

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

**ANA LAURA MARTINS DE ANDRADE**

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO A LASER (660nm) ASSOCIADA ÀS  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM QUEIMADURAS DE ESPESSURA  
TOTAL: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

**SÃO CARLOS**

**2019**

**ANA LAURA MARTINS DE ANDRADE**

**EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO A LASER (660nm) ASSOCIADA ÀS  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM QUEIMADURAS DE ESPESSURA  
TOTAL: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisioterapia da Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Coorientadora: Dra. Patrícia Brassolatti

**SÃO CARLOS-SP  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Ana Laura Martins de Andrade, realizada em 03/12/2019:

---

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto  
UFSCar

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinfildi  
UNIFESP

---

Prof. Dr. Cleber Ferraresi  
USC

(on line)

---

Profa. Dra. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro  
USP

---

Profa. Dra. Mariana Árias Avila Vera  
UFSCar

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) processo 2015/ 17648-9.

*Dedico esse trabalho aos meus pais  
**Arioswaldo e Juçara** por serem meus  
maiores incentivadores pela busca  
constante de conhecimento e por serem  
sempre meu porto seguro.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*Agradeço com toda admiração e respeito o Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto por desde o início acreditar, incentivar e apoiar meus caminhos. Uma pessoa grandiosa em conhecimento profissional e pessoal, um exemplo de humildade e inteligência. Obrigada pela oportunidade de aprender e evoluir tanto academicamente e como ser humano. Meu eterno agradecimento ao senhor.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, maior fonte de força espiritual, por trilhar meus caminhos, entregar meu destino nas mãos de pessoas tão especiais e por me conduzir nessa caminhada com discernimento e força.*

*Aos meus pais **Arioswaldo R. de Andrade** e **Juçara Maria M. de Andrade**, por me apoiarem e acreditarem em mim até mesmo nos momentos que nem eu acreditava. Minha base e exemplos de sabedoria e honestidade. Obrigada por todo carinho, amor e por muitas vezes olharem os meus sonhos antes mesmos dos seus.*

*Aos meus irmãos **Rita de Cássia M. de Andrade Maquiaveli** e **Arioswaldo M. de Andrade**, meus melhores amigos, onde sempre encontrei conforto e os maiores incentivadores da minha carreira profissional. Agradeço a paciência e por cada conselho ou palavra principalmente nos momentos mais difíceis.*

*A minha sobrinha **Isabela A. Maquiaveli**, que chegou em um momento ímpar em nossas vidas e trouxe amor e esperança em cada sorriso e palavra. E a **Ana Maria de Paula**, exemplo de força e uma das responsáveis pela minha criação, agradeço por todo amparo e atenção.*

*Aos meus tios **Katia** e **Wladimir Fagioli**, **Oswaldo Martins** e **Andreia Duarte**, primos **João**, **Gustavo** e **Filipe** e ao meu cunhado **Filipe Maquiaveli** por sempre me ouvirem, apoiarem e torcerem pelas minhas conquistas.*

*As amigas-irmãs que essa trajetória me trouxe, **Larissa Nascimento**, **Julia Parisi**, **Patricia Brassolatti**, **Albaiza Otterço** e **Érika Rampazo**. A vida me trouxe amigos os quais fiz muitas vezes de família. Obrigada por compartilharem comigo os momentos de alegrias e dificuldades, por serem muitas vezes o folego que me faltava.*

*Ao **Murilo Silveira**, que sempre se fez presente por onde fosse minha caminhada. Obrigada por todo carinho, paciência, apoio e por me incentivar a ser eu mesma sempre. Agradeço por hoje fazer parte da minha vida de maneira tão especial.*

*Aos amigos de S. J. do Rio Pardo e São Carlos por sempre estarem junto a mim independentemente de onde eu estivesse: **Juliana, Fernanda, Amanda, Luzia, Naiara, Julia Manzini, Cintia Martignago Genoveva, Maria Carolina, Daiana, Cássia, Lia Mara, Adria, Mariana, Tatmatsu, Gaby e Fer Duarte.***

*A todos os amigos que passaram pelo **Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos (LAREF)** durante esses anos e contribuíram para meu crescimento acadêmico e pessoal.*

*A todos os **professores do Departamento de Fisioterapia**, em especial a **Dra. Mariana Arias Avila Vera**, que contribuíram para minha formação, e sempre estiveram dispostos a me auxiliar quando necessário.*

*Aos funcionários do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, em especial a **Iolanda S. Vilela e Emerson Trevisan.***

*Aos professores, **Dr. Richard E. Liebano, Dra. Fernanda F. Anibal, e Dr. Paulo Sérgio Bossini**, profissionais com grande conhecimento científico e exemplos de humildade da carreira acadêmica. A vocês minha admiração.*

*Aos professores e supervisores do **3B's Research Group**, em especial a **Profa. Dra. Alexandra Marques e Dra. Lucília Silva** por todo apoio e dedicação ao meu trabalho durante minha passagem por Portugal.*

*Aos amigos de Portugal, **Mariana, Joana, Maria, Daniel, Nuno, José, Thais, Luana, Lisiane e Ingrid** por me ampararem e fazerem com que a saudade do Brasil fosse amenizada durante todo meu intercâmbio.*

*Aos professores, **Dra. Angela M. de Oliveira Leal e Dr. Marco Andrey C. Frade** pelas grandes contribuições a este projeto e pela disponibilidade de seus laboratórios.*

*Aos membros da banca de qualificação e defesa pela disponibilidade e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio dado ao presente trabalho.*

*Em especial, a Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida (2015/17648-9).*

*A todos que compartilharam, torceram e conviveram comigo nesses anos,*

*Muito Obrigada!*

*“Todo caminho da gente é resvaloso.  
Mas, também, cair não prejudica demais.  
A gente levanta, a gente sobe, a gente volta!  
O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim:  
Esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,  
Sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria,  
E ainda mais alegre no meio da tristeza...”*

João Guimarães Rosa – Grande Sertão Veredas

## RESUMO

DE ANDRADE, A.L.M. Efeitos da fotobiomodulação a laser (660nm) associada às células tronco mesenquimais em queimaduras de espessura total: estudo *in vitro* e *in vivo*. 2019. 162p. Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.

A queimadura é definida como uma lesão traumática de origem térmica que acomete os tecidos orgânicos e pode ser classificada de acordo com a camada de pele atingida. Levando em consideração a complexidade do processo de reparo tecidual envolvido nesse tipo de lesão, o tratamento de queimaduras sempre foi um desafio tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações. De acordo com a literatura, a utilização da terapia por fotobiomodulação a laser (FBM) no tratamento de queimaduras, especialmente em fases iniciais do processo, promove uma melhor cicatrização e menor tempo de reparo. Outra grande área que vêm sendo investigada para o tratamento de lesões cutâneas e tem se destacado no ramo da engenharia tecidual é a utilização de células-tronco, em especial as mesenquimais. Acredita-se que a associação de ambas as terapias são capaz de acelerar o processo de reparação tecidual de queimaduras, de forma a estimular a proliferação celular e auxiliar a formação de um tecido de qualidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da FBM a laser (660nm) na proliferação de células-tronco mesenquimais (CTMs); identificar os mecanismos biológicos envolvidos na ação da FBM a laser; estabelecer um modelo experimental eficaz de queimadura de espessura total; e investigar a associação das técnicas (FBM e CTMs) no tratamento de queimadura de espessura total. Para isso foram realizados quatro estudos, sendo dois *in vitro* e dois estudos *in vivo*. Para a realização dos estudos *in vitro* foram realizados cultivos bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D), sendo utilizado células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASCs) e a FBM a laser com três diferentes energias (1 J, 2 J e 6 J), sendo assim realizado quatro grupos para o cultivo 2D e quatro grupos para o cultivo 3D. Ressalta-se que para o cultivo 3D foi utilizado um hidrogel esponjoso de gellan gum. Foram avaliados para ambos os cultivos a viabilidade, proliferação celular, espécie reativas de oxigênio (EROs) e o mediador inflamatório interleucina-8 (IL-8). Os estudos *in vitro* concluíram que a FBM a laser é capaz de estimular a proliferação das hASCs, além de manter a viabilidade das mesmas, dependendo da energia empregada em ambos os cultivos, além de contribuir diretamente para a estimulação de EROs e atuar na modulação da IL-8 no cultivo 3D. Para os estudos *in vivo* foram utilizados 114 ratos, da linhagem Wister, sendo 18 para o primeiro estudo e 96 para o segundo. Para o primeiro estudo, foi realizado o modelo de

queimadura por ferro de solda, com temperatura de 150°C e os animais foram aleatorizados em três grupos, G5: realização da queimadura com 5 segundos de contato do ferro de solda; G10: realização da queimadura com 10 segundos de contato do ferro de solda; e G20: realização da queimadura com 20 segundos de contato do ferro de solda. Foram realizadas análises histopatológicas que concluíram que independente do tempo de aplicação, todos os grupos resultaram em uma queimadura de espessura total. Para o segundo estudo in vivo, os animais foram distribuídos ao acaso em quatro grupos: GC: grupo controle, GL: animais tratados com a FBM a laser (660nm) e 2 J de energia, GCT: animais tratados com CTMs e GLCT: animais tratados com a associação da FBM a laser (660nm e 2 J de energia) e CTMs. Os grupos tratados pela FBM a laser receberam as irradiações três vezes por semana, em dias alternados durante 21 dias. Os grupos tratados com CTMs receberam dez aplicações das células em volume total de 600µL logo após a indução da queimadura. Foi realizado o monitoramento fotográfico nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após o início do experimento para avaliar o grau de contração da lesão. Os animais foram sacrificados em quatro períodos distintos (3°, 7°, 14° e 21° dia após o procedimento experimental) sendo realizada a coleta de sangue e dos tecidos para posterior análises histológica, imunohistoquímica, imunoenzimática e de birrefringência. O estudo concluiu que a associação das CTMs com a FBM a laser foi eficaz para acelerar o processo de reparo e formar um tecido cutâneo de qualidade.

**Palavras-chave:** queimadura; fotobiomodulação; laserterapia; células-tronco.

## ABSTRACT

DE ANDRADE, A.L.M. Effects of laser photobiomodulation (660nm) associated with mesenchymal stem cells on full thickness burns: in vitro and in vivo study. 2019. 162p. Physiotherapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos-SP.

Burning, a traumatic lesion of thermal origin affects organ tissues and may be classified according to the layers of affected tissue. The complexity of the tissue repair process has always made burning treatment a challenge, not only due to its severity but also due to its multiple complications. Photobiomodulation (PBM) therapy for burning, especially in the initial phases of the process, promotes better healing and shorter repair time. The use of stem cells is an area of cutaneous lesion treatment that has been greatly explored and has shown progress in the field of tissue engineering, especially with mesenchymal stem cells. The association of both therapies is believed to accelerate the burned tissue repair process, stimulating cell proliferation and aiding the growth of a tissue of quality. Thus, this study aimed to evaluate the laser PBM therapy (660nm) action on the mesenchymal stem cells (MSC) proliferation; identify the biological mechanisms involved in the laser PBM action; establish an efficient experimental model for full thickness burn; and investigate the association of the techniques (PBM and MSCs) on the treatment of full thickness burns. Thus, we performed four studies, two *in vitro* and two *in vivo*. The *in vitro* studies were performed with two (2D) and tri (3D) dimensional cultures, using mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (hASCs) and laser PBM with three different energies (1J, 2J and 6J), with four groups for 2D cultures and four groups for 3D cultures. The 3D culture used a gellan gum spongy-like hydrogel. In both cultures we evaluated the viability, cell proliferation, reactive oxygen species (ROSs) and the inflammatory mediator interleukin-8 (IL-8). The *in vivo* studies concluded that laser PBM stimulates hASCs proliferation, in addition to maintaining their viability, depending on the energy used in both cultures; in addition to contributing directly to the stimulation of the ROSs and acting in the IL-8 modulation in the 3D culture. The *in vivo* studies utilized 114 Wistar mice, 18 for the first and 96 for the second study. The first study was performed with the soldering iron burn method, with temperature of 150 °C. The animals were randomized in three groups, G5: burned with 5 seconds of contact with the soldering iron; G10: burned with 10 seconds of contact with the soldering iron; and G20: burning with 20 seconds of contact with the soldering iron. Histopathological analysis concluded that all groups resulted in full thickness burn, regardless of the time of application. For the second *in vivo* study, the animals were randomly distributed

in four groups: CG: control group, LG: animals treated with laser PBM (660 nm) and 2 J of energy, TCG: animals treated with MSCs and GLCT: animals treated with laser PBM (660 nm and 2J of energy) plus MSCs). The groups treated with laser PBM received irradiations three times a week, in alternated days, for 21 days. The groups treated with MSCs received ten applications of cells in a total volume of 600  $\mu$ L right after the burning. We performed photographic monitoring in the periods of 3, 7, 14 and 21 days after the beginning of the experiment to evaluate the lesion contraction. Animals were euthanized in four distinct periods (3, 7, 14 and 21 days after the experimental procedure) and we collected blood and tissue for further histological, immunohistochemistry, immunoenzyme and birefringence analyses. We conclude that the association of MSCs and laser PBM was an efficient method to accelerate the repair process and formation of cutaneous tissue of quality.

**Keywords:** burn; photobiomodulation; lasertherapy; stem cells.

## LISTA DE FIGURAS

### CONTEXTUALIZAÇÃO

**Figura 1: Zonas da queimadura.** Classificação atribuída por Jackson em 1953 com relação as alterações locais causadas por queimaduras.....32

**Figura 2: Esquematização dos possíveis mecanismos de ação da FBM com laser nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho.** Absorção dos fótons de luz pela mitocôndria, mais especificamente no citocromo c oxidase ou por fotorreceptores da membrana plasmática das células seguido da cascata de eventos ocasionados pela transformação da energia luminosa em energia metabólica como aumento do ATP e NO estimulando a proliferação, migração e adesão celular.....36

**Figura 3: Ilustração esquemática da Lei de Arndt-Schultz sobre a resposta bifásica da FBM** .....37

### ESTUDO I

**Figura 1: Irradiação com a FBM.** Laser InGalP (Photon Laser III, DMC®) acoplado a um suporte para manutenção da fixação do aparelho. Placa de 24 poços, com distância de 3.34cm da ponta da caneta ao fundo do poço.....61

**Figura 2:** Avaliação do crescimento celular através do ensaio azul de trypan, em diferentes momentos. (\*) Diferença significativa ( $p < 0.05$ ) .....63

**Figura 3:** Atividade mitocondrial de culturas celulares, submetidas ou não à FBM, com diferentes energias, em diferentes momentos. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) .....64

### ESTUDO II

**Figura 1: Preparação do hidrogel esponjoso GG-RGD e cultivo celular.** Associação dos compostos de gellan gum com RGD seguido da elaboração do hidogel a partir de um *punch* com 5mm de diâmetro e incorporação das células ao hidrogel mantidos em cultura com meio  $\alpha$ -mem.....79

**Figura 2: Linha do Tempo:** Projeto experimental de irradiação FBM e coleta de amostras para posterior análise.....81

**Figura 3 - Viabilidade de hASCs após FBM (2D e 3D).** **A)** Viabilidade de hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas pelo MTS. **B)** Viabilidade de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, quantificadas a partir de imagens microscópicas confocais. **C)** Porcentagem de viabilidade de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM. As células vivas foram coradas com calceína (verde) e as células mortas coradas com iodeto de propídio (vermelho). As imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Alemanha). Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:** hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.....85

**Figura 4 - Proliferação de hASCs após FBM (2D e 3D).** **A)** Proliferação de hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas por quantificação de DNA. **B)** Proliferação de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, quantificadas a partir de imagens de microscopia confocal para Ki67 e **C, D)** porcentagem de células proliferativas de hASCs sem (G5) e com (G6) -G8) exposição ao FBM. As células proliferativas são imunocoradas para ki-67 (verde) e contra-coradas com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Alemanha). G1: hASCs; G2: hASCs+FBM 1J; G3: hASCs+FBM 2J; G4: hASCs+FBM 6J; G5: hASCs+GG-RGD; G6: hASCs+GG-RGD+FBM 1J; G7: hASCs+GG-RGD+FBM 2J; G8: hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Dados expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.....87

**Figura 5 - Expressão de IL-8 após FBM (2D e 3D).** **A)** Expressão de IL-8 por hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas pelo ensaio ELISA. **B)** Expressão de IL-8 por hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, determinadas pelo ensaio ELISA. Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:**

hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Dados expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.....89

**Figura 6 - Expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS) após FBM (2D e 3D).** **A)** Expressão de EROs por hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura 2D padrão. **B)** Expressão de EROs por hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D. Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:** hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.....91

### ESTUDO III

**Figura 1: A:** Animal tricotomizado na região dorsal; **B:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 5 segundos; **C:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 10 segundos; **D:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 15 segundos.....107

**Figura 2:** Multímetro Digital Et-1110a Minipa utilizado para aferição de temperatura e aparelho de ferro de solda, placa de alumínio circular com diâmetro de 3cm.....107

**Figura 3:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. **A:** Grupo 5 segundos, necrose total da epiderme, derme, hipoderme com extensão para tecido muscular; **B:** Grupo 10 segundos, necrose total da epiderme, derme e hipoderme; **C:** Grupo 15 segundos: necrose total da epiderme, derme, hipoderme com extensão para tecido muscular.....109

### ESTUDO IV

**Figura 1: Evolução do processo de reparação tecidual.** **A:** Fotomicrografias representativas dos grupos GC, GL, GCT e GLCT ilustrando redução na área da ferida em todas as fases do processo de reparo. **B:** Cálculo da porcentagem de contração da ferida em todos os grupos e tempos experimentais. Teste de Anova *two-away* entre-grupos,  $p < 0.05$ .....130

**Figura 2: Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais.** Avaliação histopatológica nos diferentes tempos e grupos. **EP:** Epiderme; **DE:** Derme; \* Infiltrado inflamatório; ♦ Organização das fibras de colágeno.....133

**Figura 3: Análise histológica por scores.** Avaliação de infiltrado inflamatório, tecido de granulação e colágeno por escores como descritos nas tabelas 1 e 2, para todos os grupos estudados durante todo o processo de reparo. Teste de Anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa  $p < 0.05$ .....134

**Figura 4: Birrefringência do colágeno. A:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais, em diferentes tempos, referentes à birrefringência das fibras colágeno. **B:** Porcentagem da organização do colágeno e todos os grupos e períodos experimentais. Teste de Anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ . \*\*diferença significativa  $p < 0.001$ .....135

**Figura 5: Imunomarcção do colágeno tipo III. A:** Análise imunohistoquímica (40x) da expressão do Col III nos diferentes grupos e períodos experimentais. **B:** Porcentagem da expressão do Col III, teste de anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ .....137

**Figura 6: Imunomarcção do colágeno tipo I. A:** Análise imunohistoquímica (40x) da expressão do Col I nos diferentes grupos e períodos experimentais. **B:** Porcentagem da expressão do Col I, teste de anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ .....139

**Figura 7: Expressão imunoenzimática das citocinas anti e pró inflamatórias. A:** Expressão do TNF- $\alpha$ ; **B:** Expressão da IL-10, durante todo o período experimental em todos os grupos estudados. Teste de anova two-away entre-grupos, \*diferença significativa  $p < 0.05$ , \*\*diferença significativa  $p < 0.001$ .....141

## LISTA DE TABELAS

### ESTUDO I

**Tabela 1:** Parâmetros utilizados para a FBM com laser InGaP.....61

**Tabela 2:** Porcentagem de viabilidade das células-tronco (hASCs) em diferentes momentos após a FBM nos grupos estudados.....63

### ESTUDO II

**Tabela 1:** Detalhamento dos parâmetros da FBM com laser InGaALP.....80

### ESTUDO III

**Tabela 1:** Presença ou ausência das estruturas da pele e músculo.....110

### ESTUDO IV

**Tabela 1:** Lista detalhada dos parâmetros utilizados para a FBM.....124

**Tabela 2:** Escala de classificação histopatológica para avaliação de Infiltrado Inflamatório..126

**Tabela 3:** Escala de classificação histopatológica para análise semiquantitativa da expressão do colágeno e tecido de granulação.....126

**Tabela 4: Detalhamento dos anticorpos utilizados.....127**

**Tabela 5:** Média e Desvio Padrão da avaliação de contração da ferida em todos grupos e tempos estudados. Teste de Anova two-away para avaliação intra-grupos,  $p < 0.05$ .....131

**Tabela 6:** Média e Desvio Padrão da porcentagem de colágeno tipo I e todos os grupos e tempos estudados. Teste de Anova two-away intra grupos,  $p < 0.05$ .....136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

**%** = porcentagem

**µm** = micrometros

**2D** = bidimensional

**3D** = tridimensional

**ATP** = Trifosfato de Adenosina

**BMSCs** = células-tronco de medula óssea (*Bone marrow derived stem cells*)

**Ca<sup>2+</sup>** = Cálcio

**CCO** = citocromo c oxidase

**cells/cm<sup>2</sup>** = células por centímetros quadrados

**Cm** = centímetros

**cm<sup>2</sup>** = centímetros quadrados

**CO<sub>2</sub>** = Dióxido de Carbono

**Col I** = colágeno 1

**Col III** = colágeno 3

**COX-2** = Ciclo-oxigenase-2

**CTEs** = Células-tronco embrionárias

**CTMs** = Células-tronco mesenquimais

**DCFH** = 7' -dichlorodihydro fluorescein diacetate

**DE** = derme

**EDTA** = ácido etilenodiamino tetra-acético

**EP** = epiderme

**EROs** = espécies reativas do oxigênio

**EUA** = Estados Unidos da América

**FBM** = Fotobiomodulação

**g** = gramas

**G1** = Grupo

**G10** = Grupo 10 segundos

**G180** = Grupo Laser 180 J/cm<sup>2</sup>

**G2** = Grupo hASCs irradiadas com energia de 1J

**G20** = Grupo 15 segundos

**G20** = Grupo Laser 20 J/cm<sup>2</sup>

**G3** = Grupo hASCs irradiadas com energia de 2J

**G4** = Grupo hASCs irradiadas com energia de 6J

**G5** = Grupo 5 segundos

**G5** = Grupo hASCs+GG-RGD e simulação a irradiação da FBM

**G6** = Grupo hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 1J

**G7** = Grupo hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 2J

**G70** = Grupo Laser 70 J/cm<sup>2</sup>

**G8** = Grupo hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 6J

**GC** = Grupo Contole

**GCT** = Grupo células-tronco

**GG** = *Gellan Gum*

**GL** = Grupo Laser

**GLCT** = Grupo laser + células tronco

**h** = horas

**hASCs** = células-tronco de tecido adiposo humanos (*human adipose-derived stems cells*)

**hPDLSC** = células-tronco derivada de polpa dentaria humana (*Human periodontal ligament stem cells*)

**ID** = intradérmica

**IL-10** = interleucina 10

**IL-1 $\beta$**  = interleucina 1 beta

**IL-6** = interleucina 6

**IL-8** = interleucina 8

**InGalP** = Fosfato de arsênio índio gálio

**J** = Joules

**J/cm<sup>2</sup>** = Jaules por centímetros quadrados

**LLLT** = Terapia Laser de Baixa Intensidade (low level laser therapy)

**MEC** = Matriz Extracelular

**mg/kg** = miligramas por kilogramas

**mg/ml** = miligrama por mililitros

**min** = minutos

**ml** = mililitro

**MTS** = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

**MTT** = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bro-mide

**mW** = miliwatts

**mW/cm<sup>2</sup>** = miliwatts por centímetros quadrados

**nm** = nanômetros

**NO** = oxido nítrico

**°C** = graus Celsius

**PGE2** = Prostaglandina 2

**RGD** = *péptido arginine-glycine-aspartic acid*

**rpm** = rotações por minuto

**s** = segundos

**SFB** = soro fetal bovino

**TGF- $\beta$**  = Fator de transformação do crescimento beta

**TNF- $\alpha$**  = Fator de transformação do crescimento alfa

**UFSCar** = Universidade Federal de São Carlos

**w/v** = peso por volume (*weight by volume*)

**$\mu\text{L}$**  = microlitros

## APRESENTAÇÃO

---

O presente estudo foi desenvolvido sobre a orientação do Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto, no Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, fomentado com bolsa de estudo nível Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2015/17648-9.

Esta Tese foi estruturada de acordo com as normas complementares nº 002/2006 do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPGft) que possibilita a apresentação desta em formato do artigo. Sendo assim, esse trabalho está redigido em 3 partes.

A **primeira parte** é composta além dos elementos pré-textuais uma contextualização atualizada sobre os temas abordados na obra, seguido dos objetivos gerais e específicos da mesma.

Na **segunda parte** são apresentados quatro manuscritos, dois publicados e dois submetidos, sendo estes intitulados:

- “*Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells*” publicado no periódico *Lasers in Medical Science*.  
Cujos objetivos principais foram de observar a ação da fotobiomodulação a laser (FBM) nas células tronco mesenquimais (CTMs) a fim de identificar os parâmetros mais eficazes para proliferação e viabilidade deste tipo celular.
- “*Effect and mechanisms of photobiomodulation on the behavior of mesenchymal stem cells in two-dimensional and three-dimensional cultures*” submetido no periódico *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Que teve como discussão central as diferentes respostas de modelos de

cultura celular bidimensional e tridimensional, a fim de compreender melhor os mecanismos da FBM a laser nas CTMs.

- “*Alternative animal model for studies of total skin thickness burns*” publicado no periódico Acta cirúrgica Brasileira. Com principal intuito de padronizar um modelo animal de queimadura de espessura total efetivo que visasse menor sofrimento animal.

- “*Effect of photobiomodulation associated with cell therapy in the process of cutaneous regeneration in third degree burns in rats*” submetido no periódico e *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Este estudo objetivou observar técnicas inovadoras para o tratamento de queimaduras de espessura total, como a FBM a laser e a terapia celular com CTMS, quanto a qualidade de tecido neoformado além da aceleração da resolução de um processo de reparo cutâneo crítico.

A **terceira e última parte** desta tese é composta pelas considerações finais e conclusão, perspectivas futuras, anexos e apêndice.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b>	<b>28</b>
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>30</b>
1.1. Queimaduras .....	30
1.2. Fotobiomodulação a laser no Reparo Cutâneo .....	35
1.3. Células-Tronco no Reparo Cutâneo.....	39
1.4. Fotobiomodulação a laser e Células-Tronco no Reparo Cutâneo.....	41
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1. Objetivo Geral.....	44
2.2. Objetivos Específicos .....	44
<b>3. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>PARTE II</b>	<b>53</b>
<b>4. ESTUDO I.....</b>	<b>54</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	57
4.2. METODOLOGIA .....	58
4.2.1. Cultura dos hASCs .....	59
4.2.2. Irradiação com FBM .....	60
4.2.3. Delineamento .....	60
4.2.4. Citotoxicidade e Viabilidade celular .....	61
4.3. RESULTADOS .....	62
4.4. DISCUSSÃO .....	65
4.5. CONCLUSÃO .....	68

4.6. REFERÊNCIAS:	69
<b>5. ESTUDO II</b>	<b>72</b>
5.1. INTRODUÇÃO	75
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	77
5.2.1. Preparação das estruturas 3D de <i>Gellan Gum</i> com <i>arginine-glycine-aspartic acid</i> (GG-RGD)	77
5.2.2. Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Adiposas Humanas (hASCs)	78
5.2.3. Cultivo celular (hASCs)	78
5.2.4. Fotobiomodulação (FBM)	79
5.2.5. Experimental Design	80
5.2.6. Citotoxicidade e Viabilidade celular	81
5.2.7. Proliferação celular	82
5.2.8. Expressão Interleucina 8 (IL-8)	83
5.2.9. Estresse oxidativo	83
5.2.10. Análise estatística	84
5.3. RESULTADOS	84
5.3.1. Viabilidade das hASCs após FBM (2D e 3D)	84
5.3.2. Proliferação de hASCs após FBM (2D e 3D)	86
5.3.3. Expressão de IL-8 após FBM (2D e 3D)	88
5.3.4. Expressão de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) após FBM (2D e 3D)	90
5.4. DISCUSSÃO	92
5.5. CONCLUSÃO	95

5.6.	REFERÊNCIAS.....	97
<b>6.</b>	<b>ESTUDO III.....</b>	<b>102</b>
6.1.	INTRODUÇÃO .....	105
6.2.	METODOLOGIA .....	106
6.2.1.	Modelo Experimental de Queimadura de 3º grau .....	106
6.2.2.	Análise Histológica .....	108
6.2.3.	Análise Estatística .....	108
6.3.	RESULTADOS .....	108
6.4.	DISCUSSÃO .....	110
6.5.	CONCLUSÃO .....	112
6.6.	REFERÊNCIAS.....	113
<b>7.</b>	<b>ESTUDO IV .....</b>	<b>116</b>
7.1.	INTRODUÇÃO .....	119
7.2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	120
7.2.1.	Modelo experimental de queimadura de espessura total.....	121
7.2.2.	Obtenção e aplicação das hASCs .....	122
7.2.3.	Fotobiomodulação.....	123
7.2.4.	Avaliação da contração da ferida .....	124
7.2.5.	Coleta dos tecidos e eutanásia dos animais.....	125
7.2.6.	Análise Histológica .....	125
7.2.7.	Imunohistoquímica.....	126
7.2.8.	Análise de Birrefringência .....	127

7.2.9. Ensaio Imunoenzimático .....	128
7.2.10. Análise Estatística .....	128
7.3. RESULTADOS .....	129
7.4. DISCUSSÃO.....	141
7.5. CONCLUSÃO .....	145
7.6. REFERÊNCIAS.....	146
<b><u>PARTE III</u></b> .....	<b>151</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO .....</b>	<b>152</b>
<b>9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>155</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>158</b>
ANEXO I.....	159
ANEXO II.....	160
ANEXO III .....	161
ANEXO IV.....	162

## **PARTE I**

---

**1. CONTEXTUALIZAÇÃO**

**2. OBJETIVOS**

## **1. CONTEXTUALIZAÇÃO**

---

## 1.1. Queimaduras

Atualmente sabe-se que lesões por queimaduras são consideradas uma das causas mais frequentes de mortalidade e de graves incapacidades a longo prazo, tornando-se um grande problema de saúde pública (AHUJA; BHATTACHARYA, 2004). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2017 1 milhão de casos de queimaduras são notificados a cada ano no Brasil, sendo que 100.000 são atendidos em salas de emergência, 40.000 necessitam de internação hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes podem vir a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões. A literatura destaca que o perfil epidemiológico de populações com altos índices de lesionados por queimaduras está interligado com países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, atribuindo à alta densidade populacional, ao analfabetismo, às moradias precárias, pobreza, carência de campanhas públicas de educação em saúde como os principais fatores associados ao elevado índice (AHUJA; BHATTACHARYA, 2004).

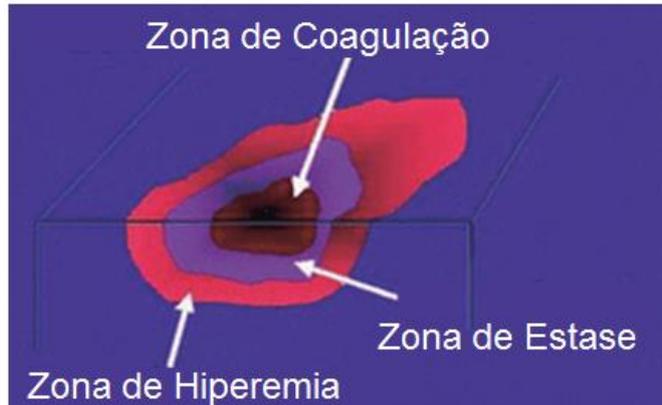
A definição de queimadura dá-se como uma lesão traumática, de origem térmica, que acomete os tecidos orgânicos e pode ser classificada de acordo com a camada de pele atingida, variando desde uma pequena bolha até formas graves, capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à extensão e à profundidade (XUE et al., 2012). Deste modo, as lesões por queimadura podem ser classificadas de acordo com a extensão atingida e a profundidade da pele prejudicada, sendo esta determinante para o tratamento e prognóstico do paciente. Essas lesões são denominadas como superficiais (1º grau), de espessura parcial (2º grau) e de espessura total (3º grau) (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010; GUIRRO; GUIRRO, 2004).

As queimaduras superficiais afetam apenas a epiderme, apresentando-se hiperemiadas, edematosas e dolorosas, retomando seus aspectos originais dentro de 5 a 7 dias. Já as queimaduras de espessura parcial podem ser subclassificadas como parcial-superficial ou parcial-profunda. A parcial-superficial acomete a epiderme e a camada superior da derme (derme papilar), sendo observado bolhas, umidade e dor acentuada, com tempo médio de

cicatrização entre 14-21 dias, que pode levar a um mínimo de tecido cicatricial (JOHNSON; RICHARD, 2003). As queimaduras parciais-profundas acometem quase toda a espessura da derme, apresentando coloração pálida e são menos dolorosas que as superficiais; o tempo necessário para cicatrização pode ser de seis semanas ou mais, e tais queimaduras deixam um tecido cicatricial que pode hipertrofiar-se e contrair-se (ANDRADE et al., 2010; EVERS et al., 2010). Nas queimaduras de espessura total, a lesão acomete toda a espessura da pele e, em alguns casos, se estende ao tecido subcutâneo, músculos e ossos, sendo caracterizadas por apresentar aspecto esbranquiçado e rígido e por não haver elementos dérmicos para regeneração. Na maioria dos casos, a recuperação para esse tipo de lesão é realizada através de cirurgias de enxerto (DE ANDRADE et al., 2017; EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010; JOHNSON; RICHARD, 2003).

A profundidade da queimadura pode não ser precisa ou facilmente determinada no primeiro dia. Durante sua evolução, uma infecção ou uma instabilidade hemodinâmica podem alterar sua profundidade. O próprio processo de reposição volêmica produz vários radicais livres que levam danos secundários adicionais aos tecidos (BARBOSA et al., 2007), sendo assim, uma lesão de espessura parcial-superficial pode evoluir para espessura total depois de 72 horas (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010).

As mudanças fisiopatológicas que ocorrem nos tecidos, causadas por queimaduras, seguem até hoje a classificação de Jackson (1953) com as três zonas de alterações locais: Zona de Coagulação, Zona de Estase e Zona de Hiperemia.



**Figura 1: Zonas da queimadura.** Classificação atribuída por Jackson em 1953 com relação as alterações locais causadas por queimaduras.

**Fonte:** modificado de EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010.

Acredita-se que a zona de coagulação no foco central da lesão consiste em um tecido desvitalizado, já a zona mais periférica é caracterizada por vasodilatação, alterações inflamatórias sem danos estrutural e recebe a denominação de zona de hiperemia. A zona de estase encontra-se em uma região mais intermediária, localizada entre a zona de coagulação e de hiperemia e possui prognóstico indeterminado (JACKSON, 1953) sendo frequentemente mais identificada em queimaduras dérmicas de espessuras parciais e totais, com características de estase vascular e isquemia.

Do ponto de vista clínico, a zona de estase é a região que apresenta alguns dos maiores desafios para tratamento, pois o tecido, apesar de ter potencial de cura, pode progredir para uma lesão de espessura total, sendo que a área isquêmica só pode ser recuperada se a revascularização for alcançada em alguns dias; caso contrário, a morte do tecido é inevitável (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010).

Após uma lesão causada por queimaduras, o organismo inicia o processo de reparação tecidual, sendo esse dividido em três fases: inflamatória/exsudativa, proliferativa e de maturação/remodelamento. A fase inflamatória tem início imediatamente após a lesão, onde

ocorre a formação de uma rede de fibrina e migração de neutrófilos, linfócitos e, posteriormente, macrófagos, que são responsáveis pela eliminação das células desvitalizadas. Adicionalmente, também ocorre o aumento de citocinas inflamatórias como fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e prostaglandina 2 (PGE2). A fase proliferativa, responsável pela formação do tecido de granulação, pode ser dividida em três subfases, reepitelização, fibroplasia e angiogênese. A primeira é caracterizada pelo processo de migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes para o local da lesão; a fibroplasia é responsável pela proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas de caráter estrutural; já a última subfase tem como ação principal a formação de novos vasos, que darão suporte ao desenvolvimento da nova matriz. Ainda nessa fase ocorre o início do fenômeno de contração da lesão realizado pelos miofibroblastos. Por fim, a fase de maturação ou remodelamento, é configurada pela substituição do colágeno tipo III pelo tipo I, absorção de água e diminuição do número de vasos, com duração de 6 meses ou mais (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; GALLIOT et al., 2017).

No decorrer do processo de reparo, os pacientes que sofreram algum tipo de queimadura, podem desenvolver complicações em consequência do tempo necessário para o tratamento, e consequentemente a cura. A pele íntegra é a maior barreira contra infecções de microrganismos que o corpo humano possui, porém, na queimadura, o equilíbrio da microbiota da pele íntegra é modificado, o que facilita o estabelecimento e proliferação de bactérias patogênicas que pode ocasionar diversas complicações, como quadro de sépsis (AZEVEDO et al., 2002; HUEBINGER et al., 2010).

Para um melhor entendimento sobre a fisiopatologia envolvida nas lesões por queimaduras, diversos modelos experimentais são descritos com objetivo de exemplificar os processos biológicos que ocorrem durante a cicatrização, além de serem frequentemente utilizados para observar a eficácia e os mecanismos de ação de diversos tratamentos

(ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). Os modelos apresentados na literatura incluem: contato direto com metal aquecido (VENTER et al., 2015), eletricidade (ZELT et al., 1988) e escaldadura (água aquecida) (DAHIYA, 2009). Já é de consenso nos estudos que o modelo realizado com eletricidade é de alta complexidade de execução, e geralmente requerem animais maiores. Com relação ao modelo de escaldadura, a falta de precisão da profundidade associada a dificuldade de limitação da área impedem o detalhamento do tipo de queimadura. Assim, o modelo com metal aquecido é mais explorado, pela facilidade de execução, queima precisa com profundidade constante e delimitação de área. Devido a profundidade ser o principal determinante do prognóstico deste tipo de lesão, o modelo de queimadura por placa aquecida deve possuir parâmetros bem determinados para o sucesso da técnica. Assim o estabelecimento da temperatura, do tempo de exposição e da pressão de contato são imprescindíveis, porém nota-se dados muitas vezes controversos na literatura com relação a padronização desses determinantes (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014; VENTER et al., 2015).

Dentro deste âmbito o tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem, como citado anteriormente. As lesões que atingem além da derme reticular são tratadas de forma mais cautelosa, pois o risco de infecção é maior, com possibilidade de amputações (CRISÓSTOMO et al., 2004; RAHMANIAN-SCHWARS et al., 2012).

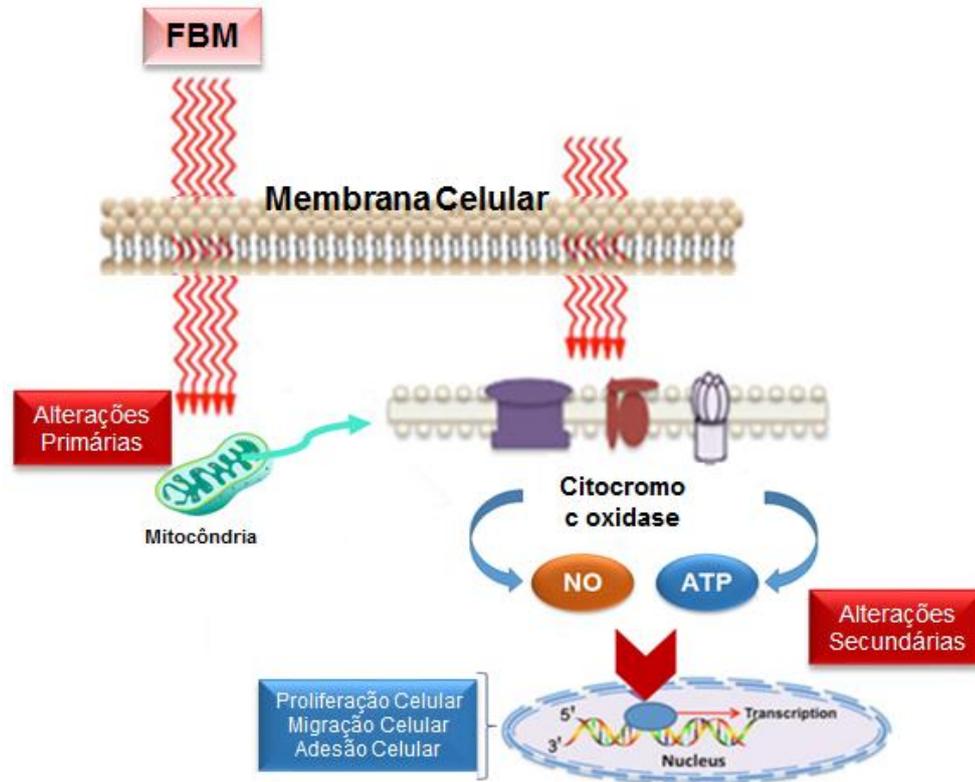
Muitas são as opções cirúrgicas descritas na literatura para recobrir o leito da ferida, todavia, embora os enxertos de pele continuem sendo o padrão utilizado para o fechamento rápido e permanente de queimaduras de espessura total é necessário que haja uma neovascularização no local para garantir a efetividade dessa cirurgia (SANCHEZ, 2017). Além disso, a cirurgia de enxerto muitas vezes evolui com formação de cicatrizes hipertróficas, fibrose grave e adesão tecidual. Estudos demonstram que essa neovascularização, bem como a

melhora da cicatrização, podem ser favorecidas com a utilização da terapia por fotobiomodulação a laser (FBM) (BRASSOLATTI et al., 2016).

## **1.2. Fotobiomodulação a laser no Reparo Cutâneo**

A FBM a laser caracteriza-se por ser uma forma de fototerapia que envolve a aplicação de luz monocromática e coerente de baixa potência em vários tipos de lesões. Nas últimas décadas tem se destacado devido ao sucesso quando utilizada para induzir a cicatrização, reparação de feridas complexas e aumento da vascularização local (HAWKINS; HOURELD; ABRAHAMSE, 2005; MARTIGNAGO et al., 2018; OTTERÇO et al., 2018). Seu êxito deve-se a amplos efeitos sobre os diferentes tecidos, entre os quais se destacam os efeitos trófico-regenerativos, moduladores da resposta inflamatória e analgésicos, observado em estudos tanto *in vitro* como *in vivo* (CARVALHO et al., 2003; EDUARDO et al., 2008; SOBANKO et al., 2008, de ANDRADE et al., 2017).

Os mecanismo de ação envolvidos na FBM ainda não foram totalmente elucidados. A literatura demonstra que a FBM possui uma ampla gama de efeitos a nível molecular, celular e tecidual (FREITAS; HAMBLIN, 2017). Karu (1987), apresenta que a base das hipóteses para esclarecer esses mecanismos de ação está na absorção da energia luminosa por cromóforos mitocondriais, em especial a citocromo c oxidase (CCO). Acredita-se que a energia absorvida é convertida em energia metabólica, sendo esta utilizada na cadeia respiratória ocasionando a ativações da cadeia de transporte de elétrons e o aumento da produção de ATP. Conseqüentemente, uma cascata de eventos ocorre nas mitocôndrias, que leva a bioestimulação de vários processos como a mudança na concentração de espécies reativas de oxigênio (EROS), do Cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e do óxido nítrico (NO) (Figura 1).

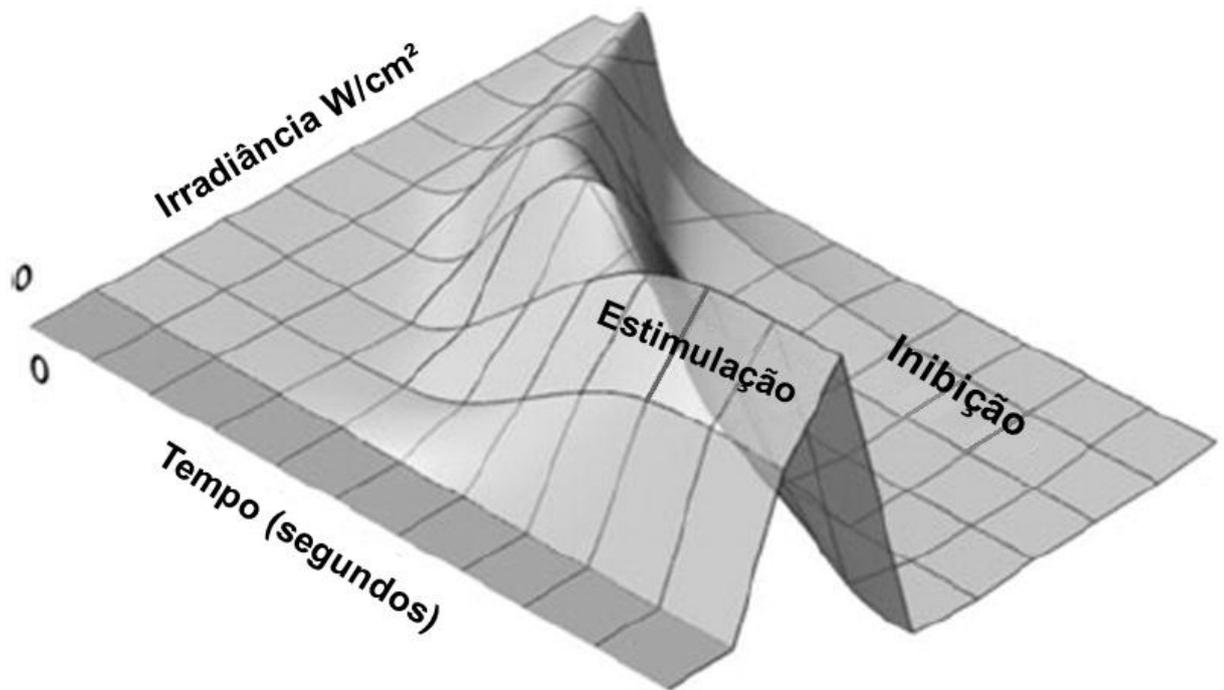


**Figura 2:** Esquematização dos possíveis mecanismos de ação da FBM com laser nos comprimentos de onda vermelho e infravermelho. Absorção dos fótons de luz pela mitocôndria, mais especificamente na citocromo c oxidase ou por fotorreceptores da membrana plasmática das células, seguido da cascata de eventos ocasionados pela transformação da energia luminosa em energia metabólica como aumento do ATP e NO estimulando a proliferação, migração e adesão celular.

**Fonte:** Modificada de OTTERÇO et al.,2018

Para que a FBM promova de fato a fotobioestimulação o conceito de janela-terapêutica é frequentemente discutido na literatura. Esse conceito está estritamente relacionado com a Lei de Arndt-Schultz que prediz que as células modificam sua atividade biológica em função da quantidade de estímulo aplicado, ou seja, o efeito da FBM é dose-dependente dos parâmetros utilizados, podendo ser observado bioestimulação quando aplicado doses adequadas (Figura

2b), inibição quando utilizado doses altas (Figura 2c) e ainda pode-se não observar nenhuma reação se a dose empregada for muito baixa (Figura 2a) (HUANG et al., 2011).



**Figura 3: Ilustração esquemática da Lei de Arndt-Schultz sobre a resposta bifásica da FBM.**

Fonte: Adaptado de CHUNG et al., 2012.

O uso potencial dos lasers na biomodulação do reparo cutâneo, por meio de suas propriedades fotoquímicas e fotobiológicas, vem sendo estudado por pesquisadores em todo o mundo e seus efeitos positivos na estimulação da angiogênese bem como no tempo da reparação tecidual vem sendo evidenciados (KUFFLER, 2016).

De acordo com a literatura, a utilização da FBM no tratamento de queimaduras, especialmente em fases iniciais do processo, promove uma melhor cicatrização e menor tempo de reparo do tecido, através dos efeitos antioxidantes proporcionado pela terapia, como a capacidade de reduzir a intensidade do infiltrado inflamatório e a estimulação na produção de macrófagos. Porém, atualmente, há estudos que mostram resultados positivos com a utilização

FBM no processo de reparo além das fases iniciais, como na fase de proliferação, em que a FBM estimula a proliferação de fibroblastos, acelera a epitelização, aumenta a produção e organização das fibras de colágeno e estimula a produção de células endoteliais. Nas etapas finais do processo, ainda auxilia na maturação do colágeno tipo III em tipo I (BRASSOLATTI et al., 2016; CHIAROTTO et al., 2014; FIÓRIO; ALBERTINI, 2014; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006).

Nos últimos anos, muito se tem discutido sobre a parametrização adequada para a utilização da FBM em diversas situações, entre elas na recuperação de tecidos lesionados por queimaduras. Brassolatti et al., 2018 realizaram uma revisão sistemática que abordou a ação da FBM em todos os graus de queimaduras afim de encontrar uma parametrização adequada para aplicação da técnica. O estudo identificou que o laser mais utilizado para esse tipo de afecção é no comprimento de onda do vermelho com parâmetros dentro de uma janela-terapêutica de 1J à 25 J dependendo das características das lesões, porém os autores também relatam que em comprimento de ondas mais altos, altas energias podem ser eficazes para uma melhor resolução do processo de reparo.

Além da utilização da FBM, vários avanços significativos feitos nas últimas décadas melhoraram muito o atendimento ao paciente com queimaduras (GACTO-SANCHEZ, 2017). As pesquisas com biomarcadores, controle de inflamação e utilização da terapia celular com células-tronco são alternativas que vem sendo frequentemente exploradas, com destaque para as células-tronco que vem se consolidando como um efetivo campo de atuação na área da engenharia de tecidos, no entanto ainda carece de mais investigações e esclarecimentos (GACTO-SANCHEZ, 2017; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2015).

### 1.3. Células-Tronco no Reparo Cutâneo

As células-tronco são caracterizadas por serem células indiferenciadas que se multiplicam de forma prolongada ou ilimitada através de sucessivas mitoses, podendo se dividir em células idênticas a ela, com o mesmo potencial de auto-renovação, ou dar origem a células especializadas, como células sanguíneas, epiteliais, musculares, entre outras. Existem dois tipos de células-tronco potencialmente úteis para a aplicação, sendo elas: células-tronco embrionárias (CTEs) e as células-tronco adultas (autólogas) (ZUK et al., 2001).

Dentre as células-tronco autólogas podemos destacar as células-tronco mesenquimais (CTMs) que são células com grande potencial de aplicação na terapia celular, sendo indiferenciadas, com alta capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células especializada (HORVAT et al., 2009). As CTMs foram descritas pela primeira vez por Friedenstein et al., em 1966, que observaram a presença de uma população celular peculiar em células mononucleares da medula óssea de camundongos. Essa população era representada por células de formato fibroblástico e apresentavam a propriedade de formar colônias *in vitro*, sendo dessa forma denominadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas. As crescentes pesquisas nessa área se dá pelo fato destas células serem isoladas a partir de diversos tecidos como medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, ligamentos periodontal e tecido adiposo (SEO et al., 2004; KERN et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; MUVLA et al., 2008; SOLEIMANI et al., 2012).

Atualmente com a expansão do conhecimento sobre as CTMs foram descobertas várias formas para a utilização terapêutica, sendo que sua multipotencialidade favorece sua utilização na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (ARANDJELOVIC et al., 2014). Estudos como de Pittenger, et al., (1999), demonstraram que as CTMs são células multipotentes passíveis de se diferenciarem em células de tecidos mesodérmicos como osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo. Posteriormente, diversos outros trabalhos demonstraram a

capacidade das CTMs em se diferenciar em tipos celulares como células endoteliais (REYES, et al., 2002), hepatócitos (SATO, et al., 2005) células neurais (KANG, et al., 2004) e células da epiderme *in vitro* (SASAKI, et al., 2008).

No campo da cicatrização de tecidos cutâneo, o uso de CTMs tem sido relatado para diferentes tipos de feridas. As queimaduras foram de especial interesse devido ao grande número de casos encontradas hoje em dia, além do crescente número de estudos que relatam a eficácia da técnica destacando as diversas vias de ação (GHIEH et al., 2015). Essas células trafegam para áreas de lesão e secretam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento para estimular o reparo de maneira parácrina sendo demonstrado que esses fatores modulam o processo inflamatório, recrutam vários tipos de células para neovascularização e estimulam a proliferação durante esse processo de reparo (STRONG; NEUMEISTER; LEVI, 2017).

Um dos primeiros trabalhos com CTMs no tratamento de lesões por queimaduras foi o de Shumakov et al., (2003) que utilizaram um modelo experimental de queimadura em camundongos e aplicaram como terapia células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (BMSC) autólogas e células fibroblastóides embrionárias (CTEs) sendo observado uma aceleração do processo de regeneração da pele nos grupos tratados com ambas as terapias comparados ao controle. O estudo relatou a diminuição da infiltração de células imunocompetentes nas úlceras e aceleração do processo de formação de vasos sanguíneos e de tecido de granulação no local afetado pelas queimaduras profundas.

Clinicamente, Rasulov et al., 2005 foram pioneiros em demonstrar a eficácia do uso de CTMs em um estudo de caso de uma paciente de 45 anos que apresentava queimaduras de primeiro, segundo e terceiro grau em 40% da área corporal, e que inicialmente havia sido tratado com as técnicas habituais em casos de queimaduras graves, incluindo o procedimento de auto-enxertos de pele, porém todos os tratamentos não resultaram em melhora significativa. Após 20 dias de internação foi observada uma ineficiência do enxerto e a piora do estado clínico

da paciente. Neste momento foi introduzida a terapia celular utilizando CTMs autólogas. Três dias após implante de pele com CTMs houve um aumento da angiogênese nas regiões queimadas, e após oito dias, foi observada a normalização dos valores bioquímicos sanguíneos da paciente, aceleração do processo de reepitelização e consequente recobrimento da ferida.

#### **1.4. Fotobiomodulação a laser e Células-Tronco no Reparo Cutâneo**

Os estudos na área de engenharia de tecidos preconizam que quanto maior a proliferação das CTMs, maior será a capacidade de cura e regeneração dos tecidos no qual estas células residem. Pelo fato das CTMs terem um crescimento e taxas de proliferação lentas, a literatura vem buscando terapias alternativas que possam aumentar a sua proliferação e ainda manter a característica de células estaminais (MVULA et al., 2008; DE VILLIERS et al., 2011).

Dentro deste contexto, foi demonstrado em diversos estudos que a utilização da FBM pode ser eficaz no aumento da proliferação e viabilidade de diversos grupos celulares, inclusive as CTMs, porém neste grupo celular, ainda encontram-se escassos os trabalhos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Até o momento os estudos *in vitro* apresentam que na faixa de comprimento de onda de 600nm a 700nm, a PBM estimula uma maior proliferação das CTMs além de sua diferenciação. Já nos estudos *in vivo*, pouco tem sido discutido quanto aos mecanismos e os parâmetros mais eficazes na associação destas terapias, porém os estudos encontrados relatam que estas terapias quando associadas aceleram o processo de cicatrização de lesões, como as causadas por queimaduras, além de resultar na formação de um novo tecido de qualidade semelhante de um tecido sadio (MUVLA et al., 2008; CALIARI-OLIVEIRA et al., 2015).

Atualmente, um único estudo abordou a associação da FBM com a terapia celular no tratamento de queimaduras. Lamaro-Cardoso et al., 2019, exploraram a ação das técnicas no reparo cutâneo de queimaduras de espessura total em um modelo animal, sendo discutida a ação

das terapias comparado a terapia convencional com sulfadiazina de prata. Os resultados promissores do estudo demonstram que a associação das técnicas podem acelerar o processo de reparo tecidual quando comparado ao tratamento convencional, porém ainda destacam que mais estudos precisam ser realizados na tentativa de se esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos nas terapias além da padronização de protocolos eficazes principalmente envolvendo a FBM. O estudo apesar de encorajador não compara as terapia isoladas, além de não conseguir realmente demonstrar como de fato se organiza o novo tecido formado a nível biológico.

Além das lacunas encontradas na literatura tanto quanto associação das técnicas como o mecanismo de ação das mesmas é relevante destacar que apesar da FBM estar em constante discussão na literatura como alternativa de tratamento de diversas complicações clínicas, a variedade e discrepância de parâmetros dificulta a comparação entre os estudos o que resulta na falta de protocolos que possam ser realmente eficazes. Sendo assim, este estudo teve como objetivo verificar a eficácia da FBM a laser no processo de proliferação das CTMs, sem causar danos moleculares preservando suas características morfológicas e estruturais, além de investigar a ação da FBM, em diferentes energias, associada ou não as CTMs no processo de reparação tecidual em lesões causadas por queimaduras. Desta forma, espera-se que a aplicação da associação destas terapias promova uma diminuição no tempo do processo de cicatrização e melhore a qualidade do reparo tecidual, para que posteriormente a associação destas técnicas sejam utilizada como uma alternativa de baixo custo e fácil aplicação para o tratamento de lesões causadas por queimadura.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação da FBM a laser na viabilidade e proliferação de CTMs *in vitro*, além de identificar os efeitos do tratamento com FBM a laser (660 nm), associado ou não a utilização da CTMs, em um modelo experimental *in vivo* utilizando a lesão tecidual de queimadura de espessura total.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a ação da FBM a laser (660nm) em diferentes fluências na viabilidade e proliferação de CTMs, *in vitro*;
- Investigar os possíveis mecanismos de ação da FBM a laser com diferentes fluências nas CTMs, através da quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e fatores inflamatórios como IL-8, *in vitro*.
- Comparar ação da FBM a laser nas CTMs em culturas bidimensional (2D) e tridimensional (3D);
- Analisar a ação da FBM a laser (660nm) e da aplicação das CTMs, na queimadura de espessura total em ratos, quanto a presença dos fatores inflamatórios interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento alfa (TNF- $\alpha$ ), através do ensaio imunoenzimático (ELISA).
- Investigar o tempo de cicatrização do tecido cutâneo após a queimadura de espessura total mediante aos tratamentos de FBM e CTMs, isolados e associados.

- Investigar as alterações morfológicas teciduais em vários períodos após a queimadura experimental, em ratos, em todos os grupos estudados através da análise de histopatologia;
- Avaliar a organização e quantificar as fibras de colágeno tipo I e tipo III durante diversos períodos e em todos os grupos estudados através das análises de birrefringência e imunohistoquímica.

### **3. REFERÊNCIAS**

---

ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 17, p. 3241–55, set. 2014.

AHUJA, R. B.; BHATTACHARYA, S. Burns in the developing world and burn disasters. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 329, n. 7463, p. 447–9, 21 Aug. 2004.

ANDRADE, A.G.; LIMA, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**. 9(1):21-30, 2010.

ARANDJELOVIC, P.; KAUR, P. The regenerative potential of epithelial stem cells in tissue repair. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 56, p. 107-10, Nov 2014.

AZEVEDO, A. M. Z.; MACHADO, M. J.; CHASSOT, G. C. Assistência de Enfermagem nos Pacientes Queimados com Curativo Aberto na Unidade de Internação. **Mom. & Perspec. Saúde** - Porto Alegre, v. 15, n. 2, Dec. 2002.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BARBOSA, E. et al. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 693-702, Dec. 2007

BRASSOLATTI, P. et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. **Microsc Res Tech**, v. 79, n. 4, 2016.

BRASSOLATTI, P. et al. Evaluation of the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model: a systematic review. **Lasers Med. Sci.**, v. 33, n 9, p. 1841-1848, 2018.

CARVALHO, P.T.C., SIQUEIRA, J.F.R., FERREIRA, J.V.L., SILVA, I.S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe. **Fisioter Bras**, v 4, v. 4, p. 253-8, 2003.

CHIAROTTO, G. B. et al. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830nmGaAlAs) on burn of second-degree in rats. **Lasers Med Sci**, v. 29, n. 5, p. 1685-93, Sep 2014.

- CHUNG H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Ann Biomed Eng.** V. 40, n. 2, p. 516–533, Feb 2012.
- CRISÓSTOMO, M. R., SERRA, M.C., GOMES, D.R. Epidemiologia das queimaduras. In: Maciel E, Serra MC, eds. **Tratado de queimaduras**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2004.
- DAHIYA, P. Burns as a model of SIRS. **Frontiers in bioscience** (Landmark edition), v. 14, p. 4962–7, 1 jun. 2009.
- DE ANDRADE, A. L. M. et al. Alternative animal model for studies of total skin thickness burns. **Acta Cir. Brasileira**, v. 32, n. 10, 2017.
- DE VILLIERS, J. A.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine. **Stem Cell Rev**, v. 5, n. 3, p. 256-65, Sep 2009.
- EDUARDO, F.DE, P. et al. Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. **Lasers Surg Med**, v. 40, n. 6, p. 433-8, Aug 2008.
- EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Exp. Dermatol.**, v. 19, n. 9, p. 777–783, Sep. 2010.
- FIÓRIO, F. B.; ALBERTINI, R. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. **Lasers Med Sci**, v. 29, p. 313–319, 2014.
- FREITAS, L. F. DE; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, v. 22, n. 3, p. 1–37, 2017.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY, S., II; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morphol**, v. 16, n. 3, p. 381-90, Dec 1966.
- GACTO-SANCHEZ, P. Surgical treatment and management of the severely burn patient: Review and update. **Med. Intensiva**, v. 41, n. 6, p. 356–364, 1 ago. 2017.
- GALLIOT, B. et al. Trends in tissue repair and regeneration. **Development**, v. 144, n. 3, p. 357–364, 1 Fev. 2017.

GHIEH, F. et al. The Use of Stem Cells in Burn Wound Healing: A Review. **BioMed research international**, p. 1-9, Jul. 2015.

GUIRRO, E. C. O.; GUIRRO, R. R. J. Fisioterapia Dermato Funcional: fundamentos, recursos, patologias. 3<sup>a</sup> ed., Barueri, São Paulo: ed. Manole, 2004

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. **Photomedicine and laser surgery**, v. 24, n. 6, p. 705–714, 2006.

HAWKINS, D.; HOURELD, N.; ABRAHAMSE, H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1056, p. 486–493, 2005.

HORVAT-KARAJZ, K. et al. In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. **Lasers Surg Med.**, v. 41, n. 6, p. 463-9, Aug 2009.

HUANG, Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. **Dose Response**, v. 9, n. 4, p. 602–618, 2011.

HUEBINGER, R. M. et al. IL-10 polymorphism associated with decreased risk for mortality after burn injury. **J Surg Res.**, v. 164, n. 1, p. e141-5, Nov 2010.

JACKSON, D. M. The diagnosis of the depth of burning. **BRIT J SURG**, v. 40, n. 164, p. 588–596, May 1953.

JOHNSON, R. M.; RICHARD, R. Partial-thickness burns: identification and management. **ADV SKIN WOUND CARE**, v. 16, n. 4, p. 178-87–9, 2003.

KANG, S.K.; PUTNAM, L.A.; YLOSTALO, J.; POPESCU, I.R.; DUFOUR, J.; BELOUSOV, A.; BUNNELL, B.A. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. **J Cell Sci**. v. 117, p. 4289-4299, 2004.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **J Quantum Electron**, v. 23, n. 10, p. 1703–1720, 1987.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-301, May 2006.

KUFFLER, D. P. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Reg Medicine**, v. 11, n. 1, p. 107–122, jan. 2016

LAMARO-CARDOSO, A. et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. **J. Photochem. Photobiol B**, v. 194, p. 174–182, May 2019.

MARTIGNAGO, C. C. S. et al. Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats. **Lasers Med Sci**, v. 34, n. 5, p. 1041–1047, Dez. 2018.

MVULA, B. et al. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. **Lasers Med Sci**, v. 23, n. 3, p. 277-82, Jul 2008.

MVULA, B.; MOORE, T. J.; ABRAHAMSE, H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. **Lasers Med Sci**, v. 25, n. 1, p. 33-9, Jan 2010

NUNEZ, S. C. et al. The influence of red laser irradiation timeline on burn healing in rats. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 2, p. 633-641, Feb 2013

CALIARI-OLIVEIRA, C. et al. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. **Cell Transplant**, v. 25, n. 2, May 7 2015.

OTTERÇO, A. N. et al. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. . **J. Photochem. Photobiol B**, v. 183, p. 22–29, jun. 2018.

PINFILDI, C. E. et al. Helium-neon Laser in viability of random skin flap in rats. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 1, p. 89-91, 2005.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 2 abr. 1999.

Queimados - Ministério da Saúde - Portal da Saúde. Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990-queimados>>.

Acesso em: 30 set. 2019.

RAHMANIAN-SCHWARZ, A. et al. Improvement of skin quality using a new collagen scaffold in acute burns and reconstructive surgery: an in vivo evaluation of split skin graft transplantation in a rat model. **Dermatol Surg**, v. 38, n. 8, p. 1338-45, Aug 2012.

RASULOV, M. F. et al. First experience in the use of bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. **B Exp Biol Med**, v. 139, n. 1, p. 141–144, jan. 2005.

RENNO, A. C. et al. Effect of low-level laser therapy (660 nm) on the healing of second degree skin burns in rats. **J Cosmet Laser Ther**, v. 13, n. 5, p. 237-42, Oct 2011.

REYES, M. et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J Clin Invest**, v. 109, n. 3, p. 337-46, Feb 2002.

SANCHEZ-MUNOZ, I. et al. The use of adipose mesenchymal stem cells and human umbilical vascular endothelial cells on a fibrin matrix for endothelialized skin substitute. **Tissue Eng Part A**, v. 21, n. 1-2, p. 214-23, Jan 2015.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2581-7, Feb 15 2008.

SATO, Y. et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 756-63, Jul 15 2005.

SEO, B. M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-55, Jul 2004.

SHUMAKOV, V. I. et al. Mesenchymal bone marrow stem cells more effectively stimulate regeneration of deep burn wounds than embryonic fibroblasts. **Bull Exp Biol Med**, v. 136, n. 2, p. 192-5, Aug 2003.

SOBANKO, J. F.; ALSTER, T. S. Efficacy of low-level laser therapy for chronic cutaneous ulceration in humans: a review and discussion. **Dermatol Surg**, v. 34, n. 8, p. 991-1000, Aug 2008.

SOLEIMANI, M. et al. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 2, p. 423-30, Mar 2012.

STREM, B. M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med**, v. 54, n. 3, p. 132-41, Sep 2005.

STRONG, A. L.; NEUMEISTER, M. W.; LEVI, B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents. **Clinics in plastic surgery**, v. 44, n. 3, p. 635, jul. 2017.

VENTER, N. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; MARQUES, R. G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 542-7, May 2015.

XUE, C. et al. Propagation of cutaneous thermal injury: a mathematical model. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the **European Tissue Repair Society**, v. 20, n. 1, p. 114–22, 2012.

YANG, Y. et al. Scalded skin of rat treated by using fibrin glue combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells. **Ann Dermatol**, v. 26, n. 3, p. 289-95, Jun 2014.

ZELT, R. G. et al. High-voltage electrical injury: chronic wound evolution. **Plast Reconstr Surg.**, v. 82, n. 6, p. 1027–41, dez. 1988.

ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

## **PARTE II**

---

### **ESTUDO I:**

**Efeito da fotobiomodulação na proliferação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo**

Publicado no periódico “*Lasers in Medical Science*”

### **ESTUDO II:**

**Efeitos e mecanismos da fotobiomodulação no comportamento de células-tronco mesenquimais em culturas bidimensionais e tridimensionais**

Submetido no periódico “*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*”

### **ESTUDO III:**

**Um modelo animal otimizado para estudos de queimaduras de espessura total da pele**

Publicado no periódico “*Act Cirúrgica Brasileira*”

### **ESTUDO IV:**

**Efeito da fotobiomodulação associado a terapia celular no processo de regeneração cutânea na queimadura de terceiro grau em ratos**

Submetido no periódico “*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*”

## **4. ESTUDO I**

---

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSO.**

***PHOTOBIMODULATION EFFECT ON THE PROLIFERATION OF ADIPOSE  
TISSUE MESENCHYMAL STEM CELLS***

Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>, Genoveva Luna Flores<sup>2</sup>, Patrícia Brassolatti<sup>3</sup>, Marcel Nani Leite<sup>4</sup>, Ângela Merice de Oliveira Leal<sup>2</sup>, Marco Andrey Cipriani Frade<sup>4</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Medicina, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-SP, Brasil

<sup>4</sup> Departamento de Dermatologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP, Brasil

**Artigo publicado no periódico “*Lasers in Medical Science*”**

<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2642-2>

## Resumo

**Introdução:** O uso de células tronco mesenquimais (CTMs) na engenharia de tecidos vem sendo amplamente investigado pelos pesquisadores. Sabe-se que quanto maior a proliferação deste grupo celular maior é a capacidade regenerativa e cicatricial dos tecidos onde residem. Nesse contexto a terapia por fotobiomodulação (FBM) é apresentada na literatura como uma técnica eficaz na proliferação de diversos tipos celulares, porém a parametrização e o modo de ação desta técnica ainda não estão elucidados, tornando-se necessária a sua investigação. O objetivo deste estudo foi de avaliar a ação da FBM, com diferentes energias e densidades de energia, nas CTMs de tecido adiposo (hASCs). Foram utilizadas hASCs, semeadas em placas de 24 poços, contendo  $3 \times 10^4$  de células por poços mantidas em meio de cultura. **Métodos:** Foram realizados quatro grupos experimentais, sendo um grupo com hASCs e simulação da FBM e outros três grupos, que receberam a irradiação da FBM, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com um laser de 660nm, potência de 40mW e energias de 0.56; 1.96; 5.04J. Foram realizadas as análises de MTT e Azul de Trypan para avaliar a proliferação e viabilidade celular após 1 hora da irradiação com a FBM. **Resultados:** Os resultados da atividade mitocondrial avaliados pelo MTT mostrou diferença estatística nas primeiras 24 horas para o grupo G180 comparado ao GC e as 72 horas para os G20 e G70 quando comparado ao GC. Para o teste de Azul de Trypan, foram observadas diferenças significativas ao final do experimento para os grupos G20 e G70 quando comparados com o GC e G180. Em ambos os testes não foram observados ao final do experimento diferença estatística entre os grupos G20 e G70 e foi observada uma redução do crescimento e atividade mitocondrial celular para o grupo G180. **Conclusão:** Assim pode-se concluir que a FBM com energias próximas a 0,56J e 1,96J são eficazes na proliferação de hASCs, e que energias mais altas, como 5.04 podem ser prejudiciais.

**Palavra-chave:** fotobiomodulação; células-tronco mesenquimais.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A utilização de células-tronco mesenquimais (CTMs) vem sendo amplamente investigada nas diferentes áreas da engenharia de tecidos e na medicina regenerativa, sendo uma alternativa das modalidades terapêuticas convencionais, pelo fato destas células serem indiferenciadas com potencial importante para aplicações em terapias celular, além da capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células especializadas, como adipócitos, condrócitos e osteoblastos(1). Essas células são de fácil isolamento, expansão e cultivo *in vitro*, podendo ser isoladas a partir de vários tecidos, como medula óssea, polpa dentária, ligamento periodontal, cordão umbilical e tecido adiposo (2–5)

As células estaminais adultas podem ser isoladas a partir de tecido adiposo lipo-aspirados em números significativos e exibem crescimento estável e cinética proliferativa em cultura (2,6,7). As CTMs derivadas do tecido adiposo (hASCs) têm um potencial de diferenciação similar àquelas derivadas da medula óssea (BMSCs), e seu potencial regenerativo deve-se principalmente a essa multipotencialidade, podendo originar tipos celulares distintos, como tecidos de origem mesodérmica, como osso, cartilagem, músculo, tendão/ligamento, gordura e derme, tornando-as uma fonte potencial para futuras aplicações na engenharia de tecidos em contextos clínicos (7).

As CTMs apesar possuem alto poder de diferenciação, possuem uma baixa taxa proliferativa normalmente, porém, pelo fato deste grupo celular ser altamente aplicado na medicina regenerativa, é de grande importância que se estabeleçam métodos capazes de acelerar o processo de proliferação, mantendo a viabilidade das células.

Atualmente a literatura apresenta que, quanto maior a proliferação de CTMs, maior é a capacidade regenerativa e cicatricial dos tecidos onde residem. Neste contexto, podemos destacar a terapia com a fotobiomodulação (FBM), quem vem sendo apresentada na literatura

como uma terapia eficaz na proliferação de diversos tipos celulares, como fibroblastos (8,9), células endoteliais(8), osteoblastos (10), células epiteliais(11) , linfócitos (12) e CTMs (3).

A terapia por FBM vem se destacando devido a utilização de uma baixa densidade de energia e comprimento de onda, capaz de penetrar facilmente resultando em efeitos biomoduladores em células e tecidos, com capacidade de estimular uma maior proliferação celular através da absorção da luz pelos cromóforos intracelulares, sendo esta convertida em energia metabólica (13,14).

No que se refere a proliferação celular das CTMs, a FBM vem apresentando efeitos positivos e promissores, porem os mecanismos biológicos relacionados com este efeito biostimulador ainda não estão totalmente elucidados. Acredita-se que na faixa de comprimento de onda de 600nm a 700nm, a FBM estimula uma maior proliferação das CTMs além de sua diferenciação (7,9,15) . Entretanto, a bioestimulação não é sempre observada, uma vez que uma variedade de fatores influenciam no processo, fazendo com que a interação da luz do laser com células e tecidos possam estimular ou inibir a proliferação celular(16) . Nesse sentido, a bioestimulação *in vitro* depende de parâmetros relacionados a FBM, como o comprimento da onda, energia, potência, tempo de irradiação (17) tipo de célula irradiada (9), e características fisiológicas das células (18). Portanto, objetivo deste estudo foi avaliar a ação da FBM, com diferentes energias e densidades de energia, na proliferação das CTMs de tecido adiposo.

## **4.2. METODOLOGIA**

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos sob o protocolo 6224231115. As hASCs foram obtidas a partir de cirurgias de abdominoplastias realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sendo doado pelos pacientes, mediante assinatura de consentimento. O método de

isolamento celular baseia-se na digestão da matriz extracelular (MEC) em colagenase a 0,075% (SIGMA) durante 30 minutos a 37 ° C de acordo com o método previamente estabelecido (6). A digestão foi neutralizada com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, Invitrogen).

Foi realizado a centrifugação do tecido adiposo e posteriormente este foi plaqueado em placa de cultura de tecidos. As HADCs foram cultivadas e expandidas a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub> usando meio de cultura (o  $\alpha$ -MEM da Gibco, 10% de soro de bovino fetal, 1% de antibiótico-antimicótico 1%, da Gibco e L-Glutamina 200 mM,). O meio era trocado duas vezes por semana, e a passagem das células eram realizadas ao atingir 80% de confluência, através da utilização de solução de tripsina-EDTA a 0,25% (da Invitrogen). Durante o estudo, apenas a 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagem foram utilizadas.

Com relação a caracterização, esta foi realizada e reportada por Caetano et al., 2015 (19), sendo que citometria de fluxo revelou positividade das hASCs para CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 (BD Biosciences, EUA), sendo estes marcadores de células estaminais. Em seguida, as células foram cultivadas em meios de diferenciação osteogênica e adipogênica (kits de diferenciação StemPro®, Invitrogen Corp., EUA) durante 21 e 28 dias, confirmada sua natureza multipotente através da avaliação por microscopia óptica.

#### **4.2.1. Cultura dos hASCs**

Foram semeadas  $3 \times 10^4$  células por poço utilizando placas de cultivo de 24 poços da marca TPP® e mantidas em meio de cultivo composto de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de baixa glicose, suplementado com 10% Soro Fetal bovino (SFB) – os dois fornecidos pela empresa Nutricell® e antibiótico/antimicótico (A/A). Após a semeadura as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sendo retiradas somente para irradiação.

O mesmo procedimento foi aplicado ao grupo controle. Para garantir reprodutibilidade dos dados, este experimento foi realizado em triplicata.

#### **4.2.2. Irradiação com FBM**

Foi utilizado um laser vermelho, diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo (InGaAIP) (Photon Laser III, DMC São Carlos/SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nanômetros (nm), potência de 40mW, área transversa do feixe de 0,028 cm<sup>2</sup> e energias de 0.56J, 1.96J e 5.04J (Tabela 1).

Após a semeadura, as placas foram irradiadas após 24, 48 e 72 horas do inoculo. Para cada horário estabelecido foi avaliada a viabilidade e a proliferação celular. A ponteira do laser foi direcionada de forma perpendicular a cada poço, se mantendo fixa por um suporte, com distância de 3,34cm da ponta da caneta laser até o fundo do poço, de modo que esta distância permitiu que o feixe da luz laser recobrisse todo o poço (Figura 1). As células foram semeadas de modo que um poço, entre os semeados, era deixado vazio, para prevenir a dispersão intencional de luz entre os poços.

#### **4.2.3. Delineamento**

O estudo foi dividido em quatro grupos, sendo três grupos irradiados pela FBM e um grupo simulado:

**GC:** hASCs com simulação da terapia FBM.

**GL20:** hASCs irradiadas pela FBM (660nm) com 0.56J de energia

**GL70:** hASCs irradiadas pela FBM (660nm) com 1.96J de energia

**GL180:** hASCs irradiadas pela FBM (660nm) com 5.04J de energia



**Figura 1: Irradiação com a FBM.** Laser InGalP (Photon Laser III, DMC®) acoplado a um suporte para manutenção da fixação do aparelho. Placa de 24 poços, com distância de 3.34cm da ponta da caneta ao fundo do poço.

**Tabela 1: Parâmetros utilizados para a FBM com laser InGalP.**

Parâmetros	Valores
Potência (mW)	40
Comprimento de Onda (nm)	660
Modo de ação	Contínuo
Área transversa do feixe (cm <sup>2</sup> )	0.028
Densidade de Energia (J/cm <sup>2</sup> )	20; 70; 180
Tempo (s)	14; 49; 126
Energia (J)	0.56; 1.96; 5.04

#### 4.2.4. Citotoxicidade e Viabilidade celular

Com o intuito de avaliar a proliferação celular, foi analisada a atividade mitocondrial das células utilizando o ensaio de citotoxicidade baseado em MTT, que envolve a conversão do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bro-mide (MTT) a um formazano

insolúvel. Ao fim dos procedimentos do ensaio, após quatro horas de incubação, foi realizada a leitura da absorbância em um leitor de microplacas, *Multiskan FC* (Thermo Scientific®), com 570nm.

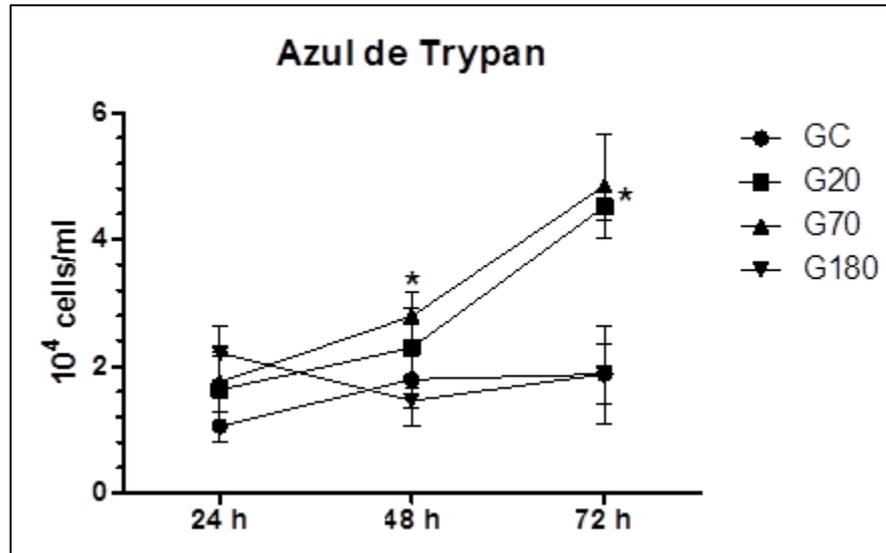
Ainda foi realizada avaliação da viabilidade e crescimento celular através do ensaio de Azul de Trypan, em que as células marcadas com azul de Trypan, em cada poço, foram contadas em uma câmara de Neubauer. As contagens de células eram realizadas por dois examinadores cegos e previamente calibrados.

Todas as avaliações foram realizadas a cada uma hora após a irradiação da FBM, totalizando um máximo de três aplicações.

### **4.3. RESULTADOS**

Os resultados do ensaio de azul de trypan demonstraram que nas primeiras 24 horas, após o inóculo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, exceto o G180, quanto ao crescimento celular. Já após 48 horas, o grupo G70 ( $2.79 \times 10^4 \pm 0.3$ ) apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo GC ( $1.79 \times 10^4 \pm 0.4$ ), sendo essa diferença mantida nas 72 horas (G70:  $4.85 \times 10^4 \pm 0.8$ ; GC:  $1.87 \times 10^4 \pm 0.7$ ), sendo também nesse período observada um crescimento significativo do grupo G20 ( $4.52 \times 10^4 \pm 0.2$ ) em comparação com o grupo GC ( $1.87 \times 10^4 \pm 0.7$ ) (figura 1).

Com relação ao grupo G180 ( $2.21 \times 10^4 \pm 0.4$ ), é importante ressaltar que nas primeiras 24 horas, este apresentou crescimento celular superior que ao GC ( $1.05 \times 10^4 \pm 0.2$ ), porém após 48 horas já foi observada uma inibição (G180:  $1.45 \times 10^4 \pm 0.4$ ), sendo essa mantida até o final do período experimental (G180:  $1.87 \times 10^4 \pm 0.4$ ) (figura 1).

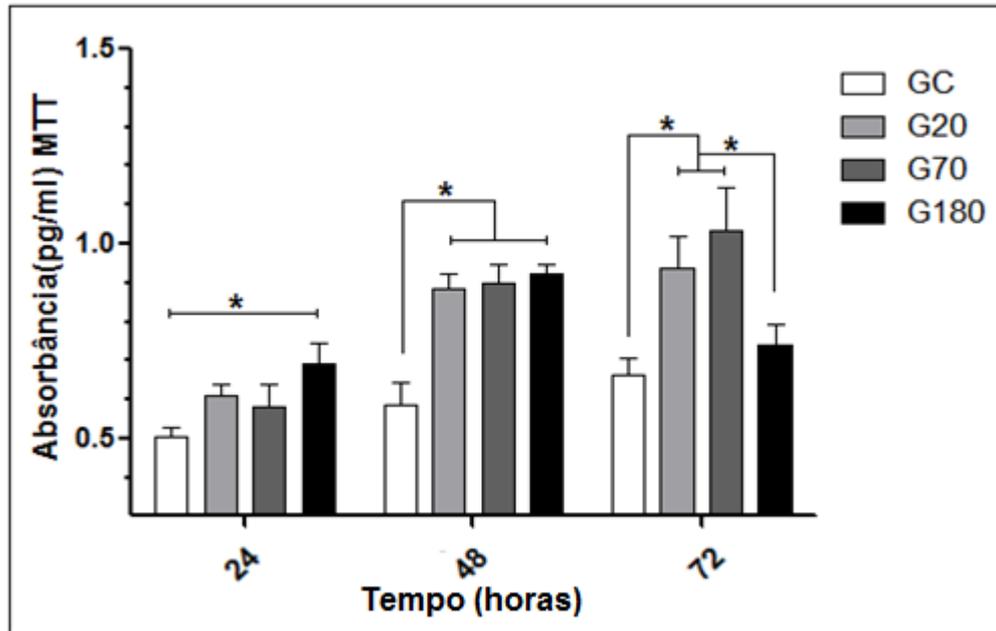


**Figura 2:** Avaliação do crescimento celular através do ensaio azul de trypan, em diferentes momentos. (\*) Diferença significativa ( $p < 0.05$ ).

Ainda no ensaio de Azul de Trypan não foram apresentadas diferenças significativa com relação a viabilidade células, nem quando comparado entre os grupos, nem nos tempos estudados (Tabela 2).

**Tabela 2:** Porcentagem de viabilidade das células-tronco (hASCs) em diferentes momentos após a FBM nos grupos estudados.

	GC	GL20	GL70	GL180
<b>T24</b>	100%	154%	166%	210%
<b>T48</b>	100%	127%	155%	81%
<b>T72</b>	100%	241%	259%	99%



**Figura 3:** Atividade mitocondrial de culturas celulares, submetidas ou não à FBM, com diferentes energias, em diferentes momentos. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A avaliação da atividade mitocondrial realizada através do teste de MTT demonstrou nas primeiras 24 horas diferença significativa do grupo G180 quando comparado ao grupo GC, entretanto não foi observada diferença entre os demais grupos. Já 48 horas após o inoculo foi observada um aumento na taxa proliferativa nos grupos G20, G70, G180 quando comparado o grupo GC, não havendo também, diferença entre os grupos irradiados. Ao final do experimento, foi observado que tanto o grupo G20 quanto G70 apresentaram taxas proliferativas maiores que os demais grupos, não havendo diferença entre ambos, porém o grupo G70 apresentou um aumento significativo da taxa proliferativa quando comparado aos grupos GC e G180, demonstrando que a energia de 1,96J foi mais eficaz que as demais doses (Figura3).

Acredita-se que ao final das 72 horas o grupo G180 apresentou uma ação inibitória, devido à alta dose de energia aplicada, enquanto que o grupo G20, apresentou um acúmulo de energia demonstrando resultados mais promissores.

#### 4.4. DISCUSSÃO

Atualmente, a literatura vem destacando a importância de se acelerar processos de proliferação celular para uma maior eficácia de sua aplicação na engenharia de tecidos. Nos últimos anos, a utilização da terapia por fotobiomodulação (FBM) vem sendo investigada em diferentes áreas, como para diminuição da dor, reparo de tecidos e na proliferação e viabilidade de diversos tipos celulares, como por exemplo em células-tronco mesenquimais (CTMs), porém, uma variedade de fatores, como a parametrização adequada, contribuem para que sua ação seja realmente eficaz (17–19). Mesmo que os mecanismos de ação desta terapia, FBM, ainda não tenham sido totalmente esclarecidos (19), acredita-se que a irradiação aplicada, em diferentes tipos celulares, é seguida do aumento do óxido nítrico (NO), dos fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio (ROS) (20).

Nosso estudo demonstrou que independente das energias aplicadas pela FBM, com laser de espectro de luz visível (vermelho), todos os grupos irradiados apresentaram maior proliferação ao durante o experimento, quando comparado ao GC.

A parametrização adequada, como destacado anteriormente, ainda é muito controversa na literatura, porém a maioria dos estudos destacam que a utilização da FBM com laser vermelho produz melhores resultados quanto a proliferação e a viabilidade celular. Eduardo et al., (2008)(13) realizaram um estudo utilizando a FBM com objetivo de avaliar a proliferação de células tronco do ligamento periodontal (hPDLSC), com laser no mesmo comprimento de onda (660nm) e potências próximas ao nosso estudo (20mW e 40mW), destacando que a FBM foi capaz de estimular a proliferação deste tipo celular além de manter a viabilidade, assemelhando-se ao nosso estudo.

Outro estudo, realizado por Soares et al., (2015)(3), avaliaram a ação da FBM em células hPDLSC, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas, utilizando um laser (660nm), com potência de 30 mW e energias de 0,48J e 1J, apresentando resultados promissores quanto a maior energia

empregada, destacando que energias muito baixas podem ter pouca influência sobre taxas de proliferação, corroborando com nosso estudo, que avaliou a taxa de proliferação, das células hASCs, nos mesmos tempos e com parâmetros muito semelhantes, sendo também concluído que energias mais altas são eficazes para estimular proliferação celular, porém é importante ressaltar que existe um limiar de “dose-resposta” para o emprego de energias muito altas, como em nosso estudo em que a maior energia, ao final das 72 horas apresentou inibição na taxa de proliferação.

Karu (1987) (16), destacou em seu trabalho que aplicação de altas doses da FBM podem gerar danos aos fotorreceptores, gerando efeito de inibição metabólica e morte celular. Essa ideia foi apoiada por diversos estudos, como de Kreisler et al., (2002)(21), que observaram que a utilização de altas energias exercerem efeitos negativos em células de fibroblastos, corroborando com o estudo de Huang et al., (2011) (22), que realizaram uma revisão apresentando a possibilidade de respostas bifásicas da FBM quando aplicada em diversos tipos celulares.

Huang et al., (2011)(22), descreveram em seu estudo a ação da FBM com respostas bifásicas em estudos em animais e *in vitro*, destacando que pouca luz pode não gerar resposta, como muita luz pode ser prejudicial. Os autores apresentaram a hipótese de que a resposta bifásica apresentada pela FBM pode ser esclarecida através da ação das EROs, destacando que possivelmente existem dois tipos, sendo um benéfico e o outro lesivo. Assim, doses mais baixas podem provavelmente produzir EROs benéficas, estimulando o transporte de elétrons e a produção de ATP, enquanto de doses altas podem produzir EROs lesivos que podem danificar a atividade mitocondrial.

Karu (1988)(23) ainda relata que o efeito acumulativo de doses altas resultam em um efeito inibitório e são caracterizadas por uma diminuição na viabilidade e proliferação celular com danos significativos a membrana celular e ao DNA, por outro lado o seu estudo também

demonstra que o efeito acumulativo com valores baixos de energia podem ao final gerar resultados significativos, podendo ser ilustrado por nosso estudo em que a maior energia aplicada, até a segunda irradiação, ainda proporcionava efeitos positivos, porém após 72 horas, foi observada uma inibição celular enquanto que para o grupo de menor energia, ao final do experimento apresentava resultados mais promissores.

Com relação ao tipo celular específico avaliado em nosso estudo com a ação da FBM, a literatura ainda se apresenta muito escassa, além de divergir, não somente na parametrização como também no número ideal de aplicações. Além disso, as diferentes condições de irradiação com diferentes feixes de laser e espalhamento, potência de saída, calibração de equipamentos, entre outros fatores também devem ser consideradas.

Uma revisão realizada em 2015 por Ginani et al.,(17) apresentaram somente quatro estudos que relacionavam a fototerapia com células tronco do tipo ASCs de humanos ou animais, sendo destes, três estudos que utilizaram um laser vermelho com potências variando de 50mW á 110mW, número varável de aplicações e valores de energia muitas vezes não apresentados, demonstrando uma notável divergência entre a parametrização. Esta revisão ainda apresenta os resultados da ação da FBM em células tronco do tipo BMSCs, sendo essas mais comuns na literatura, em que a parametrização descrita apresenta uma menor discrepância, uma vez que 76% dos estudos foram realizados com um laser vermelho e potências próximas de 60mW, porém a energia aplicada apresentou uma grande variação de aplicação, sendo entre 0.15J á 45J.

Com base nos resultados apresentados pela literatura e a grande discrepância entre a parametrização optamos por realizar esse estudo, afim de destacarmos as diferenças quanto a aplicação de parâmetros distintos e assim sugerir, doses mais eficazes para a aplicação da FBM em células do tipo hASCs.

Devido à grande divergência de parâmetros e resultados na literatura é observada uma grande dificuldade em comparar estudos que envolvam a FBM na proliferação de diversos grupos celulares, pelo fato da maioria dos estudos não apresentarem detalhadamente as condições experimentais e parâmetros aplicados em seus estudos. Assim, sugere-se que novos estudos com maior rigor científico sejam realizados para facilitar a comparação entre eles a fim de encontrarmos protocolos mais eficazes para cada tipo de célula.

#### **4.5. CONCLUSÃO**

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que a FBM (660nm) atua de maneira eficaz na proliferação de células-tronco do tipo hASCs, quando utilizadas energias entre 0.56J e 1.96J, mesmo que aplicadas em vários tempos, em contra partida energias mais altas como 5,04J, apresentou eficácia inicialmente, porém quando aplicada várias vezes foi observada uma ação inibitória.

#### 4.6. REFERÊNCIAS:

1. Balogh Z, Uher F, Service NB, Cell S, Unite B. In Vitro Effect of Carboplatin , Cytarabine , Paclitaxel , Vincristine , and Low-Power Laser Irradiation on Murine Mesenchymal Stem Cells. 2009;469(May):463–9.
2. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. 2008;277–82.
3. Soares DM, Ginani F, Augusto C, Barboza G. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. 2015;1171–4.
4. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts — an in vitro study. 2012;423–30.
5. Gadelha R, Rodrigo V, Ribeiro A, Galva CA. In vitro comparative analysis of cryopreservation of undifferentiated mesenchymal cells derived from human periodontal ligament. 2012;461–9.
6. Zuk PA, Ph D, Zhu MIN, Mizuno H, Benhaim P, Lorenz HP. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. 2001;7(2):211–28.
7. Villiers JA De, Houreld NN. Influence of Low Intensity Laser Irradiation on Isolated Human Adipose Derived Stem Cells Over 72 Hours and Their Differentiation Potential into Smooth Muscle Cells Using Retinoic Acid. 2011;869–82.
8. Liebert MA. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. 2006;24(6):705–14.
9. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Brief Report Effect of Wavelength on Low-Intensity Laser Irradiation-Stimulated Cell Proliferation In Vitro. 2005;12(October 2004):8–12.
10. Marques M. Irradiation at 780 nm Increases Proliferation Rate of Osteoblasts Independently of Dexamethasone Presence. 2006;336:332–6.
11. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Marques M, Schubert MM, et al.

- Cultured Epithelial Cells Response to Phototherapy With Low Intensity Laser. 2007;372(April):365–72.
12. Benedicenti S, Pepe IM, Angiero F, Benedicenti A. Intracellular ATP Level Increases in Lymphocytes Irradiated with Infrared Laser Light of Wavelength 904 nm. 2008;26(5):451–3.
  13. Eduardo FDP, Bueno DF, Freitas PM De, Marques M, Passos-bueno MR, Eduardo CDP. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation : A Preliminary Study. 2008;438:433–8.
  14. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. 2010;33–9.
  15. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D, et al. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. 2008;112–7.
  16. Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. J Quantum Electron 1987; 23(10):1703-17.
  17. Ginani F, Soares DM, Augusto C, Barboza G. Effect of low-level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation : a systematic review. 2015;
  18. Oliveira TS De, Serra AJ, Manchini MT. Effects of low level laser therapy on attachment , proliferation , and gene expression of VEGF and VEGF receptor 2 of adipocyte-derived mesenchymal stem cells cultivated under nutritional deficiency. 2014;
  19. Caetano, G. F., Bártolo, P. J., Domingos, M., Oliveira, C. C., Leite, M. N., & Frade, M. A. C. (2015). Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone (PCL) scaffold. *Procedia Engineering*, 110, 59–66
  20. Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KAM. Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. 2016;X(X):1–10.
  21. Gao X. *Journal of Biomedical Science*. 2009;16:31–7.

22. Kreisler M, Christoffers AB, Al-haj H, Willershausen B, Hoedt B. Low Level 809-nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts. 2002;369(February):365–9.
23. Huang Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. 2011;602–18.
24. Karu TI. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low intensity laser irradiation. *Laser Life Sci.* 1988; 2(1):53-74

## **5. ESTUDO II**

---

**EFEITOS E MECANISMOS DA FOTOBIMODULAÇÃO NO COMPORTAMENTO  
DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CULTURAS BIDIMENSIONAIS E  
TRIDIMENSIONAIS**

***EFFECT AND MECHANISMS OF PHOTOBIMODULATION ON THE BEHAVIOR  
OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN TWO-DIMENSIONAL AND THREE-  
DIMENSIONAL CULTURES***

Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>, Lucília Pereira da Silva<sup>2</sup>, Patrícia Brassolatti<sup>3</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1</sup>, Alexandra Pinto Marques<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos CEP:13565-905, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> 3B's Research Group, Universidade do Minho (UMinho), Guimarães, CEP: 4805-017, Portugal.

<sup>3</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos CEP:13565-905, São Paulo, Brasil.

**Artigo submetido no periódico “*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*”**

## Resumo

O uso de células tronco mesenquimais (CTMs) na engenharia de tecidos vem sendo amplamente investigado. Sabe-se que quanto maior a proliferação deste grupo celular maior é a capacidade regenerativa e cicatricial dos tecidos onde residem. Nesse contexto a terapia por fotobiomodulação (FBM) é apresentada na literatura como uma técnica eficaz na proliferação de diversos tipos celulares, porém a parametrização e o modo de ação desta técnica ainda não estão elucidados. Estudos com cultura celular em 3D vem sendo amplamente explorados, devido à tridimensionalidade oferecida, facilitando o compreensão das reações celulares em um ambiente com características mais próximas do *in vivo*. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da FBM, com diferentes energias, nas CTMs, em cultura celular 2D e 3D. Foram utilizadas células tronco mesenquimais de tecido adiposo (hASCs) isoladas para cultura em 2D, e associado ao hidrogel esponjoso de *gellan gum* (GG) para a construção da cultura em 3D. Foram realizados oito grupos experimentais, sendo quatro para cultivo 2D: um grupo controle com simulação da FBM e três grupos irradiados com energias diferentes; e quatro para o cultivo 3D: um grupo controle (hASCs+GG) com simulação da FBM e outros três grupos (hASCs+GG) também irradiados com diferentes energias. O grupos irradiados receberam a FBM durante sete dias consecutivos, com um laser de 660nm, potência de 40mW e energias de 1, 2 e 6 J. Foram realizadas análises de proliferação e viabilidade celular, além da quantificação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e do mediador inflamatório interleucina 8 (IL-8) nos tempos de 1, 3 e 7 dias após a primeira irradiação. Os resultados desmontaram que independentemente do tipo de cultivo, a FBM foi capaz de aumentar a proliferação celular nas energias de 1 J e 2 J, porém no cultivo 2D a energia de 6 J não foi benéfica. Além disso foi observada uma ação direta da FBM no aumento das EROs no cultivo 3D com a energia de 2 J e em ambos os cultivos com a energia de 6 J. Com relação a expressão da IL-8, foi observada diminuição significativa somente no cultivo 3D com todas as energias avaliadas. Assim podemos concluir, que a dimensionalidade extra do cultivo 3D é capaz de modificar os resultados da FBM, além de destacarmos que esta é uma técnica eficaz na proliferação desse tipo celular e possui estreita relação com a produção de EROs e mediadores inflamatórios.

**Palavras- chave:** fotobiomodulação; cultura celular; bidimensional; tridimensional; células-tronco.

## 5.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as pesquisas nas áreas de medicina regenerativa e engenharia de tecidos avançaram extensivamente com base nas descobertas do uso de células tronco, em particular as células-tronco mesenquimais (CTMs), que se apresentam como uma alternativa às modalidades terapêuticas convencionais (1). Esse grupo celular vem sendo amplamente investigado devido a possibilidade de extração de uma grande variedade de tecidos (2–5), além de possuírem grande capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células especializadas, como adipócitos, condrócitos e osteoblastos (6,7).

As células tronco mesenquimais advindas do tecido adiposo (ASCs) despertaram o interesse no ambiente científico pelo fato destas células serem facilmente isoladas em altas quantidades através de tecidos lipoaspirados, além de exibirem crescimento estável e cinética proliferativa favorável em cultura (1,2,8). Além disso as ASCs têm um alto potencial de diferenciação devido a sua multipotencialidade, podendo originar tipos celulares distintos de origem mesodérmica como osso, cartilagem, músculo, tendão/ligamento, gordura e derme, favorecendo futuras aplicações em contextos clínicos (8,9).

A terapia por fotobiomodulação a laser (FBM) é relatada na literatura como uma terapia alternativa no tratamento de diversas disfunções clínicas, com ênfase na cicatrização e regeneração tecidual, sendo que seu êxito deve-se aos amplos efeitos sobre os diferentes tecidos, entre os quais se destacam o aumento da atividade celular e os efeitos trófico-regenerativos através da modulação da resposta inflamatória e analgésica (10–12).

Diversas respostas celulares foram observadas em modelos *in vitro* após irradiação com a FBM em diferentes comprimentos de onda, sendo as principais: aumento da respiração mitocondrial e produção de ATP (13,14), a síntese de proteínas (15) e a migração e proliferação das células (12,16,17). A literatura vem buscando formas alternativas que possam aumentar a proliferação e ainda manter o carácter de células estaminais (8,18), porém a grande discrepância

entre a parametrização dificulta a comparação entre os estudos, tornando mais difícil o estabelecimento de protocolos eficazes (19–21). Para além disso, esses estudos foram projetados para modelos celulares de monocamadas bidimensionais (2D), cultivadas em substratos planos e rígidos, que recebem uma quantidade homogênea de nutrientes e fatores de crescimento do meio, porém, essas condições podem não refletir a situação *in vivo*, onde as células crescem dentro de um complexo tridimensional (22,23).

Pesquisas anteriores demonstraram que os modelos de cultura tridimensional (3D) fornecem um ambiente melhor para a morfologia celular e análise de fenótipo, permitindo que as células migrem, estabelecendo comunicação entre elas e com a matriz extracelular (MEC) (24). A literatura apresenta diferentes modelos de materiais biológicos em 3D, sendo os de culturas celulares em hidrogéis um dos modelos mais utilizados. Nos últimos anos, um dos desafios no design de hidrogéis foi modelar as propriedades do hidrogel para formar estruturas compatíveis com células, porém nos hidrogéis tradicionais muitas vezes não é observado uma adesão e migração celular satisfatória (22).

A *gellan gum* (GG) é um exopolissacarídeo bacteriano que se assemelha à composição de glicosaminoglicano da MEC. Estudos recentes tem explorado hidrogéis de GG para várias aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, porém estes não permitem a adesão de células de maneira satisfatória, assim, foram desenvolvidos hidrogéis esponjosos de GG através de um processo de freezing/freeze-drying/re-hydration (25). Estes hidrogéis esponjosos permitem a absorção de proteínas do soro do meio às quais as células depois se aderem. Afim de controlar o tipo de proteína à qual as células se ligam, a *gellan gum* foi funcionalizada com péptidos específicos que permitem a adesão de células específicas (26). De modo a promover a adesão a células estaminais, este trabalho propõe o uso de hidrogéis esponjosos funcionalizados com o *péptido arginine-glycine-aspartic acid* (RGD) como modelos de cultura *in vitro* em 3D.

Com isso acredita-se, que resultados mais confiáveis sobre respostas celulares a diferentes estímulos, como FBM, podem ser obtidos a partir dos modelos 3D (27,10). Assim, este estudo teve como objetivo explorar a ação da FBM, em diferentes energias, no comportamento de hASCs em condições 2D e 3D, com o hidrogel esponjoso GG-RGD, *in vitro* para elucidar os mecanismos de ação dessa terapia de maneira mais fidedigna e estabelecer parâmetros eficazes que possam se futuramente aplicados com segurança em estudos *in vivo*.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Preparação das estruturas 3D de *Gellan Gum* com *arginine-glycine-aspartic acid* (GG-RGD)

Hidrogéis esponjosos de gellan gum (GG) foram preparados de acordo com um procedimento previamente descrito e patenteado com algumas modificações (28). O GG (Sigma-Aldrich, Portugal) foi modificado pela primeira vez com divinilsulfona (DVS, Sigma-Aldrich, Portugal), conforme relatado anteriormente. A eficiência da conjugação de DVS foi confirmada por <sup>1</sup>H-RMN. Em seguida foi adicionado ao GG-DVS (1%, p / v) o peptídeo CGRGDSP (800 µM, 95% de pureza, Selleckchem, EUA) por 1 h em temperatura ambiente. A eficiência da conjugação do peptídeo CGRGDSP foi determinada por micro-BCA. Uma solução de GG (2%, p / v) foi dissolvida a 90°C por 30 min e depois misturada com a solução GG-DVS-RGD (1%, p / v) à temperatura ambiente (1: 1, v: v) A mistura foi vertida numa placa de petri e deixada reticulada à temperatura ambiente. Os hidrogéis foram então congelados a -80°C, por 24 horas e liofilização (LyoAlfa 10/15, Telstar, Espanha) durante três dias para obter redes poliméricas secas com GG/GG-RGD. Em seguida foram produzidos discos, através de *punch*, com um diâmetro de 5 mm e altura de aproximadamente 4 mm.

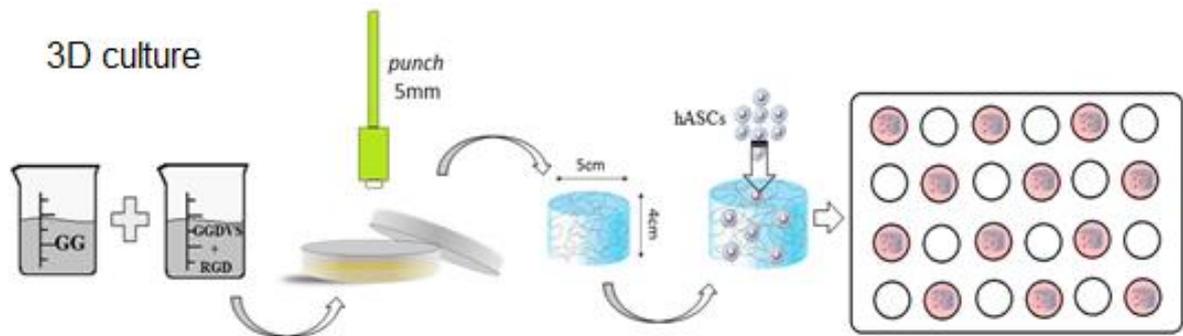
### **5.2.2. Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Adiposas Humanas (hASCs)**

As hASCs foram isoladas através de amostras de tecidos subcutâneo humano obtidos por lipoaspiração. As amostras foram fornecidas pelo Hospital da Prelada (Porto, Portugal), após a assinatura do termo de consentimento pelos pacientes sob um protocolo de colaboração com o 3B's *Research Group*, aprovado pelos comitês de ética de ambas as instituições. O isolamento das hASCs foi realizado no grupo de Investigação 3B's de acordo com o protocolo já padronizado (29). As células foram cultivadas em  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) (Life Technologies, Bleiswijk, The Netherland) suplementado com 10% Soro Fetal bovino (FBS) (Life Technologies, Bleiswijk, The Netherland), 1% antibiótico/antimicótico (A/A) (Life Technologies, Paisley, UK) e mantidas numa incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O fenótipo de hASCs foi confirmado pela expressão dos principais marcadores mesenquimais (CD90, CD105 e CD73) analisados por citometria de fluxo e após diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica.

### **5.2.3. Cultivo celular (hASCs)**

Para o estudo 2D, as células foram cultivadas a uma densidade de 2.500-5.000 cells/cm<sup>2</sup> ( $1 \times 10^4$ ) em placas de cultivo de 48 poços e após 24h da semeadura receberam a irradiação pela FBM em meio  $\alpha$ -MEM (Life Technologies, Bleiswijk, The Netherland). Para os estudos em 3D, as células foram adicionadas aos hidrogéis esponjosos (GG-RGD) numa suspensão celular de  $8 \times 10^4$  células/mL, sendo inoculado  $0.08 \times 10^6$  células por hidrogel, após a dispersão adequada das células dentro da solução polimérica, as partículas de hidrogel foram preparadas como descrito anteriormente. Partículas de hidrogel de células carregadas foram incubadas em meio  $\alpha$ -MEM suplementado em uma atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. A construção

foi mantida em cultura por 24 horas e em seguida estimulada pela FBM. Para garantir reprodutibilidade dos dados, ambos os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 1: Preparação do hidrogel esponjoso GG-RGD e cultivo celular.** Associação dos compostos de gellan gum com RGD seguido da elaboração do hidogel a partir de um *punch* com 5mm de diâmetro e incorporação das células ao hidrogel mantidos em cultura com meio  $\alpha$ -mem.

#### 5.2.4. Fotobiomodulação (FBM)

Foi utilizado um laser vermelho, diodo Alumínio Gálio Índio Fósforo (InGaAlP) (Therapy XT, DMC São Carlos/SP, Brasil) com comprimento de onda de 660 nanômetros (nm), potência de 40mW, área transversa do feixe de 0,0475 cm<sup>2</sup> e energias de 1J, 2J e 6J (Tabela 1). A ponteira do laser foi direcionada de forma perpendicular a cada poço, sendo mantida fixamente, com distância de 3,14 cm da ponta da caneta laser até o fundo do poço, de modo que esta distância permitiu que o feixe da luz laser recobrisse a área total do poço (17), alterando a área do feixe para 0,95 cm<sup>2</sup>. As células foram semeadas de modo que um poço, entre os semeados, foi deixado vazio, para prevenir a dispersão intencional de luz entre os poços.

As aplicações da FBM ocorrem inicialmente após 24h da semeadura das células e durante 7 dias consecutivos com um intervalo de 24h entre cada irradiação, totalizando sete irradiações por grupo.

É importante ressaltar que os parâmetros de potência, comprimento de onda e energia foram baseados em um estudo de Andrade et al., 2018 (17) que destacaram a ação da FBM nas CTMs em cultivo bidimensional.

**Tabela 1:** Detalhamento dos parâmetros da FBM com laser InGaALP;

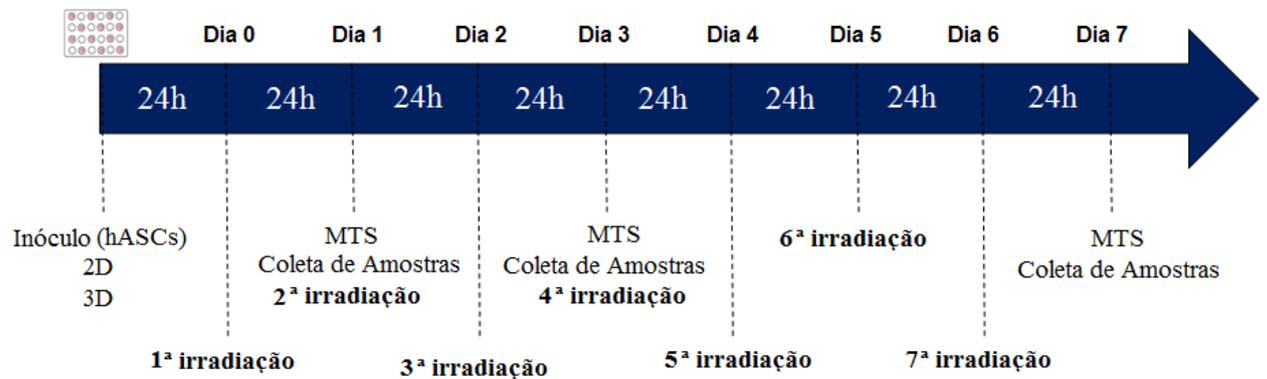
<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Potência (mW)</b>	40
<b>Comprimento de Onda (nm)</b>	660
<b>Modo de ação</b>	Contínuo
<b>Área transversa do feixe (cm<sup>2</sup>)</b>	0.0475
<b>Área irradiada (cm<sup>2</sup>)</b>	0.95
<b>Irradiância (mW/cm<sup>2</sup>)</b>	42.55
<b>Densidade de Energia (J/cm<sup>2</sup>)</b>	1; 2.1; 6.3
<b>Tempo (s)</b>	25;50;150
<b>Energia (J)</b>	1;2;6
<b>Número e Frequência das sessões</b>	7 irradiações (a cada 24 horas)

### 5.2.5. Experimental Design

O presente estudo foi dividido em oito grupos, sendo quatro grupos para o experimento em 2D (G1-G4) e quatro grupos para o experimento em 3D (G5-G8):

- **Grupo 1 (G1):** hASCs e simulação a irradiação da FBM;
- **Grupo 2 (G2):** hASCs irradiadas com energia de 1J.
- **Grupo 3 (G3):** hASCs irradiadas com energia de 2J;
- **Grupo 4 (G4):** hASCs irradiadas com energia de 6J;
- **Grupo 5 (G5):** hASCs+GG-RGD e simulação a irradiação da FBM;
- **Grupo 6 (G6):** hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 1J;
- **Grupo 7 (G7):** hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 2J;

- **Grupo 8 (G8):** hASCs+GG-RGD irradiadas com energia de 6J;



**Figura 2: Linha do Tempo:** Projeto experimental de irradiação FBM e coleta de amostras para posterior análise.

### 5.2.6. Citotoxicidade e Viabilidade celular

A citotoxicidade foi avaliada 1, 3 e 7 dias após a primeira irradiação da FBM, através da análise de células vivas e mortas recorrendo a análise de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-sulfofenil) -2H-tetrazólio) para a cultura 2D, em que foi realizada a incubação das células com uma mistura de meio de cultura, sem vermelho fenol, + MTS (proporção de 5:1), para cada poço, mantidas por quatro horas protegidas da luz. A leitura da absorbância da placa foi realizada com 490nm como descrito pelo fabricante. Para a cultura 3D, as células foram incubadas com uma mistura de calceína (1:1000) e propidium iodide (1:500) em meio durante 1h em uma atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. As células foram posteriormente analisadas no microscópio laser confocal (Leica) e a quantificação de células vivas/mortas foi efectuada através do software Image J.

### 5.2.7. Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada 1, 3 e 7 dias após a primeira irradiação FBM. Para a cultura 2D, as células foram incubadas por 1 h em H<sub>2</sub>O e congeladas a -80°C antes da quantificação do DNA. O kit Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies, Escócia) foi usado para quantificar o DNA de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a quantificação do DNA foi realizada adicionando 28,7 µL de amostra ou padrão a um poço de uma placa de poliestireno branco de 96 poços, misturada com 100 µL de tampão Tris-EDTA 1X (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,5) e 71,3 µL de 1X de reagente Quant-iT™ PicoGreen®, todos os reagentes do kit de ensaio Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Life Technologies, Escócia) e incubados por 10 min em temperatura ambiente. A fluorescência foi lida a 480 nm (excitação) e 520 nm (emissão) no leitor de microplacas. Para a cultura 3D, as células foram imunocoradas com o marcador de proliferação ki67 e o marcador nuclear 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, SIGMA, EUA). Resumidamente, hidrogéis do tipo esponjoso carregados de células foram fixados com 400 µl de formalina tamponada (Thermo Scientific, EUA) e, em seguida, hidrogéis do tipo esponjoso foram cortados em quatro pedaços para melhor penetração dos reagentes. Os hidrogéis carregados de células foram incubados com 1% v / v de Triton-X 100 frio (SIGMA, Portugal) por 20 min a 4°C para permeabilização da membrana celular, seguido de incubação com 2,5% v / v de soro de cavalo (Kit VECTASTAIN Elite ABC, Vector Labs, EUA) por 1h em RT para bloquear a ligação inespecífica ao antígeno e, em seguida, com o anticorpo primário anti-Ki67 (1:50, Abcam, Estados Unidos) a 4 °C por 24 horas. As amostras foram cuidadosamente lavadas com PBS antes da adição do anticorpo secundário (1: 500, Alexa Fluor 488 - Abcam, Estados Unidos) e DAPI (0,02 mg / mL, Biotium, EUA) durante a noite a 4°C. As amostras foram cuidadosamente lavadas com PBS antes da análise confocal no microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Alemanha) com os filtros 405 (DPI) e 488 (ki-67). O número de células proliferativas e o número total de células foram

quantificados pelo software Image J para determinar a% de células proliferativas no hidrogel esponjoso.

#### **5.2.8. Expressão Interleucina 8 (IL-8)**

Para a avaliação da concentração de IL-8 foi utilizado o ensaio de ELISA com o kit IL-8 Human ELISA (MyBioSource, California, EUA, com amostras dos sobrenadante coletados 1, 3 e 7 dias após a primeira irradiação. Uma série de soluções padrão de diluição dupla foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Os valores das amostras foram lidos a partir da curva padrão ajustada para dois comprimentos de onda, 450 nm e 620nm e com as unidades de medida expressas como picograma por mililitro. Todas as amostras foram analisadas simultaneamente. Para a análise estatística os resultados foram transformados em porcentagem (%).

#### **5.2.9. Estresse oxidativo**

A detecção e quantificação do estresse oxidativo foi realizada com um kit específico, *OxiSelect in vitro ROS/RNS assay* (Cell Biolabs, EUA), com amostras dos sobrenadante coletados 1, 3 e 7 dias após a primeira irradiação. Este kit emprega uma “sonda” baseada no 2', 7' -dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH). O DCFHA reage com as espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando uma fluorescência. Foi utilizado um leitor de microplaca fluorescente com capacidade de leitura de 480 nm (excitação) e 530 nm (emissão). O protocolo adotado foi o descrito pelo fabricante. Para a análise estatística os resultados foram transformado em porcentagem (%).

### **5.2.10. Análise estatística**

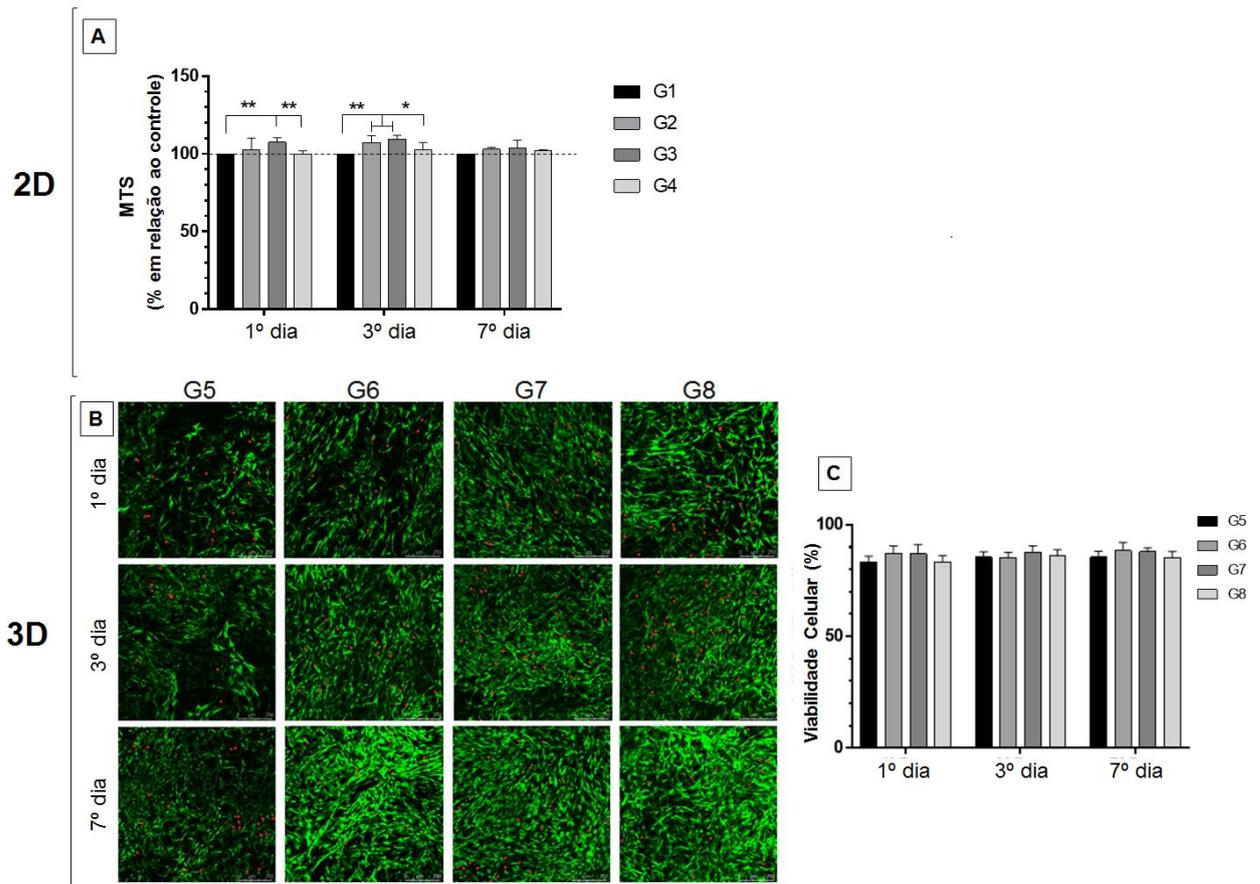
Os dados estão apresentados em média e desvio padrão e por meio de técnicas descritivas, tais como gráficos e tabelas. A normalidade foi avaliada com o teste de Shapiro Wilk, e para comparação entre os grupos foi realizada a análise de variância pelo teste ANOVA-Two way. Na presença de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) foi aplicado o teste de Tukey. O software GraphPad Prism® 7.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a realização das análises.

## **5.3. RESULTADOS**

### **5.3.1. Viabilidade das hASCs após FBM (2D e 3D)**

O efeito do FBM na viabilidade de hASCs cultivados sob condições padrão 2D foi avaliado através da análise da atividade mitocondrial (Figura 3A). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos após a primeira aplicação de FBM. No entanto, diferenças significativas foram detectadas três dias após a primeira irradiação (Figura 3A). Uma atividade metabólica significativamente maior foi observada nos grupos G2 e G3 quando comparados aos grupos G1 e G4 ( $p < 0,05$ ).

O efeito do FBM na viabilidade de hASCs cultivados em hidrogéis esponjosos do tipo GG biofuncionalizados em 3D foi avaliado medindo a quantidade de células vivas / mortas (Figura 3B). Todos os grupos apresentaram viabilidade acima de 80%, sem diferenças significativas entre os grupos, independentemente do tempo e quantidade de irradiação (Figura 3B e 3C).

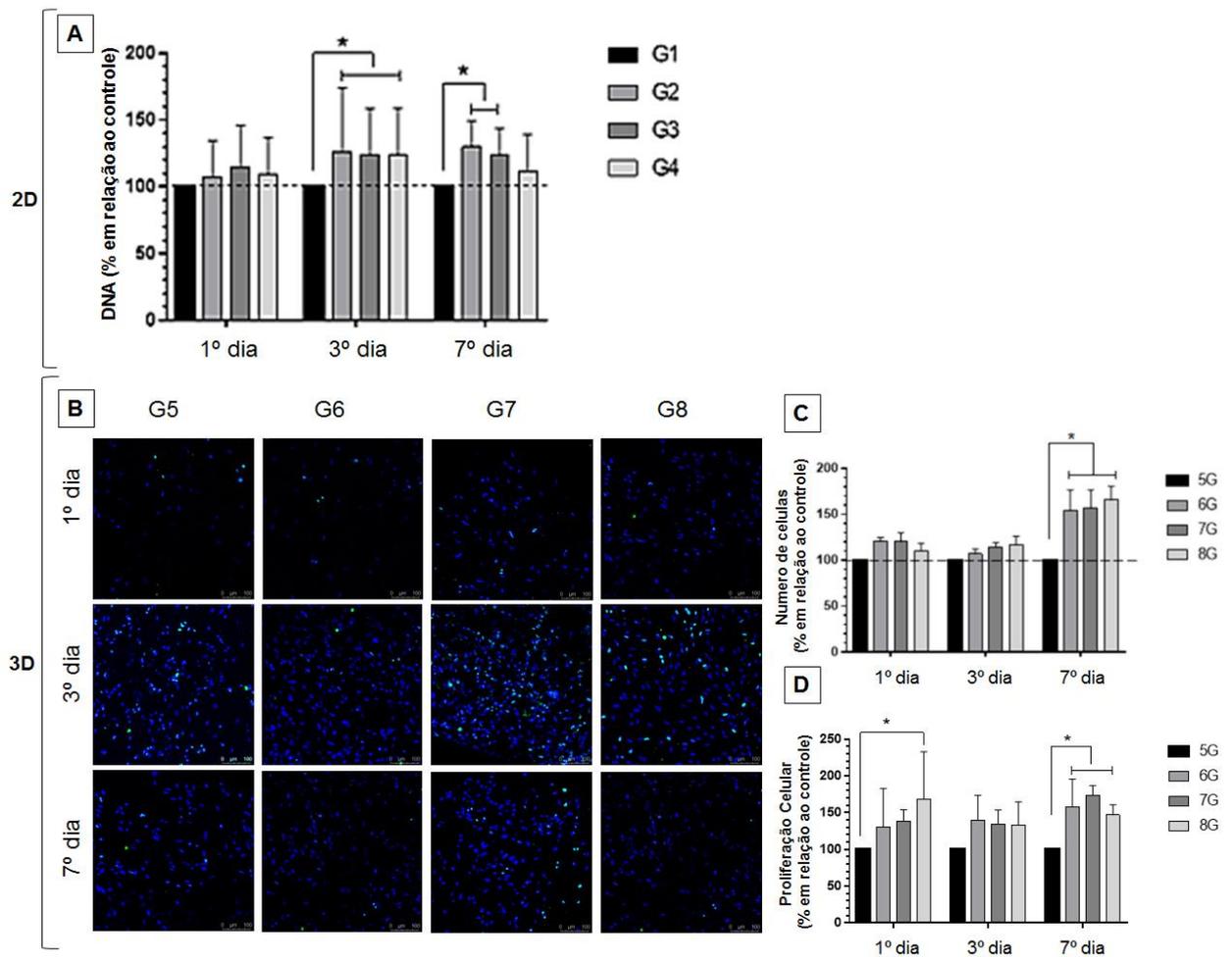


**Figura 3 - Viabilidade de hASCs após FBM (2D e 3D).** A) Viabilidade de hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas pelo MTS. B) Viabilidade de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, quantificadas a partir de imagens microscópicas confocais. C) Porcentagem de viabilidade de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM. As células vivas foram coradas com calceína (verde) e as células mortas coradas com iodeto de propídio (vermelho). As imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Alemanha). Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:** hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.

### 5.3.2. Proliferação de hASCs após FBM (2D e 3D)

O efeito do FBM na proliferação de hASCs cultivadas sob condições padrão 2D foi avaliado por quantificação de DNA (Figura 4A). Todos os grupos que receberam irradiação com a FBM (G2-G4) apresentaram proliferação significativamente superior no terceiro dia (G2 = 126,3% ± 47; G3 = 124,3% ± 34; G4 = 123,9% ± 35,  $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle (G1). Ao final do período experimental (7 dias), apenas os grupos G2 e G3 apresentaram proliferação significativamente maior (G2 = 129,8% ± 19,5; G3: 126,5% ± 20,1,  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (G1).

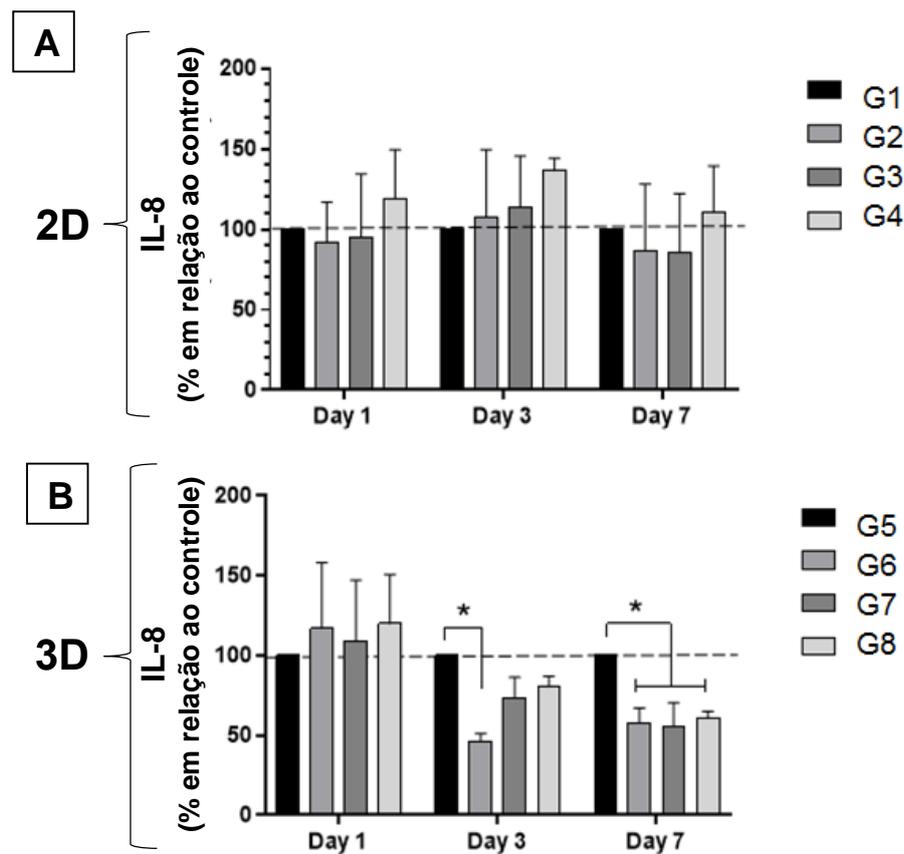
O efeito do FBM na proliferação de hASCs cultivadas em hidrogéis esponjosos do tipo GG biofuncionalizados em 3D foi avaliado quantificando a quantidade de células vivas (Figura 4B) e células proliferativas (Figura 4C e D) ao longo do tempo a partir de imagens de microscopia confocal. O número de células vivas nos hidrogéis esponjosos biofuncionalizados em 3D foi significativamente maior no grupo G8 ( $p = 0,0279$ ) no terceiro dia e nos grupos G6, G7 e G8 ( $p < 0,001$ ) no sétimo dia, em relação ao grupo controle (G5) (Figura 4B). Um número maior de células vivas foi detectado no primeiro dia em grupos irradiados em relação ao controle (Figura 4C e D). A quantidade de células proliferativas foi maior em todos os grupos (G6, G7 e G8) em todos os momentos, mas uma quantidade significativa de células proliferativas foi detectada apenas no grupo G8 (168% ± 64,24) quando comparado ao grupo controle após 24 horas (Figura 4C e D). Ao final do experimento, observamos que os grupos irradiados apresentaram diferença significativa com maior porcentagem de células proliferativas (6G: 158,27% ± 37,2; 7G: 172,97% ± 13,81; 8G: 146,78% ± 14,16) quando comparado ao grupo controle.



**Figura 4 - Proliferação de hASCs após FBM (2D e 3D).** **A)** Proliferação de hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas por quantificação de DNA. **B)** Proliferação de hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, quantificadas a partir de imagens de microscopia confocal para Ki67 e **C, D)** porcentagem de células proliferativas de hASCs sem (G5) e com (G6) -G8) exposição ao FBM. As células proliferativas são imunocoradas para ki-67 (verde) e contra-coradas com DAPI (azul). As imagens foram adquiridas usando um microscópio confocal Leica TCS SP8 (Leica, Alemanha). G1: hASCs; G2: hASCs+FBM 1J; G3: hASCs+FBM 2J; G4: hASCs+FBM 6J; G5: hASCs+GG-RGD; G6: hASCs+GG-RGD+FBM 1J; G7: hASCs+GG-RGD+FBM 2J; G8: hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Dados expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.

### 5.3.3. Expressão de IL-8 após FBM (2D e 3D)

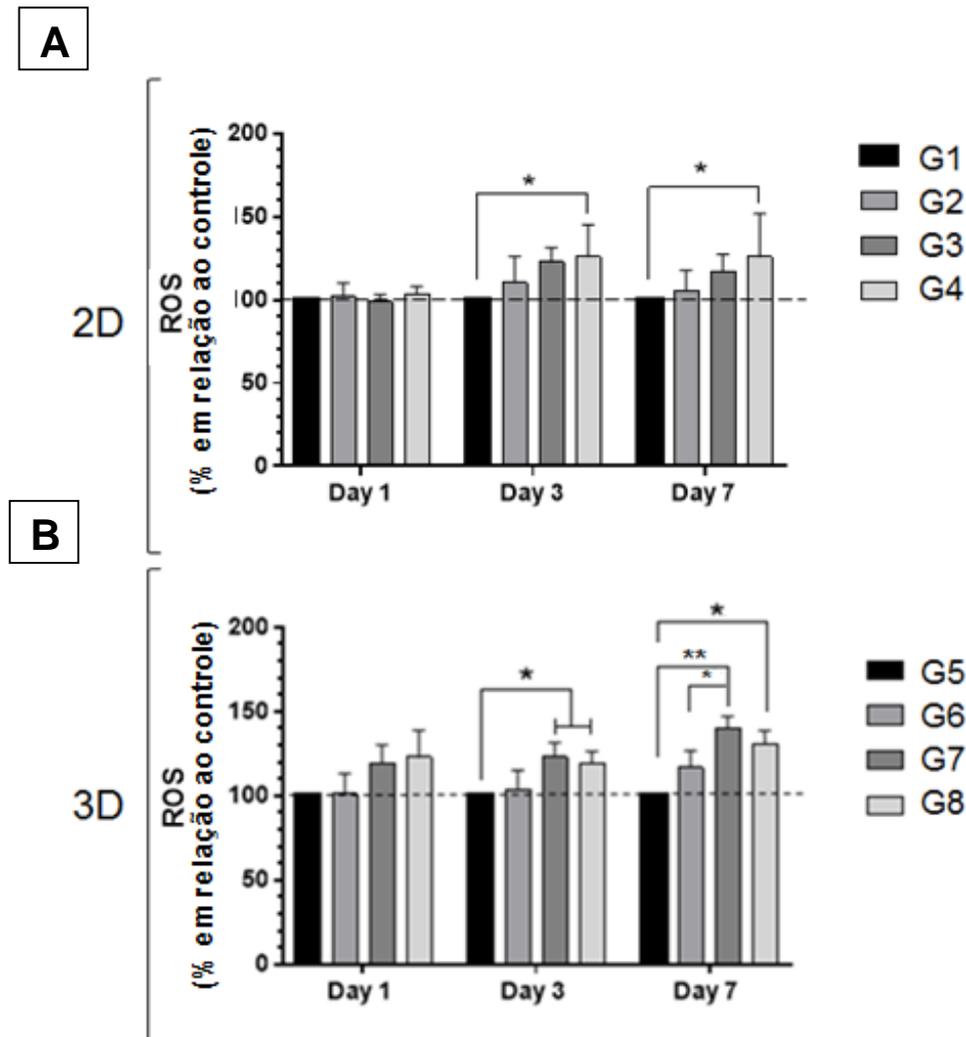
O efeito do FBM na liberação de IL-8 por hASCs foi quantificado por ELISA (Figura 5). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos irradiado e controle durante todo o período experimental em que as células foram cultivadas em condições de cultura padrão (2D) (Figura 5A). No entanto, a expressão de IL-8 foi diminuída em todos os grupos irradiados no terceiro e sétimo dias, quando as células foram cultivadas em condições de cultura 3D (Figura 5B). O grupo G6 apresentou redução estatisticamente significativa no terceiro dia ( $p = 0,009$ ) e todos os grupos irradiados apresentaram redução significativa no sétimo dia (G6: 57,67%; G7: 55,74%; G8: 60,69%) quando comparado ao grupo controle (G5).



**Figura 5 - Expressão de IL-8 após FBM (2D e 3D).** A) Expressão de IL-8 por hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura padrão 2D, determinadas pelo ensaio ELISA. B) Expressão de IL-8 por hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D, determinadas pelo ensaio ELISA. Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:** hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Dados expressos em média e desvio padrão. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.

#### **5.3.4. Expressão de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) após FBM (2D e 3D)**

Nas condições padrão 2D, a análise reativa das espécies de oxigênio não revelou diferenças significativas entre os grupos após 24 horas (Figura 6A). Entretanto, no terceiro e sétimo dia após o início das irradiações, todos os grupos apresentaram maior liberação de EROs quando comparados ao grupo controle (G1), sendo estatisticamente diferente para o grupo G4 ( $122\% \pm 8$  e  $117\% \pm 10$ ) (Figura 6A). Nas condições de cultura 3D, os grupos G7 e G8 apresentaram maior porcentagem de EROs logo após a primeira irradiação, quando comparados ao grupo controle (G5). Essa diferença foi estatisticamente significativa do terceiro ao sétimo dia (Figura 6B). Vale ressaltar que, no sétimo dia de avaliação, quando comparados os grupos irradiados, os grupos G7 ( $140\% \pm 6,9$ ) e G8 ( $130\% \pm 8,6$ ) apresentaram valores superiores em relação ao G6 ( $116\% \pm 10$ ), e diferença foi estatisticamente significativa (fig. 6).



**Figura 6 - Expressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) após FBM (2D e 3D).** **A)** Expressão de EROs por hASCs sem (G1) e com (G2-G4) exposição ao FBM em condições de cultura 2D padrão. **B)** Expressão de EROs por hASCs sem (G5) e com (G6-G8) exposição ao FBM em condições de cultura 3D. Dados expressos em média e desvio padrão. **G1:** hASCs; **G2:** hASCs+FBM 1J; **G3:** hASCs+FBM 2J; **G4:** hASCs+FBM 6J; **G5:** hASCs+GG-RGD; **G6:** hASCs+GG-RGD+FBM 1J; **G7:** hASCs+GG-RGD+FBM 2J; **G8:** hASCs+GG-RGD+FBM 6J. Diferença estatística (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,001$ , teste de ANOVA *two-way* com *post-hoc* de Tukey.

## 5.4. DISCUSSÃO

As recentes investigações a respeito da utilização de CTMs na engenharia de tecidos tem despertado o interesse de pesquisadores na busca por técnicas eficazes que estimulem sua proliferação. Sabe-se que a FBM é uma técnica eficaz para a proliferação de diversos grupos celulares, sendo a faixa de comprimento de onda de 600nm a 700nm a mais indicada para as CTMs (17,30). Acredita-se que exista uma “janela terapêutica” capaz de gerar os efeitos bioestimulatórios, entretanto a parametrização adequada ainda permanece controversa na literatura (31). Em nosso estudo propusemos observar a eficácia e os mecanismos de ação da FBM, com diferentes doses de energia, nas hASCs em cultivos bidimensionais e tridimensionais afim de também comparar ambas as técnicas.

Um estudo *in vitro* bidimensional realizado previamente por nosso grupo de pesquisa concluiu que o uso da FBM para proliferação de hASCs com um laser vermelho é capaz de gerar respostas bifásicas quanto ao comportamento celular, dependendo da energia e tempo de exposição empregados, entretanto os mecanismo de ação não haviam sido explorados (17). No presente estudo, novamente destacamos a ação da FBM apresentando uma resposta bifásica no estudo em 2D porém, o mesmo comportamento celular frente aos mesmos parâmetros não foram observados no cultivo 3D. Esses resultados nos levam a questionar se a resposta bifásica apresentada está mais relacionada a dose aplicada da FBM ou as condições em que as células foram cultivadas, pois no cultivo 3D o fato das células serem mantidas sobre um hidrogel pode ter ocorrido a difusão da luz no hidrogel reduzindo a ação da FBM sobre as células, não chegando a atingir um nível de inibição ou inativação celular.

Ginani et al., 2018(32) avaliaram a proliferação e viabilidade de CTMs, em cultivo bidimensional, após a aplicação da FBM com um laser vermelho e parâmetros muito similares aos utilizados em nosso estudo (30mW; 0.5J e 1J). Os autores concluíram que a energia de 1J apresentou maior eficácia na proliferação celular, mantendo a viabilidade das células. Esses

achados corroboram com nosso estudo uma vez que em nosso cultivo bidimensional, as doses de 1J e 2J apresentaram efeito bioestimulatório nas hASCs, sem alterar a viabilidade celular.

Apesar da literatura destacar que a FBM em cultivos 2D promove uma alteração no comportamento celular levando muitas vezes a uma maior proliferação, é importante ressaltar que a utilização de altas energias podem ser prejudiciais como destacado por Kreisler et al., (2002) (33), que observaram que altas doses de energia podem gerar uma ação inibitória ou inativação, assim como em nosso estudo em 2D, que no 3º dia de avaliação o grupo com maior energia apresentou resultados negativos quando comparado as outras doses.

A busca por modelos biológicos para culturas em 3D vem sendo amplamente investigado na literatura na tentativa de se reduzir o uso de animais. Sabe-se que nos tecidos humanos, as células se conectam a uma estrutura de suporte chamada matriz extracelular (MEC) e não apenas umas às outras, como ocorre no cultivo em 2D, sendo que a conexão a outras estruturas alteram o comportamento celular (34,35). O modelo de culturas em géis de MEC é o mais utilizado, porém nos hidrogéis tradicionais muitas vezes não é observado uma adesão e migração celular satisfatória (22). Em nosso estudo foi utilizado um hidrogel esponjoso, GG-RGD, previamente testado em outros trabalhos que avaliaram a interação do composto com CTMs e concluíram que o hidrogel era compatível com as propriedades celulares, além de ser observada adesão e crescimento celular de forma natural e satisfatória (29,36) possibilitando assim a execução deste estudo de forma fidedigna. Ao contrário dos estudos projetados em culturas 2D (34), em nosso estudo foi possível observar que a interação das células com o hidrogel de GG-RGD, gerou um comportamento diferente do visto no cultivo em 2D, sendo observado que a dose de energia mais alta, utilizada no estudo, quando aplicada em cultivo bidimensional obteve uma atividade inibitória enquanto no cultivo 3D a dose não foi prejudicial, assim discrepância entre os resultados pode estar relacionado ao fato das células no cultivo 3D interagirem com o hidrogel. Até o momento, este é o primeiro estudo que avaliou a

ação da FBM na proliferação de CTMs em cultivo tridimensional, utilizando um hidrogel esponjoso que simula características próximas da MEC. Zaccara et al., 2018(37) realizaram um estudo em que foi avaliado a ação da FBM na diferenciação de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs) em cultivo tridimensional utilizando um laser vermelho com 1J de energia, sendo obtidos resultados positivos.

Com relação aos mecanismos envolvidos na FBM várias são as teorias que buscam esclarecer ação desta terapia no organismo (31,38). Em nosso estudo foi observado que no cultivo em 2D a quantidade EROs liberada pela energia mais alta (4G) empregada foi maior do que o grupo que não recebeu irradiação, e no cultivo em 3D as duas maiores energias foram as que também obtiveram maior liberação da EROs, corroborando com a teoria de que a FBM estimula a produção de EROs. Entretanto, na cultura em 2D sugere-se que o aumento da EROs pode ter promovido uma ação negativa na células, já que observamos que a energia mais alta possa ter gerado uma inibição celular.

Freitas e Hamblin (2017) (39) discutiram em seu estudo os possíveis mecanismos de ação da FBM, destacando que a técnica apresentava um envolvimento direto com o estresse oxidativo e a liberação de EROs, assim como Huang et al., (2011) (31) que observaram a possibilidade de existirem dois tipos distintos de EROs, podendo haver EROs benéficos ou prejudiciais as célula, que pode ser exemplificado por nosso estudo, em que o aumento da produção de EROs no cultivo 2D foi prejudicial para a proliferação celular em contra partida no cultivo 3D o aumento das EROs pode ter contribuído para o aumento da proliferação e expressão celular. Além disso sabe-se que a quantidade liberada de EROs também influencia no comportamento celular, sendo que em grandes quantidades pode ser altamente prejudicial (31,39). Stadler et al., 2000 realizaram um estudo em que foi avaliado a ação da FBM na proliferação de linfócitos com um laser com comprimento de onda de 660nm, potência de 40mW e energias próximas as utilizadas em nosso estudo. Os autores concluíram que o aumento

da proliferação celular estava atrelado a estimulação das EROs e da produção de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), assim como nossos resultados encontrados no cultivo 3D.

Outro fator discutido na literatura que pode contribuir para a compreensão da ação da FBM é a modulação de citocinas anti e pró-inflamatórias (39,40). Em nosso estudo no cultivo 3D, os grupos que receberam a irradiação obtiveram uma diminuição da IL-8 após o 3º dia. Já as células cultivadas em 2D não obteve-se diferença entre os grupos em nenhum dos períodos. Hwang et al., (2015) (41) cultivaram células humanas do ânulo fibroso com meio condicionado obtido de macrófagos contendo as citocinas pró-inflamatórias IL1 $\beta$ , IL6, IL8 e TNF- $\alpha$ . Eles compararam 405, 532 e 650 nm com energias de até 1,6 J. Os autores descobriram que todos os comprimentos de onda reduziram a expressão de IL8.

A dimensionalidade adicional das culturas 3D é característica crucial que leva a diferenças nas respostas celulares, influenciando a organização espacial dos receptores da superfície celular envolvidos nas interações com as células circundantes (22), devido ao papel desempenhado pela IL-8 na comunicação célula-célula o cultivo bidimensional pode não favorecer um ambiente propício para tal interação.

## 5.5. CONCLUSÃO

FBM (660nm) promoveu a proliferação de hASCs e a produção de EROs nas condições de cultura 2D e 3D, mas uma redução de IL-8 foi detectada nas condições de cultura 3D. Esses resultados levantam a questão de se discutir se a resposta bifásica está mais relacionada à dosagem da FBM utilizada ou às condições de cultivo celular. Na cultura 3D, pode ocorrer difusão da luz no hidrogel, reduzindo a ação da FBM nas células, não atingindo um nível de inibição celular. A cultura celular 3D é uma alternativa eficiente para entender os mecanismos celulares ativados pela FBM, uma vez que essa condição está mais próxima do organismo vivo. Assim, é essencial explorar melhor protocolos que possam ser utilizados em futuros estudos *in*

*vivo*, bem como os mecanismos de ação desencadeados pelo PBM. Indicamos a necessidade de mais estudos *in vitro* com culturas 3D para evitar estudos experimentais em larga escala com animais.

## 5.6. REFERÊNCIAS

1. Zuk PA, Ph D, Zhu MIN, Mizuno H, Benhaim P, Lorenz HP. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211–28.
2. Soares DM, Ginani F, Augusto C, Barboza G. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci.* 2015;30:1171–4.
3. Madeira C, Santhagunam A, Cabral JMS. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol.* 2014;33(1):35–42.
4. Toyserkani NM, Christensen ML, Sheikh SP, Sørensen JA. Adipose-Derived Stem Cells. *Ann Plast Surg.* 2015;75(1):117–23.
5. Klar AS, Zimoch J, Biedermann T. Skin Tissue Engineering : Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2017;2017.
6. Spradling A, Drummond-barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature.* 2001;414(November):98–104.
7. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(November):105–11.
8. Villiers JA De, Houreld NN, Abrahamse H. Influence of Low Intensity Laser Irradiation on Isolated Human Adipose Derived Stem Cells Over 72 Hours and Their Differentiation Potential into Smooth Muscle Cells Using Retinoic Acid. *Stem Cell Rev.* 2011;7(4):869–82.
9. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine Jeffrey. *Circ Res.* 2017;100(9):1249–60.
10. Basso FG, Soares DG, Alberto C, Costa DS. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci [Internet]. Lasers in Medical Science;* 2016;31:973–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-016-1945-4>
11. Brassolatti P, de Andrade ALM, Bossini PS, Otterço AN, Parizotto NA. Evaluation of

- the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2018;
12. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013;32(1):41–52.
  13. Karu T. Mitochondrial Mechanisms of Photobiomodulation in Context of New Data About Multiple Roles of ATP. *Photomed Laser Surg*. 2010;28(2):159–60.
  14. Amaroli A, Ravera S, Parker S, Panfoli I, Benedicenti A, Benedicenti S. 808-nm laser therapy with a flat-top handpiece photobiomodulates mitochondria activities of *Paramecium primaurelia* (Protozoa). *Lasers Med Sci* [Internet]. 2016 May 16 [cited 2019 Feb 12];31(4):741–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984347>
  15. Lipovsky A, Oron U, Gedanken A, Lubart R. Low-level visible light (LLVL) irradiation promotes proliferation of mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2013 Jul 25 [cited 2019 Feb 12];28(4):1113–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007630>
  16. Frigo L, Favero GM, Lima HJC1, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J et al. Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner. *Photomed Laser Surg*. 2010;28:151–6.
  17. de Andrade ALM, Luna GF, Brassolatti P, Leite MN, Parisi JR, de Oliveira Leal ÂM, et al. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2018;32:1–7.
  18. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med Sci*. 2008;23:277–82.
  19. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med*. 2007;39(4):373–8.
  20. Hu W, Wang J, Yu C, Lan CE, Chen G, Yu H. Helium – Neon Laser Irradiation Stimulates Cell Proliferation through Photostimulatory Effects in Mitochondria. *J*

- Invest Dermatol [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2007;127(8):2048–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700826>
21. Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. Photobiomodulation alters matrix protein activity in stressed fibroblast cells in vitro. *J Bio.* 2017;11(3):1–13.
  22. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(10):839–45.
  23. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Techno.* 2014;12(4):207–18.
  24. Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D Cell Culture Systems : Advantages and Applications. *J Cell Physiol.* 2015;230(May 2014):16–26.
  25. da Silva LP, Cerqueira MT, Sousa RA, Reis RL, Correlo VM, Marques AP. Engineering cell-adhesive gellan gum spongy-like hydrogels for regenerative medicine purposes. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Feb 12];10(11):4787–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048775>
  26. da Silva LP, Jha AK, Correlo VM, Marques AP, Reis RL, Healy KE. Gellan Gum Hydrogels with Enzyme-Sensitive Biodegradation and Endothelial Cell Biorecognition Sites. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2018 Mar [cited 2019 Feb 12];7(5):1700686. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29388392>
  27. da Silva LP, Santos TC, Rodrigues DB, Pirraco P, Cerqueira MT, Reis RL, et al. Stem Cell-Laden Hyaluronic Acid-Based Spongy-Like Hydrogels for an Integrated Healing of Diabetic Wounds Pathophysiologies. *J Invest Dermatol.* Elsevier Inc.; 2017;137(7):1541–51.
  28. da Silva LP, Cerqueira MT, Sousa RA, Reis RL, Correlo VM, Marques AP. Engineering cell-adhesive gellan gum spongy-like hydrogels for regenerative medicine purposes. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Feb 12];10(11):4787–97.
  29. Cerqueira MT, Da Silva LP, Santos TC, Pirraco RP, Correlo VM, Reis RL, et al. Gellan gum-hyaluronic acid spongy-like hydrogels and cells from adipose tissue

- synergize promoting neoskin vascularization. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(22):19668–79.
30. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Brief Report Effect of Wavelength on Low-Intensity Laser Irradiation-Stimulated Cell Proliferation In Vitro. *Lasers Surg Med*. 2005;12(October 2004):8–12.
  31. Huang Y, Sharma SK, Carroll J, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy – an update. *Dose Responde*. 2011;9(4):602–18.
  32. Ginani F, Soares DM, Alexandre H, Rocha DO, Souza LB De, Augusto C, et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Lasers Med Sci. Lasers in Medical Science*; 2018;33:95–102.
  33. Kreisler M, Christoffers AB, Al-haj H, Willershausen B, Hoedt B. Low Level 809-nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;369(February):365–9.
  34. Lee SIL, Ko Y, Park JUNB. Evaluation of the osteogenic differentiation of gingiva - derived stem cells grown on culture plates or in stem cell spheroids : Comparison of two - and three - dimensional cultures. *Exp Ther Med*. 2017;14(3):2434–8.
  35. Cukierman E, Cukierman E, Pankov R, Stevens DR. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science (80- )*. 2001;23:1708–20.
  36. Ferris C, Stevens L, Gilmore K, Mume E, Greguric I, Kirchmajer D, et al. Peptide modification of purified gellan gum. *J MATER CHEM B*. 2015;3(6):1106–15.
  37. Zaccara I, Mestieri L, Moreira M, Grecca F, Martins M, Kopper P. Photobiomodulation therapy improves multilineage differentiation of dental pulp stem cells in three-dimensional culture model. *J Biomed Opt*. 2018;23(9):1–9.
  38. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci*. 2009;16(1):31–7.
  39. Freitas LF de, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2017;22(3):1–37.

40. Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *J Quantum Electron.* 1987;23(10):1703–20.
41. Hwang M, Shin J, Kim K, Yoo C, Jo G, Kim J, et al. Low level light therapy modulates inflammatory mediators secreted by human annulus fibrosus cells during intervertebral disc degeneration in vitro. *Photochem Photobiol.* 2015;91(2):403–4013.

**6. ESTUDO III**

---

**UM MODELO ANIMAL OTIMIZADO PARA ESTUDOS DE QUEIMADURAS DE  
ESPESSURA TOTAL DA PELE**

***ALTERNATIVE ANIMAL MODEL FOR STUDIES OF TOTAL SKIN THICKNESS  
BURNS***

Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>; Julia Risso Parisi<sup>1</sup>; Patrícia Brassolatti<sup>2</sup>; Nivaldo  
Antonio Parizotto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos-  
SP, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Genética, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São  
Carlos- SP, Brasil.

**Artigo publicado no periódico “Acta Cirurgica Brasileira”**

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170100000005>

## Resumo

**Introdução:** A queimadura de terceiro grau é caracterizada como lesão grave do tecido, com envolvimento da espessura total. Diante da dificuldade em estabelecer tratamentos eficazes, a literatura vem buscando modelos experimentais que apresentam características semelhantes às que ocorrem nos pacientes, para melhor compreender a fisiopatologia desse tipo de lesão. Assim, este estudo apresenta um modelo experimental alternativo de queimadura de terceiro grau de fácil reprodutibilidade. **Metodologia:** Dezoito ratos, Wister, machos, foram divididos aleatoriamente em três grupos, sendo alocado seis animais em cada grupo. Para a realização da queimadura, foi utilizado um ferro de solda acoplado a uma placa de alumínio, a uma temperatura de 150°C, com diferentes tempos de exposição por grupo. Os animais do Grupo 5 (G5) foram queimados a 150 °C com tempo de exposição de 5 segundos; Grupo 10 (G10) os animais foram queimados a 150 °C com tempo de exposição de 10 segundos e o grupo 15 (G15) os animais foram queimados a 150 °C com tempo de exposição de 15 segundos. **Resultados:** As análises histopatológicas demonstraram que os três grupos possuíam características morfológicas bastante similares, com envolvimento de espessura total do tecido, caracterizando todas as lesões como de terceiro grau. **Conclusão:** Através dos dados apresentados podemos concluir que a técnica apresentada é eficaz para reproduzir uma queimadura de terceiro grau e é sugerida a temperatura de 150°C com 5 segundos de exposição para minimizar os riscos para os animais.

**Palavras-chave:** Queimaduras; modelo animal; pele; ratos.

## 6.1. INTRODUÇÃO

As queimaduras são lesões teciduais que representam uma forma grave de trauma<sup>1</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 1.000.000 de pessoas são acometidas por ano no Brasil, e os registros de mortes encontrados mundialmente são próximos a 300.000<sup>2,3</sup>. Considerando o alto índice de morbidade e mortalidade associados ao trauma, na última década foi crescente o número de pesquisas que investigam recursos inovadores destinados ao tratamento da queimadura, e já foi observado no atendimento clínico uma significativa redução no número de óbitos quando tais terapias são aplicadas<sup>1,4,5</sup>.

Sendo assim, no intuito de explorar melhor a fisiopatologia da queimadura e a evolução do processo de cicatrização envolvido, através de novos métodos de tratamento, o modelo experimental vem sendo extensivamente utilizado. A literatura atual descreve diversos protocolos destinados a realização da queimadura em modelo experimental, porém existem divergências relacionadas tanto ao tamanho da lesão quanto a temperatura e o tempo a serem empregados. Com isso, é observado que os protocolos ainda não estão bem estabelecidos para cada grau de acometimento a ser induzido, pois alguns estipulam parâmetros semelhante para graus de queimaduras diferentes<sup>5,6,7</sup>.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi propor um novo protocolo experimental para indução de queimaduras especificamente de terceiro grau em ratos. Com isso, espera-se que tal protocolo sirva de referência para os futuros estudos que visam o estudo dos tratamentos destinados a este tipo de lesão.

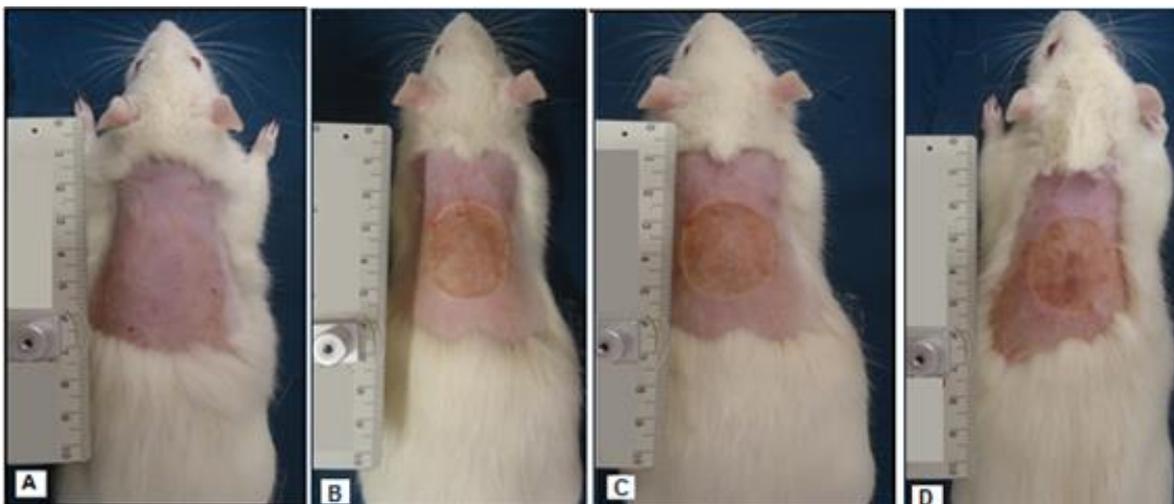
## 6.2. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, protocolo nº 6224231115. Os animais utilizados no estudo permaneceram durante todo o experimento no Departamento de Fisioterapia da UFSCar, alocado em gaiolas individuais com condições de temperatura, luz e alimentação controladas. Foram utilizados 18 animais (*Rattus norvegicus*: var.albinus, Rodentia Mammalia), machos, da linhagem Wistar, pesando entre 200-250g, distribuídos ao acaso em três grupos, sendo alocados 6 animais em cada grupo, G5: animais submetidos a queimadura de 3º grau, com 5 segundos de aplicação do ferro de solda ao tecido; G10: animais submetidos a queimadura de 3º grau, com 10 segundos de aplicação do ferro de solda ao tecido; G15: animais submetidos a queimadura de 3º grau, com 15 segundos de aplicação do ferro de solda ao tecido.

### 6.2.1. Modelo Experimental de Queimadura de 3º grau

Para a indução da queimadura os animais foram inicialmente anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) intraperitonealmente e posteriormente tricotomizados pela técnica digital na região dorsal correspondente a uma área de 4cm X 5cm (Figura 1). Posteriormente a isso, foi iniciado o processo de queimadura da pele do animal através de uma placa de alumínio, em formato circular, com 3cm de diâmetro acoplada a um ferro de solda<sup>8,9,10</sup> (Figura 1) aquecido em uma temperatura de 150° C, controlada com auxílio de um termostato (Figura 2)<sup>10,11,12</sup>. A placa foi pressionada na região dorsal nos animais com três tempos diferentes, sendo para o G5: 5 segundos, G10: 10 segundos e G15: 15 segundos.

É importante destacar que todas as queimaduras foram realizadas pelo mesmo avaliador e a pressão exercida no dorso do animal consistiu somente no próprio peso do aparelho.



**Figura 1:** **A:** Animal tricotomizado na região dorsal; **B:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 5 segundos; **C:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 10 segundos; **D:** Animal submetido a queimadura por aplicação do ferro de solda por 15 segundos.



**Figura 2:** Multímetro Digital Et-1110a Minipa utilizado para aferição de temperatura e aparelho de ferro de solda, placa de alumínio circular com diâmetro de 3cm.

### 6.2.2. Análise Histológica

O sacrifício dos animais foi realizado com dosagem letal de anestésico (ketamina e Xylasina). Após 15 minutos da realização do modelo experimental de queimadura, realizou-se a coleta dos tecidos para a confecção das lâminas. Foi realizada a coleta de amostra do tecido, sendo padronizado do lado direito, contendo a região da borda da lesão cutânea abrangendo um pequeno fragmento de pele saudável e a área da lesão propriamente dita. As amostras foram fixadas em formalina 10% e armazenadas em álcool 70%, e encaminhadas para confecção e posteriormente análise. Para a confecção da lâminas as amostras foram incluídas em parafina e tecido foi seccionamento em 5 $\mu$ m de espessura. As lâminas foram coradas utilizando hematoxilina e eosina e analisadas por um patologista cego, sendo utilizado um microscópio de luz (Olympus, X100).

### 6.2.3. Análise Estatística

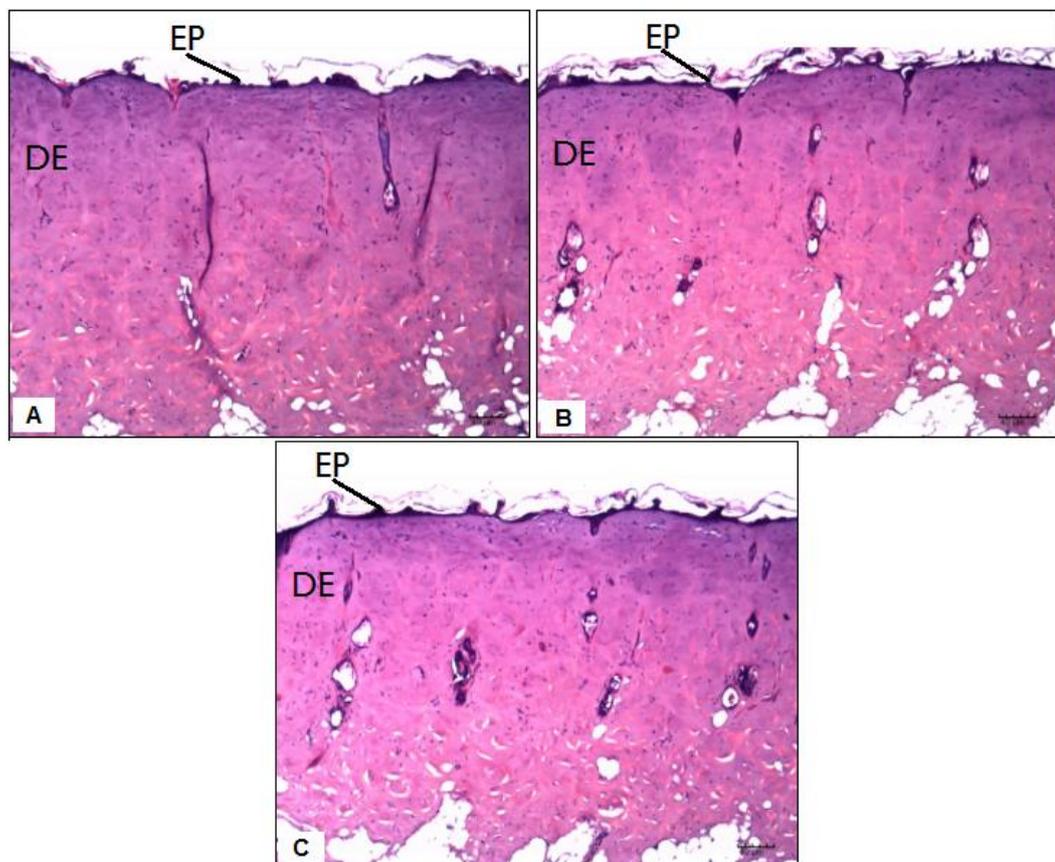
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise dos resultados foi realizada através do *Software* Graph PadPrism 5.0. Foi realizado o teste de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Para análise de variância foi utilizado (ANOVA) *one-way*. Para as comparações múltiplas foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância será de  $P < 0,05$ .

## 6.3. RESULTADOS

Através das análises histopatológicas foi possível relatar que não foi observada diferença significativa entre os três grupos estudados, uma vez que todos os grupos

apresentaram características morfológicas bastante semelhantes (Figura 3), sendo possível classificar os três tipos de queimaduras como sendo de terceiro grau, com acometimento total da espessura do tecido.

Nos grupos G5, G10 e G15 foi possível observar características de necrose total da epiderme e seus anexos, necrose da derme papilar e reticular além da vasocongestão da derme profunda. Nos três grupos também foi possível identificar uma extensão da necrose para os tecidos subcutâneos e musculares (Tabela 1).



**Figura 3:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais. **A:** Grupo 5 segundos, necrose total da epiderme, derme, hipoderme com extensão para tecido muscular; **B:** Grupo 10 segundos, necrose total da epiderme, derme e hipoderme; **C:** Grupo 15 segundos: necrose total da epiderme, derme, hipoderme com extensão para tecido muscular.

**Tabela 1:** Presença ou ausência das estruturas da pele e músculo.

	<b>G5</b>	<b>G10</b>	<b>G20</b>
<b>Epiderme</b>	SIM	SIM	SIM
<b>Derme Papilar</b>	SIM	SIM	SIM
<b>Derme Total</b>	SIM	SIM	SIM
<b>Hipoderme</b>	SIM	SIM	SIM
<b>Musculatura</b>	Yes	No	Yes

Grupos: 6 animais em cada.

#### 6.4. DISCUSSÃO

As queimaduras são responsáveis por muitas alterações fisiopatológicas, que representam uma forma grave de trauma evoluindo com diversas complicações, principalmente as que acometem a espessura total da pele, determinadas de terceiro grau. Para aprimorar o conhecimento da fisiopatologia da queimadura e estudar possíveis agentes terapêuticos, diversos modelos experimentais são destacados na literatura na tentativa de reproduzir uma lesão com características semelhantes às encontradas na prática clínica.

Dentre os diversos modelos experimentais de queimaduras encontrados atualmente na literatura estão: o modelo de água quente<sup>13,14</sup>, modelo utilizando eletricidade<sup>15</sup> e o modelo experimental com instrumentos incandescentes<sup>16,17</sup>. Entretanto os dois primeiros modelos citados não são considerados procedimentos adequados para produzir queimaduras, pois limita o controle da área a ser queimada, dificultando assim tanto o tratamento quanto as avaliações<sup>15</sup>. Em contrapartida o modelo que utiliza instrumentos incandescentes, com destaque para a utilização do modelo com uma placa de alumínio acoplada a um ferro de solda, demonstra ser um método recomendado pela fácil aplicação, delimitação da área e controle fixo da temperatura.

Diversos trabalhos utilizando alumínio acoplado ao ferro de solda, vem sendo apresentados como um método eficaz para a reprodução do modelo experimental de queimaduras de terceiro grau<sup>8,9,16,17,18</sup>, porem há uma grande discrepância na temperatura utilizada, podendo variar desde 100°C a 200°C, além do tempo de aplicação que varia dentre 5 ás 30 segundos. Caliar-Oliveira et al., (2015)<sup>18</sup>, realizaram um estudo que reproduziu uma queimadura de terceiro grau, na região dorsal do animal, utilizando um ferro de solda com a temperatura de 200°C e 25 segundos de aplicação, sendo encontradas as mesmas características morfológicas no tecido do estudo apresentado por KO et al., (2013)<sup>9</sup> que também utilizaram um ferro de solda para reprodução da lesão entretanto com uma temperatura de 200°C e tempo de aplicação de 10 segundos. Brassolatti et al., (2016)<sup>17</sup> apresentaram um estudo em que o modelo experimental de queimadura de terceiro grau foi realizado através de uma placa de alumínio acoplado a um ferro de solda, porem a temperatura utilizada era significativamente menor, sendo de 150°C com aplicação no dorso do animal de 10 segundos, demonstrando que não é necessária a utilização de temperaturas muito elevadas para a realização deste tipo de lesão.

A literatura ainda apresenta temperaturas mais baixas, 100°C<sup>16,19</sup> e 130°C, utilizando o modelo com ferro de solda para a reprodução de queimaduras de terceiro grau, porém vários outros trabalhos utilizaram estas temperaturas com diversos tempos de exposição, para realização de lesões de segundo grau (Pessolatto et al., 2011; Chiarotto et al., 2014)<sup>20</sup>, gerando assim discordância quanto aos resultados morfológicos que caracterizam o acometimento da espessura do tecido.

Campelo et al., (2011)<sup>7</sup> discutiram três temperaturas distintas, 100°C, 150°C e 200°C, para reprodução do modelo experimental de queimadura pela transferência de energia (calor) por condução direta (Cobre / pele), com tempo de exposição fixado em 9 segundos. Os resultados demonstraram que as lesões geradas pela temperatura de 100°C não acometiam a espessura total da pele, caracterizadas assim como de segundo grau, em contrapartida, as lesões

formadas pelas temperaturas mais altas, apresentaram acometimento total de todas as camadas da pele sendo então, classificadas como de terceiro grau.

Diante do exposto e dos dados apresentados em nosso estudo, foi possível constatar que para a indução de uma lesão de terceiro grau, em modelo experimental, não é necessário temperaturas superiores a 150°C, como descritas por Busuioc<sup>16</sup> e Caliaría-Oliveira<sup>18</sup>. Além disso nossos resultados demonstram claramente que não há necessidade da utilização de tempos prolongados para indução da lesão, pois em apenas 5 segundos foi obtida a lesão desejada com as mesmas características morfológicas das encontradas em tempo superiores, como 10 e 15 segundos.

Assim, acredita-se que com os dois parâmetros destacados pelo nosso estudo seja possível estabelecer um novo protocolo para o modelo de queimadura, pois mostrou-se ser eficaz para a reprodutibilidade do modelo experimental proposto, com a utilização da temperatura de 150°C e um menor tempo de exposição (5 min), buscando reduzir o sofrimento e o risco do animal.

## **6.5. CONCLUSÃO**

Através dos resultados obtidos é possível observar que a técnica utilizada é compatível para a reprodução da queimadura de terceiro grau. Destacamos ainda que trata-se de um método seguro, eficaz e de fácil reprodutibilidade, que pode servir de base para os novos estudos que visam investigar novas abordagens de tratamento em queimaduras de terceiro grau em modelo experimental.

## 6.6. REFERÊNCIAS

1. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke M. Animal Models in Burn Research. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2014;71(17):3241-3255. doi: 10.1007/s00018-014-1612-5.
2. Organização WH. O Global Burden of Disease: 2004. Geneva2008; Disponível a partir do [www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/GBD\\_report\\_2004update\\_full.pdf](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf)
3. Cruz BF, Cordovil PBL, Batista KNM. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras Yes Brasil: revisão de literatura. Rev Bras Queimaduras2012;11(4):246-250.
4. Brigham PA, McLoughlin E. Burn incidence and medical care use in the United States: estimates, trends, and data sources. J Burn Care Rehabil. 1996;17(2):95–107. PMID: 8675512.
5. Mitsunaga-Junior JK, Gragnani A, Ramos MLC, Ferreira LM. Rat an experimental model for burns: A systematic review. Acta Cir. Bras. 2012;27(6): 417-423. doi.org/10.1590/S0102-86502012000600010.
6. Atiyeh BS, Hayek SN, Gunn SW. New technologies for burn wound closure and healing review of the literature. Burns. 2005;31(8): 944–956. PMID: 16274932.
7. Campelo APBS, Campelo MWS, Britto GAC, Ayala AP, Guimarães SB, Vasconcelos PRL. An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. Acta Cir. Bras.2011;26 (Suppl1): 38-42. doi.org/10.1590/S0102-86502011000700008.
8. Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawashiro K, Sakanaka, M. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. British Journal of Pharmacology.2006;148( 6): 860-870. doi: 10.1038/sj.bjp.0706794.
9. Ko WJ, Na YC, Suh BS, Kim HA, Heo WH, Choi GH, Lee SU. The effects of topical agent (kelo-cote or contractubex) massage on the thickness of post-burn scar tissue formed in rats. Arch Plast Surg,2013;40(6):697-704. doi: 10.5999/aps.2013.40.6.697.

10. Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*. 2015;41(3):542–7. doi: 10.1016/j.burns.2014.08.002.
11. Chiarotto GB, Neves LMG, Esquisatto MAM, Amaral MEC, Santos GMT, Mendonça FAS. Effects of laser irradiation (670-nm InGaP and 830-nm GaAlAs) on burn of second-degree in rats. *Laser Med Sci*. 2014;29:1685–93. doi: 10.1007/s10103-014-1573-9.
12. Yang Y, Zhang W, Li Y, Fang G, Zhang K. Scalded skin of rat treated by using fibrin glue combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Dermatol*. 2014;26(3):289–95. doi: 10.5021/ad.2014.26.3.289.
13. Meireles GC, Santos JN, Chagas PO, Moura AP, Pinheiro AL. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(1):47-54. doi: 10.1089/pho.2007.2051.
14. Tavares E, Trajano L, Mencalha AL. Expression of DNA repair genes in burned skin exposed to low-level red laser. 2014;1953–7. doi: 10.1007/s10103-014-1612-6.
15. Avsar U, Halici Z, Akpınar E, Yayla M, Avsar U, Harun U, Harun U, Hasan Tarik A, Bayraktutan Z. The Effects of Argan Oil in Second-degree Burn Wound Healing in Rats. *Ostomy Wound Manage*. 2016;62(3):26-34. PMID: 26978857.
16. Mitsunaga Junior JK; Gragnani A; Ramos MLC, Ferreira, LM. Rat an experimental model for burns: A systematic review. *Acta Cir. Bras*. 2012;27(6):417-423. PMID: 22666760.
17. Busuioc CJ, Mogosanu GD, Popescu FC, Lascar I, Parvanescu H, Mogoanta L. Phases of the cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns: histological and immunohistochemical study. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 2013;54(1):163-171, 2013. PMID: 23529325.
18. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MC, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, De Avó LR, Araújo-Moreira FM, Parizotto NA. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microsc Res Tech*. 2016;79(4):313-20. doi: 10.1002/jemt.22632.

19. Caliari-Oliveira C, Yachite JN, Ramalho LN, Palma PV, Carlos D, Cunha Fde Q, De Souza DA, Frade MA, Covas DT, Malmegrim KC, Oliveira MC, Voltarelli JC. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. *Cell Transplant*. 2016;25:201–215. doi: 10.3727/096368915X688128.
20. Meyer TN, Silva AL da. A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras*. 1999; 14 (4). doi.org/10.1590/S0102-86501999000400009.
21. Pessolato AGT, Martins DS, Ambrósio CE, Mançanares CAF, Carvalho AF. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns*,2011;37(7): 1192-1201. doi: 10.1016/j.burns.2011.05.016.

## **7. ESTUDO IV**

---

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO ASSOCIADO A TERAPIA CELULAR NO  
PROCESSO DE REGENERAÇÃO CUTÂNEA NA QUEIMADURA DE TERCEIRO  
GRAU EM RATOS**

***EFFECT OF PHOTOBIMODULATION ASSOCIATED WITH CELL THERAPY IN  
THE PROCESS OF CUTANEOUS REGENERATION IN THIRD DEGREE BURNS IN  
RATS***

Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup>, Patricia Brassolatti<sup>2</sup>, Genoveva Flores Luna<sup>3</sup>, Julia Risso Parisi<sup>1</sup>, Ângela Merice de Oliveira Leal<sup>3</sup>, Marco Andrey Cipriani Frade<sup>4</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos CEP:13565-905, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos CEP:13565-905, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Medicina, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos CEP:13565-905, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Dermatologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo (USP), Ribeirão Preto, CEP: 4049-900, São Paulo, Brasil.

**Artigo submetido no periódico “*Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*”**

## Resumo

Devido à complexidade envolvida no processo de cicatrização de queimaduras de espessura total, a literatura procura alternativas para otimizar a reconstrução tecidual. O objetivo deste estudo foi explorar a ação da PBM associada às CTMs no processo de cicatrização de queimaduras de terceiro grau. Foram utilizados 96 ratos *Wistar* machos, distribuídos em quatro grupos com 24 animais cada: Grupo Controle (GC); Grupo Laser (GL); Grupo de Terapia Celular (GCT); Grupo Laser e Terapia Celular (GLCT). A queima foi realizada com chapa de alumínio (150°C). Foram realizadas análises de contração da ferida, histologia, imunohistoquímica, birrefringência e imunoenzimática para avaliar a qualidade do tecido. Nossos resultados demonstram que a associação das técnicas é capaz de acelerar o processo de reparo, modulando o processo inflamatório, apresentando tecido cutâneo de melhor qualidade. Assim, concluímos que o uso de PBM associado à terapia celular é um tratamento promissor no reparo de queimaduras de espessura total.

**Palavras-chave:** fotobiomodulação; queimaduras; células-tronco.

## 7.1. INTRODUÇÃO

A queimadura é definida pela Sociedade Internacional de Lesões por Queimadura como uma lesão traumática e de origem, na maioria das vezes, térmica que acomete os tecidos orgânicos. As lesões por queimadura podem ser classificadas de acordo com a extensão atingida e a profundidade da pele prejudicada (1,2). As queimadura mais complexas, denominadas de espessura total (3º grau) acometem as três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e em alguns casos se entendem ao tecido subcutâneo, músculo e osso (3,4). Esse tipo de queimadura é caracterizada por apresentar aspecto esbranquiçado, rígido e de difícil cicatrização (5).

Devido à complexidade que está envolvida no processo de cicatrização de queimaduras de espessura total, a forma de tratamento mais utilizada é a cirurgia de enxerto, porém mediante a observação de resultados estéticos e funcionais insatisfatórios devido a rejeição e/ou contração tecidual, assim como, a redução da vascularização local, novas abordagens de tratamento vêm sendo avaliadas na tentativa de se estabelecer alternativas que acelerem o processo de reparo, bem como garantir uma reconstrução tecidual que se assemelhe as características de um tecido sadio (6–9) .

Dentro deste contexto, a terapia por fotobiomodulação (FBM) vem ganhando destaque nas últimas décadas, caracterizada por ser uma forma de fototerapia que envolve a aplicação de luz monocromática e coerente de baixa potência em vários tipos de lesões, obtendo sucesso quando utilizada para induzir a cicatrização, reparação de feridas complexas e aumento da vascularização local (10–13).

A literatura apresenta que a utilização da FBM no tratamento de queimaduras, especialmente em fases iniciais do processo promove uma melhor cicatrização e menor tempo de reparo do tecido, através dos efeitos antioxidantes proporcionados pela terapia, como a capacidade de modular a intensidade do infiltrado inflamatório e estimular a produção de

macrófagos e síntese de colágeno (6,14). Além disso, estudos recentes tem demonstrado que a FBM também estimula as etapas subsequentes do processo de reparo, auxiliando na formação do tecido de granulação através da estimulação na síntese de fibroblasto e formação de novos vasos, e na maturação do colágeno de tipo III em tipo I (12,13,15).

Apesar dos resultados positivos da FBM em relação a cicatrização de lesões causadas por queimaduras, principalmente quanto a velocidade da resolução do processo de reparo, a qualidade do tecido neoformado muitas vezes não é satisfatório sendo assim o tratamento com células tronco mesenquimais (CTMs), no reparo de feridas, vem apresentando respostas positivas quanto a essa questão (7).

Os estudos com CTMs na engenharia de tecidos, vem ganhando destaque nas últimas décadas, principalmente na reconstrução de tecidos dérmicos devido à alta capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em diversos tipos de células, como as epiteliais (7). Assim na tentativa de se acelerar processos de cicatrização garantindo uma boa qualidade tecidual, estudos vem explorando a associação da FBM com as CTMs na tentativa de criaram uma alternativa de baixo custo, fácil aplicação como forma de tratamento de lesões cutâneas (16,17).

Assim esse estudo teve como objetivo avaliar a associação da FBM, com parâmetros pré determinados na literatura (11,18), com as CTMs afim de verificar o tempo de reparo e a qualidade do tecido neoformado.

## **7.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram utilizados 96 animais (*Rattus norvegicus*: var.albinus, Rodentia Mammalia), machos, da linhagem Wistar, pesando entre 250-300 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Durante a realização do procedimento

experimental os animais permaneceram individualmente em gaiolas apropriadas de polipropileno padrão, no biotério do departamento de fisioterapia. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFSCar sobre o protocolo nº 6224231115 e conduzido de acordo com as normas internacionais de ética na experimentação animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais sendo alocados 24 animais em cada grupo:

- **Grupo Controle (GC):** Animais submetidos à queimadura e tratados de forma simulada com a FBM.
- **Grupo Laser (GL):** Animais submetidos à queimadura e tratados com FBM com comprimento de onda de 660nm, 40mW e dose de 1,96J.
- **Grupo células-tronco mesenquimais (GCT):** Animais submetidos à queimadura e tratados com CTMs.
- **Grupo Laser e células-tronco mesenquimais (GLCT):** Animais submetidos à queimadura e tratados com aplicação de CTMs associados com a FBM com comprimento de onda de 660nm, 40mW e dose de 1,96J.

### **7.2.1. Modelo experimental de queimadura de espessura total**

Os animais foram anestesiados com Ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) intraperitonealmente e posteriormente tricotomizados pela técnica digital na região dorsal correspondente a uma área de 4cm X 5cm. Após, foi iniciada o processo de queimadura na pele do animal através de uma placa de alumínio, em formato circular, com 3cm de diâmetro acoplada a um ferro de solda com temperatura de 150° C (2,19). A placa foi posicionada sobre o dorso e mantida por 5 segundos, sendo estes parâmetros já pré-estabelecidos na literatura (2),

totalizando uma área queimada de 7,1 cm<sup>2</sup>. A temperatura era controlada com auxílio de um termostato. Imediatamente após a lesão, os animais receberam 6.2 mg/Kg -1 de dipirona sódica com o propósito de analgesia.

### **7.2.2. Obtenção e aplicação das hASCs**

As hASCs foram obtidas a partir de cirurgias de abdominoplastias realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sendo doado pelos pacientes, mediante assinatura de consentimento. O método de isolamento celular baseia-se na digestão da matriz extracelular (MEC) em colagenase a 0,075% (SIGMA) durante 30 minutos a 37° C de acordo com o método previamente estabelecido (20). A digestão foi neutralizada com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, Invitrogen).

Foi realizado a centrifugação do tecido adiposo e posteriormente este foi plaqueado em placa de cultura de tecidos. As hASCs foram cultivadas e expandidas a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub> usando meio de cultura (o  $\alpha$ -MEM da Gibco, 10% de soro de bovino fetal, 1% de antibiótico-antimicótico 1%, da Gibco e L-Glutamina 200 mM,). O meio era trocado duas vezes por semana, e a passagem das células eram realizadas ao atingir 80% de confluência, através da utilização de solução de tripsina-EDTA a 0,25% (da Invitrogen). Durante o estudo, apenas a 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> passagem foram utilizadas.

Com relação a caracterização, esta foi realizada e reportada por Caetano et al., 2015 (21), sendo que citometria de fluxo revelou positividade das hASCs para CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105 (BD Biosciences, EUA), sendo estes marcadores de células estaminais. Em seguida, as células foram cultivadas em meios de diferenciação osteogênica e adipogênica (kits

de diferenciação StemPro®, Invitrogen Corp., EUA) durante 21 e 28 dias, confirmada sua natureza multipotente através da avaliação por microscopia óptica.

Aproximadamente 20 minutos após a realização da queimadura experimental com os animais ainda anestesiados, os animais do GCT e GLCT foram submetidos à aplicação intradérmica (ID) de CTMs, em volume total de 600µL aplicado em 4 doses de 150 µL em pontos pré-estabelecidos (7). Os animais foram mantidos em observação durante 4 horas após a queimadura.

### **7.2.3. Fotobiomodulação**

Para os grupos tratados com a FBM, o laser utilizado foi de 660nm (Photon Laser III, DMC, Brasil), com potência de 40mW, área de secção transversa do feixe de 0,028 cm<sup>2</sup> (tabela 1). A aplicação foi realizada em quatro pontos nas bordas da lesão (Figura 1), de modo pontual, pela técnica de contato, sendo padronizados com gabarito de acetato, além de um ponto central com distância de 1cm. A ponteira foi posicionada em um suporte de modo que permaneceu imóvel durante o procedimento. As aplicações foram iniciadas imediatamente após a lesão e ao decorrer de todo o experimento, sendo realizadas três vezes na semana, em dias alternados. O tempo total do tratamento foi de 21 dias, totalizando 10 aplicações da FBM.

**Tabela 1:** Lista detalhada dos parâmetros utilizados para a FBM

<b>Fabricante</b>	DMC®
<b>Modelo</b>	Photon Laser III
<b>Ano de Produção</b>	2010
<b>Número e tipo de emissores (laser ou LED)</b>	1/Laser
<b>Comprimento de onda e largura de banda [nm]</b>	660
<b>Modo de pulso [CW ou Hz, pulsado]</b>	CW
<b>Tamanho do ponto do feixe no alvo [cm<sup>2</sup>]</b>	0.028
<b>Irradiância no alvo [mW / cm<sup>2</sup>]</b>	1.43
<b>Duração da exposição [seg]</b>	49
<b>Exposição radiante [J / cm<sup>2</sup>]</b>	70
<b>Energia radiante [J]</b>	1.96
<b>Número de pontos irradiados</b>	5
<b>Técnica de aplicação</b>	Pontual
<b>Energia radiante total [J]</b>	9.8

#### 7.2.4. Avaliação da contração da ferida

Foi realizado um acompanhamento clínico-fotográfico das lesões imediatamente após a indução da queimadura nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. No momento da captura da imagem uma régua foi colocada ao lado de cada animal fotografado para posterior análise computacional. Todas as fotos foram realizadas com uma câmera digital (Nikon, com resolução de 5152 x 3864 pixels), acoplada a um tripé, a uma distância de  $15 \pm 1$  cm (altura entre o dorso do animal até o limite inferior da máquina) foi realizada o cálculo da porcentagem de cicatrização das ulcerações a partir da análise das imagens pelo programa Image J®, versão 1.3.1 (NHI, Estados Unidos).

O grau de contração (GC) da área da ferida foi calculado por meio da fórmula adaptada de Oliveira et al., (2000):

$$\% \text{ de cicatrização} = 100 - \frac{\text{Área final da úlcera (pixels)}}{\text{Área inicial da úlcera (pixels)}} \times 100$$

### **7.2.5. Coleta dos tecidos e eutanásia dos animais**

Foi realizada a coleta das amostras do tecido, nos quatro períodos experimentais (3, 7, 14 e 21 dias pós cirurgia), abrangendo a borda da lesão cutânea, pequeno fragmento de pele saudável e a área da lesão propriamente dita. Após as coletas, as amostras foram fixadas em formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e armazenadas em álcool 70%.

A eutanásia dos animais foi realizada também nos quatro períodos experimentais através de dose letal de anestésico (ketamine 285 mg / kg and xilasin 36 mg / kg), sendo sacrificados 6 animais em cada período por grupo.

### **7.2.6. Análise Histológica**

As amostras foram embebidas em parafina e cortadas em secções transversais (5 µm). Três secções foram obtidas de cada amostra, sendo posteriormente coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck). A avaliação foi realizada na zona de transição, entre o tecido saudável e o neoformado, utilizando um microscópio óptico (Zeiss Axioskop, Carl Zeiss, objetiva de 40 ×) para verificar qualitativamente a morfologia do tecido, sendo observado a intensidade de infiltrado inflamatório, a organização das fibras de colágeno e a presença de tecido de granulação.

Foi realizada uma análise semi-quantitativa através de escores pré-estabelecidos, considerando os valores de 0 a 4 (22) e 0 a 3 (12) descritos na Tabela 2 e 3. A análise foi cegada em relação aos grupos experimentais e foi realizada por dois revisores.

**Tabela 2:** Escala de classificação histopatológica para avaliação de Infiltrado Inflamatório

<b>Infiltrado Inflamatório</b>	
<b>1</b>	Inflamação aguda (membrana piógena é formada)
<b>2</b>	Predominância da inflamação aguda difusa (predominância do tecido de granulação)
<b>3</b>	Predominância de inflamação crônica (fibroblastos começando a proliferar)
<b>4</b>	Resolução e cicatrização (redução ou desaparecimento de inflamação crônica, embora persistam células redondas ocasionais)

**Tabela 3:** Escala de classificação histopatológica para análise semiquantitativa da expressão do colágeno e tecido de granulação.

<b>Scores</b>	<b>Colágeno</b>	<b>Tecido de Granulação</b>
<b>0</b>	Ausente	Ausente
<b>1</b>	Leve	Mínimo
<b>2</b>	Moderado	Leve
<b>3</b>	Intenso	Moderado
<b>4</b>		Intenso

### 7.2.7. Imunohistoquímica

As amostras foram desparafinizadas e reidratadas em banhos de xilol e etanol graduado, sendo o material foi incubado durante 12 minutos. As secções foram então pré-incubadas com peróxido de hidrogénio a 0,3% em solução salina tamponada com PBS durante 10 min e depois bloqueadas com soro a 5% em solução de PBS durante 10 min. Após o bloqueio da peroxidase, as amostras foram incubadas com anticorpos primários, descritos na Tabela 2, por um período de duas horas. O anticorpo secundário (kit ABC, PK-6200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) foi então aplicado a uma diluição de 1:5 durante 30 min. A detecção colorimétrica foi realizada com substrato de diaminobenzidina (DAB, SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e hematoxilina.

**Tabela 4: Detalhamento dos anticorpos utilizados**

<b>Anticorpo</b>	<b>Referência</b>	<b>Diluição</b>
<b>Colageno 1</b>	Santa Cruz Biotechnology	1:200
<b>Colageno 3</b>	Santa Cruz Biotechnology	1:200

Foi utilizado o software ImageJ para análise quantitativa da expressão do colágeno III e I através da porcentagem de pixels de área marcada com o plug-in Color Deconvolution com Methyl Green DAB (12). Três imagens de cada lâmina foram capturadas com aumento de 20x. As médias aritméticas dos valores em pixel das amostras foram utilizadas para a análise estatística.

#### **7.2.8. Análise de Birrefringência**

As lâminas coradas com Picrosirius Red foram analisadas com o objetivo de observar a organização e quantificar os tipos de colágeno I e III sem diferenciá-los. Foram capturadas três imagens, por corte, em microscópio óptico polarizado (OLYMPUS BX53) com ampliação de 400x.

O software Color Deconvolution ImageJ foi utilizado para avaliar a porcentagem de coloração azul (colágeno) na área da imagem. Este software reconhece as cores da imagem e as decompõe em três cores básicas: azul (colágeno), vermelho e roxo, sendo assim realizada a medição da cor azul como a porcentagem do total de pixels de colágeno em cada imagem (23).

### **7.2.9. Ensaio Imunoenzimático**

A quantificação das citocinas plasmáticas foi realizada utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA). Neste estudo, as citocinas fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 10 (IL-10) foram avaliadas por suas influências no processo inflamatório.

Foi realizada a coleta do sangue de cada animal (5 ml) sendo colocado em tubos heparinizados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 min para separação do plasma do soro. O soro resultante desta centrifugação foi aliqotado no microtubo e congelado a -80 ° C. As citocinas foram medidas usando os kits Mouse TNF- $\alpha$  e IL-10 ELISA Set (BD Biosciences<sup>®</sup>, Minnesota, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços de base cônica (Mybiosource, Califórnia, EUA), sensibilizadas com anti-citocinas monoclonais que permaneceram “overnight” à temperatura ambiente. Sobrenadantes e curvas padrão (feitas com citocinas recombinantes) foram adicionados e as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 2 horas. Subsequentemente, os anticorpos anti-citocina biotinilados foram adicionados e mantidos durante 1 h à temperatura ambiente. Foi utilizada uma lavadora de placas (Wellwach BC, Thermo Scientific<sup>®</sup>) e o leitor de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific<sup>®</sup>) para medição da absorvância com 450 nm, conforme recomendado no kit.

### **7.2.10. Análise Estatística**

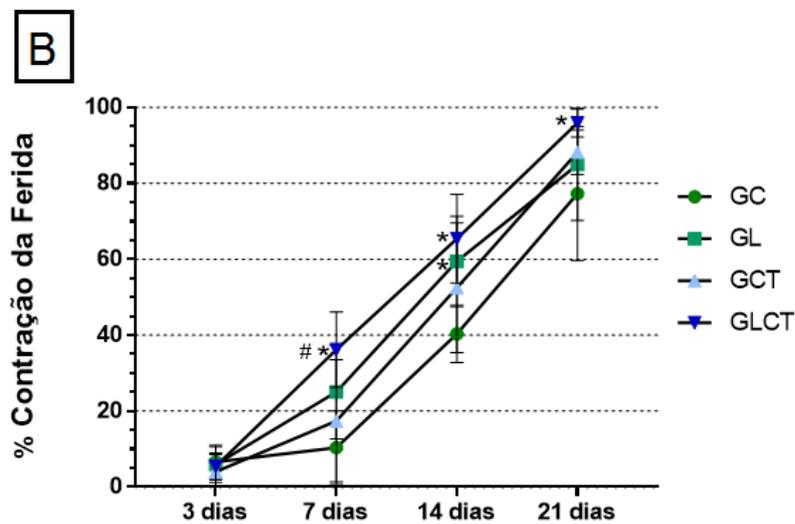
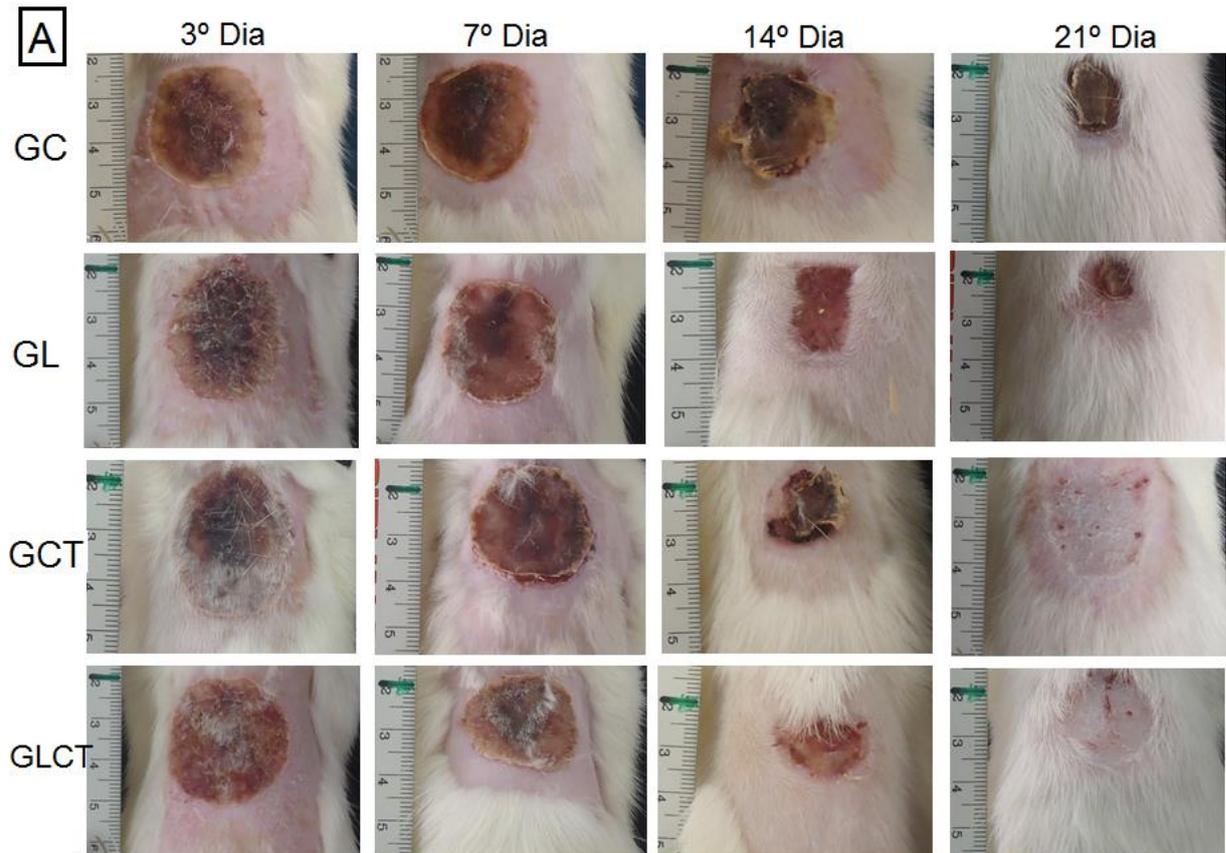
A análise dos resultados foi realizada com o Software Graph PadPrism 7.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Realizamos o teste de Saphiro Wilk para avaliar a normalidade dos dados, sendo apresentados com distribuição

normal, assim, foi utilizado para comparações entre grupos e intra grupo, o teste paramétrico da ANOVA two-way.

Para comparações múltiplas, foi utilizado o teste *post-hoc* de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$ .

### **7.3. RESULTADOS**

Através da análise da porcentagem de contração de feridas foi possível observar na avaliação entre grupos que a partir do 7º de avaliação obteve-se uma diferença significativa entre os grupos estudados, em que o grupo GLCT ( $p=0.0013$ ) apresentou redução significativa da ferida quando comparado ao GC. No 14º dia de avaliação foi observada diferença significativa dos grupos GL (0.026) e GLCT (0.0019) quando comparado o GC. Ao final do período experimental (21 dias) observou-se que o grupo GLCT ( $95.95 \pm 3.77$ ) apresentou melhor cicatrização quando comparado o GC ( $77.30 \pm 17.64$ ).



**Figura 1: Evolução do processo de reparação tecidual. A:** Fotomicrografias representativas dos grupos GC, GL, GCT e GLCT ilustrando redução na área da ferida em todas as fases do processo de reparo. **B:** Cálculo da porcentagem de contração da ferida em todos os grupos e tempos experimentais. Teste de Anova two-away entre-grupos,  $p < 0.05$ .

Os resultados da análise intra-grupo para contração da ferida, demonstraram que em todos os grupos foram encontradas diferenças significativas em todos os tempos estudados, demonstrando que o progresso do processo de cicatrização ocorreu em todos os grupos, tendo ao final do experimento uma contração da ferida em todos os grupos superior a 77% (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média e Desvio Padrão da avaliação de contração da ferida em todos grupos e tempos estudados. Teste de Anova two-away para avaliação intra-grupos,  $p < 0.05$ .

	GC	GL	GCT	GLCT
<b>3° dia</b>	6.60 ±4.33 ▲◆	5.89 ±4.72 ▲◆	3.98 ±3.61 ▲◆	5.42 ±3.53 ▲◆
<b>7° dia</b>	10.32 ±9.73 ▲◆	25.00 ±12.35* ▲◆	17.41 ±52.48 ▲◆	36.15 ±9.91* ▲◆
<b>14° dia</b>	40.33 ±7.55*#◆	59.45 ±11.91*#◆	52.48 ±17.08*#◆	65.40 ±11.69*#◆
<b>21° dia</b>	77.30 ±17.65*#▲	84.94 ±14.67*#▲	88.20 ±5.92*#▲	95.95 ±3.78*#▲

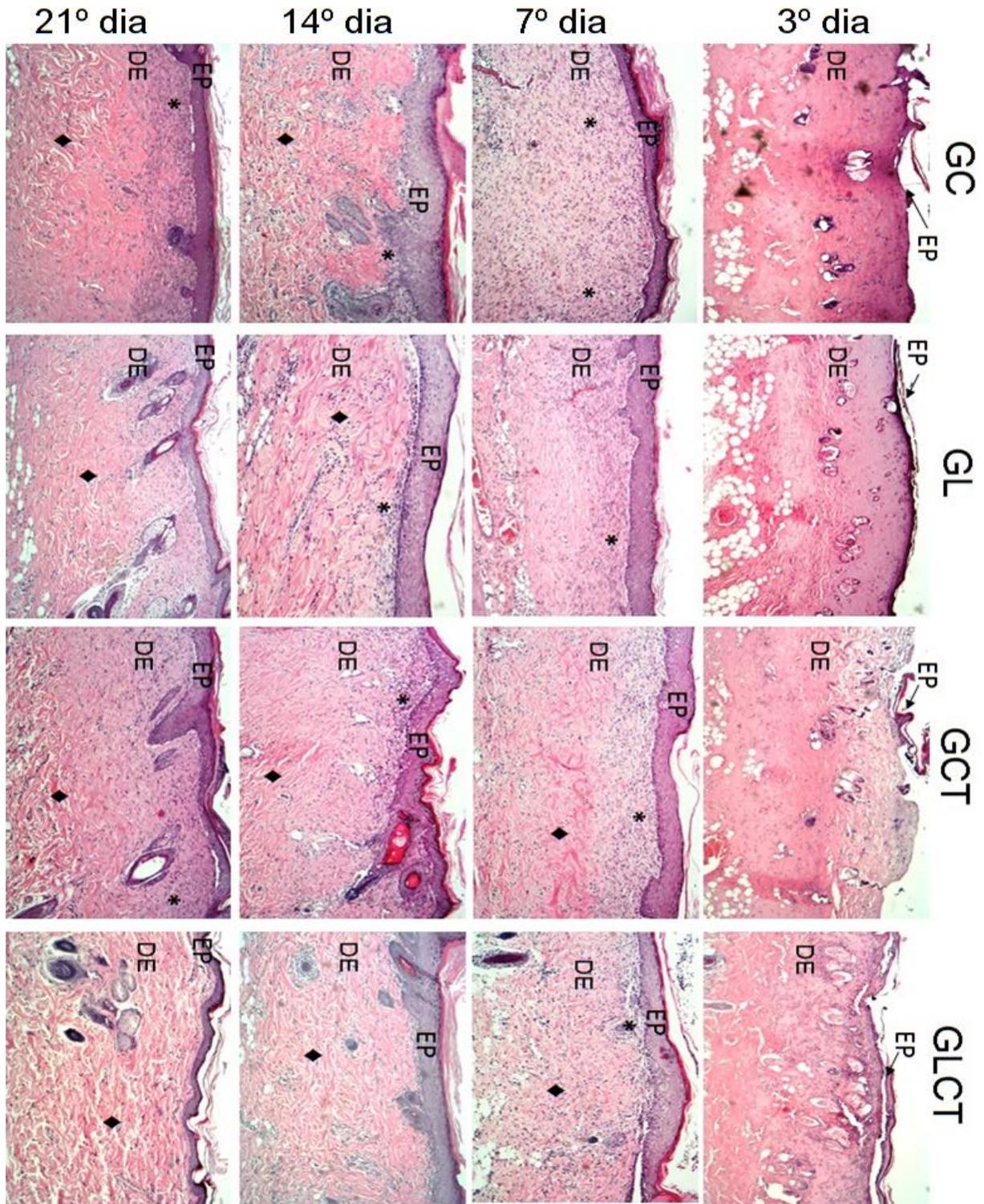
\*Diferença com 3° dia; #Diferença com 7° dia; ▲ Diferença com 14° dia; ◆Diferença com 21° dia.

Com relação a avaliação histopatológica, foi observado através da análise semi-quantitativa que no 3° dia de avaliação todos os grupos não apresentaram diferenças significativas com características morfológicas bastante semelhantes, sendo identificada necrose total da epiderme e seus anexos, necrose da derme papilar e reticular além da vasocongestão da derme profunda. No 7° dia de avaliação já foi possível observar que os grupos GL e GLCT apresentavam um intenso infiltrado inflamatório, além de ser identificado a formação do tecido de granulação e início da síntese das fibras de colágeno. Nesse mesmo período os grupos GC e GCT apresentavam ainda características de inflamação aguda.

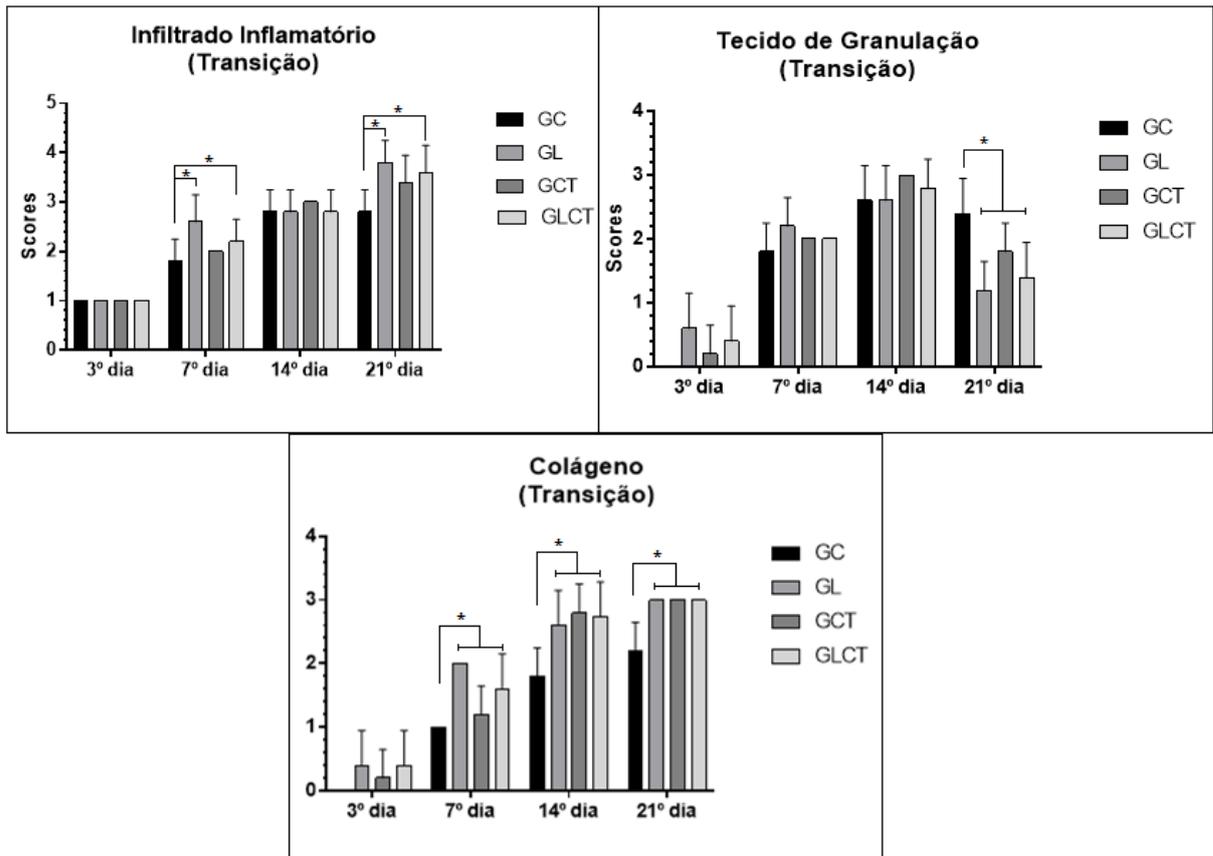
No 14° dia de avaliação foi observado que todos os grupos tratados, independente da terapia, apresentaram uma maior quantidade e organização de fibras de colágeno, com características de inflamação crônica, além do aumento do número de fibroblastos e a formação

de novos vasos. O grupo GC no mesmo período apresentou características de inflamação aguda difusa, ainda com presença de infiltrado inflamatório e início da formação de tecido de granulação.

Ao final do período experimental (21º dia), foi identificado que os grupos GL e GLCT apresentavam uma melhor organização tecidual com melhor organização e síntese do colágeno e a formação de novos vasos, embora ainda fossem identificados células características da fase proliferativa. Já grupo GCT apesar de apresentar sinais claros da fase regenerativa, não foi identificado uma boa organização tecidual. Para o grupo GC ao final dos 21 dias ainda não foram encontradas características que evidenciavam a fase regenerativa, sendo observado a presença de fibroblastos, porém com menor organização das fibras de colágeno e presença ainda de infiltrado inflamatório logo abaixo da epiderme.



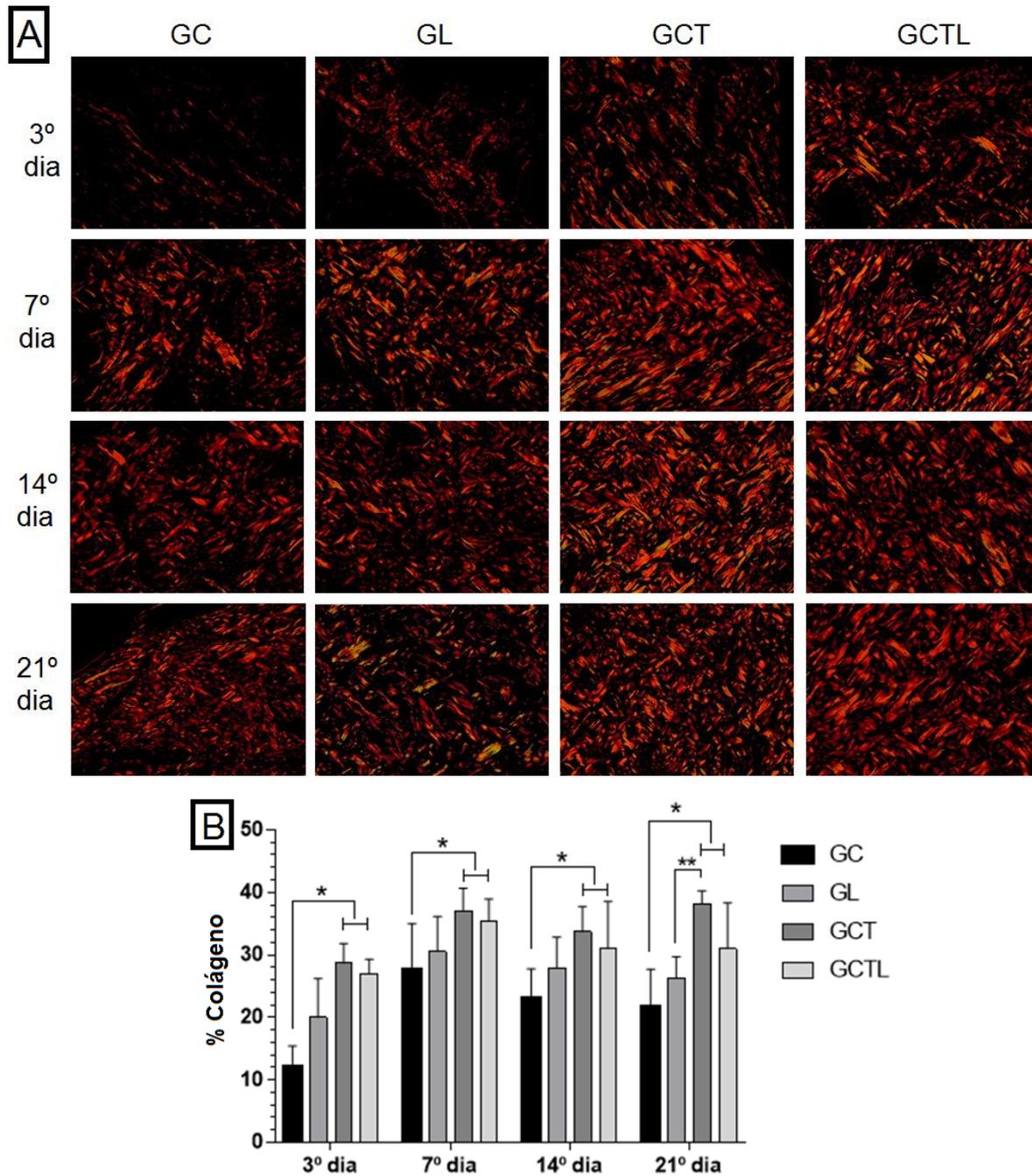
**Figura 2: Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais.** Avaliação histopatológica nos diferentes tempos e grupos. EP: Epiderme; DE: Derme; \* Infiltrado inflamatório; ◆ Organização das fibras de colágeno.



**Figura 3: Análise histológica por scores.** Avaliação de infiltrado inflamatório, tecido de granulação e colágeno por escores como descritos nas tabelas 1 e 2, para todos os grupos estudados durante todo o processo de reparo. Teste de Anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa  $p < 0.05$ .

Através da análise entre-grupos realizada através da técnica de birrefringência (Figura 4) foi possível avaliar a organização bem como a expressão das fibras de colágeno. No terceiro dia foi observado que os grupos GCT ( $28.66 \pm 3.15$ ) e GLCT ( $26.99 \pm 2.29$ ) apresentaram resultados superiores aos encontrados no GC ( $12.13 \pm 3.28$ ). Essa diferença se manteve no 7º dia (GCT:  $36.98 \pm 3.66$ ; GLCT:  $35.35 \pm 3.58$ ) e 14º dia (GCT:  $33.70 \pm 4.07$ ; GLCT:  $31.01 \pm 7.51$ ) de avaliação, sendo que ambos os grupos apresentaram uma porcentagem de organização e expressão do colágeno superior o GC (7º dia:  $27.60 \pm 7.42$ ; 14º dia:  $23.07 \pm 4.69$ ). No 21º dia de avaliação foi observada diferença significativa do grupo GCT ( $38.18 \pm 2.06$ ) com os grupos GL

( $27.86 \pm 5.00$ ) e GC ( $21.59 \pm 6.11$ ), além do grupo GLCT ( $31.04 \pm 7.28$ ) apresentar resultados superiores quando comparado ao grupo controle.



**Figura 4: Birrefringência do colágeno. A:** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais, em diferentes tempos, referentes à birrefringência das fibras colágeno. **B:** Porcentagem da organização do colágeno e todos os grupos e períodos experimentais. Teste de Anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ . \*\*diferença significativa  $p < 0.001$ .

Na avaliação intra-grupos para a organização e expressão do colágeno, identificou-se no grupo GC um aumento mais acentuado da porcentagem de colágeno no 7º e 14º dia de avaliação quando comparado ao 3º dia. Já no grupo GL observou-se um aumento significativo no 7º 14º e 21º dia de avaliação comparado ao 3º dia. O grupo GCT apresentou melhores resultados também a partir do 7º dia de avaliação comparado ao 3º dia. Com relação ao grupo GLCT apesar de apresentar uma melhor organização das fibras de colágeno no 7º dia de avaliação, os períodos subsequentes também apresentaram maiores valores quando comparado ao 3º dia, porém a diferença não foi significativa (Tabela 6).

**Tabela 6:** Média e Desvio Padrão da porcentagem de colágeno tipo I e todos os grupos e tempos estudados. Teste de Anova *two-way* intra grupos,  $p < 0.05$ .

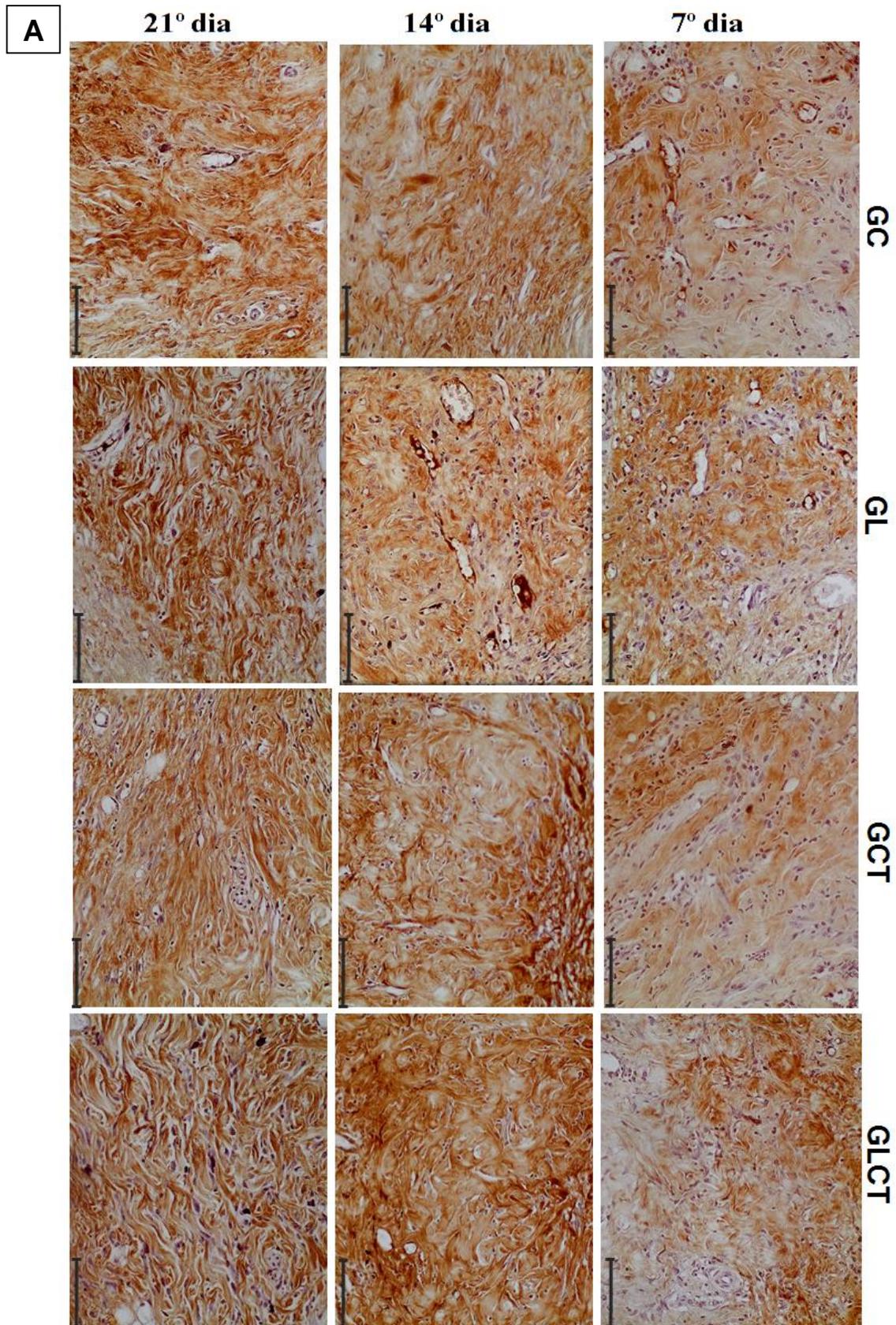
	GC	GL	GCT	GLCT
<b>3º dia</b>	12.13 $\pm$ 3.28	19.98 $\pm$ 6.23	28.66 $\pm$ 3.15	26.99 $\pm$ 2.29
<b>7º dia</b>	27.61 $\pm$ 7.42*	30.53 $\pm$ 5.62*	36.98 $\pm$ 3.67*	35.35 $\pm$ 3.58*
<b>14º dia</b>	23.07 $\pm$ 4.69*	27.88 $\pm$ 4.00*	35.70 $\pm$ 4.07	32.01 $\pm$ 7.51
<b>21º dia</b>	21.59 $\pm$ 7.6.11*	26.27 $\pm$ 3.42*	38.19 $\pm$ 2.06*	32.05 $\pm$ 7.28

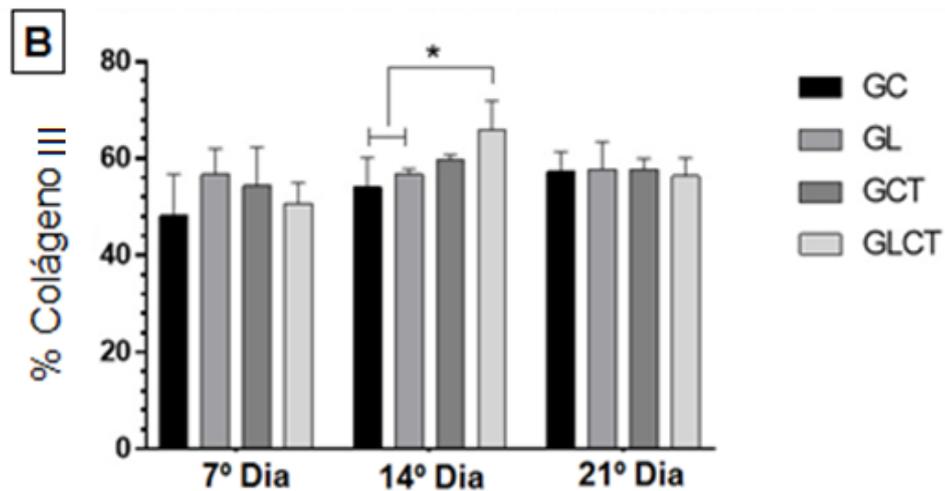
\*Diferença com 3º dia.

Nas análises de imunohistoquímica, foram observadas a expressão dos colágenos tipo III e tipo I de todos os grupos no 7º, 14º e 21º períodos estudados. Com relação análise entre-grupos da expressão do colágeno tipo III, foi possível observar que no 7º dia de avaliação todos os grupos apresentaram a mesma quantidade de imunomarcção, não havendo diferença significativa. Já no 14º dia de avaliação o grupo GLCT (65,85  $\pm$  6,026) apresentou uma maior expressão do col III quando comparado ao grupo GC (54,07  $\pm$  6,11) e ao GL (56,66  $\pm$  1,14). No 21º dia de avaliação não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Na avaliação intra-grupos foi observado crescimento significativo da expressão do col III no grupo GC do 7º (48.17  $\pm$  8.6) para o 21º (57.24  $\pm$  4.14) dia. Já para o grupo GLCT a maior

expressão do col III ocorreu no 14º ( $65.85 \pm 3.75$ ) dia, sendo identificada diferença significativa com o 7º ( $50.65 \pm 4.29$ ) dia de avaliação.



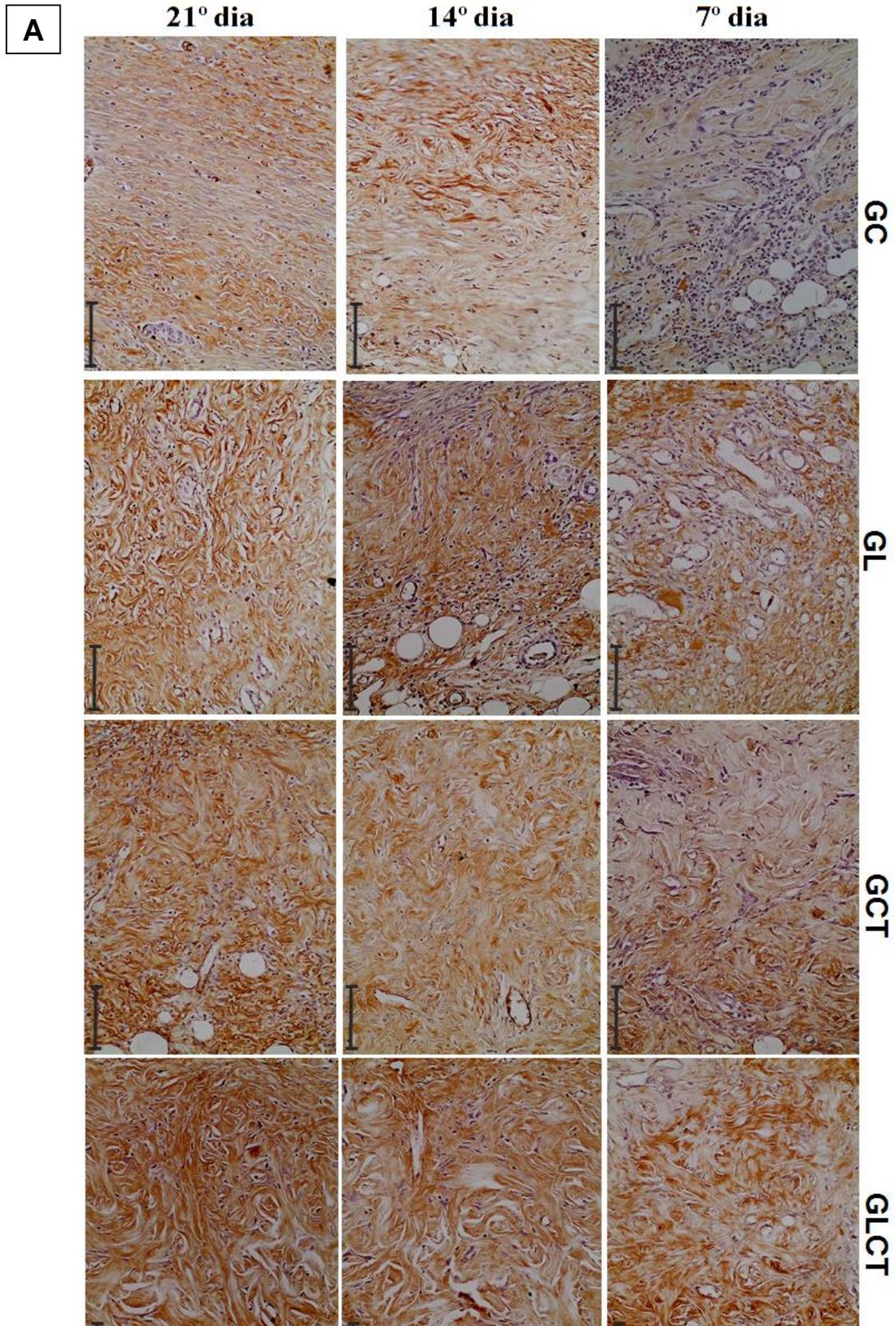


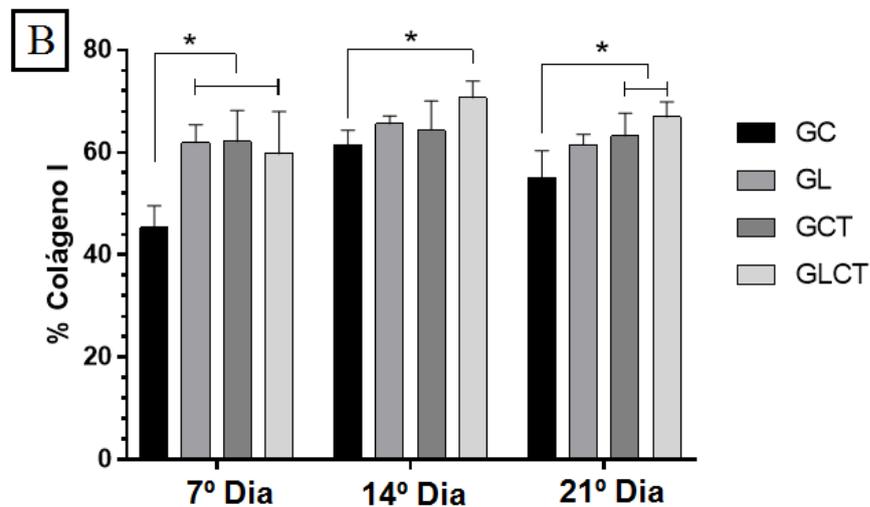
**Figura 5: Imunomarcaco do colágeno tipo III.** **A:** Análise imunohistoquímica (40x) da expressão do Col III nos diferentes grupos e períodos experimentais. **B:** Porcentagem da expressão do Col III, teste de anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

Para a expressão do colágeno tipo I, na análise entre-grupos, foi identificado que no 7º dia de avaliao a imunoexpressão em todos os grupos tratados (GL:  $61.98 \pm 3.57$ ; GCT:  $62.16 \pm 6.07$ ; GLCT:  $59.77 \pm 8.23$ ) foram superiores comparado ao GC ( $45.33 \pm 4.28$ ). No 14º dia de avaliao somente o grupo GLCT ( $70.70 \pm 3.21$ ) apresentou maior expressão, significativa, com relao ao GC ( $61.51 \pm 2.83$ ). Ao final do período experimental (21º dia) os grupos GCT ( $p = 0.042$ ) e GLCT ( $p = 0.006$ ) apresentaram resultados superiores significativos comparado ao GC, demonstrando que ambos os tipos de tratamentos aceleraram o processo de maturaco do colágeno.

Na avaliao intra-grupos foi possível observar que o grupo GC apresentou diferença significativa nos diferentes tempos experimentais, sendo que os valores do 14º ( $61.51 \pm 2.83$ ) e 21º ( $55.14 \pm 5.24$ ) dia foram superiores com relao ao 7º dia ( $45.32 \pm 4.28$ ). Para o grupo GLCT foram encontradas diferenças significativas também no 14º e 21º dia quando comparado o 7º

dia de avaliação. Vale ressaltar que a expressão do col I teve maior destaque no 14º dia de avaliação em todos os grupos tratados.



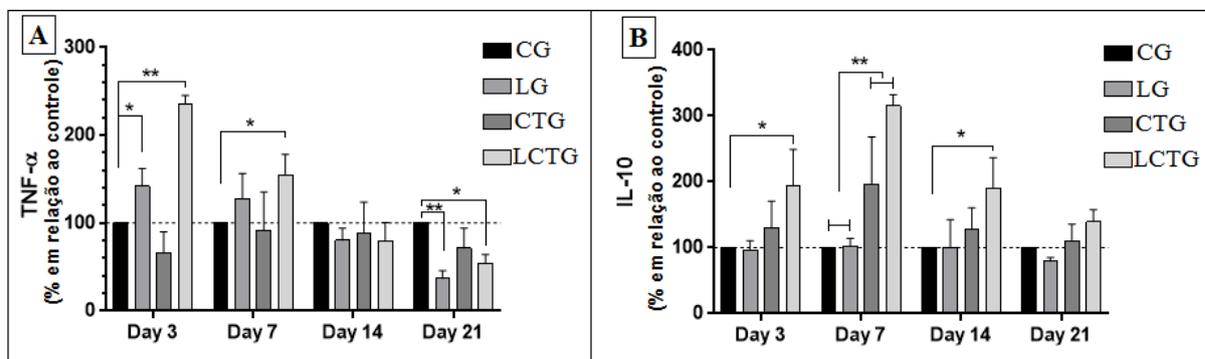


**Figura 6: Imunomarcção do colágeno tipo I. A:** Análise imunohistoquímica (40x) da expressão do Col I nos diferentes grupos e períodos experimentais. **B:** Porcentagem da expressão do Col I, teste de anova two-away entre-grupos, \* diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

Nas avaliações imunoenzimáticas observamos um aumento significativo da expressão do TNF- $\alpha$  no dia três para os grupos GL (142%  $\pm$ 20.1) e GLCT (235%  $\pm$ 10) quando comparado ao controle, sendo esse aumento mantido no dia sete para o grupo GLCT (154%  $\pm$ 23). Já no 14º dia não houve diferenças significativas entre os grupos. No final do período experimental o grupo controle apresentava ainda expressão de TNF-  $\alpha$ , já os grupos GL (37%  $\pm$ 8.8) e GLCT (54%  $\pm$ 9.8) apresentaram redução significativa (Figura 7A).

Com relação a IL-10, na primeira avaliação (dia 3), o grupo GLCT (193%  $\pm$ 55.8) apresentou maior expressão da citocina quando comparado aos grupos GC (100%) e GL (96%  $\pm$ 14.3). Já no sétimo dia do período experimental, tanto o grupo GCT (196%  $\pm$ 71.3) quanto o GLCT (315%  $\pm$ 16.6) apresentaram aumento significativo na expressão da IL-10 quando comparado aos demais grupos. No 14º dia o grupo GLCT (191%  $\pm$ 45.9) manteve um aumento significativo da citocina em relação ao GC. Vale ressaltar, que ao final do período experimental

todos os grupos apresentavam a mesma quantidade de IL-10, não sendo encontradas diferenças significativas.



**Figura 7: Expressão imunoenzimática das citocinas anti e pró inflamatórias. A:** Expressão do TNF- $\alpha$ ; **B:** Expressão da IL-10, durante todo o período experimental em todos os grupos estudados. Teste de anova two-away entre-grupos, \*diferença significativa  $p < 0.05$ , \*\*diferença significativa  $p < 0.001$ .

#### 7.4. DSCUSSÃO

Atualmente tem sido explorado na literatura formas alternativas para a cicatrização de lesões causadas por queimaduras, em especial a de espessura total (terceiro-grau) devido as complicações recorrentes como dificuldade e lentidão do processo de regeneração, além dos resultados insatisfatórios dos tratamentos usuais (24,25). Assim, nosso estudo buscou associar recursos (CTMs e FBM respectivamente), já descritos isoladamente na literatura como alternativas promissoras de tratamento no processo cicatricial da pele, na tentativa de acelerar e garantir a formação de um tecido cutâneo de qualidade.

Diversos são os mecanismos pelo qual acredita-se que a FBM contribua para o processo de regeneração cutânea, destacando a modulação da inflamação, síntese do colágeno e proliferação celular (14,26). Estudos prévios realizados pelo nosso próprio grupo demonstrou

a eficácia da FBM na proliferação de CTMs quando utilizados em doses adequadas em um estudo *in vitro* (18). No presente estudo nossos resultados demonstraram que quando associados ambos os tratamentos o tempo de regeneração da pele ocorreu de forma mais rápido como demonstrado pela análise de contração da ferida.

A maturação e a organização das fibras de colágeno no processo de reparo tecidual de lesões por queimaduras tendem a ser dificultados, além de muitas vezes não ocorrerem de maneira adequada, gerando a formação de tecido fibroso resultando na contração do tecido adjacente. O presente estudo observou de maneira detalhada a expressão, organização e maturação do colágeno durante todas as fases do processo de reparo, sendo identificado que os grupos tratados com FBM isolado ou associado a hASCs obtiveram melhores resultados, comprovando a eficácia dos tratamentos propostos. Estudos recentes destacaram que a FBM é uma técnica eficaz na maturação do colágeno tipo III em tipo I, além de contribuir de forma efetiva para a sua organização (12,13).

Fiório et al., 2013 (15) destacaram a ação da FBM sobre o colágeno tipo III e tipo I em ratos com lesões causadas por queimaduras de terceiro grau e parâmetros próximos aos utilizados no presente estudo. Os resultados de seu estudo demonstrou que a técnica era eficaz na organização e maturação das fibras de colágeno. Similarmente o estudo de Brassolatti et al., 2014 (26), afirmaram que a FBM foi capaz de acelerar o processo de reparo de queimaduras de terceiro grau, além de contribuir de forma positiva para o aumento e organização do colágeno.

Além da utilização da FBM no tratamento de lesões de pele, a utilização da terapia celular com CTMs no processo de cicatrização cutânea destaca-se na engenharia de tecidos através dos resultados positivos encontrados, devido ao potencial de modular a inflamação, estimular a reparação tecidual e, possivelmente, diferenciar e substituir diversos tipos celulares locais (27,28). Estudos prévios destacaram que parâmetros histológicos, como a densidade da

formação de vasos, quantidade de tecido de granulação e a gravidade da inflamação, foram favorecidos com a utilização da CTMs no processo de cicatrização de queimaduras (29,30).

Uma revisão recente realizada por Francis e colaboradores (28) identificou as linhagens de células tronco utilizadas como tratamento na regeneração tecidual de lesões por queimaduras, destacando que as CTMs derivadas de tecido adiposo possuem grande potencial regenerativo devido a sua capacidade proliferativa e por ser pluripotente, podendo inclusive se diferenciar nas três camadas germinativas (31), contribuindo para a neo-angiogênese e neovascularização. Em nosso estudo, essas afirmações foram exemplificadas nos grupos que utilizaram hASCs tanto na forma isolada quanto associada, sendo identificado através das análises histológicas e imunohistoquímicas uma qualidade superior do tecido neoformado quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Caliari-Oliveira et al., 2016 (7), avaliaram a contração da ferida de queimaduras de espessura total em ratos após o tratamento com hASCs, sendo observado aceleração do fechamento da ferida além de um tecido cutâneo de qualidade, com neovascularização e de tecido de granulação formados mais rapidamente do que os animais que não receberam o tratamento. Os mesmos achados foram evidenciados neste estudo para todos os grupos tratados, porém vale ressaltar que o grupo que associou a terapia celular com a FBM obteve a redução do infiltrado inflamatório e a reorganização tecidual de forma mais rápida e evidente.

Outro mecanismo proposto tanto pela FBM quanto pela terapia celular com CTMs no processo de reparo é a modulação de citocinas e agentes inflamatórios (7,32). Em nosso estudo foram avaliados citocinas pró e anti inflamatórias na tentativa de se observar por qual mecanismos as terapias atuavam.

Zhang et al., 2015 (33) relataram os efeitos das CTMs, de cordões umbilicais, sobre queimaduras em ratos, avaliando citocinas pró inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e anti inflamatórias como a IL-10, destacando que a liberação excessiva dos mediadores

inflamatórios, pode gerar graves danos teciduais causando depleção localizada, infecção local e deterioração. Os autores concluíram que no grupo CTMs todos os marcadores pró inflamatórios nas fases mais tardias foram reduzidos significativamente, exibindo uma taxa de cicatrização mais rápida, em contra partida, foi observado uma maior expressão do IL-10, demonstrando sua ação anti inflamatória. Esses achados corroboram com nosso estudo, uma vez que os grupos tratados com CTMs obtiveram uma maior liberação da IL-10 durante todo o processo de reparo.

Em relação a atuação da FBM na modulação de mediadores inflamatórios, acredita-se que nas fases iniciais do processo de reparo ocorra o aumento de citocinas pró inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , entretanto, no decorrer do tempo após a irradiação é esperado a redução substancial desses mediadores quando comparado processo natural do reparo, para assim acelerar do tempo de cicatrização (34,35). Em nosso estudo observou-se um aumento significativo do TNF- $\alpha$  nas fases iniciais, já no decorrer do período experimental foi observado que os grupos não irradiados ainda mantinham uma expressão significativa do TNF- $\alpha$ , enquanto nos grupos irradiados sua expressão já estava totalmente reduzida.

Contudo a associação da FBM com a terapia celular a literatura encontra-se escassa. Lamaro-Cardoso et al., 2019 (25) observaram em seu estudo a ação da FBM associado a células de fibroblastos na regeneração cutânea de queimadura de espessura total em ratos, durante o todo o período de processo de reparo, sendo referido que o grupo que utilizou a associação das técnicas apresentou rapidez no fechamento da ferida, garantindo um tecido com melhor qualidade. Apesar do estudo se diferir do nosso devido a comparação de diferentes potências da FBM, além de não realizar um grupo isolado da FBM, os autores concluem que quando utilizado a potência de 30mW os resultados foram mais significativos quando comparado aos demais grupos, assim como em nosso estudo que utilizou parâmetros próximos e associou a terapia celular.

Os achados deste estudo quando comparados com a literatura demonstram a importância da associação de ambas as técnicas, visando otimizar o tempo de tratamento e auxiliar ou melhorar as condições do tecido cicatricial, de lesões causadas por queimadura que atinjam toda a espessura da pele.

## **7.5. CONCLUSÃO**

Através dos dados apresentados neste estudo foi possível concluir que a FBM quando associado a CTMs é capaz de contribuir e acelerar o processo de cicatrização de queimaduras de espessura total através da modulação da inflamação e organização tecidual, garantindo a formação de um tecido cutâneo de qualidade.

## 7.6. REFERÊNCIAS

1. Guirro E, Guirro R. *Fisioterapia Dermato-Funcional: fundamentos, recursos, patologias*. 3.ed.rev. Barueri: Manole; 2004. 1-560 p.
2. de Andrade ALM, Parisi JR, Brassolatti P, Parizotto NA. Alternative animal model for studies of total skin thickness burns. *Acta Cir Bras*. 2017;32(10).
3. Venter NG, Marques RG, Santos JS dos, Monte-Alto-Costa A. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. *Burns* [Internet]. Elsevier; 2016 Jun 1 [cited 2019 Mar 12];42(4):807–14. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030541791600005X>
4. Jabeen S, Clough ECS, Thomlinson AM, Chadwick SL, Ferguson MWJ, Shah M. Partial thickness wound: Does mechanism of injury influence healing? *Burns* [Internet]. Elsevier; 2019 Feb 8 [cited 2019 Mar 12]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417918306971>
5. Wu YC, Wu GX, Huang HH, Kuo SM. Liposome-encapsulated farnesol accelerated tissue repair in third-degree burns on a rat model. *Burns* [Internet]. Elsevier; 2019 Mar 1 [cited 2019 Mar 12]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417918309975>
6. Brassolatti P, Ergio PS, Encio MCDER, Kido HW, Tim CR, Almeida-lobes L, et al. Comparative Effects of Two Different Doses of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing Third-Degree Burns in Rats. *Microsc Res Tech*. 2016;320(February):313–20.
7. Caliari-Oliveira C, Yachite JNU, Ramalho LNZ, Palma PVB, Carlos D, De Queiróz Cunha F, et al. Xenogeneic Mesenchymal Stromal Cells Improve Wound Healing and Modulate the Immune Response in an Extensive Burn Model. *Cell Transplant* [Internet]. SAGE PublicationsSage CA: Los Angeles, CA; 2016 Feb 1 [cited 2019 Mar 12];25(2):201–15. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.3727/096368915X688128>
8. Trajano ETL, da Trajano LA, dos Santos Silva MA, Venter NG, de Porto LC, de Fonseca A, et al. Low-level red laser improves healing of second-degree burn when

- applied during proliferative phase. *Lasers Med Sci.* 2015;30(4):1297–304.
9. Zhang K-R, Liu H-T, Zhang H-F, Zhang Q-J, Li Q-X, Yu Q-J, et al. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis.* Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2007 Jul;12(9):1579–88.
  10. Hawkins D, Abrahamse H. Effect of Multiple Exposures of Low-Level Laser Therapy on the Cellular Responses of Wounded Human Skin Fibroblasts. *Photomed Laser Surg.* 2006;24(6):705–14.
  11. Brassolatti P, de Andrade ALM, Bossini PS, Otterço AN, Parizotto NA. Evaluation of the low-level laser therapy application parameters for skin burn treatment in experimental model: a systematic review. *Lasers Med Sci [Internet].* Springer London; 2018 Jul 5 [cited 2019 Feb 5];33(5):1159–69. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-018-2526-5>
  12. Otterço AN, Andrade AL, Brassolatti P, Pinto KNZ, Araújo HSS, Parizotto NA. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. *J Photochem Photobiol B Biol [Internet].* 2018 Jun [cited 2019 Mar 12];183:22–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29684717>
  13. Martignago CCS, Tim CR, Assis L, Neves LMG, Bossini PS, Renno AC, et al. Comparison of two different laser photobiomodulation protocols on the viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci [Internet].* 2018 Dec 19 [cited 2019 Mar 12]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30565200>
  14. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, et al. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg.* 2014;32(1):41–52.
  15. Fiório FB, Albertini R. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci.* 2014;29:313–9.
  16. Amini A, Pouriran R, Abdollahifar M-A, Abbaszadeh HA, Ghoreishi SK, Chien S, et al. Stereological and molecular studies on the combined effects of photobiomodulation

- and human bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium on wound healing in diabetic rats. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2018 May [cited 2019 Mar 12];182:42–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29604553>
17. Bagheri M, Amini A, Abdollahifar M-A, Ghoreishi SK, Piryaei A, Pouriran R, et al. Effects of Photobiomodulation on Degranulation and Number of Mast Cells and Wound Strength in Skin Wound Healing of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2018 Aug [cited 2019 Mar 12];36(8):415–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30004319>
  18. de Andrade ALM, Luna GF, Brassolatti P, Leite MN, Parisi JR, de Oliveira Leal ÂM, et al. Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci*. 2018;32:1–7.
  19. Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*. 2015;41(3):542–7.
  20. Zuk PA, Ph D, Zhu MIN, Mizuno H, Benhaim P, Lorenz HP. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
  21. Caetano GF, Jorge P, Domingos M, Caliari C, Nani M, Andrey M, et al. Osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Polycaprolactone ( PCL ) scaffold. *Procedia Eng* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;110(16):59–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.010>
  22. Otterço AN, Brassolatti P, Andrade ALM, Avó LRS, Bossini PS, Parizotto NAE. Effect of photobiomodulation (670 nm) associated with vitamin A on the inflammatory phase of wound healing. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2018 Dec 22 [cited 2019 Mar 27];33(9):1867–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29790013>
  23. Caetano GF, Frade MAC, Andrade TAM, Leite MN, Bueno CZ, Moraes ÂM, et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Mar 19];103(5):1013–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220821>

24. Rose LF, Chan RK. The Burn Wound Microenvironment. *Adv wound care* [Internet]. Mary Ann Liebert, Inc.; 2016 Mar 1 [cited 2019 May 28];5(3):106–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26989577>
25. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM, Fantinati MS, Milhomem AC, Almeida VL, et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. Elsevier; 2019 May 1 [cited 2019 May 28];194:174–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134418314234?via%3Dihub>
26. Brassolatti P, Bossini PS, Oliveira MCD, Kido HW, Tim CR, Almeida-Lopes L, et al. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microsc Res Tech*. 2016;79(4).
27. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2019 Jun 4];363(9419):1439–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15121408>
28. Francis E, Kearney L, Clover J. The effects of stem cells on burn wounds: a review. *Int J Burns Trauma* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2019 [cited 2019 Jun 10];9(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30911430>
29. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Transplantation Promotes Cutaneous Wound Healing of Severe Burned Rats. Covas DT, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 20 [cited 2019 Jun 4];9(2):e88348. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586314>
30. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* [Internet]. NIH Public Access; 2012 Mar [cited 2019 Jun 4];33(3):136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227317>
31. Zuk PA. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. Kellogg D, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2019 Jun 10];21(11):1783–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375149>

32. Ocon CA, dos Santos SA, Caires JR, de Oliveira MFD, Serra AJ, Leal-Junior EC, et al. Effects and parameters of the photobiomodulation in experimental models of third-degree burn: systematic review. *Lasers Med Sci* [Internet]. Springer London; 2018 Sep 18 [cited 2019 Feb 5];1–12. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-018-2633-3>
33. Zhang J, La X, Fan L, Li P, Yu Y, Huang Y, et al. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cell transplantation in rat burn models. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. e-Century Publishing Corporation; 2015 [cited 2019 Jun 10];8(5):5129–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26191208>
34. Freitas LF de, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2017;22(3):1–37.
35. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang Y-Y, Carroll JD, Hamblin MR. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng* [Internet]. NIH Public Access; 2012 [cited 2019 Jun 11];40(2):516. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288797/>

## **PARTE III**

---

### **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

### **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

### **ANEXOS**

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO**

---

Através dos dados e resultados expostos nesta tese podemos concluir que:

- A FBM a laser em parâmetros adequados é capaz de promover a proliferação de CTMa em cultivos celulares bidimensionais, mantendo as características biológicas destas, porém em doses inadequadas é possível observar o fenômeno apresentado por Andt-Shulz de inibição ou ausência de resposta biológica.
- Os modelos bidimensionais apesar de serem frequentemente apresentados na literatura e suficientes para elucidar diversos mecanismos de ação de várias terapias, podem não ser tão esclarecedores para observar os mecanismos envolvidos na FBM a laser, sendo o modelo tridimensional adequado e suficiente para obtenção de respostas e respaldo de evolução para experimentação *in vivo*.
- Os mecanismos biológicos de ação da FBM a laser com energias de 1 á 6 Joules em modelos tridimensionais demonstram que o laser é capaz de aumentar a expressão de EROS além de estimular a produção de IL-8 em CTMs mantendo a viabilidade e induzindo uma maior proliferação celular.
- Para a elaboração de um modelo experimental de queimadura de espessura total com a utilização de placas de solda, a literatura já preconiza a temperatura de 150°C como adequada, e através de nossos estudos observamos que o tempo de 5 segundos de manutenção da placa no animal é suficiente para propagação do modelo, sendo observada o acometimento de todas as camadas da pele.
- A FBM a laser, assim como as CTMs, em especial as derivadas de tecido adiposo são técnicas que isoladas apresentam eficácia na resolução de lesões como as ocasionadas por queimaduras, de forma a acelerar o processo de reparo.
- A associação da FBM a laser, em parâmetros adequados, com as CTMs são técnicas que juntas beneficiam o reparo de lesões de queimaduras, acelerando o processo de

reparo além de garantir a formação de um tecido com características próximas as de um tecido sadio, auxiliando na neovascularização, organização de fibras de colágeno e modulação de citocinas pró e anti-inflamatórias.

## **9. PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

Os propostos apresentados nessa Tese demonstram que, apesar da FBM a laser ser uma técnica extensivamente explorada na literatura, seus mecanismos de ação e biológicos ainda estão em constante discussão, sendo evidenciado a necessidade de estudos que explorem essa temática a nível de cultivo celular, estudos experimentais e ensaios clínicos, afim de proporcionarem um maior entendimento sobre ação dessa técnica, além de produzirem protocolos eficazes de aplicação que facilitem a prática clínica.

Adicionalmente, os estudos presentes demonstram a eficácia da FBM a laser tanto na proliferação de CTMs quanto como terapia no tratamento de reparo tecidual cutâneo. Acredita-se que a associação desta técnica a terapia celular parece ser um caminho promissor para o tratamento de lesões causadas por queimaduras, abrindo um novo panorama de discussão sobre tratamentos alternativos aos convencionais que, além de serem eficazes, podem ser de fácil aplicação e baixo custo.

O trabalho em questão também destaca estudos em cultivos tridimensionais, sendo este tema atualmente bastante discutido pois, além de elucidar diversos questionamentos que antes teriam que passar por testes *in vivo*, está em constante aperfeiçoamento, sendo apresentado na literatura e até mesmo no mercado, diversas formas de materiais que possam servir de base para a tridimensionalidade, garantindo assim avanços nas técnicas de cultura que além de serem mais baratas demandam menos tempo que outros tipos de estudos.

A realização desta TESE motiva novos questionamentos para futuras pesquisas. Ressalta-se que mais estudos que visem investigar a ação de CTMs na área de engenharia tecidual devem ser realizados partindo da premissa que a terapia celular parece ser um caminho para inúmeras investigações de tratamentos, principalmente quando associado a outras técnicas. Além disso, estudos que explorem além da FBM a laser, a FBM com LED devem ser investigados, pelo fato deste tipo de FBM nos últimos anos ter se mostrado eficaz como terapia em diversas afecções, além do baixo custo do aparelho e o aumento da área de aplicação,

possibilitado por maiores áreas do feixe, serem diferenças importantes na elaboração de tratamentos. Assim acredita-se que seria também de grande contribuição explorar as temáticas presentes neste estudo com a aplicação de irradiações com LEDs.



## ANEXO I

Pró Reitoria  
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (660nm) ASSOCIADA À CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU: ESTUDO "IN VITRO" E "IN VIVO"", protocolada sob o CEUA nº 6224231115, sob a responsabilidade de **Ana Laura Martins de Andrade** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 26/11/2015.

We certify that the proposal "EFFECTS OF LOW LEVEL LASER THERAPY (660nm) ASSOCIATED WITH STEM CELLS IN MESENCHYMAL THIRD DEGREE BURNS: STUDY "IN VITRO" E "IN VIVO"", utilizing 96 Heterogenics rats (96 males), protocol number CEUA 6224231115, under the responsibility of **Ana Laura Martins de Andrade** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 11/26/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2016](#) a [10/2018](#) Área: [Fisioterapia](#)

Origem: [Biotério Central da UFSCar](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [2 a 3 meses](#) N: [96](#)

Linhagem: [Wistar](#) Peso: [250 a 300 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Recursos Fisioterapeúticos - Dep. de Fisioterapia Biotério do Dep. de Fisioterapia São Carlos, 06 de dezembro de 2016

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

## ANEXO II

Lasers in Medical Science  
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2642-2>

ORIGINAL ARTICLE



## Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells

Ana Laura Martins de Andrade<sup>1</sup> · Genoveva Flores Luna<sup>2</sup> · Patrícia Brassolatti<sup>3</sup> · Marcel Nani Leite<sup>4</sup> · Julia Risso Parisi<sup>1</sup> · Ângela Merice de Oliveira Leal<sup>2</sup> · Marco Andrey Cipriani Frade<sup>4</sup> · Fernanda de Freitas Anibal<sup>3</sup> · Nivaldo Antonio Parizotto<sup>1</sup>

Received: 27 February 2018 / Accepted: 14 September 2018  
 © Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2018

### Abstract

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue engineering has been extensively investigated. The greater the proliferation of this cellular group, the greater the regenerative and healing capacity of the tissue to which they belong. In this context, photobiomodulation (PBM) is an efficient technique in proliferation of distinct cell types. However, its parameters and mode of action are still unclear and require further investigation. This study aimed to evaluate the PBM action with different energies in MSCs of adipose tissue (hASCs). We used hASCs, seeded in 24-well plates, with  $3 \times 10^4$  cells per well, in culture media. We used a total of four experimental groups, one with hASCs and simulated PBM and three other groups, which received PBM irradiation at 24, 48, and 72 h, with a 660-nm laser and power of 40 mW and energy of 0.56, 1.96, and 5.04 J. We performed analyses of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue to evaluate cell proliferation and viability, 1 h after PBM irradiation. Software Graph PadPrism 7.0 was used. Intergroup comparisons were performed with ANOVA two-way and we used the Tukey post hoc test. Mitochondrial activity evaluated by MTT revealed the statistical difference in the first 24 h for group with more high energy when compared to control group; and in the 72 h for two irradiated groups when compared to the control group. The trypan blue test showed significant differences at the end of the experiment for two irradiated groups LG1 ( $4.52 \times 10^4 \pm 0.2$ ) and LG2 ( $4.85 \times 10^4 \pm 0.8$ ), when compared to the control group ( $1.87 \times 10^4 \pm 0.7$ ). Both tests failed to be statistically different at the end of the experiment for groups LG1 and LG2 and observed a reduction in cellular mitochondrial growth and activity for group LG3. We conclude that PBM with energy close to 0.56 and 1.96 J promote proliferation of hASCs, and higher energy, such as 5.04 J, can be harmful.

**Keywords** Photobiomodulation · Mesenchymal stem cells

### Introduction

The use of mesenchymal stem cells (MSCs) has been widely investigated in different areas of tissue engineering and regenerative medicine as an alternative to conventional therapeutic methods. Their multipotentiality offers applications in cell therapy, in addition to their ability to self-renewal, proliferation, and differentiation into several specialized cell types like adipocytes, chondrocytes, and osteoblasts [1]. These cells are easily isolated, expanded, and cultivated in vitro and can be obtained from several tissues, such as bone marrow, dental pulp, periodontal ligament, umbilical cord, and adipose tissue [2–5].

Adult stem cells can be isolated from adipose tissue liposuctioned in significant numbers and show stable growth and proliferative kinetic in culture [2, 6, 7]. MSCs derived from

✉ Ana Laura Martins de Andrade  
 anandrade90@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP 13565-905, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medicine, Post-Graduate Program in Biotechnology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP 13565-905, Brazil

<sup>3</sup> Department of Morphology and Pathology, Post-Graduate Program in Evolutionary Genetics and Molecular Biology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP 13565-905, Brazil

<sup>4</sup> Dermatology Division of Internal Medicine Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP 4049-900, Brazil

## ANEXO III



## 5-Experimental Surgery

## Alternative animal model for studies of total skin thickness burns<sup>1</sup>

Ana Laura Martins de Andrade<sup>I</sup>, Julia Risso Parisi<sup>II</sup>, Patrícia Brassolatti<sup>III</sup>, Nivaldo Antonio Parizotto<sup>IV</sup>

<sup>I</sup>Fellow Master degree, Postgraduate Program in Physiotherapeutic Resources Laboratory, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brazil. Acquisition and interpretation of data, statistical analysis, manuscript writing.

<sup>II</sup>Fellow Master degree, Postgraduate Program in Biosciences, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Brazil. Intellectual and scientific content of the study.

<sup>III</sup>PhD in Biotechnology, UFSCar, Sao Carlos-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study.

<sup>IV</sup>Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Physiotherapeutic Resources Laboratory, UFSCar, Sao Carlos-SP, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, technical procedures.

### Abstract

**Purpose:** To present an alternative experimental model of third degree burn of easy reproducibility.

**Methods:** Eighteen male Wister rats were randomly divided into three groups, 6 of which were allocated to each group. A soldering iron coupled to an aluminum plate was used to produce burn, at a temperature of 150°C, with different exposure times per group. Group 5 (G5) animals were burned at 150°C with exposure time of 5 seconds; Group 10 (G10) the animals were burned at 150°C with exposure time of 10 seconds and group 15 (G15) the animals were burned at 150°C with exposure time of 15 seconds.

**Results:** Histopathological analyzes showed that all three groups had similar morphological characteristics, with total thickness involvement.

**Conclusion:** The technique is effective to reproduce a third degree burn and suggests the temperature of 150°C with 5 seconds of exposure in order to minimize the risks to the animals.

**Key words:** Burns. Models, Animal. Skin. Rats.

## ANEXO IV

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine



**EFFECT OF PHOTOBIMODULATION ASSOCIATED WITH  
CELL THERAPY IN THE PROCESS OF CUTANEOUS  
REGENERATION IN THIRD DEGREE BURNS IN RATS**

Journal:	<i>Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>
Manuscript ID	TERM-19-0262
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	05-Jul-2019
Complete List of Authors:	Andrade, Ana Laura; UFSCar, Brassolatti, Patricia; UFSCar Luna, Genoveva; UFSCar, Medicine Parisi, Julia; UFSCar, Physiotherapy Leal, Angela; UFSCar, Medicine Frade, Marco Andrey; USP, Medicine Parizotto, Nivaldo; UFSCar
Keywords:	Stem cells, burns, photobiomodulation, tissue repair, lasertherapy, wound healing

SCHOLARONE™  
Manuscripts