ZACHARY & McGAVIN, 2013).

3 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*

Os testes *in vitro* não substituem os testes *in vivo*, porém estudos do comportamento celular *in vitro* são essenciais para que se tenha um uso coerente e seguro na prática médica. Além disso, apresentam vantagens como a redução da utilização de animais, facilidade de manutenção, cultivo e exigência de menor espaço em relação aos biotérios. A cultura celular é uma extensão da técnica de cultura de tecidos, um termo genérico utilizado para incluir culturas *in vitro* de órgãos, tecidos e células (FRESHNEY, 2005; FANG, 2017).

No entanto, as células isoladas, tecidos ou órgãos só podem ser cultivados *in vitro* quando mantidos em instalações adequadas, com temperaturas definidas e suplementados com meio contendo nutrientes e fatores de crescimento. 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).

3.1 ESTUDOS EM CULTURA CELULAR

No início do Século XX, as considerações do pesquisador americano Ross Harrison (1908), foram consideradas um marco ao uso da técnica de cultura/cultivo celular ou tecidual. Seu objetivo era observar células de animais livres das interferências de organismos internos e manter diante da exposição do ambiente externo. Os tecidos eram fragmentados e submersos no soro do animal de origem ou no plasma sanguíneo que estavam nos frascos. Harrison, realizou testes *in vitro* para o estudo de métodos *in vivo*, através do cultivo da medula espinhal embrionária de anfíbios (FRESHNEY, 2005; LIMA-NETO, 2010).

Existiam grandes dificuldades quanto a execução, para tanto, eram utilizadas uma dispersão de células com origem de um tecido de uma linhagem celular, degradação enzimática, química, mecânica ou de uma cultura primária (ZORTÉA, 2010).

A cultura celular envolve isolamento e manutenção da viabilidade e proliferação das células de um tecido vegetal ou animal em um meio *in vitro* com nutrientes, fatores de crescimento e sobrevivência com boas condições de pH, temperatura, tensão de CO_2 e de O_2 e osmolaridade adequada. Pode-se definir como uma junção de práticas para permitir a manutenção celular em um sistema *in vitro* sob condições adequadas independentemente do tipo de tecido de origem (DO AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011).

O cultivo celular foi fundamental para elucidar interações célula-célula e elaborar os primeiros procedimentos experimentais, progressivamente, as dificuldades foram elucidadas através de materiais de uso descartáveis, estéreis, assépticos, métodos de manuseios seguros, atenção e meios de cultura adequados (LIMA-NETO, 2010).

Um dos avanços nos experimentos com o cultivo celular se deu com o uso de linhagens celulares. A linhagem celular pode ser caracterizada como um conjunto de células oriundas pelo subcultivo de uma célula primária mantidas em condições adequadas de armazenamento. Neste sentido, uma das linhagens utilizadas são as da cultura de fibroblastos, fundamentais para a produção de matriz extracelular e de colágeno, para tanto as linhagens de fibroblastos L929 foram uma das primeiras a serem estabelecidas nas culturas contínuas. A L929 é derivada do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de camundongos machos *Mus musculus* (C3H/Na) (BRETAS, 2011; DE OLIVEIRA, 2014).

As pesquisas *in vitro* com cultura de células foi o começo das análises do comportamento biológicos dos materiais. Tem sido utilizado devido a padronização da amostra e ser uma boa alternativa ao uso dos animais de laboratório (HAUMAN & LOVE, 2003; FRESHNEY, 2010).

3.2 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

Os testes *in vitro* que avaliam a citotoxicidade estão relacionados com modificações que ocorrem nas células, desde as mais brandas, como determinadas funções celulares até a não viabilidade celular. A morte celular é evidenciada por alterações na morfologia celular, 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).

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)-5-difenil brometo de tetrazolio) e o MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-IL)-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 análise 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).

3.3 ÓXIDO NÍTRICO E SÍNTESE DE COLÁGENO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora, sintetizada a partir do aminoácido arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que age nos sistemas nervoso, imunológico e circulatório (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 quantificadas, são capazes de gerar efeito contrário, inibindo a produção de colágeno. De certa forma, 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).

A coloração do colágeno através do Sirius Red é um método histológico padrão. Utilizada para quantificar a síntese de colágeno em cultura celular. O procedimento é de fácil execução com função de verificar a relação aos diferentes materiais extracelulares. Essa determinação do conteúdo de colágeno celular desperta grandes interesses em pesquisas por se basear na medição do teor de hidroxiprolina por métodos químicos e associação da prolina marcada radiativamente nos colágenos e possibilitar a quantificação da taxa de síntese e degradação de colágeno (PUCHTLER *et al.* 1964, BLUMENKRANTZ E ASBOE-HANSEN, 1975; TULLBERG, 1999).

Foi mediante a coloração específica de colágeno pelo Sirius Red, Junqueira et al. (1979) desenvolveram um ensaio colorimétrico de ligação de corante que quantifica as soluções de colágeno espalhadas em lâminas de vidro. O que possibilita a análise de várias amostras devido a leitura ser na placa de microtitulação (TULLBERG, 1999).

Desta forma, considerando-se a necessidade de avaliar a influência da luz LED na atividade e viabilidade de fibroblastos e compreender os efeitos sobre o processo de cicatrização, optou-se por utilizar cultivo celular de fibroblastos e técnicas que fossem viáveis para abordar adequadamente a proposta do uso de diferentes potências do equipamento emissor da luz. É necessário ressaltar que ainda são poucos os estudos que têm sido desenvolvidos com a luz LED, cujos efeitos clínicos e experimentais mostram-se promissores para área de reparação tecidual.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade e atividade de fibroblastos após a irradiação com LED vermelho 630 nm em diferentes potências e tempo fixo de cinco segundos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Irradiar cultura de fibroblastos com LED vermelho 630 nm e potência de 50 mW, 75 mW e 100 mW por cinco segundos;
- b) Avaliar a viabilidade (citotoxicidade) de fibroblastos irradiados;
- c) Mensurar a produção de óxido nítrico por fibroblastos irradiados;
- d) Verificar a produção de colágeno por fibroblastos irradiados.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada seguiu todo o protocolo de manejo estabelecido pelo Laboratório de Citocinas no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás – UFG/Regional Goiânia, conforme descrito a seguir.

5.1 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 orientação do Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira. 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 100mL do meio RPMI (Sigma-R6504) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cripion - FB 0010S®), 1mL de L-glutamina (Gibco 100x®) a 200mM, 1mL de Hepes (Sigma H0763®) a 1M, 100µL de 2-Mercaptoetanol (Sigma M6250®) (50mM), 1mL de estreptomicina (Sigma P7794®)/penicilina (Sigma P7794®) (10.000U/mL estrept. e 10.000µg/mL de penic).

As células permaneceram armazenadas em reservatório de nitrogênio líquido, congeladas a -70°C em meio com DMSO 5% (Mallinckrodt®). Para o experimento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e levadas rapidamente ao banho-maria a 37°C para descongelar sob movimentos leves. No fluxo laminar, preparado adequadamente para o uso, a amostra foi colocada em tubo tipo Falcon estéril 15 e, em seguida, acrescentou-se o meio RPMI completo gota a gota sob movimentos leves. O frasco foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, a 10°C, formando na parte inferior do frasco um *pellet* de células (GEY, et al., 1952; LUCEY, et al., 2009).

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. Realizado a contagem das células, diluindo-as em azul de tripano 0,1% na placa de 96 poços seguido da quantidade e diluição celular adequada através do cálculo.

$$\text{Quantidade de células} \times \text{dilução} \times \text{Fator da câmara} \div 1000$$

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%) (Figura 3 e 4).

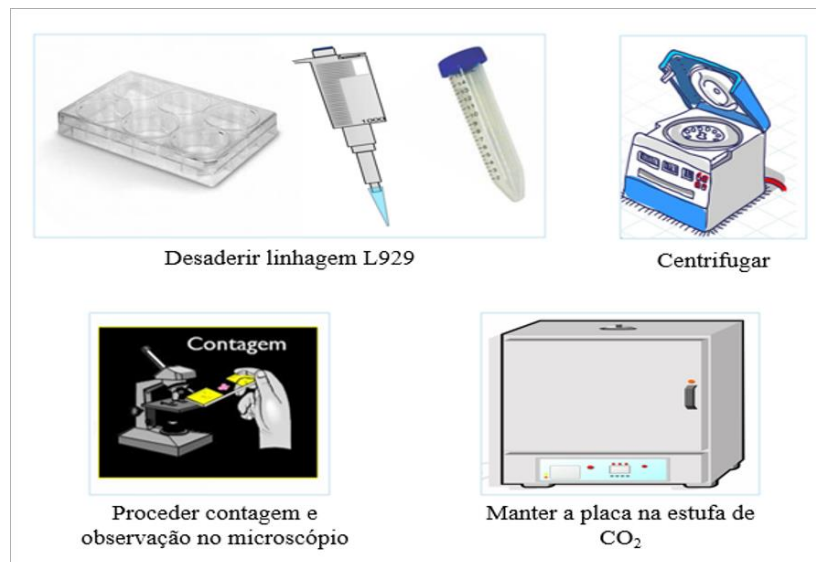


Figura 3 - Esquema representativo da cultura de fibroblastos L929.
Fonte: Adaptado Google Imagens



Figura 4 - Cultura de fibroblastos L929.
Fonte: Arquivo pessoal

Após a cultura apresentar confluência de 80 – 90%, foi realizada a tripsinização nas placas de 96 poços de fundo chato para cultura celular e distribuição para o experimento, 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 5).

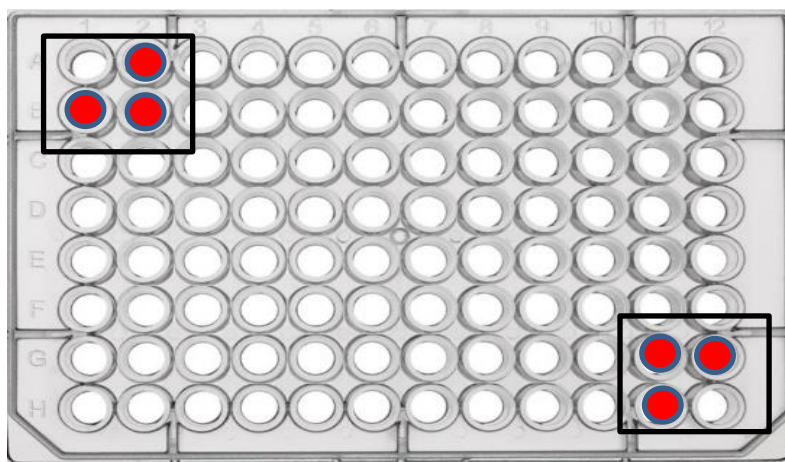


Figura 5 - Esquema representativo da distribuição das células cultivadas na placa de 96 poços. No quadrante superior esquerdo, três poços ocupados, compondo as repetições dos grupos controles, cujas células não são irradiadas por LED. No quadrante inferior direito, três poços ocupados para compor as repetições dos grupos experimentais, cujas células são irradiadas. Fonte: Adaptado Google Imagens

5.2 IRRADIAÇÃO COM LED 630 NM

Após as 24 horas de sedimentação, iniciou-se a irradiação com tempo fixo de cinco segundos, variando-se a potência de acordo com cada grupo: grupo 1 (G50), potência de 50 mW; grupo 2 (G75), 75 mW e grupo 3 (G100), 100 mW (Figura 6).

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 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 (MENEZES,2006).

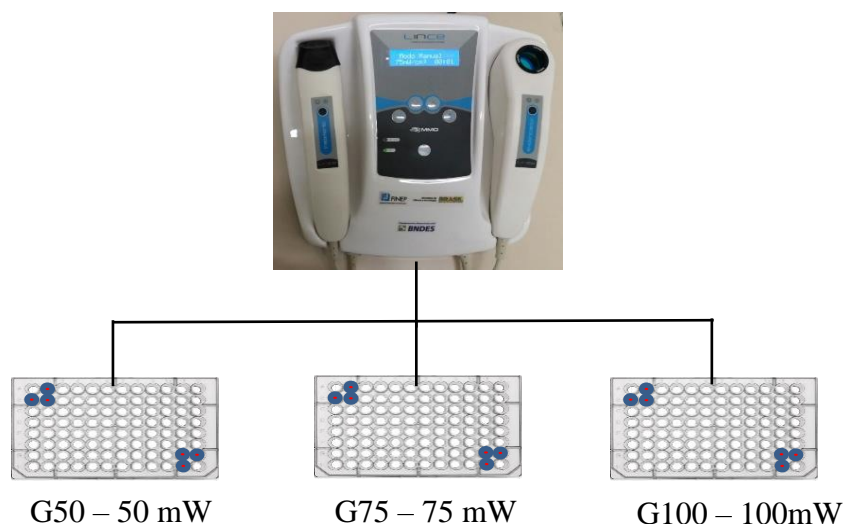


Figura 6 - Esquema representativo da composição dos grupos experimentais. Grupo 1 (G50), irradiação com 50 mW, grupo 2 (G75) com 75 mW e grupo 3 (G100), com 100 mW. Em todos os grupos o tempo de irradiação foi de cinco segundos. Para cada grupo, realizou-se a experimentação em triplicata, com três repetições (poços preenchidos em vermelho no quadrante superior esquerdo). Os grupos controles estão no quadrante inferior direito (poços preenchidos em vermelho). Fonte: Adaptado Arquivo Pessoal

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]).

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO METODO 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 12 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 7) (BASSO, 2013; MOSMANN, 1983; PASANI, 2015).

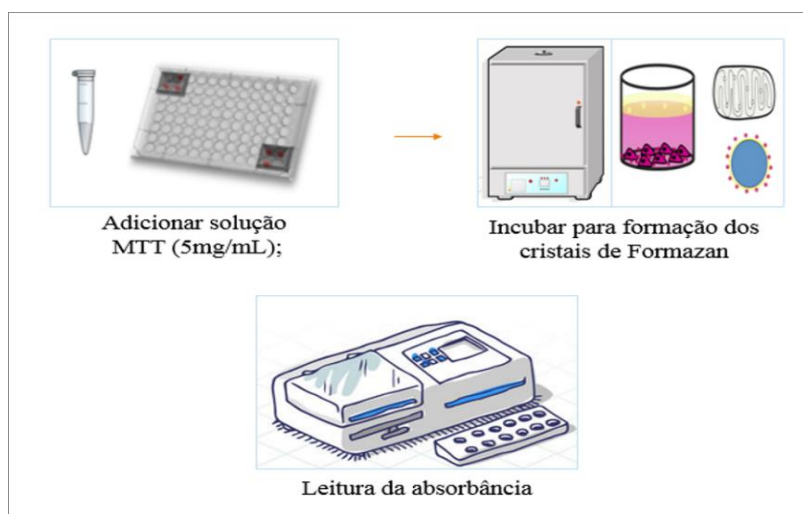


Figura 7 - Esquema representativo do ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT.
Fonte: Adaptado Google Imagens

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A quantificação de NO (Figura 8) produzido pelas células foi determinado pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células por meio da reação de diazotação com o reagente de Griess (Sigma Aldrich) (GREEN *et al.*, 1982).

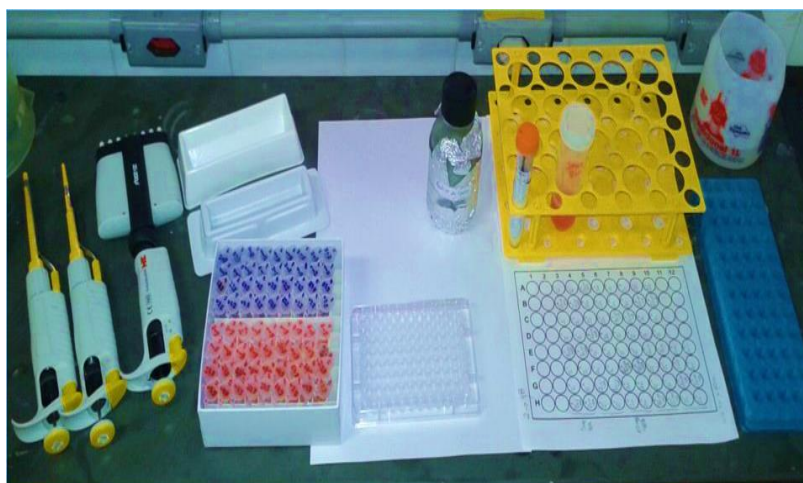


Figura 8 - Preparo para ensaio da produção de Óxido Nítrico.
Fonte: Arquivo pessoal

Para isto, foram transferidas alíquotas de 50 μL 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 sufamilamida 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) (Figura 9). A concentração foi calculada a partir de curva padrão de nitrito de sódio (1,5625 μM a 100 μM). 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 9 - Esquema representativo do ensaio de produção de NO.
Fonte: Adaptado Google Imagens

5.5 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 µL 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 µL de ácido clorídrico 0,01 M. Os tubos foram centrifugados novamente (12.000 rpm/10 min), o sobrenadante descartado e adicionado 30 µL 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 (Figura 10) (BARROS, 2017).



Figura 10 - Esquema representativo do ensaio de colágeno.
Fonte: Adaptado Google Imagens

A porcentagem de síntese de colágeno para cada amostra foi calculada com base nos valores médios de absorvância do grupo controle.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram verificados quanto à distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e os grupos comparados pelo teste ANOVA, ao nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO METODO MTT

A avaliação da citotoxicidade pelo teste MTT demonstrou que o LED nas potências de 50 mW, 75 mW e 100 mW, irradiado por cinco segundos, não proporcionou a perda da viabilidade 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 fibroblástica L929 pelo método MTT*

Viabilidade (%)				
Período	GC	G50	G75	G100
24 h	101,21 ± 0,99 ^{Aa}	99,66 ± 1,03 ^{Aa}	98,50 ± 1,04 ^{Aa}	99,50 ± 0,54 ^{Aa}
48 h	99,75 ± 0,71 ^{Aa}	100,33 ± 1,05 ^{Aa}	99,16 ± 1,16 ^{Aa}	100,00 ± 1,41 ^{Aa}
72 h	102 ± 1,00 ^{Aa}	99,50 ± 1,37 ^{Aa}	99,83 ± 0,75 ^{Aa}	99,16 ± 0,75 ^{Aa}

*A tabela expressa em porcentagem após irradiação por LED, nas potências de 50mW (G50), 75 mW (G75) e 100 mW (G100), durante cinco segundos. Avaliação em 24, 48 ou 72 horas. Grupo controle (GC), não sofreu irradiação.

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.

6.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO (NO)

Os resultados da produção de NO pelos fibroblastos demonstram que houve diferença significativa em 24 e 48 horas entre o grupo controle e os demais grupos experimentais, que apresentaram médias superiores. Entre G50 e G75 não houve diferença significativa, porém G100 apresentou diferença significativa quando comparado com G50 e G75. Em 72 horas houve diferença significativa entre o grupo controle e os grupos experimentais. No mesmo período de avaliação, houve diferença significativa entre G50, G75 e G100 (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de nitrito produzida por fibroblastos L929*

Produção NO (%)				
Período	GC	G50	G75	G100
24 h	100,00 ± 1,00 ^{Aa}	106,00 ± 0,91 ^{Ab}	108,00 ± 1,00 ^{Ab}	110,00 ± 0,51 ^{Ac}
48 h	99,75 ± 0,71 ^{Aa}	111,29 ± 0,72 ^{Ab}	112,00 ± 1,1 ^{Ab}	114,00 ± 1,00 ^{Ac}
72 h	102 ± 1,00 ^{Aa}	109,00 ± 1,07 ^{Ab}	113,23 ± 0,70 ^{Ac}	115,06 ± 0,45 ^{Bd}

*A tabela expressa após a irradiação por LED, nas potências de 50mW (G50), 75 mW (G75) e 100 mW (G100), durante cinco segundos. Grupo controle (GC), não sofreu irradiação.

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.

6.3 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 experimentais apresentaram médias superiores, havendo diferença significativa entre G50 e os demais grupos (G75 e G100). 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*

Produção de colágeno (%)				
Período	GC	G50	G75	G100
24 h	100,00 \pm 1,05 ^{Aa}	160,00 \pm 1,91 ^{Ab}	169,00 \pm 1,40 ^{Ac}	179,00 \pm 2,51 ^{Ac}
48 h	105,75 \pm 0,41 ^{Aa}	161,98 \pm 1,80 ^{Ab}	172,00 \pm 1,18 ^{Ac}	178,00 \pm 1,00 ^{Ac}
72 h	110,09 \pm 1,00 ^{Ba}	165,00 \pm 1,00 ^{Ab}	171,00 \pm 1,90 ^{Ac}	179,06 \pm 1,45 ^{Ac}

*A tabela expressa em porcentagem, após a irradiação por LED, nas potências de 50mW (G50), 75 mW (G75) e 100 mW (G100), durante cinco segundos. Grupo controle não sofreu irradiação.

Valores apresentados em média \pm desvio padrão.

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

7 DISCUSSÃO

A utilização dos Diodos Emissores de Luz (LEDs) vem sendo introduzidas em diversas áreas da saúde. É válido observar que as diferenças do *laser* com relação ao LED principalmente quanto ao custo menor, tem fortalecido os experimentos com este dispositivo, mas com base discreta do uso da radiação eletromagnética não coerente na literatura (PARISER, 2008). Os efeitos da fotobiomodulação não coerentes dos LEDs, por exemplo nas mitocôndrias, têm sido investigados (KARU, 1999). Outros autores, por

sua vez, estudam os mecanismos da radiação na reparação tecidual (AL-WATBAN *et al.*, 2003; AGNOL, 2009), ou justificam o uso devido a produção de colágeno e fibroblastos (PEREIRA *et al.*, 2002; REDDY, 2003).

SAMPAIO *et al.* (2013) 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. 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.

Segundo 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 danos dos fibroblastos em questão.

No entanto, em relação aos parâmetros de irradiação testados é possível considerar escassez quanto aos protocolos *in vitro* de potências, tempo, metodologias e doses de energia ideais para estímulo da cultura celular. É importante a padronização de informações adequadas dos estudos *in vitro*, pois estes determinam as características da resposta celulares com a interação das doses e fontes de luz utilizadas (HARRY *et al.*, 2001).

Antes de dar início a qualquer prática com o uso da luz LED é preciso estabelecer os parâmetros de algumas variáveis, sejam elas: área, tempo, potência média e densidade de energia (TOYOHAMA *et al.*, 2003).

Na literatura os valores de potência média recomendados para estimular células de cultura em baixa intensidade variam de 1 a 500 mW, nas doses de até 50 J/cm² (ALGHAMDI *et al.*, 2011). São encontrados estudos com distinções dos valores de irradiância entre 0,5 mW/cm² a 140 mW/cm² (VINCK *et al.*; 2005; AIHARA *et al.*, 2006; GRITSCH, 2008). Quanto as densidades de energia do LED para a fotobiomodulação apresentaram uma variação de 0,093 J/cm² a 162 J/cm² (AIHARA *et al.*, 2006; TAOUFIK *et al.*, 2008).

Por esse motivo, nesta pesquisa foi utilizado o LED vermelho 630 nm, área de 9,6 cm², em triplicata, durante 5 segundos com três potências diferentes para comparação em 50 mW, 75 mW e 100 mW, respectivamente com densidade de energia em 0,26 J/cm², 0,39 J/cm² e 0,52 J/cm² calculados a partir das fórmulas de dosimetria do LED

(MOREIRA, 2009). Desta forma, as irradiâncias empregadas estão dentro dos intervalos dos parâmetros avaliados na literatura.

O equipamento mostrou-se de fácil manuseio, portátil e adaptável para aplicação do LED em diversas situações e com a necessidade de pouco espaço. Além disso, o equipamento possui a função de verificação da potência emitida, que pode ser conferida anteriormente às sessões de irradiação, utilizando-se um de seus acessórios acoplados a um receptor de emissão e garantindo a quantidade e intensidade luz planejada.

É necessário ressaltar que o uso experimental ou clínica do LED é plausível, uma vez que cumpre os requisitos de portabilidade, segurança e manuseio. A seleção dos parâmetros também se mostrou adequada, mesmo que não haja na literatura parâmetros definidos em consenso pela experimentação por outros pesquisadores. Neste quesito, pode-se afirmar a positividade destes parâmetros pelos resultados que demonstraram não haver citotoxicidade, bem como otimizou a produção de óxido nítrico e colágeno pelos fibroblastos cultivados.

As pesquisas com métodos *in vitro* determinam respostas positivas quanto a rapidez, por reprodução e limitação do número de variáveis, além da acessibilidade financeira em relação aos experimentos *in vivo* (ROGERO, 2003).

Os testes *in vitro* são fundamentais para detectar a toxicidade de materiais e equipamentos para uso de aplicação clínica sem gerar lesões no organismo e nem reações adversas, além de evitar gastos desnecessários e diminuir a utilização do modelo animal. São mais controlados e, por esse motivo, possuem maior reprodutibilidade. O cultivo das células *in vitro*, é uma valiosa ferramenta para reconhecer mecanismos pelos quais os biomateriais, a terapia de luz e outros instrumentos de estudo, podem produzir reações adversas nas células, levando a possibilidade de morte celular. Normalmente se avalia a citotoxicidade basal, aquela que afeta a morfologia e a função de todas as células do organismo. Alterações das funções basais geralmente alteram as funções específicas (PALMA *et al.*, 2008).

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 reepitelização, 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 terapia com radiação é amplamente utilizada em diferentes tipos de culturas celulares como recurso biomodulatórios, 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).

Neste estudo foram utilizados os testes *in vitro* com fibroblastos L929 para controle dos fatores experimentais e das suas variáveis. Outros autores também escolheram como modelo experimental essa linhagem celular para verificar a viabilidade.

Embora as condições experimentais apresentem características distintas de algumas pesquisas, nossos resultados concordam com estudos anteriores que utilizaram o MTT em fibroblastos L929. Os ensaios de citotoxicidade possibilitam analisar os procedimentos e reações em nível celular ou os resultados de substâncias por ambiente controlado (GOMES-FILHO, 2009).

GOMES-FILHO (2011) investigou a viabilidade fibroblástica L929 pelo ensaio MTT devido as vantagens de rapidez, precisão, simplicidade e não exigir radioisótopos para o seu experimento. As análises estatísticas do MTT, não mostraram diferenças significativas estatística ($p < 0,05$) entre o material experimental e o grupo controle. No entanto, o autor relata que em intervalos maiores poderiam diferir os resultados, pois a citotoxicidade pode ser alterada de acordo com o tempo.

OSORIO (1998) afere os efeitos citotóxicos de materiais endodônticos pelo ensaio MTT em inserções de cultura de fibroblastos L929. Já Torabinejad 1995, utiliza células de fibroblasto L929 para testar a citotoxicidade por ensaio MTT em materiais de preenchimento de raízes dentárias.

No estudo de Maia 2014 foi avaliado a citotoxicidade *in vitro* com LED azul nos tempos de 6, 24 e 48 h em linhagem de fibroblastos L929 através do método colorimétrico MTT, a fotobiomodulação não foi citotóxica e resultou em viabilidade fibroblástica.

A aplicação do LED vermelho 630nm, com potências variando em 50 mW, 75 mW e 100 mW, durante cinco segundos, não foram letais para os fibroblastos da linhagem

L929, conforme demonstrado pelos ensaios de citotoxicidade pelo método MTT. Outros autores observaram efeitos semelhantes da luz de LED vermelho sobre fibroblastos, demonstrando que variações da potência não foram citotóxicas nos cultivos celulares e estimularam a proliferação (SONNEWEND, 2009; FERREIRA *et al.*, 2013).

Descrito por Rogero, 2000; Cruz *et al.*, 1987 que os testes *in vitro* são fundamentais para detectar a toxicidade de materiais e equipamentos para uso de aplicação clínica sem gerar lesões no organismo e nem reações adversas. Só depois de comprovado os efeitos benéficos e adequados que o estudo pode dar continuidade. Os testes de citotoxicidade condiz em expor o material em contato direto ou indireto com a cultura de células para verificar as respostas celulares, dentre elas, a inibição da formação de colônias ou adesão dos corantes vitais, para isto, é necessário diferenciar entre as células viáveis, danificadas ou não viáveis, através da intensidade de cor da cultura celular.

Neste estudo foi utilizado como mediador na resposta celular o óxido nítrico, no qual, é capaz de produzir a proliferação dos fibroblastos (DAGHIGH, 2002). A quantificação de óxido nítrico foi determinada através do acúmulo de nitrito no sobrenadante com meio da reação de diazotação pelo reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982; BRYAN & GRISHAM, 2007).

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 e 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).

Na atividade metabólica dos fibroblastos submetidos à ledterapia, nas diferentes potências e tempo fixo de cinco segundos, observou-se que houve diferença significativa na produção de óxido nítrico em G100, em relação a G50, G75 e ao grupo controle. Segundo BAE *et al.*, 2014, a produção de NO por fibroblastos é importante durante os estágios do processo inflamatório, da cicatrização e remodelação tecidual após a ocorrência de lesões teciduais. Um dos estudos que reafirmam a participação do NO no processo de remodelação, verificou que a produção de NO por fibroblastos derivados de tecido cicatricial é reduzida em relação à produção de fibroblastos constituintes do tecido conjuntivo (WANG *et al.*, 1997).

Relatados na literatura a avaliação dos cultivos de fibroblastos obtidos a partir de feridas produzidas por inserção de esponjas no subcutâneo de ratos, demonstrando que as células na primeira passagem *in vitro* produziram NO de forma espontânea, mas essa capacidade foi marcadamente diminuída em passagens subsequentes, reafirmando o papel do NO no controle da produção da matriz extracelular do tecido conjuntivo (SCHAFER, 1997). Chung *et al.*, 2011; Pansani, 2015, observam em seus experimentos na produção pelos fibroblastos expostos ao TNF- α , o aumento significativo na produção de NO, o que representa relação a resposta inflamatória.

Neste aspecto, os resultados obtidos demonstram que a estimulação dos fibroblastos com LED vermelho, nas potências selecionadas tendem a estimular a produção de NO pelos próprios fibroblastos, indicando interferência metabólica nestas células.

Além do ensaio da redução de MTT, a concentração de colágeno sintetizada pelos fibroblastos foi avaliada através do método Sirius Red que fundamenta na ligação do corante Direct Red (Sigma-Aldrich) em ácido pícrico que satura as fibras colágenas para quantificar o colágeno total existente na amostra (TULLBERG-REINERT & JUNDT, 1999).

A ação do óxido nítrico nos fibroblastos também está relacionada com a produção de colágeno. Witte *et al.*, 2000 demonstrou que a presença de óxido nítrico otimizou a produção de colágeno pelos fibroblastos, atribuindo o seu efeito na pós-tradução do colágeno. Por outro lado, outros pesquisadores demonstraram que o excesso de óxido nítrico proporciona a redução da produção de colágeno (PARK *et al.*, 2013). Assim, a estimulação de fibroblastos por LED vermelho 630 nm em diferentes

potências, demonstrou que há maior produção de óxido nítrico com relação direta com a potência utilizada.

Estudos da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia, relatam maior degradação de fibras colágenas e menos células inflamatórias na área de lesão depois da fotobiomodulação, que condiz a uma opção terapêutica para acelerar a cicatrização por ser bioestimuladora para o reparo tecidual, aumentando a circulação local e proliferação. Segundo pesquisas, esse tipo de terapia exerce efeito cicatricial por meio da síntese de colágeno, número de fibroblastos, aumento da atividade mitótica e neovascularização (SMITH, 2005; DE CASTRO CARVALHO, 2010).

Portanto, verificou-se neste experimento a produção de colágeno, cujos resultados demonstraram haver diferença significativa entre os grupos irradiados e o grupo controle. E, apesar de não haver diferença significativa entre G50 e G75, G100 apresentou diferença significativa com maior produção, sugerindo que há relação diretamente proporcional entre as potências utilizadas e a produção de colágeno. Somado a isto, G100, apresentou diferença significativa na produção de óxido nítrico, reforçando que pode haver relação com o nível de NO e produção de colágeno. Resultados semelhantes sobre a produção de colágeno *in vitro* foram relatados em trabalho com irradiação por LED vermelho em fibroblastos gengivais humanos. Os autores descreveram que houve maior produção de colágeno nas células irradiadas em relação ao grupo controle não irradiado (PARK e HONG, 2015).

A emissão de luz LED vermelha para estímulo da produção de colágeno tem sido verificada por alguns autores, porém não há consenso dos parâmetros ideais como potência, comprimento de onda e tempo para que haja otimização da produção sem comprometer o metabolismo e vitalidade celular. Além disso, tem sido demonstrado que há possibilidade de a luz vermelha inibir a produção de colágeno, útil para as alterações da cicatrização como a formação de queloides. É necessário distinguir qual o limite de usos de parâmetros para a aplicação da fototerapia, uma vez que efeitos antagônicos são possíveis (MAMALIS *et al.*, 2016).

A fotoestimulação com LED é indicada para a cicatrização tecidual com fortes evidências de atuar também, na atenuação do processo inflamatório. Diversos fatores podem influenciar, como a potência, comprimento de onda e tempo de exposição, porém, 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 e WALT, 2013). Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho corroboram na demonstração de que a emissão da luz LED vermelha, nas potências utilizadas interferiu no metabolismo celular, mas não de forma a ocasionar danos severos que culminam na morte das células.

8 CONCLUSÕES

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 cinco segundos, não ocasionou morte celular, estimulou a produção de óxido nítrico em 15% e do colágeno em 80% 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNE, Jones Eduardo. **Eu sei eletroterapia**. Santa Maria: Pallotti, 2011.

AGNOL, Mauro Antônio Dall; NICOLAU, Renata Amadei; LIMA, Carlos José; MUNIN, Egberto. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 6, p. 909-916, 2009.

AIHARA, Norihito; YAMAGUCHI, Masaru; KASAI, Kazutaka. Low-energy irradiation stimulates formation of osteoclast-like cells via RANK expression in vitro. **Lasers in medical science**, v. 21, n. 1, p. 24-33, 2006.

ALBUQUERQUE, Alexsandra G. et al. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21-30, 2010.

ALGHAMDI, Khalid M.; KUMAR, Ashok; MOUSSA, Noura A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers in medical science**, v. 27, n. 1, p. 237-249, 2012.

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

ALMEIDA, Taís Corrêa. **Avaliação da interferência de fatores pré-analíticos na mensuração dos metabólitos do óxido nítrico e determinação dos intervalos de referência para uma população saudável**. Dissertação (Mestrado). Santa Maria, 2014.

AL-WATBAN, Farouk AH; ANDRES, Bernard L. Polychromatic LED therapy in burn healing of non-diabetic and diabetic rats. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 21, n. 5, p. 249-258, 2003.

ANDERS, Juanita J.; LANZAFAME, Raymond J.; ARANY, Praveen R. **Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy**. 2015.

BAGNATO, V. S; CORAZZA, A. V.; CORAZZA, L.F.G.; JORGE, J. **Fotobioestimulação comparativa do LASER e LEDs de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos**. In: X Congresso Brasileiro de Física Médica, 2005, Salvador, 2005.

BAE, Hyemi; LEE, Hong Jun; KIM, Kwangjun; KIM, Jung-Há; KIM, Taeho; KO, Jae-Hong; BANG, Hyoweon; LIM, Inja. The stimulating effects of nitric oxide on intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human dermal fibroblasts

through PKG pathways but not the PKA pathways. **The Chinese journal of physiology**, v. 57, n. 3, p. 137-151, 2014.

BAROLET, Daniel; ROBERGE, Charles J.; AUGER, François A.; BOUCHER, Annie; GERMAIN, Lucie. Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 12, p. 2751-2759, 2009.

BARROS, Suelen Aline de Lima. **Efeitos do recobrimento da zircônia por um biovidro**: caracterização da superfície e avaliação de propriedades biológicas. Dissertação (Mestrado). Araraquara: [s.n.], 2017.

BASSO, Fernanda G. et al. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Lasers in medical science**, v. 28, n. 2, p. 367-374, 2013.

BERNITZ, Franz; SCHALLMOSER, Oskar; SOWA, Wolfram. Advanced electronic driver for power LEDs with integrated colour management. In: **Industry Applications Conference, 2006. 41st IAS Annual Meeting. Conference Record of the 2006 IEEE**. IEEE, 2006. p. 2604-2607.

BLUMENKRANTZ, Nelly; ASBOE-HANSEN, Gustav. An assay for hydroxyproline and proline on one sample and a simplified method for hydroxyproline. **Analytical biochemistry**, v. 63, n. 2, p. 331-340, 1975.

BOURGUIGNON-FILHO, Aguimar de Matos et al. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. **Rev Port Estomatol Cir Maxilofac**, v. 46, n. 1, p. 37-43, 2005.

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

BRYAN, Nathan S.; GRISHAM, Matthew B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 5, p. 645-657, 2007.

BUCHHOLZ, Julia; WALT, Heinrich. Veterinary photodynamic therapy: a review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 10, n. 4, p. 342-347, 2013.

CALMON, W. J. **Verificação in vitro das temperaturas intra pulpares geradas pelo clhmento 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.

CAMELO, Flaviana Pires. **Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CATÃO, Maria Helena. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. **Rev. bras. patol. oral**, v. 3, n. 4, p. 214-218, 2004.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Nitric oxide. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

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.

CHUNG, Hoon; DAI, Tianhong; SHARMA, Sulbka. K.; HUANG, Ying-Ying; CARROLL, James D.; HAMBLIN, Michael R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of biomedical engineering**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.

COELHO, Maria Cristina de Oliveira Cardoso et al. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea Sugar cane biopolymer in cutaneous healing. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. unknown, p. 11-13, 2002.

CORAZZA, Adalberto Vieira; JORGE, Jacks; KURACHI, Cristina; BAGNATO, Vanderlei Salvador. Photobiomodulation on the angiogenesis of skin wounds in rats using different light sources. **Photomedicine and laser surgery**, v. 25, n. 2, p. 102-106, 2007.

CRUZ, Aurea Silveira et al. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 51-7, 1987.

DAGHIGH, Farzaneh et al. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. **Journal of periodontology**, v. 73, n. 4, p. 392-400, 2002.

DE CASTRO CARVALHO, Kelsyanne et al. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. **Conscientiae saúde**, v. 9, n. 2, 2010.

DE OLIVEIRA, Priscila Daniele. Terapia ultrassônica de baixa intensidade em cultura celular de fibroblastos. Londrina: Unopar, 2014.

DO AMARAL, Jônatas Bussador; MACHADO-SANTELLI, Gláucia Maria. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, 2011.

DOGRA, Sunil; KANWAR, Amrinder Jit. Narrow band UVB phototherapy in dermatology. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 70, n. 4, p. 205, 2004.

DOVER, Jeffrey S.; PHILLIPS, Tania J.; ARNDT, Kenneth A. Cutaneous effects and therapeutic uses of heat with emphasis on infrared radiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 278-286, 1989.

DUARTE, Ida; BUENSE, Roberta; KOBATA, Clarice. Photohterapy. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 81, n. 1, p. 74-82, 2006.

EL SAYED, Salah O.; DYSON, Mary. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Lasers in surgery and medicine**, v. 10, n. 6, p. 559-568, 1990.

FAILACHE, H. Geido D. **Fuente de fototerapia em base a LEDs. Facultades de Ingeniería y Medicina Universidad de la República O. del Uruguay. Montevideo**, 2006.

FANG, Ye; EGLIN, Richard 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, MHG; PESSOA, C. O.; MORAES FILHO, M. O. Avaliação da citotoxicidade in vitro e da toxicidade aguda in vivo de extratos da *Phyllanthus amarus*. **Pesquisa Médica**. 2004;2(7):26-29.

FERREIRA, Cláudia Luísa Ribeiro; NICOLAU, Renata Amadei; OLIVEIRA, Marco Antonio; COSTA, Davidson Ribeiro; JÚNIOR, Antonio 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.

_____. Ian. Cryopreservation. **Culture of Animal Cells**, 2010.

GENOVESE, Walter João. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. In: **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. 2000.

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p. 264-265, 1952.

GOMES-FILHO, João Eduardo et al. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast Viability and cytokine production. **Journal of endodontics**, v. 35, n. 11, 2009.

GOMES-FILHO, João Eduardo et al. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 4, p. 329-336, 2011.

GONÇALVES, Aline do Carmo. **Avaliação do efeito do laser terapêutico de 660nm na Leishmaniose Tegumentar experimental: expressão de citocinas e perfil funcional de macrófagos.** 93 páginas. Dissertação de Mestrado. UFG – Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRITSCH, Kerstin et al. Biological behaviour of buccal cells exposed to blue light. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 5-6, p. 805-810, 2008.

HAEKKINEN, L. A. R. I.; UITTO, VELI-JUKKA; LARJAVA, Hannu. Cell biology of gingival wound healing. **Periodontology** **2000**, v. 24, n. 1, p. 127-152, 2000.

HARRIS, Albert K.; WILD, Patricia; STOPAK, David. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. **Science**, v. 208, n. 4440, p. 177-179, 1980.

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

JOZSA, L.; KANNUS, P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 7, n. 2, p. 113-118, 1997.

JUNQUEIRA, L. C. U.; COSSERMELLI, W. and; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Archivum histologicum japonicum**, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica: texto e atlas.** 12ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARU, Tiina. Laser biostimulation: a photobiological phenomenon. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 3, n. 4, p. 638, 1989.

KESAVA REDDY, G. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. **Lasers in surgery and medicine**, v. 33, n. 5, p. 344-351, 2003.

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

KIM, Myung-Sun; CHO, Yong-Ick; KOOK, Min-Suk; JUNG, Sang-Chul; HWANG, Young-Hyun; KIM, Byung-Hoon. Effect of 660 nm light-emitting diode on the wound healing in fibroblast-like cell lines. **International Journal of Photoenergy**, v. 2015, 2015.

KREISLER, Matthias et al. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of clinical periodontology**, v. 30, n. 4, p. 353-358, 2003.

KULEKCIOGLU, Sevinc et al. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 114-118, 2003.

LAUREANO, André; RODRIGUES, Ana Maria. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, p. 355-367, 2011.

LIMA, Gustavo Danilo Nascimento. **Efeito da fotobiomodulação a laser sobre a viabilidade de fibroblastos expostos a medicamentos endodônticos**. 41 páginas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. Aracajú, 2015.

LIMA-NETO, J. F. et al. Viability and cell cycle analysis of equine fibroblasts cultured in vitro. **Cell and tissue banking**, v. 11, n. 3, p. 261-268, 2010.

LINS, R. D. A. U. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 6, p. 849-55, 2010.

LUMILEDS LIGHTING, LLC. Disponível em: <<http://www.lumileds.com>>. Acesso em: 15 fev. 2018.

MAIA, Nayara Kívilla do Carmo. Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à Terapia Fotodinâmica: estudo in vitro da citotoxicidade em fibroblastos L-929. 2014.

MAMALIS, Andrew; KOO, Eugene; GARCHA, Manveer; MURPHY, William J.; ISSEROFF, R. Rivkah; JAGDEO, Jared. 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.

MAMALIS, Andrew; SIEGEL, Daniel; JAGDEO, Jared. Visible Red Light Emitting Diode Photobiomodulation for Skin Fibrosis: Key Molecular Pathways. **Current dermatology reports**, v. 5, n. 2, p. 121-128, 2016.

MATOS, Felipe de Souza. **Efeito da fotobiomodulação a laser de $\lambda 808$ nm E $\lambda 660$ nm no processo de reparo periodontal de dentes reimplantados em ratos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. Aracajú, 2016.

MAXWELL, Linda. Therapeutic ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammation and repair. **Physiotherapy**, v. 78, n. 6, p. 421-426, 1992.

MENEZES, Priscila Fernanda Campos de. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com Laser**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MEYER, Patrícia Froes et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v. 11, n. 6, p. 428-432, 2010.

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.

MOREIRA, Mauro Ceretta et al. **Utilização de conversores eletrônicos que alimentam LEDs de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

MORENO, Ivan; SUN, Ching-Cherng. Modeling the radiation pattern of LEDs. **Optics express**, v. 16, n. 3, p. 1808-1819, 2008.

MORISCOT, Anselmo Segari; CARNEIRO, José; ABRAHAMSOHN, Paulo Alexandre. Histologia para Fisioterapia e outras áreas da Reabilitação. In: **Histologia para fisioterapia e outras áreas da reabilitação**. 2004.

MORTIMER, A. J.; DYSON, M. The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. **Ultrasound in medicine and Biology**, v. 14, n. 6, p. 499-506, 1988.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUTHU, Subramanian; SCHUURMANS, Frank J.; PASHLEY, Michael D. Red, green, and blue LED based white light generation: issues and control. In: **Industry Applications Conference, 2002. 37th IAS Annual Meeting. Conference Record of the. IEEE**, 2002. p. 327-333.

NIELS Ryberg Finsen – Biographical. [www.Nobelprize.org](http://www.Nobelprize.org/Nobel/Media/AB/2014/Disponible%20em%20http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/finsen-bio.html/>) Nobel Media AB 2014. Disponível em<
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/finsen-bio.html/>. Acesso em março, 2018.

OBAYASHI, Kei 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.

OSORIO, Rosa María et al. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 2, p. 91-96, 1998.

PALMA, M. B. S.; CORAT, E. J.; SOARES, C. P.; Avaliação da citotoxicidade *in vitro* de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCTN). Relatório Final de Projeto de Iniciação Científica (PIBIC/CqPQ/ INPE), 2008.

PANSANI, Taisa Nogueira. **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**. Araraquara: UNESP, 2015.

PARISER, David et al. Topical methyl-aminolevulinate photodynamic therapy using red light-emitting diode light for treatment of multiple actinic keratoses: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 59, n. 4, p. 569-576, 2008.

PARK, Jong-Tae; HONG, Ki Seok. 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.

PARK, Julie E.; ABRAMS, Morton J.; EFRON, David T.; BARBUL, Adrian. Excessive nitric oxide impairs wound collagen accumulation. **Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 487-492, 2013.

PEREIRA, G. F. M. Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2002.

PIRES-OLIVEIRA, Deise A.; OLIVEIRA, R. F.; MACHADO, A. H.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO-SOARES, C. Laser biomodulation on L 929 cell culture. **Photomedicine and laser surgery**, v. 28, n. 2, p. 167-171, 2010.

PÖNTINEN, P. J.; AALTOKALLIO, Tommi; KOLARI, Pertti J. Comparative effects of exposure to different light sources (He-Ne laser, InGaAl diode laser, a specific type of noncoherent LED) on skin blood flow for the head. **Acupuncture & electrotherapeutics research**, v. 21, n. 2, p. 105-118, 1996.

POSTEN, William et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic surgery**, v. 31, n. 3, p. 334-340, 2005.

PUCHTLER, Holde; SWEAT, Faye. Histochemical specificity of staining methods for connective tissue fibers: Resorcin-fuchsin and Van Gieson's picro-fuchsin. **Histochemie**, v. 4, n. 1, p. 24-34, 1964.

REED, B. V. Wound healing and the use of thermal agents. **Contemporary perspectives in rehabilitation**, v. 1, p. 3-29, 1995.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RITTER, Clarice Gabardo et al. Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico e luz de diodos em ceratoses actínicas. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 639-45, 2010.

ROBBINS, Stanley L. et al. Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional. In: **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 2001.

ROELANDTS, Rik. The history of phototherapy: something new under the sun. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, n. 6, p. 926-930, 2002.

ROGERO, Sizue Ota et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

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

SALVEMINI, Daniela 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.

SAMPAIO, Susana CP Oliveira 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 in medical science**, v. 28, n. 3, p. 799-806, 2013.

SCHAFER, 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.

SCHUBERT, E. Fred; GESSMANN, Thomas; KIM, Jong Kyu. **Light emitting diodes**. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

SEHNEM, Dayany Pereira; BENAMOR, Leticia; JESUS, Liliane de Sá; VALENTIM, Rodrigo de Menezes; SOUZA, Erika Thuanne Gonçalves; ZAMBUZZI, Willian Fernando; TAKAMORI, Esther R. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, 2012.

SMITH, Kendric C. Laser (and LED) therapy is phototherapy. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 1, p. 78-80, 2005.

SONNEWEND, Daniel. **Efeito de diferentes densidades de luz não coerentes (LED - 945±20 nm) sobre culturas de fibroblastos (L929)**. Dissertação (Mestrado). São José dos Campos, 2009.

TAOUFIK, K. et al. Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts. **dental materials**, v. 24, n. 7, p. 895-900, 2008.

TORABINEJAD, Mahmoud et al. Cytotoxicity of four root end filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 10, p. 489-492, 1995.

TOYOKAWA, Hideyoshi et al. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. **Experimental biology and medicine**, v. 228, n. 6, p. 724-729, 2003.

TULLBERG-REINERT, Heide; JUNDT, Gernot. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. **Histochemistry and cell biology**, v. 112, n. 4, p. 271-276, 1999.

VINCK, Elke M. et al. Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. **Photomedicine and Laser Therapy**, v. 23, n. 2, p. 167-171, 2005.

VLADIMIROV, Yu A.; OSIPOV, A. N.; KLEBANOV, G. I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.

VOLPATO, Luiz Evaristo Ricci. **Avaliação do uso do laser de baixa intensidade e do light-emitting diode (LED) no comportamento de fibroblastos e na redução da incidência da mucosite bucal em crianças sob tratamento quimioterápico**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

WALSH, Laurence J. The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 1. Soft tissue applications. **Australian dental journal**, v. 42, n. 4, p. 247-254, 1997.

WANG, Jiali; WITTE, Frank; Xi, Tingefe; ZHENG, Yufeng; YANG, Ke; YANG, Yuansheng; ZHAO, Dewei; MENG, Jian; LI, Yangde; LI, Weirong; CHAN, Kaiming. Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. **Acta biomaterialia**, v. 21, p. 237-249, 2015.

WANG, Rijian; GHAHARY, Aziz; SHEN, You J.; SCOTT, Paul G.; TREDGET, Edward. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. **Journal of investigative dermatology**, v. 108, n. 4, p. 438-444, 1997.

WEBB, Cecilia; DYSON, Mary; 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 in surgery and medicine**, v. 22, n. 5, p. 294-301, 1998.

WHELAN, Harry T. et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 19, n. 6, p. 305-314, 2001.

_____. NASA light-emitting diodes for the prevention of oral mucositis in pediatric bone marrow transplant patients. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 20, n. 6, p. 319-324, 2002.

_____. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. **Journal of clinical laser medicine & surgery**, v. 21, n. 2, p. 67-74, 2003.

WITTE, Maria B.; THORNTON, Frank J.; EFRON, David T.; BARBUL, Adrian. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. **Nitric oxide**, v. 4, n. 6, p. 572-582, 2000.

ZACHARY, James F.; MCGAVIN, M. Donald. **Pathologic Basis of Veterinary Disease-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2013.

ZORTÉA JR, Alberto João et al. Protocolo preliminar de cultura de fibroblastos gengivais humanos. **Revista Brasileira de Implantodontia & Prótese sobre Implantes**, v. 12, n. 47/48, 2010.