

INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS  
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DE TECIDO ADIPOSEO  
*IN VITRO* E FIBROBLASTOS DE PACIENTES PORTADORES  
DE ANEMIA FALCIFORME.



**ANA PAULA FERRO**

Orientadora: Profa. Dra. Elaine  
Caldeira de Oliveira Guirro

Co-orientador: Prof. Dr. Jayme  
Adriano Farina Junior

**Doutorado**





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e  
Desempenho Funcional



**Ana Paula Ferro**

INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DE TECIDO ADIPOSEO *IN VITRO* E FIBROBLASTOS DE PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME.

INFLUENCE OF PHOTOBIMODULATION ON MULTIPOTENT MESENCHYMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE *IN VITRO* AND FIBROBLASTS OF PATIENTS WITH SICKLE CELL ANEMIA

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro

**Coorientador:** Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior

Ribeirão Preto - SP

2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação da Faculdade de Medicina  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ferro, Ana Paula

Influência da fotobiomodulação em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo *in vitro* e fibroblastos de pacientes portadores de anemia falciforme. Ribeirão Preto, 2024.

82.p

Orientador: Elaine Caldeira de Oliveira Guirro

Coorientador: Jayme Adriano Farina Junior

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – USP.

1. Fotobiomodulação; Célula tronco mesenquimal; viabilidade celular; cicatrização.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ferro, Ana Paula

**Título:** Influência da fotobiomodulação em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo *in vitro* e fibroblastos de pacientes portadores de anemia falciforme.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional – FMRP/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedicatória*

---

Dedico este trabalho a meus pais, **Maria Regina Bochembuzio Ferro** e **Celso David Ferro**. As minhas irmãs **Maria Clara Bochembuzio Ferro** e **Marcella Bochembuzio Ferro** e a todos que me auxiliaram direta e indiretamente e se fizeram presente nesse momento de minha vida. Dedico também ao **Thiago Menha** por apoiar todas as minhas escolhas.

## *Agradecimientos*

---

## AGRADECIMENTOS

Manifesto meu profundo agradecimento a todos aqueles que, de alguma forma, me apoiaram e permitiram que esta etapa fosse finalizada. Agradeço a **Deus** primeiramente, por ter me dado forças e me mantido no caminho certo durante o doutorado, com saúde e sabedoria para chegar até o final.

À **Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro**, por ter me acolhido e me incentivado a sempre buscar conhecimento, desde a graduação até o Doutorado, e por sempre ser presente durante essa trajetória. Agradeço-lhe ainda pela amizade, confiança e generosidade com que sempre me ajudou, não deixando desanimar nos momentos difíceis.

A todos os Professores que foram presentes e contribuíram para a minha formação, mas em especial ao **Rinaldo Roberto de Jesus Guirro** e **Jayme Adriano Farina Junior**, que fizeram parte do desenvolvimento do projeto e me auxiliaram para a conclusão do mesmo.

À minha **família**, que sempre me educaram e foram meu alicerce, estando presente nos momentos felizes e nos momentos mais difíceis da minha vida, me motivando e que nunca me deixaram desistir. Quero agradecer também o incentivo constante dos meus pais, **Celso David Ferro** e **Maria Regina Bochembuzio Ferro** e minhas irmãs, **Maria Clara Bochembuzio Ferro** e **Marcella Bochembuzio Ferro**, por cada batalha que vocês lutaram por mim e comigo, e por serem o que há de mais importante nessa vida. Sem vocês nada seria possível.

Ao **Thiago L. P. Menha**, por ser meu porto seguro e estar comigo durante todo esse tempo, mesmo que muitas vezes a distância, nunca deixou de apoiar e incentivar meu



sucesso pessoal e profissional. Agradeço também a sua família, **Natália Menha Dário, Daniel Dário, Deonice Menha, Mauro Menha, Manuela Dário e Francisco Dário**, por sempre estarem presentes.

Aos colegas de laboratório, que mais do que colegas, se tornaram grandes amigas, **Carolina Mestriner, Catarina Zordão, Raquel Guerero, Flávia Rangon**, que se tornaram pessoas essenciais durante esse período e certamente vou querer levá-los comigo a diante. Obrigada por cada debate enriquecedor, trocas de experiência, pelos momentos de desabafos, críticas e suporte para chegar até aqui.

As minhas amigas e familiares, **Marcela Tozzo, Victória Alicia, Julia Lopes, Natália Barboza, Lais Sestari, Isabela Lima, Monaliza Spossar, Ana Clara Rampazzo, Thais Gamba, Heloisa Botura**, amigos de longa data, que são essenciais para suportarmos as dificuldades da vida com mais leveza. Mesmo com a correria do dia-a-dia e com toda a adversidade para estarmos sempre juntos, se mantem presente na minha vida.

À equipe do Laboratório de Terapia Celular, em especial a **Maristela Delgado Orellana, Sâmia Rigotto, Taísa Risque Fernandes, Rosane Bolzoni e Camila**, além de todos os colegas do Hemocentro, por me acolherem tão bem e acima de tudo, pela paciência e dedicação de me ensinarem e me auxiliarem nas coletas dos dados.

Ao **Professor Jonathan Celli, Sally KyeiMensah, Kevin Menjivar, Yi Ran Liu e Sergio Farias** por me recepcionarem, me ensinarem e fazer me sentir em casa na University of Massachusetts, Boston, durante o período da bolsa em pesquisa no exterior.

À **Sidney Hanlon, Madeline Stump, Sampurna Chatterjee, Milena Broering** e toda a vizinhança que se tornaram minha família em Boston durante o período de bolsa no exterior, não me deixando sozinha durante os meses que passei longe de casa, fazendo a toda a diferença na experiência vivida nesse momento da minha vida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional** (PPGRDF) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) - Código de Financiamento 001 e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo subsídio financeiro, processo nº2019/09329-1.

Para finalizar, sei que não chegaria a lugar nenhum sozinha e agradeço imensamente a todos, por fazerem parte da minha trajetória.

*"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas gentes. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda."*

Antoine de Saint-Exupéry

## *Resumo*

---

Ferro AP. Influência da fotobiomodulação em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo *in vitro* e fibroblastos de pacientes portadores de anemia falciforme. 2023. Programa de Pós-Graduação em Reabilitação e Desempenho Funcional. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Feridas cutâneas em membros inferiores podem surgir como complicações relacionadas a anemia falciforme. Células-tronco indiferenciadas podem se diferenciar em vários tipos de células para reparar tecidos lesados. A fotobiomodulação pode promover a proliferação e diferenciação de células estaminais. O objetivo do estudo é investigar o efeito de diferentes parâmetros de fotobiomodulação com Laser e LED em células-tronco mesenquimais (CTMs), multipotentes derivadas do tecido adiposo e fibroblastos de indivíduos com anemia falciforme, sobre a proliferação e as possíveis alterações morfológicas nucleares em células tronco mesenquimais. Métodos: Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram submetidas a aplicações de Laser de baixa intensidade (660 nm e 830 nm; com doses de 0,5 J, 2 J e 4 J, potências de 40 mW e 100 mW) e LED (630 nm e 850 nm, com frequência variável de 0 a 1500 Hz e doses de 0,5 J, 2 J e 4 J). Após a irradiação, as células foram analisadas em 24, 48 e 72 horas com marcação de Hoechst (células viáveis) e Iodeto de Propídio (células mortas), para análise da taxa de proliferação, morte e viabilidade celular. O ensaio de cicatrização de ferida foi realizado por meio de um arranhão na camada celular com uma pipeta de 1000 µL e a análise foi realizada com o microscópio confocal e mesa motorizada (LSM 710<sup>®</sup>, Zeiss, Alemanha). Ambos os comprimentos de onda do laser e do LED foram efetivos para a proliferação celular, no entanto a viabilidade celular com o laser nas primeiras 48 horas após a irradiação, o comprimento de onda de 660 nm e potência de 100 mW mostrou resultados significativos, e com o avançar do tempo, em 72 horas, o laser de 830 nm teve aumento significativamente maior, que o laser de 660 nm. Com o LED apenas o comprimento de onda de 630 nm teve diferença significativa. Em relação ao ensaio de cicatrização, houve redução significativa dos parâmetros utilizados comparado com o grupo controle. Conclui-se que diferentes parâmetros físicos da FBM, possui respostas biológicas que interferem na taxa de proliferação, morte e consequentemente na viabilidade celular.

**Palavras-Chave:** Fotobiomodulação; Célula tronco mesenquimal; viabilidade celular; cicatrização.

# *Abstract*

---

Ferro AP. Influence of photobiomodulation on multipotent mesenchymal cells of adipose tissue in vitro and fibroblasts of patients with sickle cell anemia 2023. Postgraduate Program in Rehabilitation and Functional Performance. University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto.

Skin wounds on the lower limbs can arise as complications related to sickle cell anemia. Undifferentiated stem cells can differentiate into various cell types to repair injured tissue. Photobiomodulation can promote the proliferation and differentiation of stem cells. The objective of the study is to investigate the effect of different laser and LED photobiomodulation parameters on multipotent mesenchymal stem cells (MSCs), derived from adipose tissue and fibroblasts from individuals with sickle cell anemia, on proliferation and possible nuclear morphological changes in cells mesenchymal trunk. Methods: Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were subjected to low-intensity laser applications (660 nm and 830 nm; with doses of 0.5 J, 2 J and 4 J, powers of 40 mW and 100 mW) and LED (630 nm and 850 nm, with variable frequency from 0 to 1500 Hz and doses of 0.5 J, 2 J and 4 J). After irradiation, the cells were analyzed at 24, 48 and 72 hours with Hoechst staining (viable cells) and Propidium Iodide (dead cells), to analyze the rate of proliferation, death and cell viability. The wound healing assay was performed by scratching the cell layer with a 1000  $\mu$ L pipette and the analysis was carried out using a confocal microscope and motorized table (LSM 710<sup>®</sup>, Zeiss, Germany). Both laser and LED wavelengths were effective for cell proliferation, however cell viability with the laser in the first 48 hours after irradiation, the wavelength of 660 nm and power of 100 mW showed significant results, and As time progressed, in 72 hours, the 830 nm laser had a significantly greater increase than the 660 nm laser. With LED, only the 630 nm wavelength had a significant difference. Regarding the healing test, there was a significant reduction in the parameters used compared to the control group. It is concluded that different physical parameters of FBM have biological responses that interfere with the rate of proliferation, death and consequently cell viability.

**Keywords:** Photobiomodulation; Mesenchymal stem cell; cell viability; healing.

## *Lista de sigla e abreviações*

---



## LISTA DE SIGLA E ABREVIACOES

% - Porcentagem

$\alpha$ MEM - Meio mínimo essencial

°C - graus Celsius

AF - Anemia Falciforme

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina Trifosfato

CAPES – Coordenao de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCO - Citocromo c oxidase

cm<sup>2</sup> – Centímetros quadrados

CTMs - Células-tronco mesenquimais

CTM-TA - Células Tronco Mesenquimais do tecido adiposo

DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco

DP – Desvio padrão

EVA - Acetato-vinilo de etileno

FAPESP – Fundao de Amparo  pesquisa do Estado de São Paulo

FBM – Fotobiomodulao

G1- Grupo 660 nm, 100 mW, 0.5 J

G2- Grupo 660 nm, 100 mW, 2 J

G3- Grupo 660 nm, 100 mW, 4 J

G4- Grupo 660 nm, 40 mW, 0.5 J

G5- Grupo 660 nm, 40 mW, 2 J

G6- Grupo 660 nm, 40 mW, 4 J

G7- Grupo 830 nm, 100 mW, 0.5 J

G8- Grupo 830 nm, 100 mW, 2 J

G9- Grupo 830 nm, 100 mW, 4 J

G10- Grupo 830 nm, 40 mW, 0.5 J

G11- Grupo 830 nm, 40 mW, 2 J

G12- Grupo 830 nm, 40 mW, 4 J

G13- Grupo controle.

h - Hora

IMC - Índice de massa corporal

J – Joules

J/cm<sup>2</sup> - Joules por centímetros quadrados

Laser – *Light Amplification by Stimulated of Radiation* ou Luz Amplificada por Emissão Estimulada de Radiação

LED – *Light-Emitting Diode* ou Diodo emissor de luz

MEC - Matriz Extracelular

mL - Mililitro

mW - Miliwatts

mW/cm<sup>2</sup> - Miliwatts por centímetros quadrados

nm – Nanômetro

NO - Óxido nítrico

P – potência

p – P-valor

PI - Iodeto de Propídio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute Medium

SFB - Soro fetal bovino

TA- Tecido adiposo

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

$\mu\text{L}$  - Microlitro

## *Lista de figuras*

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fases do reparo tecidual e suas principais respostas ao longo do tempo de reparação de ferida.....31
- Figura 2 -** Atuação de diferentes células durante o processo de cicatrização. Macrófagos e neutrófilos são predominantes durante a inflamação. Na fase proliferativa há um aumento na vascularização do tecido e os miofibroblastos e fibroblastos são predominantes durante a fase de remodelação. Fonte: Wilkinson e Hardman, 2020) .....32
- Figura 3 –** Garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> para cultura e armazenamento das Células tronco mesenquimais e fibroblastos de anemia falciforme em meios de cultura, mantidas em estufa com temperatura e umidade controlada. Fonte: Arquivo pessoal.....42
- Figura 4 -** Plaqueamento celular em placas de 24 poços, com poços intercalados, com e sem células, para evitar o espalhamento intencional da luz durante a fotobiomodulação. Fonte: arquivo pessoal.....43
- Figura 5 -** Plataforma de suporte desenvolvido para irradiação a laser, fixada a 3,3 cm de distância do laser até o fundo do poço. Fonte: Arquivo pessoal.....44
- Figura 6 -** Ensaio de cicatrização de ferida, realizado por meio de um arranhão na camada de células tronco mesenquimais de indivíduos sem comorbidades e de fibroblastos de portadores de anemia falciforme. O acompanhamento das imagens foi analisado imediatamente após a aplicação do laser e 24 horas após aplicação do laser, até a aproximação das bordas. Fonte: Arquivo pessoal.....47

**Figura 7-** **A-** Microscópio confocal com mesa motorizada com controle de temperatura.  
**B-** Imagem fotográfica adquirida a cada 20 minutos da camada celular após o Scratch.  
Fonte: Arquivo pessoal.....49

**Figura 8** - A figura A mostra os valores da viabilidade celular no tempo de 24 horas após a irradiação a laser. A figura B e C representam os valores da viabilidade no tempo de 48 e 72 horas respectivamente.....54

**Figura 9** - A Figura A mostra o comportamento da viabilidade celular no tempo de 24 horas após a irradiação. Os tempos e 48 e 72 horas após irradiação são mostradas na figura B e C respectivamente.....57

**Figura 10** - Ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, com arranhão na camada de CTM's. Figura A representa o arranhão logo após a irradiação no tempo 0, seguida da figura B no tempo de 6 hora e a figura C em 24 horas, com aproximação total das bordas.....58

**Figura 11** - Ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, com arranhão na camada de fibroblastos. Figura A representa o arranhão logo após a irradiação, no tempo 0, seguida da figura B no tempo de 24 hora e a figura C em 48 horas, com aproximação total das bordas.....59

## *Lista de tabelas*

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros da fotobiomodulação utilizado para irradiação células tronco mesenquimais com laser vermelho (660 nm) e infravermelho (830 nm).....	45
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros da fotobiomodulação utilizado para irradiação células tronco mesenquimais com LED vermelho (630 nm) e infravermelho (850 nm) .....	46
<b>Tabela 3</b> – Valores referentes a proliferação celular com o laser de comprimento de onda 830 e 660 nm, potência 100 e 40 mW, grupo controle e energia de 0.5 J, 2 J e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.....	52
<b>Tabela 4</b> – Valores referentes a morte celular com o laser de comprimento de onda 830 e 660 nm, potência 100 e 40 mW, grupo controle e energia de 0.5 J, 2 J e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.....	53
<b>Tabela 5</b> – Valores de proliferação celular com o LED de comprimento de onda 850 nm, potência 60 mW, 630 nm e 50 mW, com energia de 0.5, 2 e 4 J, em relação ao tempo 24 h, 48 hr 72 horas.....	55
<b>Tabela 6</b> - Valores referentes a morte celular comparando LED de comprimento de onda 850 nm, potência 60 mW, 630 nm e 50 mW, com energia de 0.5, 2 e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.....	56
<b>Tabela 7</b> – Redução em porcentagem da área da lesão <i>in vitro</i> de CTMs após a irradiação com laser e LED, quando comparado o tempo de 6 hora e 24 horas com o tempo de 0 horas.....	60
<b>Tabela 8</b> – Redução em porcentagem da área da lesão <i>in vitro</i> de fibroblastos de portadores de Anemia Falciforme após a irradiação com laser e LED, quando comparado o tempo de 24 e 48 horas com o tempo de 0 horas.....	61



## SUMÁRIO

1. Introdução.....	27
2. Contextualização.....	30
3. Objetivo.....	37
4. Material e métodos.....	40
4.1 Considerações éticas.....	40
4.2 Coleta da amostra tecidual.....	40
4.3 Cultivo celular de CTM de indivíduos sem comorbidades.....	41
4.4 Cultivo celular de fibroblasto de portadores de anemia falciforme.....	41
4.5 Tripsinização.....	42
4.6 Plaqueamento.....	42
4.7 Fotobiomodulação a laser.....	43
4.8 Fotobiomodulação com Diodo emissor de Luz (LED).....	46
4.9 Análise das células tronco mesenquimais.....	46
4.10 Scratch Assay – ensaio de cicatrização celular.....	57
4.11 Análise estatística.....	49
5. Resultados.....	51
6. Discussão.....	63
7. Conclusão.....	67
Referências bibliográficas.....	69
Anexo A Aprovação do Comitê de Ética.....	76

# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

Células tronco mesenquimais (CTM's) são recrutadas no processo de reparo de lesões, utilizadas no tratamento de feridas e podem ser coletadas de diferentes fontes de tecidos humanos. Quando há lesões graves na pele, há também a necessidade de cobertura, reparação e restauração da mesma e geralmente essas lesões teciduais desencadeiam respostas intracelulares e intercelulares, coordenando a cura do tecido e a homeostase. A regeneração e cicatrização dos tecidos lesados dependem da quantidade de proliferação de CTM's (Mazini, et al. 2020).

Portadores de anemia falciforme (AF) frequentemente apresentam feridas cutâneas que são consideradas de difícil cicatrização, podendo ser decorrentes de diversos fatores patogênicos como disfunção do sistema imunológico, redução da disponibilidade de óxido nítrico e hipercoagulabilidade (Pinto, et al. 2023; Ladizinski, et al. 2012), sendo observada redução da área da lesão com aplicação de fotobiomodulação (Chen, et al. 2022).

O emprego do laser de baixa intensidade oferece benefícios para a cicatrização acelerando o processo, devido ao desenvolvimento de neovascularização local, proliferação celular e de fibroblastos, resultante de fatores de crescimento (de Freitas e Hamblin, 2016). Os espectros de luz visível e infravermelho próximo apresentam resultados mais efetivos em relação à proliferação e diferenciação celular. Vários comprimentos de onda e doses são utilizados para cicatrização de feridas, sem que exista uma padronização de protocolos (Leyane, 2021; Moravej 2023).

O LED (diodo emissor de luz) mostrou ser um recurso alternativo com resultados semelhantes e de custo reduzido, quando comparado com o Laser e apresenta eficácia em pacientes com feridas crônicas e redução do tempo de cicatrização das mesmas. Os mecanismos de ação do LED estão relacionados a estimulação de

fotorreceptores, alterações nos níveis de ATP celular, proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, aumento do potencial de regeneração tecidual e liberação de fatores de crescimento. O tratamento com LED mostrou organização do tecido lesado, com área de tecido de granulação presente, surgimento de folículos pilosos e papilas dérmicas (Ginani, 2015).

Os ensaios celulares são importantes ferramentas na triagem de melhores respostas frente a diferentes parâmetros físicos de recursos terapêuticos, sendo que a busca de protocolos mais eficientes e padronizados, são de grande relevância clínica para o tratamento de feridas cutâneas.

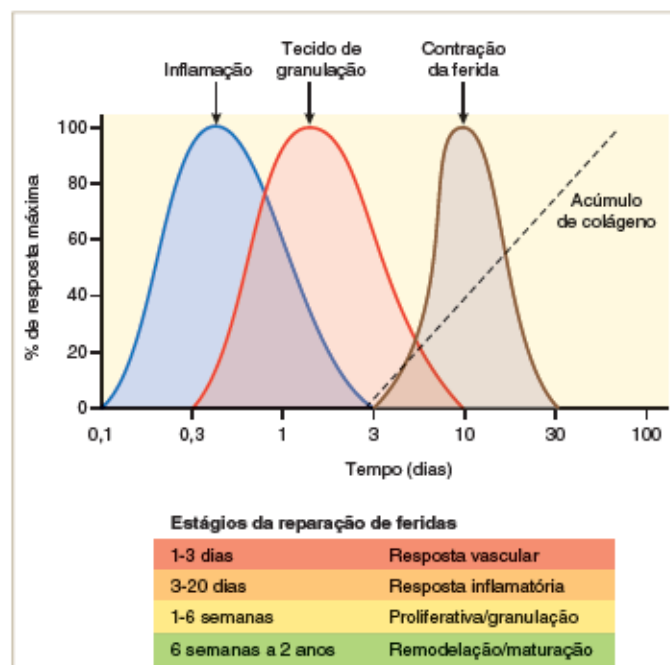
# *Contextualização*

---

## **2.CONTEXTUALIZAÇÃO**

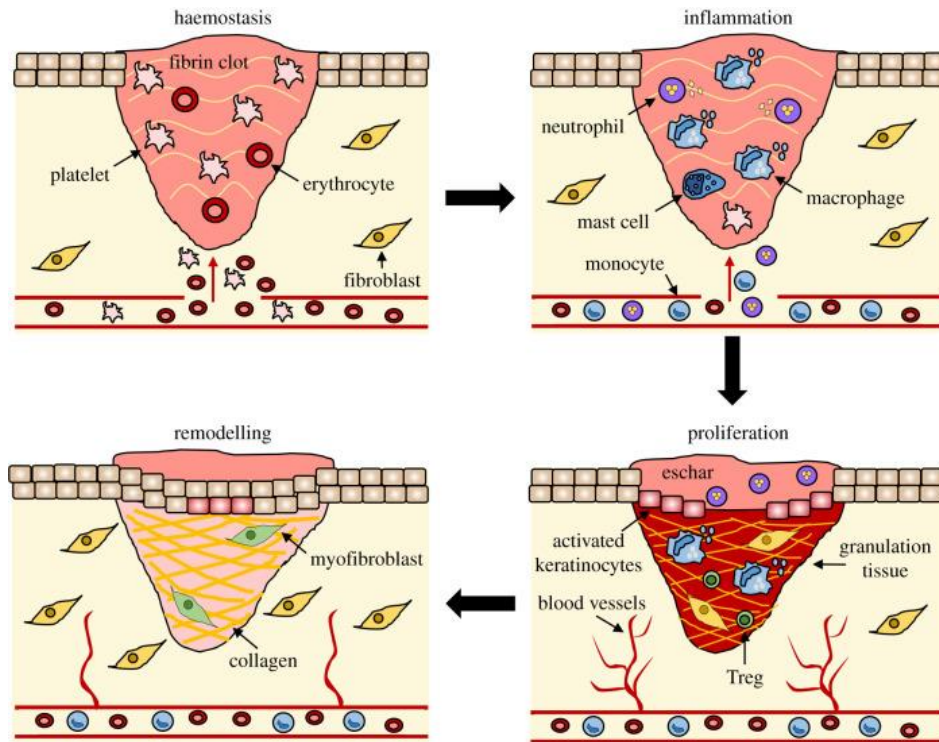
O tratamento de feridas crônicas é um problema para a saúde pública, visto que possui custo elevado e tempo de tratamento prolongado, por isso buscam-se alternativas para acelerar esse processo (Olsson, et al. 2019). A cicatrização inicia a partir do momento que a barreira da pele é danificada e se sucede de inúmeras interações celulares, para que ocorra o fechamento da lesão. Essas interações podem ser prejudicadas por alterações sistêmicas patológicas, que retardam o processo de cicatrização e conseqüentemente evolui para a cronificação da lesão (Ramasastry, 1998).

O processo de cicatrização é classificado em quatro fases sequenciais, porém sobrepostas, sendo elas: hemostasia/inflamação, proliferação e remodelação (Figura 1). As interações responsáveis em cada fase desses processos buscam alcançar a homeostasia e restauração do tecido, tornando-o mais semelhantes e funcional de um tecido não lesado. Essas interações tem início imediatamente após o momento da lesão e pode durar por anos (Velnar, et al. 2009; Wang, et al. 2024).



**Figura 1** - Fases do reparo tecidual e suas principais respostas ao longo do tempo de reparação de ferida. Fonte: Guirro e Guirro, 2023.

O reparo tecidual é iniciado com a fase da hemostasia, em que uma rede de fibrina é formada para conter o sangramento, seguida da inflamação com intuito de remoção de detritos e prevenção de infecção, com grande influxo de neutrófilos e os macrófagos, responsáveis pela limpeza dos restos celulares (Penatzer, et al. 2022). Durante a fase proliferativa, os queratinócitos e fibroblastos atuam para preencher o espaço da lesão com a geração do tecido de granulação, e concomitantemente ocorre a formação de novos vasos. Finalmente, na fase de remodelação ocorre a reorganização da matriz extracelular, substituição e rearranjo do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I com aumento da força de tensão do tecido, que vai se assemelhando com o tecido normal, podendo se prolongar por anos (Fernández-Guarino, 2023), Figura 2.



**Figura 2** - Atuação de diferentes células durante o processo de cicatrização. Macrófagos e neutrófilos são predominantes durante a inflamação. Na fase proliferativa há um aumento na vascularização do tecido e os miofibroblastos e fibroblastos são predominantes durante a fase de remodelação. Fonte: Wilkinson e Hardman, 2020.

O sucesso do processo de reparo tecidual envolve o funcionamento de muitos fatores, por ser um processo complexo e altamente regulado, para manter a função de barreira da pele. Alterações patológicas podem modificar esses mecanismos, resultando em feridas crônicas de difícil cicatrização, como o que acontece em portadores da anemia falciforme (AF), que possui uma alteração na membrana das hemácias, ficando mais susceptíveis a romper, desencadeando uma sequência de eventos que podem resultar em múltiplas complicações, como anemia hemolítica, vaso-oclusão, inflamação crônica e dano tecidual (Inusa, et al. 2019; Lisk, et al.2023).

Avanços no tratamento da AF possibilitaram um aumento da expectativa de vida e com isso as complicações começaram a ser mais frequentes (Pinto, et al. 2023). Entre



essas complicações as mais frequentes são hipertensão pulmonar, trombose, acidente vascular cerebral e retinopatia. No entanto complicações como as úlceras cutâneas vem se tornando frequentes e recorrentes e estão associadas a gravidade da doença e são de difícil cicatrização (Ladizinski, et al. 2012, Monfort e Senet, 2020; Sahu, et al. 2021), sendo importante aprofundar o entendimento sobre a fisiopatologia da lesão, e consequentemente apontar alternativas mais adequadas de tratamento.

O óxido nítrico (NO) exerce um papel fundamental no desenvolvimento da ulceração, sendo observado que portadores de AF apresentam menores níveis, quando comparado a indivíduos não acometidos pela doença (Dick, et al. 2023). O NO auxilia na vasodilatação e função endotelial, sendo que sua redução predispõe à vasoconstrição e disfunção endotelial que pode contribuir para o desenvolvimento da lesão tecidual (Mack e Kato, 2006; Levine, 2012; Sundd, 2019; Kashiwagi, et al. 2023).

Dentre as modalidades conservadoras do tratamento de lesões, sendo elas decorrentes da AF ou decorrente de outros fatores, a terapia celular por meio de células tronco mesenquimais (CTMs) é uma abordagem promissora (Farina, et al. 2019). A capacidade de se auto-renovar, proliferar e diferenciar em diversos tipos de células especializadas, podem auxiliar no processo do reparo. Podem ser isoladas a partir de inúmeros tecidos, dentre eles a medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária e tecido adiposo (TA). O TA possui algumas facilidades em relação a outros locais para coleta de CTMs, devido sua fácil acessibilidade, facilidade de coleta e quantidade superior às células encontradas na medula óssea, além de serem facilmente cultivadas e com crescimento mais rápido (Mohamed-Ahmed, et al. 2018; Mazini, et al. 2020).

Durante a cicatrização de feridas, as CTMs são recrutadas para locais lesados,

com capacidade de se proliferar e diferenciar em fibroblastos dérmicos, células endoteliais e queratinócitos, que são fundamentais nesse processo (Lee, 2016), por meio interações parácrinas que ativam a sinalização celular e acelera o fechamento da ferida, auxiliando nas fases da cicatrização (Tsai, 2017; Zhu, et al. 2023).

Outra ferramenta que potencializa o fechamento de lesões, especialmente as lesões crônicas, é fotobiomodulação (FBM), que caracteriza-se por uma terapia que implica na aplicação de luz de baixa potência, com grande campo de utilização na cicatrização e reparo tecidual (Chen, et al. 2022; Nair, et al. 2023). Os mecanismos de ação estão relacionados com a absorção da luz, convertida em energia luminosa por cromóforos mitocondriais, especialmente o citocromo c oxidase (CCO), que provoca eventos fotoquímicos e fotofísicos para alterar a atividade biológica do tecido alvo (Huang, et al. 2011; de Freitas e Hamblin, 2016).

Os estímulos ocasionados pela luz podem produzir respostas positivas na cicatrização desde fases iniciais até em fases mais tardias, com redução do infiltrado inflamatório, a estimulação de macrófagos e fibroblastos, aceleração da epitelização, organização das fibras de colágeno e estimulação da produção de células endoteliais (Karu, 1988; Hamblin. 2017; da Silva, et al. 2023).

O Laser e LED são considerados instrumentos terapêuticos que possuem semelhanças em relação a luz emitida, ambos os recursos dispõem de uma banda espectral estreita. Os feixes de luz do laser apresentam características específicas, eles são colimados, coerente e monocromático. A diferença entre as fontes está na característica do feixes de luz, uma vez que os feixes do LED não são coerentes. Apesar dessa diferença, a terapia do LED de baixa intensidade é um recurso de baixo custo comparado com a terapia de laser, com efeitos positivos no tratamento de cicatrização de feridas (Chaves, et al. 2014; Vitoriano, et al. 2019)

A energia depositada nos tecidos é absorvida e convertida em energia metabólica, utilizada na cadeia respiratória ocasionando a aumento da produção de ATP (adenosina-trifosfato) levando a estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), e óxido nítrico (NO) e redução do infiltrado inflamatório (Leyane, 2021; Moravej 2023). No entanto, esses efeitos são alcançados quando utilizado os parâmetros adequados, a quantidade de energia aplicada, pode ocasionar a estimulação, inibição ou nenhum efeito (Mignon, et al. 2018; Zein, 2018).

A utilização de parâmetros adequados para a aplicação da FBM em diversas situações, entre elas na regeneração tecidual é tema frequente de discussão em estudos. Comprimento de onda vermelha e infravermelha próximos são os que apresentam melhores resultados em condições cutâneas (Mignon, et al. 2018). A dosagem ainda continua sendo investigada, por possuir uma grande variedade de doses utilizadas que mostram resultados significativos, por esses motivos, os ensaios celulares são importantes ferramentas na triagem de melhores respostas de recursos terapêuticos, sendo que a busca de protocolos mais eficientes e padronizados, são de grande importância clínica para o tratamento de lesões cutâneas.

## *OBjetivos*

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência da fotobiomodulação em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo (CTMs-TA) de indivíduos sem comorbidades, e fibroblastos *in vitro* de portadores de anemia falciforme.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Analisar a proliferação e morte celular de CTMs-TA, submetidas à irradiação do laser com comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm, potências de 40 mW e 100 mW, energia de 0,5 J, 2,0 J e 4,0 J;
- ✓ Analisar a viabilidade celular de CTMs-TA, submetidas à irradiação do laser com comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm, potências de 40 mW e 100 mW, energia de 0,5 J, 2,0 J e 4,0 J;
- ✓ Analisar a proliferação e morte celular de CTMs-TA, submetidas à irradiação do LED com comprimento de onda de 630 nm e 850 nm, com frequência variável dentro da faixa de 0 a 1500 Hz e energia de 0,5 J, 2,0 J e 4,0 J;
- ✓ Analisar a viabilidade celular de CTMs-TA, submetidas à irradiação do LED com comprimento de onda de 630 nm e 850 nm, com frequência variável dentro da faixa de 0 a 1500 Hz e energia de 0,5 J, 2,0 J e 4,0 J;

- ✓ Analisar por meio do Scratch assay a aproximação de borda de feridas *in vitro* em CTMs-TA de indivíduos sem comorbidades, e fibroblastos *in vitro* de portadores de anemia falciforme submetidas a irradiação com laser e LED.

## *Material e Métodos*

---

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações éticas**

O estudo foi aprovado junto ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas – FMRP/USP, CAAE 18691919.3.0000.5440 sob o número de parecer 3.842.162 (Anexo A). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP, aprovado pela Comissão Deliberativa em Pesquisa do Hemocentro do HCFMRP-USP.

### **4.2 Coleta da amostra tecidual**

As amostras de célula tronco do tecido adiposo (CTM's-TA) do abdômen inferior foram coletadas de pacientes saudáveis, idade entre 20 e 54 anos e índice de massa corporal (IMC) máximo de 29 kg/m<sup>2</sup>, por meio do processo de lipoaspiração por equipe especializada. O material foi coletado, expandido e congelado em tubos criogênicos (Greiner Bio-One<sup>®</sup>, Frickenhausen, Alemanha) no nitrogênio líquido.

Os fibroblastos foram coletados de paciente em tratamento no Hemocentro do HCFMRP-USP, portador de anemia falciforme que apresentou úlcera de membro inferior, por meio de amostra de pele retirada com biopsia tipo *punch* de 4 mm, sob anestesia local, por uma equipe especializada e congelada em frasco, o qual foi acondicionada em tubos criogênicos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) e congelada no nitrogênio líquido.

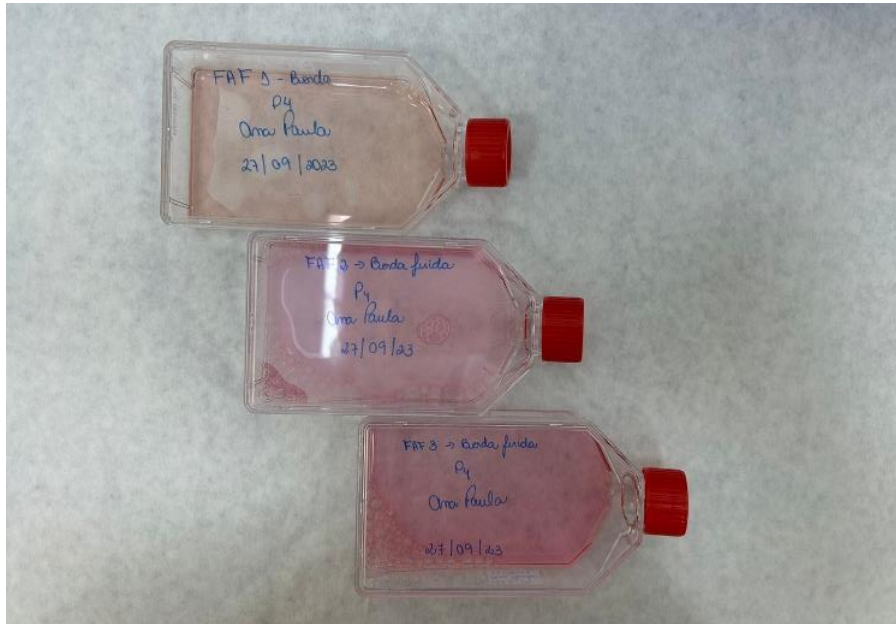


### **4.3 Cultivo celular de CTM de indivíduos sem comorbidades**

As células armazenadas foram descongeladas em banho maria (37°C) sendo o cultivo celular feito em garrafas (Greiner Bio-One®, Frickenhausen, Alemanha) de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio  $\alpha$ MEM (meio mínimo essencial, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com 10% de SFB (Soro fetal bovino, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), penicilina e estreptomicina incorporadas. As células foram incubadas em estufa úmida a 85%, com temperatura à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que o meio foi trocado a cada 48 horas. Após a adesão das CTMs-TA às garrafas, atingindo a confluência celular acima de 80%, o meio foi retirado e efetuado o processo de tripsinização.

### **4.4 Cultivo celular de fibroblasto de portadores de anemia falciforme**

As células armazenadas foram descongeladas em banho maria (37°C) sendo o cultivo celular feito em garrafas (Greiner Bio-One®, Frickenhausen, Alemanha) de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) com 10% de SFB (Soro fetal bovino, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), penicilina e estreptomicina incorporadas (Figura 3). As células foram armazenadas em estufa úmida a 85%, com temperatura à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que o meio foi trocado q a cada 48 horas. Após a adesão dos fibroblastos a garrafas, atingindo a confluência celular acima de 80%, o meio foi retirado e efetuado o processo de tripsinização.



**Figura 3** - Garrafas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> para cultura e armazenamento das Células tronco mesenquimais e fibroblastos de anemia falciforme em meios de cultura, mantidas em estufa com temperatura e umidade controlada. Fonte: Arquivo pessoal.

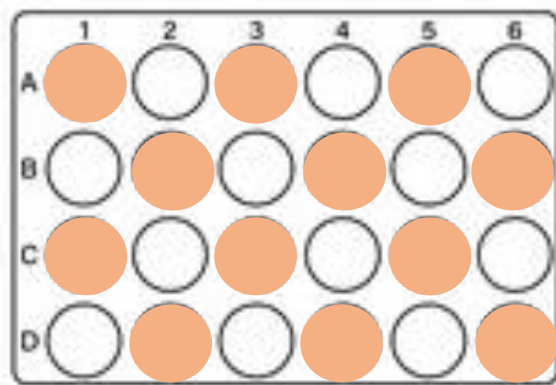
#### 4.5 Tripsinização

A tripsinização foi efetuada com a retirada do meio de cada garrafa contendo as células aderidas, sendo sua lavagem realizada com PBS (solução salina tamponada de fosfato) 1X, adicionando enzima tripsina para lise das adesões celulares (0.05% Tripsin 0.53 mM EDTA, Gibco™ Carlsbad, CA, EUA). Para ativação dessa enzima, as garrafas foram mantidas na incubadora (Thermo Scientific Enviro Scan<sup>tm</sup>, Estados Unidos) durante cinco minutos a 37°C, e em seguida, foram adicionados 9 mL de RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium: meio de cultura celular, Gibco), para sua inativação.

#### 4.6 Plaqueamento

Logo após a tripsinização, foram semeadas  $2 \times 10^4$  de CTMs-TA e fibroblastos por poço, utilizando placas de cultivo de 24 poços (CELLSTAR®, Greiner bio-one, Alemanha) em 1 mL de meio  $\alpha$ MEM + 10% SFB e DMEM + 10% SFB respectivamente. Após o plaqueamento, as células foram mantidas em estufa à 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência, dando início ao protocolo de irradiação. No que diz respeito a garantia de reprodutibilidade dos dados, todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As células foram plaqueadas de forma intercalada mantendo poços vazios entre os poços semeados, sendo que os poços vazios foram preenchidos com material EVA (acetato-vinilo de etileno) de cor preta durante a irradiação, com finalidade de minimizar a dispersão não intencional de luz durante a fotobiomodulação (Figura 4).



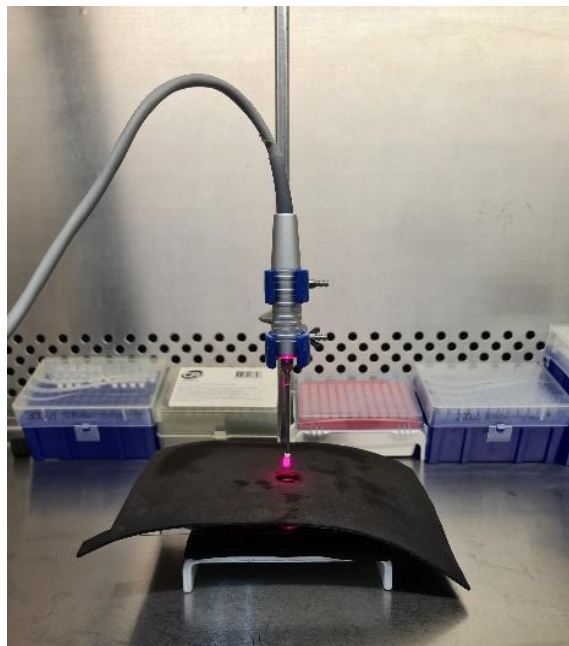
**Figura 4** - Plaqueamento celular em placas de 24 poços, com poços intercalados, com e sem células, para evitar o espalhamento intencional da luz durante a fotobiomodulação.

#### 4.7 Fotobiomodulação a laser

Os experimentos foram efetuados sob a capela de fluxo laminar (Cabine de Fluxo laminar Classe II, Labconco, EUA). As culturas de células aderidas foram irradiadas com um laser de diodo AlGaInP e AsGaAl, com equipamento Photon Lase III (DMC® Equipamentos Ltda., São Carlos, Brasil), registro da ANVISA

80030810014, com comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm respectivamente, modo de emissão contínua, área de secção transversal do feixe de 0.028 cm<sup>2</sup>, potências de 40 mW e 100 mW, energia de 0.5 J, 2 J e 4 J, intervalo das aplicações de 0, 24 e 48 horas (Tabela 1).

O probe do laser foi direcionado verticalmente em cada poço, fixo por uma plataforma de suporte, com distância de 3.3 cm do laser até o fundo do poço, de modo que o feixe de luz cobrisse todo o poço e irradiasse as células igualmente. Sobre a placa no momento da irradiação, era colocada uma placa de EVA preta, com abertura de mesmo diâmetro do poço, para garantir que o feixe não interferisse ao redor do poço (Figura 5).



**Figura 5** - Plataforma de suporte desenvolvido para irradiação a laser, fixada a 3,3 cm de distância do laser até o fundo do poço. Fonte: Arquivo pessoal.

**Tabela 1-** Parâmetros da fotobiomodulação utilizado para irradiação células tronco mesenquimais com laser vermelho (660 nm) e infravermelho (830 nm).

<b>PARÂMETROS</b>	<b>LASER 660 nm</b>	<b>LASER 660 nm</b>	<b>LASER 830 nm</b>	<b>LASER 830 nm</b>
<b>POTÊNCIA (mW)</b>	100 mW	40 mW	100 mW	40 mW
<b>MODO DE AÇÃO</b>	Contínuo	Contínuo	Contínuo	Contínuo
<b>ÁREA DO FEIXE (cm<sup>2</sup>)</b>	0,028 cm <sup>2</sup>	0,028 cm <sup>2</sup>	0,028 cm <sup>2</sup>	0,028 cm <sup>2</sup>
<b>IRRADIÂNCIA (W/cm<sup>2</sup>)</b>	3,57	1,42	3,57	1,42
<b>TEMPO (s)</b>	5; 20; 40	12.5; 50; 100	5; 20; 40	12.5; 50; 100
<b>DENSIDADE DE ENERGIA (J/cm<sup>2</sup>)</b>	17.8; 71.4; 142.8			
<b>ENERGIA (J)</b>	0,5; 2,0; 4,0			
<b>13 GRUPOS</b>	G1- 660 nm, 100 mW, 0.5 J; G2- 660 nm, 100 mW, 2 J; G3- 660 nm, 100 mW, 4 J; G4- 660 nm, 40 mW, 0.5 J; G5- 660 nm, 40 mW, 2 J; G6- 660 nm, 40 mW, 4 J; G7- 830 nm, 100 mW, 0.5 J; G8- 830 nm, 100 mW, 2 J; G9- 830 nm, 100 mW, 4 J; G10- 830 nm, 40 mW, 0.5 J; G11- 830 nm, 40 mW, 2 J; G12-830 nm, 40 mW, 4 J; G13- Controle (sem tratamento).			

#### 4.8 Fotobiomodulação com Diodo emissor de Luz (LED)

A irradiação com LED foi efetuada com um dispositivo de diodo emissor de Luz Antares<sup>®</sup> (IBRAMED, Amparo, Brasil), modo contínuo, com um comprimento de onda de 630 nm com potência de 50 mW e 850 nm (Tabela 2).

A irradiação de células mesenquimais com LED ocorreu no intervalo de zero, 24 e 48 horas. O LED foi direcionado de forma perpendicular em cada poço. Sobre a placa no momento da irradiação, era colocada uma placa de EVA preta, com abertura de mesmo diâmetro do poço, para garantir que o feixe não interferisse ao redor do poço.

**Tabela 2-** Parâmetros da fotobiomodulação utilizado para irradiação células tronco mesenquimais com LED vermelho (630 nm) e infravermelho (850 nm).

Parâmetros	LED 630 nm	LED 850 nm
Potência (mW)	50 mW	60 mW
Irradiância (W/cm <sup>2</sup> )	0,01	0,02
Área do feixe (cm <sup>2</sup> )	2,93 cm <sup>2</sup>	0,5 cm <sup>2</sup>
Tempo (s)	10; 40; 80	8; 32; 64
Densidade de energia (J/cm <sup>2</sup> )	0,17; 0,68; 1,36	0,96; 3,84; 7,68
Modo de ação	Contínuo	
Energia (J)	0,5; 2,0; 4,0	

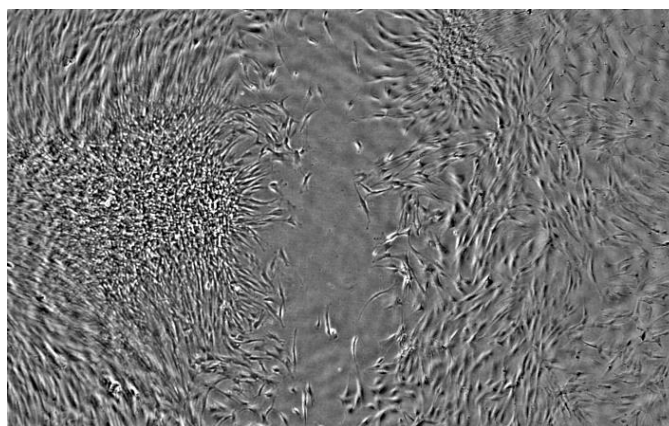
#### 4.9 Análise das células tronco mesenquimais

A análise das células tronco mesenquimais (CTM's) submetidas à estimulação, foi efetuado por meio da retirada do meio  $\alpha$ MEM + 10% SFB, sendo em seguida

adicionado em cada poço 300  $\mu$ L de PBS (Tampão fosfato-salino) com a solução dos marcadores PI (Iodeto de Propídio – Sigma Aldrich), que penetra em membranas lesadas marcando as células consideradas mortas ou inviáveis e a solução Hoechst (*Hoechst Stain solution* – Sigma Aldrich), foi utilizada para corar DNA e marcar células viáveis. As marcações foram realizadas após 24 h, 48h e 72 h da irradiação/estimulação, e as imagens das placas foram adquiridas. Os dados foram analisados com *software* MetaXpress<sup>®</sup> (Molecular Devices, San José, Califórnia, EUA), com finalidade de detectar os parâmetros mais adequados.

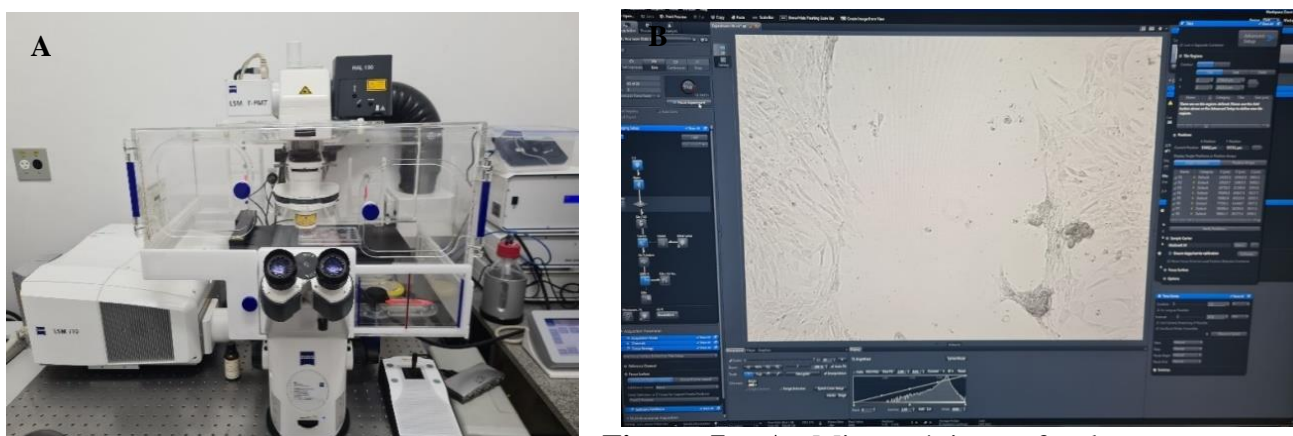
#### 4.10 Scratch Assay - Ensaio de cicatrização

O ensaio de cicatrização, também conhecido como *scratch assay* ou método de avaliação de cicatrização de feridas *in vitro*, envolve um arranhão na camada celular para criar uma lesão artificial e assim conseguir avalia o tempo de aproximação das bordas, mimetizando uma lesão (Figura 6).



**Figura 6** - Ensaio de cicatrização de ferida, realizado por meio de um arranhão na camada de células tronco mesenquimais de indivíduos sem comorbidades e de fibroblastos de portadores de anemia falciforme. O acompanhamento das imagens foi analisado imediatamente após a aplicação do laser e 24 horas após aplicação do laser, até a aproximação das bordas. Fonte: Arquivo pessoal.

No momento em que as células atingiram a confluência, foi efetuado o *scratch*, com o uso de uma ponteira 1000  $\mu$ L e em seguida a irradiação com LASER e LED, tanto em células tronco mesenquimais do tecido adiposo, quanto em fibroblastos de portadores de anemia falciforme. Os parâmetros físicos que foram identificados como melhor resposta nos ensaios celulares, de acordo com os dados obtidos nas análises das CTMs descrito anteriormente, foram utilizados para irradiação. A migração celular foi monitorada até a completa aproximação das bordas, por meio de imagens fotográficas no decorrer do tempo até a aproximação total, com o uso de microscópio confocal e mesa motorizada, contendo controle de temperatura (LSM 710<sup>®</sup>, Zeiss, Alemanha). O microscópio confocal foi utilizado para visualização, através da microscopia do campo claro e programação para obtenção das imagens por meio de fotografia a cada 20 min, por 48 h. Para padronização, foi analisada as imagens no tempo 0, 6 e 24 horas, caso não tivesse fechado a lesão, a análise continuava até a aproximação total das bordas, e o registro fotográfico foi efetuado em três pontos pré-determinados de cada poço (Figura 7).



**Figura 7 - A-** Microscópio confocal com mesa motorizada com controle de temperatura. **B-** Imagem fotográfica adquirida a cada 20 minutos da camada celular após o Scratch. Fonte: Arquivo pessoal.



#### **4.11 Análise estatística**

A normalidade dos dados apresentados de morte e proliferação celular foi verificada com o teste de Shapiro Wilk, e a comparação entre os grupos pelo teste ANOVA Two way. Na presença de diferença significativa, foi aplicado o teste de Tukey. As análises foram efetuadas com o software GraphPad Prism<sup>®</sup> 7.0 (San Diego, CA, USA) com o nível de significância estabelecido em  $p < 0,05$ .

Para o ensaio de viabilidade celular e ensaio de cicatrização *in vitro*, as variáveis apresentaram distribuição normal, portanto aplicou-se o teste T. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

## *Resultados*

---

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Resposta das CTMs-TA submetidas à irradiação do laser**

#### **5.1.1 Proliferação celular**

Em relação aos dados obtidos com a irradiação a laser sobre as CTMs-TA, a tabela 3 mostra a média e desvio padrão dos valores referentes a proliferação celular, em que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado cada parâmetro em diferentes tempos de irradiação (24, 48 e 72 horas). Ambos os comprimentos de onda apresentaram aumento nos valores da proliferação, no entanto a quantidade celular foi maior no laser de 830 nm, 100 mW, energia de 2 J e 4 J e no 830 nm, 40 mW, energia de 0,5 J e 4 J, quando comparado aos outros parâmetros utilizados. No tempo 72 horas, os parâmetros associados ao comprimento de onda de 630 nm apresentaram valores significativamente menores, quando comparado ao laser de 830 nm.

#### **5.1.2 Morte celular**

A Tabela 4 mostra a média e desvio padrão dos valores referentes a morte celular. A quantidade de morte celular apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado cada parâmetro em diferentes tempos de irradiação (24, 48 e 72 horas). No tempo de 72 horas o LASER de comprimento de onda de 660 nm, potência 100 mW, controle e energia de 0.5 J exibiram aumento na quantidade de morte celular quando comparado ao tempo 24 horas. Por outro lado, no tempo de 48 horas, houve valores menores de morte celular comparado ao tempo 24 horas no comprimento de onda de 660 nm, 40 mW, energia de 0,5 e 2 J.

**Tabela 3** – Valores referentes a proliferação celular com o laser de comprimento de onda 830 e 660 nm, potência 100 e 40 mW, grupo controle e energia de 0.5 J, 2 J e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Energia</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>830 nm/ 100 mW</b>	Controle	5130±396	8595±810*	15105±1401*#
	0,5 J	5787±447	7344±302*	15870±2657
	2 J	6252±1413	9318±816*	15438±899*#
	4 J	6744±1583	8976±1440	14271±1606*#
<b>830 nm/ 40 mW</b>	Controle	4578±543	8640±500*	13749±854*#
	0,5 J	4032±1633	8286±877*	15303±686*#
	2 J	4005±415	9147±1888	13392±940*#
	4 J	5694±505	10707±932*	16014±1699*#
<b>660 nm/ 100 mW</b>	Controle	2928±277	5757±645*	7578±454*#
	0,5 J	2559±393	5373±513*	6627±1008
	2 J	2807±285	5202±298*	8109±1488*
	4 J	3061±307	5037±597*	8043±1130*#
<b>660 nm/ 40 mW</b>	Controle	4839±584	7543±621*	10108±539*#
	0,5 J	4890±233	7369±1069*	9195±549*#
	2 J	4532±273	7026±455*	8649±851*#
	4 J	5162±569	7511±1232*	8915±227*#

\* - p<0.05 comparado ao tempo 24 h; # - p<0.05 comparado ao tempo 48 h;

**Tabela 4** – Valores referentes a morte celular com o laser de comprimento de onda 830 e 660 nm, potência 100 e 40 mW, grupo controle e energia de 0.5 J, 2 J e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.

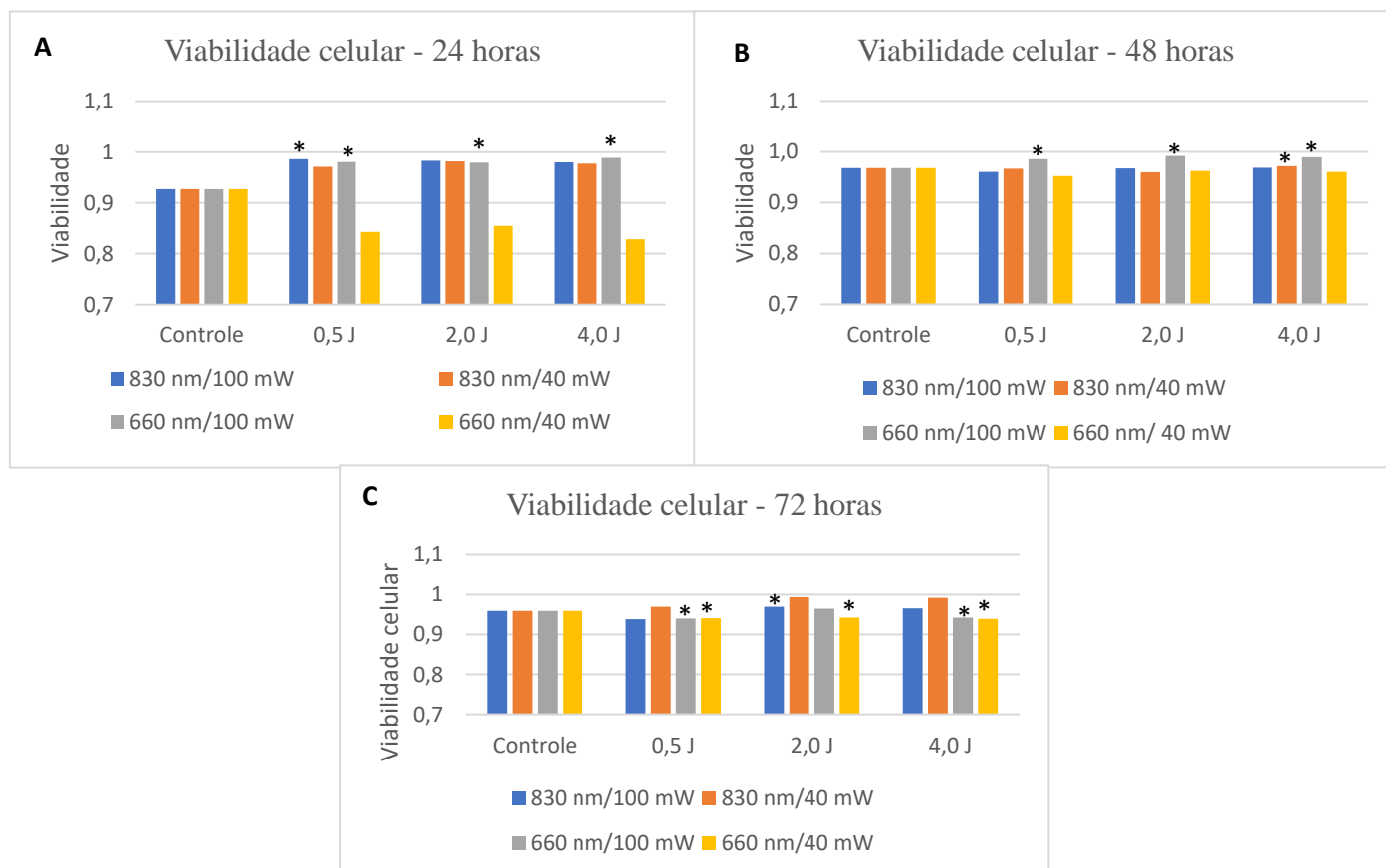
<b>Parâmetros</b>	<b>Energia</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>830 nm/ 100 mW</b>	Controle	102±44	321±22*	543±113
	0,5 J	84±34	303±69	1038±922
	2 J	111±5	318±132	477±241
	4 J	141±49	291±126	501±149
<b>830 nm/ 40 mW</b>	Controle	123±45	201±36	120±22
	0,5 J	120±59	285±42	471±597
	2 J	75±49	384±132	81±32
	4 J	132±51	315±45	126±45
<b>660 nm/ 100 mW</b>	Controle	42±13	177±121	507±76*
	0,5 J	51±13	78±5	420±81*
	2 J	60±14	42±22	291±171
	4 J	36±9	54±31	492±158
<b>660 nm/ 40 mW</b>	Controle	943±171	306±37	800±74#
	0,5 J	910±205	371±172*	574±49
	2 J	769±48	276±29*	529±140
	4 J	1068±342	308±114	574±39

\* - p<0.05 comparado ao tempo 24 h; # - p<0.05 comparado ao tempo 48 h.

### 5.1.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi calculada baseado na proliferação e morte celular. Nas primeiras 24 horas após a irradiação, apenas o comprimento de onda de 660 nm e potência de 40 mW mostraram resultados menores que o grupo controle, e o mesmo

comprimento de onda com potência de 100 mW teve aumento significativo em 24 horas, assim como no tempo de 48 horas. Com o avançar do tempo, em 72 horas, o laser de 830 nm se mostra significativamente maior, que o laser de 660 nm (Figura 8).



**Figura 8** - A figura A mostra os valores da viabilidade celular no tempo de 24 horas após a irradiação a laser. A figura B e C representam os valores da viabilidade no tempo de 48 e 72 horas respectivamente.

## 5.2 Resposta das CTMs-TA submetidas à irradiação do LED

### 5.2.1 Proliferação Celular

A Tabela 5 aponta a média e desvio padrão dos valores referentes à proliferação celular. Houve diferença significativa na proliferação celular ( $p < 0,05$ ) quando comparado cada parâmetro em diferentes tempos de irradiação (24 h, 48 h e 72 h). O LED de 850 nm apresentou quantidade celular maior que o LED de 630 nm e no tempo de 72 horas apresentou diferença significativa comparado com o tempo de 24 e 48 h.

**Tabela 5** – Valores de proliferação celular com o LED de comprimento de onda 850 nm, potência 60 mW, 630 nm e 50 mW, com energia de 0,5, 2 e 4 J, em relação ao tempo 24 h, 48 hr 72 horas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Energia</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>850 nm /60 mW</b>	Controle	2561±173	4592±369*	4846±329*#
	0,5 J	2067±395	4724±389*	5461±334*#
	2 J	2017±177	4411±242*	5126±402*#
	4 J	2595±351	4435±468*	5523±303*#
<b>630 nm 50 mW</b>	Controle	3232±109	3963±236*	3971±170*#
	0,5 J	3090±365	4377±400*	4160±227*
	2 J	3173±176	4225±226*	4282±303*
	4 J	3436±369	4041±338	4573±171#

\* -  $p < 0.05$  comparado ao tempo 24 h; # -  $p < 0.05$  comparado ao tempo 48 h.

### 5.2.2 Morte celular

Os valores referentes a morte celular estão descritos na Tabela 6 com a média e desvio padrão, sendo que a desta apresentou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) na comparação de cada parâmetro em diferentes tempos de irradiação (24 h, 48 h e 72 h).

Também foi encontrada diferença significativa no LED de 850 nm, que apresentou maior quantidade de células mortas, comparado com o LED de 630 nm.

**Tabela 6** – Valores referentes a morte celular comparando LED de comprimento de onda 850 nm, potência 60 mW, 630 nm e 50 mW, com energia de 0.5, 2 e 4 J, em relação ao tempo 24, 48 e 72 horas.

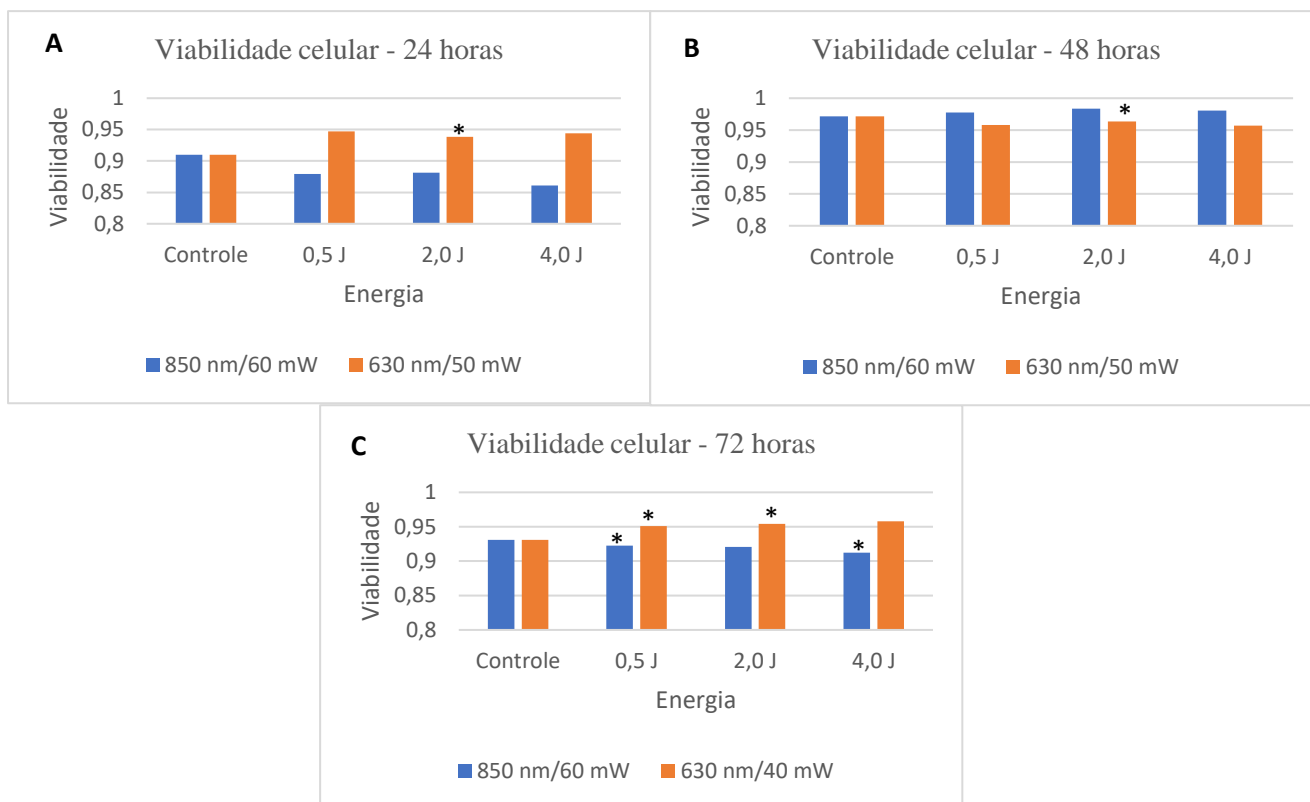
<b>Parâmetros</b>	<b>Energia</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>850 nm /60 mW</b>	Controle	254±29	89±28*	458±42*#
	0,5 J	283±111	109±8	458±85#
	2 J	272±90	74±15*	440±80#
	4 J	419±60	87±5*	531±84#
<b>630 nm 50 mW</b>	Controle	185±7	170±4*	185±13
	0,5 J	173±27	193±55	214±6
	2 J	208±17	161±31	205±24
	4 J	203±33	181±6	200±13

\* - p<0.05 comparado ao tempo 24 h; # - p<0.05 comparado ao tempo 48 h;

### 5.2.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi calculada com base nos dados de proliferação e morte celular. Nas primeiras 24 horas após a irradiação com LED, apenas o comprimento de onda de 660 nm, 2 J de energia mostrou resultados significativamente maiores que o grupo controle, e o mesmo comprimento de onda teve aumento significativo em 72 horas. assim como no tempo de 48 horas (Figura 9).

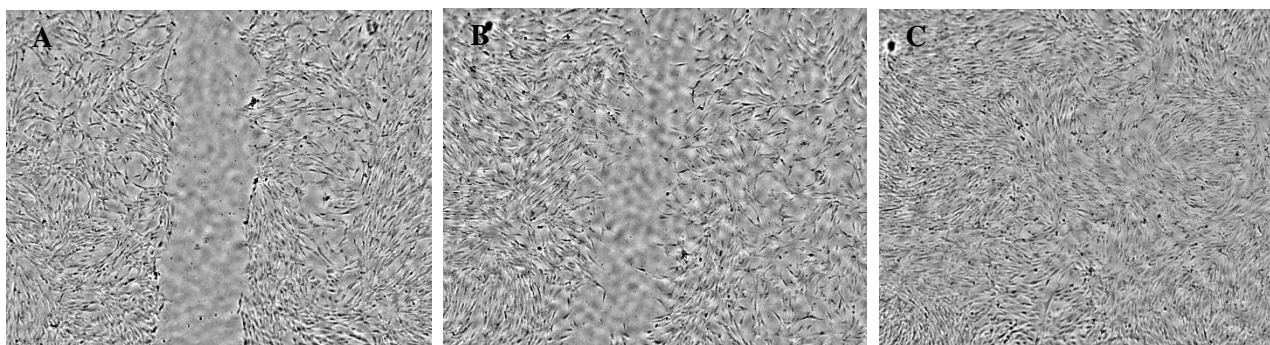




**Figura 9-** A Figura A mostra o comportamento da viabilidade celular no tempo de 24 horas após a irradiação. Os tempos e 48 e 72 horas após irradiação são mostradas na figura B e C respectivamente.

### 5.3 Scratch Assay – ensaio de cicatrização celular

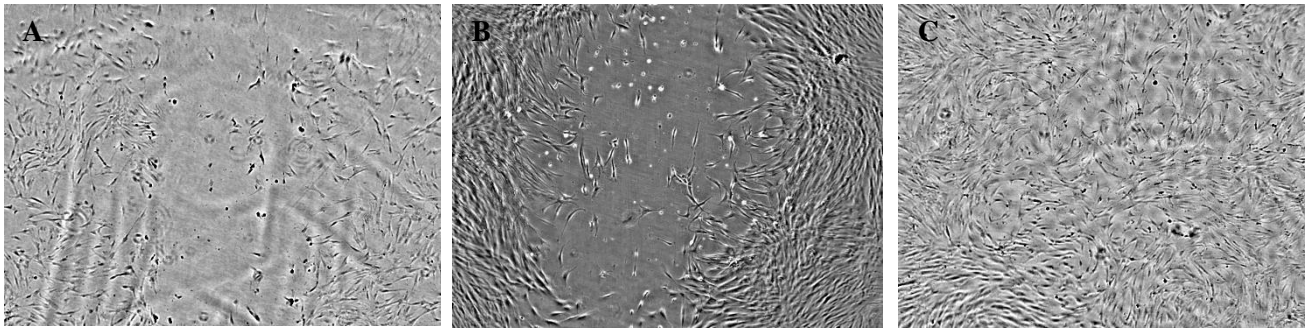
Para avaliação de cicatrização de feridas *in vitro* foi realizado o arranhão na camada de célula para criar uma lesão artificial. No presente estudo, após a irradiação com o laser e o LED, em células tronco mesenquimais do tecido adiposo, a área do sulco na camada celular foi avaliada no tempo de 0, 6 e 24 horas (Figura 10). Os parâmetros utilizados nesse ensaio foram os que apresentaram melhores resultados em relação a proliferação, morte e viabilidade celular, sendo eles LED 630 nm, laser de 660 e 830 nm, como demonstrado nas tabelas abaixo (Tabela 7).



**Figura 10** - Ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, com arranhão na camada de CTM's. Figura A representa o arranhão logo após a irradiação no tempo 0, seguida da figura B no tempo de 6 hora e a figura C em 24 horas, com aproximação total das bordas.

No presente estudo, após a irradiação com o laser e o LED em fibroblastos de portadores de anemia falciforme, a área do sulco na camada celular não apresentou fechamento completo em 24 horas, como o ocorrido nas células tronco mesenquimais de pacientes sem comorbidades, sendo as análises feitas em 0, 24 e 48 horas (Figura 11).

A área do sulco das células que receberam a estimulação comparada com o grupo controle apresentou redução no tempo de 24 horas quando comparado com o tempo de 0 horas, mas não apresentou diferença significativa. Já no tempo de 48 horas quando comparado com 0 horas, houve uma redução significativa, com fechamento quase total das bordas nos grupos irradiados com LED de 630 nm, em ambas as energias, assim como o laser de 660 nm e potência de 100 mW e o laser de 830 nm e 100 mW. O comprimento de onda vermelho, com potência de 40 mW se mostrou significativo apenas na energia de 4 J (Tabela 8).



**Figura 11** - Ensaio de fechamento de ferida *in vitro*, com arranhão na camada de fibroblastos. Figura A representa o arranhão logo após a irradiação, no tempo 0, seguida da figura B no tempo de 24 hora e a figura C em 48 horas, com aproximação total das bordas.

**Tabela 7** - Redução em porcentagem da área da lesão *in vitro* de CTMs após a irradiação com laser e LED, quando comparado o tempo de 6 hora e 24 horas com o tempo de 0 horas.

	<b>Energia</b>	<b>Área 0 h</b>	<b>Área 6 h</b>	<b>Redução %</b>	<b>Área 24 h</b>	<b>Redução %</b>
<b>Controle</b>		48,9±10	30,6±8,6	37,3%	7,3±2	85
<b>LED 630 nm</b>	2,0 J	45,7±8,6	33,6±8,6	26,3%	2,4±0,9	94,7**
<b>LED 630 nm</b>	4,0 J	44,7±7,8	26,5±3,2	40,6%	2,1±1,1	95,3**
<b>Laser 660 nm/ 100 mW</b>	2,0 J	42,1±5,3	24,5±4,1	41,8%	3,3±2,6	92,1**
<b>Laser 660 nm/ 100 mW</b>	4,0 J	40,3±7	20,5±3,2	49,1%	2,8±0,5	92,9**
<b>Laser 660 nm/ 40 mW</b>	2,0 J	46,4±15	25,7±5,2	44,6%	4,7±2,7	89,8
<b>Laser 660 nm/ 40 mW</b>	4,0 J	47±9,2	34,2±10,2	27,1%	2,5±1,2	94,7**
<b>Laser 830 nm/ 100 mW</b>	2,0 J	43,4±4,7	34,7±8,3	20,4%	2,9±0,9	93,3**
<b>Laser 830 nm/ 100 mW</b>	4,0 J	44,2±7,3	31,6±3,3	28,3%	4,5±2,6	89,7
<b>Laser 830 nm/ 40 mW</b>	2,0 J	49,7±8,7	31,7±3,9	36,2%	5,4±1,7	89
<b>Laser 830 nm/ 40 mW</b>	4,0 J	33,2±6,1	23,3±7,1	29,8%	0,8±0,5	97,3**

J: Joules; \*\* p<0,01.

**Tabela 8** - Redução em porcentagem da área da lesão *in vitro* de fibroblastos de portadores de Anemia falciforme após a irradiação com laser e LED, quando comparado o tempo de 24 e 48 horas com o tempo de 0 horas.

	<b>Energia</b>	<b>Área 0 h</b>	<b>Área 24 h</b>	<b>Redução %</b>	<b>Área 48 h</b>	<b>Redução %</b>
<b>Controle</b>		58,7±18,7	28,3±14,8	52%	4,68±3,04	92%
<b>LED 630 nm</b>	2 J	54,2±15,7	27,9±11,1	46%	1,16±0,41	98%*
<b>LED 630 nm</b>	4 J	52,0±16,5	27,2±8,5	32%	1,09±0,48	98%*
<b>Laser 660 nm/ 100 mW</b>	2 J	57,7±12,5	34,6±5,1	28%	1,02±0,95	98%*
<b>Laser 660 nm/ 100 mW</b>	4 J	60,6±16,4	33,2±12,2	62%	1,0,4±0,37	98%*
<b>Laser 660 nm/ 40 mW</b>	2 J	52,4±17,1	32,7±10,6	38%	1,58±0,40	97%
<b>Laser 660 nm/ 40 mW</b>	4 J	56,6±23	35,9±10,6	37%	0,87±0,17	98%*
<b>Laser 830 nm/ 100 mW</b>	2 J	50,4±15,7	36,1±7,58	40%	1,34±0,34	97%*
<b>Laser 830 nm/ 100 mW</b>	4 J	56,1±11,8	21,4±11	45%	0,80±0,38	99%*
<b>Laser 830 nm/ 40 mW</b>	2 J	48,1±8,5	25,8±10,6	49%	1,68±1,3	97%
<b>Laser 830 nm/ 40 mW</b>	4 J	58,0±23,4	39,5±11,9	48%	1,98±1,8	97%

J: Joules; \*\* p<0,01.

## *Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

Tratamentos de lesões cutâneas podem ser otimizados com a utilização de fotobiomodulação com a luz, sendo o laser ou o LED, visando acelerar o processo de reparo tecidual, além de evitar complicações adicionais. Sob essa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes parâmetros da fotobiomodulação em dois tipos celulares, células tronco mesenquimais do tecido adiposo de indivíduos sem comorbidades e fibroblastos de pacientes portadores de anemia falciforme, com intuito de determinar/fundamentar a melhor dose-resposta para intervenções nestas lesões.

O laser é amplamente usado para estimular a proliferação e diferenciação de diferentes tipos de células. No entanto, o efeito desejado nem sempre é observado, pois diversos fatores influenciam nesse processo e podem produzir efeitos estimulantes ou inibitórios, dependendo dos parâmetros (Ahrabi 2019). Mecanismos celulares *in vitro* resultantes da irradiação a laser normalmente expressam as mesmas condições observadas nas lesões, devido ausência de barreira óptica. A absorção da energia do laser ocorre em cromóforos presentes nas mitocôndrias, onde é convertida em energia metabólica, aumentando a síntese de ATP e da atividade do DNA para produção de RNA e proteínas específicas (Kreisler, et al. 2002; Alghamdi, et al. 2012; da Silva, et al. 2023).

A maior absorção de luz laser por estruturas celulares ocorre em comprimentos de onda na faixa do vermelho e infravermelho (Ash, et al. 2017). Contudo, a energia entregue ao tecido alvo interfere nas respostas celulares, estudos relatam que quanto maior a dose, maior a energia absorvida, conseqüentemente maior os danos causados aos fotorreceptores, reduzindo o efeito biomodulador do

laser, levando a inibição do metabolismo e consequente morte celular (Huang, et al. 2011; Zein, 2018; Na, et al 2018). No presente estudo, todas as energias utilizadas apresentaram aumento da proliferação celular, no entanto, a energia de 4 J associada a outros parâmetros, mostrou-se significativamente maior no tempo 72 horas comparada com os tempos de 24 e 48 horas. Os resultados concordam com alguns pesquisadores de que a ação do laser está diretamente relacionada à energia de irradiação, linha celular e comprimento de onda utilizado, além de metodologias bem definidas (Parenti, et al.2020).

No presente estudo, a irradiação com 660 nm, 40 mW apresentou maior número de morte celular quando comparando com os outros grupos, mostrando que a FBM com pode interferir no ciclo e crescimento celular de acordo com os parâmetros utilizados (Wang, et al. 2017), inclusive interferir na viabilidade celular. Estudo que avaliou a morte celular (Gross 1990), observou que a FBM é capaz de modular os níveis de mRNA de genes presentes nas vias de apoptose. No entanto, outro estudo com laser de 830 nm (Silva 2019), observou que o mesmo não foi capaz de causar fragmentação do DNA nas células, indicando que esse estímulo não foi suficiente para levar a célula à morte, fato que pode explicar o resultado do presente estudo, que não observou diferença significativa em relação a morte celular, quando utilizado o laser de 830 nm.

O laser e led possuem características semelhantes em relação a luz emitida, ambos dispõem de feixes de luz de banda espectral relativamente estreita, sendo que a diferença desses feixes é que os feixes do LED não são coerentes. Apesar desses contrastes, a terapia do LED é uma alternativa de baixo custo à terapia de laser, com efeitos positivos no tratamento de cicatrização de feridas, porém ainda apresenta controvérsia sobre sua eficácia (Chaves, et al. 2014), como observa-se nos



resultados encontrados no presente estudo, onde apenas o comprimento de onda de 630 nm se mostrou efetivo em relação a viabilidade celular, em diferentes tempos de análises, já o comprimento de onda de 850 nm não houve diferença significativa.

O uso do laser e do LED ainda produz controvérsias quanto à similaridade dos efeitos biológicos e terapêuticos promovidos ambos os recursos e também quanto aos parâmetros adequados a cada uma dessas fontes de luz (Pagin, et al. 2014; Vitoriano, et al. 2019). No ensaio de cicatrização celular (*scratch*), observou-se que o laser e o LED apresentaram redução do tempo de aproximação das bordas da ranhura padronizada, porém houve diferença entre os tecidos irradiados. Nas CTM-TA em 24 horas, as bordas estavam quase que totalmente aproximadas e nos fibroblastos de AF, precisou de mais tempo para a aproximação.

Embora o número de publicações relacionadas às ações inerentes a fotobiomodulação com laser sejam mais expressivas em relação ao LED, as ações de ambos os recursos são semelhantes diante dos parâmetros físicos adotados, sendo interessante mais estudos que investigues as ações de ambos os recursos frente a diversas disfunções, e diferentes parâmetros físicos.

## *Conclusão*

---

## **7. CONCLUSÃO**

Diante dos achados do presente estudo, foi possível confirmar a hipótese de que diferentes parâmetros físicos da FBM com laser e LED, possui respostas biológicas que interferem na taxa de proliferação, morte e conseqüentemente na viabilidade celular. Além de que, diferentes tecidos reagem de formas distintas, mas a FBM é capaz de acelerar o processo de cicatrização.

## *Referências bibliográficas*

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahrabi B, Tavirani MR, Khoramgah MS, et al. The Effect of Photobiomodulation Therapy on the Differentiation, Proliferation, and Migration of the Mesenchymal Stem Cell: A Review. *J Lasers Med Sci*. 2019 Fall;10:S96-S103.

AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):237-49.

Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci*. Nov;32(8):1909-1918, 2017.

Chaves MEA, Araújo AR, Piancastelli ACC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol*. 2014 Jul-Aug; 89(4): 616–623.

Chen Q, Yang J, Yin H, et al. Optimization of photo-biomodulation therapy for wound healing of diabetic foot ulcers in vitro and in vivo. *Biomed Opt Express*. 2022 Mar 25;13(4):2450-2466.

de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016 May-Jun;22(3):7000417.

Dick A, Schwartzman G, Khachemoune A. Cutaneous manifestations of sickle cell disease: an updated review. *Arch Dermatol Res*. 2023 May;315(4):729-734.

Farina JAJ, Santis GC, Orellana MD, et al. Autologous adipose-derived stem cell for painful leg ulcers in patients with sickle cell disease. a preliminary study. british journal of haematology, p. bjh.15891-3, 2019.

Fernández-Guarino M, Hernández-Bule ML, Bacci S. Cellular and Molecular Processes in Wound Healing. Biomedicines. 2023 Sep 13;11(9):2526.

Ginani F, Soares DM, Barreto MP, Barboza CA. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. Lasers Med Sci. 2015 Nov;30(8):2189-94.

Gross AJ, Jelkmann W. Helium-neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. LASERS Surg Med. 10(1):40-4, 1990.

Guirro ECO, Guirro RRJ. Fisioterapia dermatofuncional - Fundamentos, recursos e tratamentos. São Paulo. Manole, 4<sup>o</sup> edição, 2023.

Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. AIMS Biophys. 2017;4(3):337-361.

Huang YY, Sharma SK, Carrol J, Hamblin RM. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. Dose Response. 2011;9(4):602-18.

Inusa BPD, Hsu LL, Kohli N, et al. Sickle Cell Disease-Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. Int J Neonatal Screen. 2019 May 7;5(2):20.

Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low intensity laser irradiation. Laser Life Sci. 2(1):53-74, 1988.

Kashiwagi S, Morita A, Yokomizo S, et al. Photobiomodulation and nitric oxide signaling. *Nitric Oxide*. 2023 Jan 1;130:58-68.

Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, et al. Low-level 809-nm diode laser-induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 30(5):365-9, 2009.

Ladizinski B, Bazakas A, Mistry N, et al. Sickle cell disease and leg ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2012 Sep;25(9):420-8.

Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Mar 9;7:37.

Levine AB, Punihaole D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology* 2012, 122:55–68.

Leyane TS, Jere SW, Houreld SS. Cellular Signalling and Photobiomodulation in Chronic Wound Repair. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 18;22(20):11223.

Lisk C, Cendali F, Pak DI, et al. Moderate hypoxia induces metabolic divergence in circulating monocytes and tissue resident macrophages from Berkeley sickle cell anemia mice. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Jul 12;10:1149005

Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38:1237–1243.

Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005 Nov;15(11):599-607.

Mazini L, Rochette L, Admou B, et al. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 14;21(4):1306.

Mignon C, Uzunbajakava NE, Pellicena IC, et al. Differential response of human dermal fibroblast subpopulations to visible and near-infrared light: Potential of photobiomodulation for addressing cutaneous conditions. *Lasers Surg Med*. 2018 Oct;50(8):859-882.

Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Jun 19;9(1):168.

Monfort JB, Senet P. Leg Ulcers in Sickle-Cell Disease: Treatment Update. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2020 Jun;9(6):348-356.

Moravej FG, Amini A, Farahani RM, et al. Photobiomodulation, alone or combined with adipose-derived stem cells, reduces inflammation by modulation of microRNA-146a and interleukin-1 $\beta$  in a delayed-healing infected wound in diabetic rats. *Lasers Med Sci*. 2023 May 27;38(1):129.

Na S, TruongVo T, Jiang F, et al. Dose analysis of photobiomodulation therapy on osteoblast, osteoclast, and osteocyte. *J Biomed Opt*. 2018 Jul;23(7):1-8.

Nair HKR, Chong SSY, Selvaraj DDJ. Photobiomodulation as an Adjunct Therapy in Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2023 Jun;22(2):278-282.



Olsson M, Järbrink K, Divakar U, Bajpai R, Upton Z, Schmidtchen A, Car J. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a protocol for a systematic review. *Wound Repair Regen.* 2019 Jan;27(1):114-125.

Pagin MT, de Oliveira FA, Oliveira RC, Sant'Ana AC, de Rezende ML, Greggi SL, Damante CA. Laser and light-emitting diode effects on pre-osteoblast growth and differentiation. *Lasers Med Sci.* 2014 Jan;29(1):55-9.

Parenti SI, Tschon M, Sartori M, et al. Evidence from systematic reviews on photobiomodulation of human bone and stromal cells: Where do we stand? *Arch Biochem Biophys.* 2020 May 30;685:108333.

Penatzer JA, Srinivas S, Thakkar RK. The role of macrophages in thermal injury. *Int J Burns Trauma.* 2022 Feb 15;12(1):1-12. eCollection 2022.

Pinto VM, Franceschi L, Gianesin B, et al. Management of the Sickle Cell Trait: An Opinion by Expert Panel Members. *J Clin Med.* 2023 May 12;12(10):3441.

Ramasasthy SS. Chronic problem wounds. *Clin Plast Surg.* 1998 Jul;25(3):367-96.

Sahu T, Verma HK, Ganguly S, et al. Common, But Neglected: A Comprehensive Review of Leg Ulcers in Sickle Cell Disease. *Adv Skin Wound Care.* 2021 Aug 1;34(8):423-431.

Silva PAV, Anjos LMJ, et al. Photobiomodulation can alter mRNA levels cell death-related. *Lasers Med Sci.* Sep;34(7):1373-1380, 2019.

da Silva TG, Ribeiro RS, Mencialha AL, de Souza Fonseca A. Photobiomodulation at molecular, cellular, and systemic levels. *Lasers Med Sci.* 2023 Jun 13;38(1):136.

Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM. Pathophysiology of sickle cell disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2019 14:263–292.

Tsai HW, Wang PH, Tsui KH. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Feb; 1(2): 142–149.

Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009 Sep-Oct;37(5):1528-42.

Vitoriano NAM, Mont'Alverne DGB, Martins MIS, et al. Comparative study on laser and LED influence on tissue repair and improvement of neuropathic symptoms during the treatment of diabetic ulcers. *Lasers Med Sci.* 2019 Sep;34(7):1365-1371.

Wang Y, Huang YY, Wang Y, Lyu P, Hamblin MR. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810nm and 980nm lasers operates via different mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* Feb;1861(2):441-449, 2017.

Wang Z, Zhao F, Xu C, et al. Metabolic reprogramming in skin wound healing. *Burns Trauma.* 2024 Jan 2;12:tkad047.

Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biol.* 2020 Sep;10(9):200223.

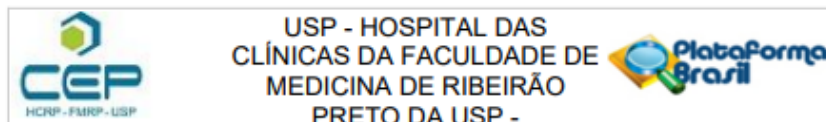
Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *J Biomed Opt.* 2018 Dec;23(12):1-17.

Zhu M, Cao L, Melino S, et al. Orchestration of Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Inflammation During Wound Healing. *Stem Cells Transl Med.* 2023 Sep 15;12(9):576-587.



## *Anexos*

## ANEXO A



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência da Fotobiomodulação e Estimulação Elétrica em Células Mesenquimais Multipotentes de Tecido Adiposo In Vitro.

**Pesquisador:** ANA PAULA FERRO

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 18691919.3.0000.5440

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.842.162

#### Apresentação do Projeto:

Resumo:

Feridas cutâneas em membros inferiores podem surgir como complicações relacionadas a anemia falciforme. Células-tronco indiferenciadas podem se diferenciar em vários tipos de células para reparar tecidos lesados. A fotobiomodulação e estimulação elétrica podem promover a proliferação e diferenciação de células estaminais. O objetivo do estudo é investigar o efeito de diferentes parâmetros de fotobiomodulação com Laser, LED, e estimulação elétrica em células-tronco mesenquimais (CTMs), multipotentes derivadas do tecido adiposo e fibroblastos de indivíduos com e sem anemia falciforme, sobre a proliferação e as possíveis alterações morfológicas nucleares em células tronco mesenquimais. Métodos: células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo serão submetidas a aplicações de Laser de baixa intensidade (660 nm e 830 nm; com doses de 1 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>, potências de 30 mW e 100 mW), LED (630 nm e 850 nm, com frequência variável de 0 a 1500 Hz e doses de 1 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>). A estimulação elétrica será com corrente pulsada 100 V, 100 µs, com 10 Hz e 100 Hz. O ensaio azul de tripan será utilizado para a avaliação da viabilidade celular, e curvas de crescimento serão usadas para avaliar a proliferação das células em zero, 24, 48, e 72 horas. Alterações nucleares serão avaliadas por coloração com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindolo) em 72 horas. Para a análise estatística, em caso de distribuição normal, será aplicado o teste ANOVA seguido de Tukey. Caso os dados não

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.842.162

apresentem distribuição normal será utilizado o KruskalWallis, seguido do teste de Dunn. O processamento dos dados será efetuado pelo software SPSS (Chicago, IL, USA), versão 17.0, sendo fixado o nível crítico de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a influência da fotobiomodulação e estimulação elétrica em células mesenquimais multipotentes de tecido adiposo e fibroblastos *in vitro*.

Objetivo Secundário:

Analisar e comparar a cinética celular das CTMs-TA submetidas à irradiação do Laser com comprimentos de onda de 660 nm e 830 nm, potências de 30 mW e 100 mW, densidade de energia de 1 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup>, de indivíduos normais e pacientes portadores de AF. Analisar

e comparar a cinética celular das CTMs-TA submetidas a irradiação do LED com comprimento de onda de 630 nm e 850 nm, com frequência

variável dentro da faixa de 0 a 1500 Hz e densidade de energia de 1 J/cm<sup>2</sup>, 4 J/cm<sup>2</sup> e 10 J/cm<sup>2</sup> de pacientes normais e portadores de AF. Analisar e

comparar a cinética celular das CTMs-TA submetidas a estimulação elétrica de alta voltagem com corrente pulsada 100 V, 100 µs, 100 Hz e curta

voltagem com corrente pulsada 300 V, 10-40 µs, 1000 Hz e 100-170 µA de pacientes normais e portadores de AF. Analisar a influência do

sobrenadante produzido pelas CTMs-TA submetidos a diferentes estímulos, sobre a migração de fibroblasto *in vitro* de pacientes normais e de

portadores de AF. Analisar citocinas e fatores de crescimento presentes no meio sobrenadante produzido pelas CTMs-TA em culturas de fibroblastos normais e de portadores de AF. Analisar as alterações nucleares avaliadas por coloração com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindolo) em 72 horas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Poderá haver algum desconforto e pequeno risco inerente ao procedimento de biopsia e da lipoaspiração, caso isso aconteça, a equipe médica será imediatamente comunicada para que tome as providências necessárias.

Benefícios:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 02 de 05



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.842.162

O estudo não apresenta benefícios imediatos para os pacientes, entretanto, poderá produzir informações fundamentais para intervenções terapêuticas com maior eficácia. Busca de protocolos mais eficientes e padronizados, para aplicabilidade clínica para o tratamento de feridas cutâneas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Metodologia Proposta:**

3.1 Considerações éticas O estudo será submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) para análise. Os experimentos serão desenvolvidos no Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP. 3.2 Cultura celular Todos os pacientes serão esclarecidos sobre o propósito da pesquisa e ao concordarem em

participar do estudo, assinarão o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A). As amostras de tecido adiposo serão conseguidas de pacientes saudáveis, através do processo de lipoaspiração. Os fibroblastos vão ser coletados de três pacientes portadores de anemia falciforme que apresentam úlcera de membro inferior, por meio de amostras de pele retirada com biópsia tipo "punch" de 6 mm sob anestesia local. 3.3 Cinética celular in vitro A avaliação da cinética de culturas e da capacidade proliferativa de CTMs-TA, será através do plaqueamento das células em triplicata com densidades iguais. Após atingirem 80% da confluência celular, as células serão tripsinizadas e realizada a contagem, para determinação da taxa de duplicação, com auxílio do analisador hematológico (Auto Hematology Analyser BC-2800 Mindray®). A cinética será analisada baseada no tempo estimado para que ocorra a divisão celular ("doubling time" ou DT) e será calculada por meio da fórmula  $DT = \frac{\ln(2)}{\ln(N/N_0)}$ , sendo N o número final de células obtidas e  $N_0$  o número inicial de células plaqueadas e t o tempo em dias que as células ficarão em cultura. 3.4. Sobrenadante derivado das CTMs-TA Serão descongelados os frascos que contém CTMs-TA, que serão obtidas após o cultivo in vitro de amostras de tecido adiposo. Cada frasco com CTMs-TA vai ser semeado em 2 garrafas de 175 cm<sup>2</sup>, possuindo MEM+ 15% de SFB. Após esse procedimento será realizado a tripsinização e contagem celular. As CTMs-TA serão plaqueadas com a concentração de  $1 \times 10^6$  em placas de 100 mm<sup>3</sup>. Será realizada a troca do meio, com PBS 1x e adicionado 5 mL de MEM+ 1% de SFB e permanecerá por 48 horas em cultura. Em seguida os sobrenadantes centrifugados serão coletados, centrifugados, filtrados 0,22 µm e separados em alíquotas de 2 mL por frasco, logo após serão acomodados em tubos criogênicos (Greiner Bio-One Frickenhausen, Alemanha) e congelados -80 °C, no período de 24 horas e em seguida serão transferidos para o nitrogênio líquido. 3.5 Isolamento e cultura de fibroblastos. As amostras de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 03 de 05



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.842.162

pele que serão coletadas de indivíduos saudáveis e com AF serão colocadas em meio estéril de tampão de cordão umbilical e enviadas ao laboratório de Terapia Celular do Hemocentro HCFMRPUSP, onde serão lavadas com meio DMEM+ antibióticos e os tecidos fragmentados serão transferidos para placas de 100 mm, em meio DMEM + 20% de SFB para cultura celular. Em seguida do cultivo dos fibroblastos, os mesmos serão coletados e congelados por alíquotas em frascos. Após determinado tempo os frascos serão descongelados e o conteúdo dividido em duas garrafas de 175 cm<sup>3</sup> em meio DMEM + 10% SFB. Em seguida será efetuada trypsinização, contagem celular e redistribuição celular de 2x10<sup>5</sup> em cada poço das placas de 6 poços. No momento em que as células atingirem a confluência, será realizado scratch, seguido da lavagem com PBS 1+ para retirada do meio e das células não aderentes. Ocorrerá a divisão das placas em grupos, controle e experimental. Para o grupo experimental será adicionado 1 mL do meio MEM+ 1% SFB com 1mL de sobrenadante obtido do cultivo das CTMs-TA. As placas serão levadas para realizar os estudos de migração celular, de forma que cada placa contenha dois tipos de fibroblastos e cada tipo ocupando fileira de três poços. 3.6 Scratch O ensaio de cicatrização será efetuado com modelo scratch assay ou método de avaliação de cicatrização de feridas in vitro, que envolve um arranhão na camada de célula, para criar uma lesão artificial, com o uso de pipeta. A migração celular será analisada e monitorada até a comp

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram corrigidos.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 4 -06/02/2020, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 4 -06/02/2020, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 04 de 05





USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.842.162

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1348007.pdf	06/02/2020 10:20:41		Aceito
Outros	RespostaCEP4.docx	06/02/2020 10:19:53	ANA PAULA FERRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	06/02/2020 10:19:22	ANA PAULA FERRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.docx	06/02/2020 10:18:57	ANA PAULA FERRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto4.docx	06/02/2020 10:18:32	ANA PAULA FERRO	Aceito
Outros	MATERIALUTILIZADO.docx	11/11/2019 11:51:26	ANA PAULA FERRO	Aceito
Orçamento	UPC.pdf	08/08/2019 19:27:23	ANA PAULA FERRO	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	07/05/2019 15:19:54	ANA PAULA FERRO	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	07/05/2019 15:03:16	ANA PAULA FERRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Fevereiro de 2020

Assinado por:  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900  
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO  
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 05 de 05

