



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

RHAVILLA SANTOS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER
AsGaAl (670nm) SOBRE CULTIVO DE FIBROBLASTO
EQUINO**

**JATAÍ-GO
2018**



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

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

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Rhaila Santos de Oliveira

Título do trabalho: Avaliação da fotobiomodulação com laser ASGAL (670 nm) sobre cultivo de fibroblastos equinos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

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

Rhaila Santos de Oliveira
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

[Assinatura]
Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 13 / 11 / 2018

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

Casos de embargo:

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

² A assinatura deve ser escaneada.

RHAVILLA SANTOS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER AsGaAl (670nm) SOBRE
CULTIVO DE FIBROBLASTO EQUINO**

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

Co-orientadora: Profa. Dra. Júlia de Miranda Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito para
obtenção do grau de Mestre em Biociência
Animal.

JATAÍ-GO

2018

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

Santos de Oliveira, Rhavilla
AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER AsGaAl
(670nm) SOBRE CULTIVO DE FIBROBLASTO EQUINO [manuscrito]
/ Rhavilla Santos de Oliveira. - 2018.
70 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo; co
orientadora Dra. Júlia de Miranda Moraes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2018.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. bioestimulação. 2. citoproteção celular. 3. modulação celular. 4.
terapia a laser de baixa intensidade. I. Marques Araujo, Gustavo
Henrique, orient. II. Título.

CDU 639.09



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Aos trinta dias do mês de Outubro de 2018, às 08:00 horas, no Prédio da Pós – Graduação Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da candidata **RHAVILLA SANTOS DE OLIVEIRA** com o trabalho intitulado “**AVALIAÇÃO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LASER AsGaAl (670nm) SOBRE CULTIVO DE FIBROBLASTO EQUINO**”. A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araújo (Orientador), Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita (Membro Interno), Prof. Dr. João Ferreira de Lima Neto (Membro Externo), considerou a candidata Rhavilla Santos de Oliveira:

APROVADA ☒ **REPROVADA** ().

Foi concedido um prazo de 15 dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araújo
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita
Membro Interno



Prof. Dr. João Ferreira de Lima Neto
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Cabem aqui meus melhores sentimentos a tudo que fez parte dessa caminhada, aprendi mais um pouco! Aprendi sobretudo que não importa o quão difícil é a caminhada, contanto que façam parte de nossos ciclos e do nosso caminho pessoas que realmente nos amam e nos protegem, nos incentivando e ensinando a não desistir e enfrentar os desafios. Eu tive muitas! Agradeço infinitamente a Deus, que trilhou meu caminho para essa conquista, se mostrando presente nos melhores momentos, e em cada grau de dificuldade me proporcionando o dobro de força! Agradeço a ele por colocar em meu caminho pessoas que me trouxeram luz durante essa caminhada, as quais aqui agradeço com muito carinho.

À minha mãe e minha madrastra pelo amor, apoio e incentivo. A toda minha família obrigada! Em especial, agradeço a meu pai, por tudo que fazes por mim. Sou grata por estar a meu lado sempre e por ser o maior responsável por essa conquista. Por seu incentivo e amor infinito, MUITO OBRIGADA!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo, meus sinceros agradecimentos! Sou grata por sua atenção, confiança e disponibilidade em me orientar desde o primeiro contato. Obrigada por acreditar em minha capacidade e por não medir esforços para me apoiar nessa jornada.

Agradeço a minha co-orientadora Prof. Dr. Júlia de Miranda Moraes e Prof. Dr. João Ferreira de Lima Neto, pela paciência, cuidado, disponibilidade e ensinamentos. Sem a ajuda de vocês, parte do que estou colhendo hoje não seria possível.

Deixo um agradecimento especial a uma amiga que esteve presente durante a graduação e toda trajetória do mestrado, Anna Beatriz Borges de Carvalho. Querida amiga, sem a tua amizade, companhia, cuidado e todo aprendizado que dividimos, a minha formação pessoal e enquanto mestre, não estaria completa. Sou imensamente grata à Deus pela amizade que construímos. Você constitui uma parte linda dessa trajetória. Muito obrigada!

À Alana Romani, Andréia Amaral, Tatiana Machiavelli, Cláudia Graziela Lemes, Anne Oliveira, Eva Oliveira, Zêila Costa e Caroline Oliveira. Obrigada professoras e amigas por tudo quanto fizestes. Se mantiveram firmes comigo e com outras mulheres na luta contra o machismo e a violência dentro da Universidade.

Vocês me ensinaram com suas vozes, gestos, experiências e lutas, a ser FORTE, dando-me apoio e estabilidade para seguir nessa caminhada.

Agradeço aos meus colegas do Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sobretudo aos alunos Rafaela, Fernanda, Hérica, Calebe, João, Sabrina e Gustavo pela amizade e auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa. Aos professores, Dra. Emília Oliveira Alves Costa, Dra. Lysa Bernardes Minasi, Dr. Alex Silva da Cruz, Dr. Cláudio Carlos da Silva e Dr. Aparecido Divino da Cruz, minha gratidão, pelas discussões, ensinamentos, atenção e carinho que tiveram comigo e com esta pesquisa.

Em especial, muitíssimo obrigada Professor Peixoto! Obrigada pelo acolhimento, pela oportunidade de conviver com a “Família Replicon”, os quais, ocupam um espaço especial em meu coração. Talvez não consiga expressar a gratidão por tê-lo conhecido e o quanto aprendi contigo e com esse ambiente. Obrigada por nos oferecer sua luz, apoio e esperança diariamente. Danilo Conrado, obrigada pelo suporte e direcionamento para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, da Universidade Federal de Goiás, em nome dos Técnicos, Elaine Jacob da Silva Carmo e Alex Wilkerson Ferreira Borges, a vocês meu muito obrigada!! Agradeço também ao Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA), da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, em nome da Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim.

Aos professores membros da banca do Exame de Qualificação e Defesa da Dissertação, Dra. Michelle Rocha Parise, Dr. Ricardo de Mattos Santa-Rita e Dr. João Ferreira de Lima Neto, muito obrigada pelo cuidado e contribuição de vocês a esse trabalho.

Por fim, a Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, a Capes e os demais colaboradores, muito obrigada!

RESUMO

A fotobiomodulação é uma terapia não invasiva, de baixo custo que envolve o uso de luz no espectro infravermelho próximo ou vermelho, com baixa potência de energia para promover ativação e modulação de mecanismos celulares. Nos últimos anos, o interesse pelo emprego dessa ferramenta na medicina veterinária tem crescido. Entre os efeitos clínicos já conhecidos tem-se a produção de analgesia, redução de processo inflamatório e edema, e, regeneração tecidual. Objetiva-se neste trabalho avaliar a concentração, viabilidade, mutagenicidade e genotoxicidade de fibroblasto equino oriundo do tecido cutâneo, expostos a irradiação laser de AsGaAl, comprimento de onda de 670 nm e potência de 30 mW, analisadas 24 horas após uma e duas irradiações, com densidades de energia de 0,5, 2, 5, 10 J/cm². Para tanto, foram empregados os testes de contagem direta em câmara de Neubauer, teste de micronúcleo e ensaio cometa. Os dados referentes a concentração e viabilidade e celular ensaio cometa foram analisados pela comparação de médias por ANOVA, seguida do teste de Tukey quando necessário e aos dados do teste de micronúcleo aplicou-se o Qui-quadrado, todos testes aplicados ao nível de significância de 5%. Conclui-se que o laser nos parâmetros ópticos e densidades de energia selecionas possui característica antimutagênica, e a depender da densidade de energia selecionada pode induzir a viabilidade e proliferação celular, e, comportar-se como agente citoprotetor, reduzindo danos na molécula de DNA.

Palavras-chave: bioestimulação, citoproteção celular, modulação celular, terapia a laser de baixa intensidade

ABSTRACT

The photobiomodulation is a non-invasive therapy, with low cost, using the laser or led light, under the infrared near or red spectrum in low potency densities, in order to promote the activation and modulation of some cellular mechanisms. The laser therapy is commonly used to induce analgesia, reduce inflammatory process and edema, and, to hasten the regeneration of injured tissues as, skin wounds, tendon and bones lesions. The present study aimed to investigate the effects of the photobiomodulation at equine fibroblast primary culture. The fibroblast culture cells were divided in 5 groups (10000 cells/each): control, and irradiated groups with different energy densities 0.5J/cm², 2J/cm², 5J/cm² and 10J/cm². The cells were cultured in a 24 well dish plate, and the groups received one or two laser irradiation 24 hours apart. The samples were obtained after 24h of each irradiation, and before for control. To proceed the cell concentration were used the direct counting with the NeuBauer chamber, trypan blue were applied to access the cellular viability, also was performed the DNA integrity test using the comet assay and, for nuclear alterations were made the Micronucleus test. The viability, concentration and Comet data were analyzed with ANOVA, followed by Tukey test when necessary, and, the chi-square test was used to the micronucleus data, the significance level was 5% in all statistical tests applied. Was concluded that the laser used in the presented optical and energy density parameters had shown some anti-mutagenic effect, and, according the energy density, can interfere at the cellular viability and proliferation. In this way, the laser act as a citoprotector agent, by the reduced DNA damage observed at the laser irradiated equine fibroblast cultured cells.

Keywords: biostimulation, cell cytoprotection, cellular modulation, low-intensity laser therapy

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.2	Objetivo geral	3
2.3	Objetivos específicos	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	Fotobiomodulação	4
3.2	Laser	5
3.2.1	Propriedades da luz laser	6
3.3	Fibroblastos	9
3.4	Principais efeitos da fotobiomodulação em culturas celulares	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Grupos experimentais	16
4.2	Cultivo celular	17
4.3	Plaqueamento celular e irradiação com laser	19
4.4	Quantificação e viabilidade celular	22
4.5	Índice de mutagenicidade pelo Teste de Micronúcleo	23
4.6	Avaliação de genotoxicidade pelo Ensaio Cometa	24
4.7	Análise estatística	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Resultados de viabilidade celular por exclusão com o corante Azul de Tripan ...	28
5.2	Resultados da quantificação celular pelo método de contagem direta em Câmara de Neubauer	29
5.3	Resultados do índice de mutagenicidade pelo Teste de Micronúcleo	32
5.4	Avaliação de genotoxicidade pelo Ensaio Cometa	34
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo atômico proposto pelo físico Niels Bohr. Em (A), esquematização do átomo, demonstrando o núcleo envolto por duas órbitas, com um elétron em cada uma delas, girando em torno do núcleo. Processo de absorção (B) e emissão (C) de fótons pelos elétrons.	7
Figura 2 - Esquema representativo do espectro eletromagnético com destaque para a região visível.....	9
Figura 3 - Fotomicroscopia de cultivo de fibroblasto equino, adquirida por meio de microscópio invertido, em aumento de 20x.	11
Figura 4 - Fotomicroscopia adquirida por meio de microscópio invertido, em aumento de 4x, demonstrando cultivo de fibroblasto equino, atingido sub-confluência de 95% em garrafa de cultivo celular.	18
Figura 5 - Esquema representativo das placas de 24 poços, mostrando os poços plaqueados com fibroblasto equino. Os poços em rosa, representam os grupos controle (não irradiados) e os poços em azul, são os grupos de irradiações. A placa A, recebeu uma irradiação, ao passo que a placa B, recebeu duas irradiações.	20
Figura 6 - Apoios feitos em E.V.A, de igual tamanho ao das placas de 24 poços. Cada um deles é específico para irradiação de um determinado grupo experimental.	21
Figura 7 - Sistema montado para irradiação das placas; (A) visão frontal, observa-se a ponteira do laser fixada pela haste de ferro posicionada abaixo do suporte de acrílico, formando um ângulo de 90° em relação a placa, e a caixa de E.V.A posicionada sobre a placa; (B) visão superior, nota-se o eixo de saída da luz laser na extremidade da ponteira, através do orifício presente no suporte de acrílico e no apoio de E.V.A.	22
Figura 8 - Imagens analisadas durante o Ensaio Cometa capturadas com auxílio do microscópio Zeiss Axio Scope A1, pelo software Zen 2012® (A, B, C, D, E); em F, imagem de nucleóides analisados utilizando o “software” Comet Score TM	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação do Aparelho Laser (AlGaAl) utilizando para as irradiações durante a fase experimental.....	20
Tabela 2 - Média $\pm$ EPM da viabilidade celular dos grupos experimentais, utilizando o corante Azul de Tripán, comparados por ANOVA ($p \leq 0,05$).....	28
Tabela 3 - Média $\pm$ EPM das concentrações celulares contabilizadas em Câmara de Neubauer, comparadas por ANOVA ($p \leq 0,05$)	30
Tabela 4 - Frequência de observação de alterações nucleares em cada 1000 células binucleadas analisadas no teste de micronúcleo comparadas pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$).....	32
Tabela 5 - Média $\pm$ EPM, do parâmetro “Comprimento do Cometa”, do Ensaio Cometa, comparadas por ANOVA ($p \leq 0,05$).....	34
Tabela 6 - Média $\pm$ EPM, da variável “% de DNA na cauda”, do Ensaio Cometa, comparados por ANOVA ($p \leq 0,05$).....	35
Tabela 7 - Média $\pm$ EPM, da variável “momento de Olive”, do Ensaio Cometa comparados por ANOVA ($p \leq 0,05$).....	37

1 INTRODUÇÃO

Na clínica médica equina, frequentemente, feridas traumáticas de espessura total no tecido cutâneo cicatrizam por segunda intenção (CELESTE et al., 2013). As feridas que recebem essa denominação, normalmente não se limitam ao tecido cutâneo, atingindo o subcutâneo e podem apresentar danos em tecido muscular e estruturas adjacentes, como cartilagens, tendões e ossos. Dos animais acometidos, uma considerável parcela é privada da carreira atlética em consequência de cicatrizes funcionalmente limitantes e esteticamente desfigurantes, resultado do processo cicatricial dificultoso na espécie (PERKINS, REID & MORRIS, 2005; WILMINK & VAN WEEREN, 2005), o que gera significativos prejuízos financeiros a indústria equina (DESCHENE et al., 2012; THEORET et al., 2013).

Em equinos, perturbações no processo cicatricial de caráter fibrótico ocorrem, especialmente, em feridas cutâneas localizadas na porção distal dos membros, resultando na formação de um tecido de granulação exuberante, que se semelham ao queuloide humano em alguns aspectos (CELESTE et al., 2011; THEORET et al., 2013; MIRAGLIOTTA et al., 2016). Sabe-se que, algumas desarmonias na resposta de reparo tecidual estão relacionadas com desequilíbrio das funções dos fibroblastos, como a síntese excessiva de proteínas da matriz extra celular (MEC), desequilíbrio na produção de metaloproteinases e seus inibidores (BARNES et al., 2009; MURAOKA & IEDA, 2014), bem como, deficiência na eliminação e/ou diferenciação dessas células em miofibroblastos, mantendo a ferida na fase proliferativa de reparo (CELESTE et al., 2011).

Nos últimos anos, houve uma progressiva busca por terapias que promovam maior velocidade de resolução dessas lesões, pensando em quesitos estéticos, financeiros e, principalmente, em melhorias na qualidade de vida e bem-estar desses pacientes. Ao encontro desse cenário, uma série de pesquisas têm demonstrado resultados positivos da aplicação da luz laser na faixa espectral do vermelho ao infravermelho próximo, por meio de ensaios clínicos e *in vitro*, apontando que essa modalidade terapêutica pode ser eficiente na promoção de melhorias do processo de regeneração de tecido cutâneo, por apresentar ação analgésica e anti-inflamatória, por estimular a proliferação, viabilidade, diferenciação, migração celular e a

angiogênese; além de aumentar a síntese de ATP, RNA, DNA e de proteínas como o colágeno (AVCI et al., 2013; KARU, 2014; KARU, 2015; FREITAS & HAMBLIN, 2016).

Embora haja estudos científicos que analisaram as respostas clínicas do emprego da fotobiomodulação na espécie equina (BERGH, RIDDERSTRÅLE & EKMAN, 2007; RYAN & SMITH, 2007; JANN et al., 2012; MORAES et al., 2014; LIMA et al., 2016; ARAUJO et al., 2017; ABDEL, ISSA & NOURI, 2017) a literatura é bastante escassa quando se trata de experimentação com culturas de células, não encontrando inclusive, nenhuma investigação acerca dos efeitos da fotobiomodulação em culturas de fibroblastos dessa espécie na literatura pesquisada.

Levando em consideração a importância e as funções do fibroblasto na regeneração tecidual, as consideráveis perdas do setor equestre em decorrência de desarmonias no processo cicatricial e as respostas promissoras observadas da interação de tecidos biológicos com a fotobiomodulação, tanto em humanos, como em animais, nosso grupo de pesquisa centraliza as investigações na interação da luz laser como modulador celular na espécie equina, e, no presente estudo, investiga os efeitos do laser com comprimento de onda de 670 nm em cultura primária de fibroblasto equino.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl) com comprimento de onda de 670 nm, e 30 mW de potência em diferentes densidades de energia (0,5; 2; 5 e 10 J), após uma irradiação, às 24 horas, e duas irradiações, sendo elas, às 24 e 48 horas do momento experimental, sobre o cultivo de fibroblasto equino oriundo do tecido cutâneo.

2.3 Objetivos específicos

- Quantificação celular pelo método de contagem direta em Câmara de Neubauer;
- Avaliação da viabilidade celular subjetiva, pelo método de Azul de Tripán;
- Avaliação da mutagenicidade pelo Teste de Micronúcleo;
- Avaliação do dano ao DNA, pelo Ensaio Cometa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fotobiomodulação

A terapia com laser de baixa potência foi acidentalmente descoberta por Endre Mester e sua equipe em 1967, na Hungria. Os pesquisadores tentavam reproduzir um experimento feito anteriormente pelo americano Paul McGuff e seus colaboradores (1965), que haviam obtido sucesso ao empregar o recém descoberto laser de rubi para curar tumores malignos em ratos. O laser de rubi utilizado por Mester continha apenas uma fração de potência do laser empregado pelo colega americano. Com isso, Mester não conseguiu curar nenhum tumor, no entanto, observou uma elevada taxa de crescimento de pelos e um menor tempo na cicatrização das feridas induzidas nos ratos tratados, em relação ao grupo controle (MESTER et al.; 1968). Este foi o primeiro indício de que o laser da baixa potência poderia ter aplicações benéficas na medicina e foi denominada como “estimulação a laser de baixa potência” ou “terapia a laser de baixa potência” (HAMBLIN, 2016).

A partir de então, esse campo amadureceu e apesar de ainda não se conseguir elucidar todos os questionamentos, muito se aprendeu sobre a base mecanicista dessa terapia, incluindo o fato de que sua atuação em células, tecidos e organismos pode provocar respostas tanto estimuladoras como inibitórias, dependendo dos parâmetros de luz selecionados (ANDERS, LANZAFAME & ARANY, 2015).

Por um período acreditou-se que apenas a luz laser seria capaz de desencadear efeitos biológicos benéficos, em virtude de características específicas que possui, como a monocromaticidade e coerência. Algum tempo depois, constatou-se que a coerência e o fator monocromático não eram determinantes para a modulação celular e sim a baixa potência da luz empregada. Incorporou-se então os diodos emissores de luz (LED) não coerentes a essa terapia, com resultados bastante semelhantes aos produzidos pelo emprego do laser (HAMBLIN, 2016).

Não é com muita frequência que uma nomenclatura globalmente aceita de um campo científico mude. No entanto, tendo em vista que as características específicas da luz laser não eram necessárias, o fato da expressão “baixo nível” ser considerada um termo subjetivo, não deixando claro o que termo “baixo” realmente significava, e

que tanto a estimulação como a inibição de processos biológicos poderiam ser terapeuticamente benéficos, decidiu-se mudar o nome para "fotobiomodulação" (ANDERS, LANZAFAME & ARANY, 2015)

De uma forma abrangente, a fotobiomodulação é um termo preciso e específico designado a uma terapia não invasiva, não-ionizante, segura e de baixo custo que consiste na aplicação de fontes luz de Laser ou Led de baixa potência, com o designo de promover a modulação de diversos mecanismos celulares e desencadear, entre outros efeitos sistêmicos, a reparação tecidual, analgesia e redução de processo inflamatório (KARU, 2010; CHUNG et al., 2012; ANDERS, LANZAFAME & ARANY, 2015).

3.2 Laser

A sigla laser teve origem na língua inglesa, é a abreviação da expressão *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que se traduz por "Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação". Refere-se a uma energia eletromagnética não ionizante, que pode ser visível ou não, de acordo com a matéria usada em sua composição e, conseqüentemente, com o comprimento de onda produzido (NAJEEB et al., 2016).

Além do tipo de material utilizado em sua elaboração, no campo médico, os lasers podem ser categorizados quanto à potência e modo de emissão de luz. Em função da potência, são agrupados em duas categorias: alta e baixa intensidade de potência (AVCI et al., 2013). Os lasers de alta intensidade abrangem potências que variam entre 1 a 30 W, com o objetivo de diérese tecidual, coagulação e atenuação microbiana. Esses propósitos são atingidos em virtude dos efeitos térmicos produzidos pelos aparelhos que compõem esse grupo (JORGE et al., 2010). Em contrapartida, os lasers de baixa potência são bastante utilizados para fins terapêuticos e como biomoduladores celulares (EDUARDO et al., 2015). Para essas finalidades, as potências utilizadas variam de 1 a 500 mW, e a energia produzida por essas potências é qualificada como atérmica, capaz de estimular membranas e organelas celulares (MARQUES et al., 2010).

Com relação ao modo de emissão da luz, tem-se a emissão contínua e pulsada. Quando o laser opera em modo contínuo, a emissão da luz acontece por mais de um segundo de duração, sem interrupção. Na emissão pulsada a radiação

acontece em pulsos consecutivos, com intervalos regulares. Essa taxa de repetição é medida em Hertz (Hz) e corresponde ao número de pulsos emitidos em um segundo. O intervalo entre pulsos pode ser muito baixo, menos de um impulso por segundo, ou muito alto, contendo mais de 100 impulsos por segundo. Nesse último caso, os pulsos acontecem em intervalos tão curtos, que a emissão aparenta ser contínua e recebe a denominação de pseudocontínua (CATORZE, 2009).

3.2.1 Propriedades da luz laser

Para compreendermos propriedades específicas da luz laser, alguns conceitos de física quântica precisam ser levantados, mesmo que superficialmente. Entre eles, é relevante entender a estrutura atômica, e posteriormente, como ela pode gerar e propagar a luz.

O átomo é a unidade básica da matéria, de característica indivisível, constituído por um núcleo central de carga elétrica positiva. É envolto por uma “nuvem” de elétrons de carga negativa, que giram em volta do núcleo em trajetórias circulares bem definidas, organizados em órbitas (Figura 1 A). Em cada uma das órbitas os elétrons possuem níveis diferentes de energia, quanto mais distantes do núcleo, maior o nível energético e mais excitado é o estado do elétron. Durante a movimentação em uma mesma órbita, não há consumo ou emissão de energia pelos elétrons. No entanto, ao transitarem entre órbitas, acontece absorção ou emissão de energia, e essa energia é denominada como fóton (luz). Ao migrar para um nível energético mais alto, ou seja, para as órbitas mais distantes do núcleo, o elétron absorve um fóton, e utiliza de sua energia para realizar tal movimentação (Figura 1 B). O contrário acontece, quando o elétron migra para níveis energéticos mais baixos. Ao realizar essa trajetória, ocorre a emissão de um fóton (Figura 1 C) (BAGNATO, 2001).

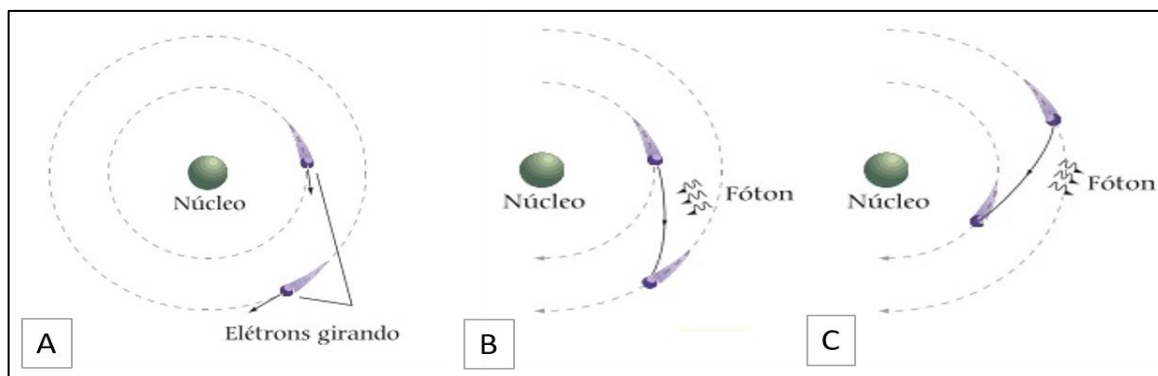


Figura 1 - Modelo atômico proposto pelo físico Niels Bohr. Em (A), esquematização do átomo, demonstrando o núcleo envolto por duas órbitas, com um elétron em cada uma delas, girando em torno do núcleo. Processo de absorção (B) e emissão (C) de fótons pelos elétrons.

Adaptado: Bagnato, 2001

Até o momento, foi descrito o processo espontâneo de emissão de energia através do sistema atômico. Contudo, há outra maneira de emissão de energia, que foi proposta por Albert Einstein no início do século passado, em seu trabalho intitulado “Teoria da Emissão Estimulada de Radiação” (EINSTEIN, 1917). Essa teoria foi a propulsora para a criação do laser algumas décadas mais tarde.

Os elétrons em estado excitado, naturalmente, apresentam uma forte tendência a ir para níveis energéticos mais baixos. No entanto, essa mudança de órbita acontece de forma relativamente demorada, podendo, como descrito por Einstein (1917), ser acelerada pelo atrito com um agente externo e um fóton pode ser esse agente. O efeito desse contato é a migração do elétron para uma órbita mais interna. Com isso, ocorre a emissão estimulada de outro fóton, que emerge lado a lado com o fóton agente da emissão. Desta maneira, esses dois fótons que emergiram desse processo vão movimentar outros átomos com elétrons em seus estados excitados, havendo a emissão estimulada de mais fótons, que se unem aos iniciais. Tanto o fóton agente de atrito, como o fóton emitido como resultado desse contato emergem do sistema com a mesma energia, propagando-se na mesma direção. Para essa característica, diz-se que eles estão em “fase”, sendo praticamente indiferenciáveis (RIBEIRO et al., 2015; SILVA, 2015). Em síntese, a luz do laser provém da emissão resultante da movimentação dos elétrons dos seus níveis energéticos de forma estimulada, produzindo um feixe de luz onde todas os fótons comportam-se identicamente.

Depois de visualizar como ocorre a produção estimulada da radiação, entender o funcionamento e a constituição do laser fica mais fácil. O laser é composto

por três elementos essenciais: o material laser, o estimulador de radiação e a cavidade óptica ou ressonador (SISTER, 2011). O material laser é o meio ativo onde ocorre a emissão estimulada de radiação, ou seja, o meio no qual a luz é gerada. Esse material disponibiliza átomos ou moléculas, das quais os elétrons emitem os fótons, podendo ser de quatro maneiras: (1) líquido, que são a base de soluções de corantes orgânicos dissolvidos em água ou álcool, como por exemplo, os corantes Rodamina 6G, Fluoresceína, Cumarina e Verde Malaquita (DUARTE et al., 1990); (2) gasoso, com um gás como meio ativo, entre os mais usados estão o Dióxido de Carbono (CO_2), Hélio-Neônio (He-Ne) e Argônio (Ar) (BRUGNERA-JÚNIOR; SANTOS & BOLOGNA, 2004); (3) sólido, na qual apresentam um íon ativo incorporado a um vidro, cristal, ou cerâmico, como é o caso do Rubi (YOSHIYASU, 2001); ou (4) um diodo semicondutor, onde a emissão de fótons ocorre pela recombinação de elétrons e orifícios em uma junção positiva-negativa (p-n). Essa composição pode ser do tipo homojunção (junção p-n de um mesmo material) ou heterojunção (junção semicondutora entre dois ou mais materiais distintos), sendo que desse último grupo tem-se como exemplo o laser de Arseneto de Gálio (GaAs), e de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAsAl) (CATUNDA et al., 1998), dentre outros.

O estimulador é uma fonte de energia externa, responsável por gerar os estados excitados nos átomos que compõem o meio ativo. Podem atuar como fontes dessa energia, a corrente elétrica, as ondas de radiofrequência, e a luz de outro laser ou de uma lâmpada. Finalmente, a cavidade óptica é composta por espelhos refletores nas extremidades, que possibilitam a movimentação dos fótons em ambas as direções dentro da cavidade óptica. Essa movimentação causará mais choques entre fótons e elétrons excitados, liberando fótons em progressão logarítmica, estabelecendo uma reação em cadeia com a produção de grande quantidade de energia. Dessa forma, se caracteriza o processo de amplificação luminosa (HECHT, 1986; CATORZE, 2009).

A energia eletromagnética resultante desse processo possui espectros visíveis ao olho humano (luz) e espectros não visíveis. Sua classificação baseia-se de acordo com o comprimento de onda e frequência, que dependem do tipo de material usado como meio ativo. O comprimento de onda é a distância entre os ápices das ondas e a frequência, é o número de ondas ou oscilações por unidade de tempo (CATORZE, 2009). De forma geral, o espectro eletromagnético é formado de radiações ultravioletas, vermelhas, infravermelhas, entre outras. No caso do sistema laser, a luz assume cores que variam de acordo com amplitude ou intensidade

luminosa, e dispõem de diferentes aplicações práticas (ALMEIDA-LOPES et al., 2001) (Figura 2).

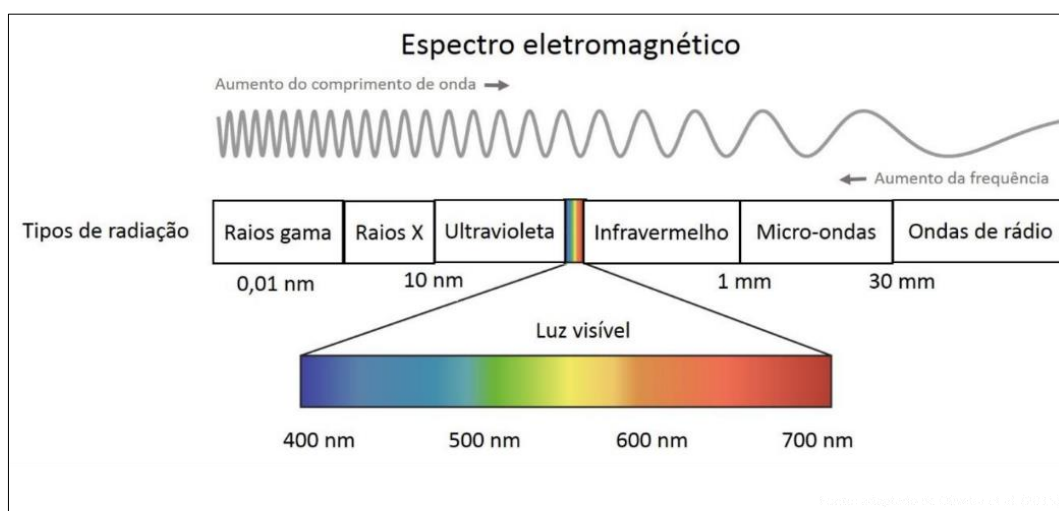


Figura 2 - Esquema representativo do espectro eletromagnético com destaque para a região visível.

Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2015)

A monocromaticidade, coerência e colimação são particularidades que diferenciam a luminosidade laser de outras fontes de luz (NAJEEB et al., 2016). A característica monocromática indica a presença de fótons com comprimento de onda específico, ou seja, todos os fótons em um mesmo comprimento de onda e, conseqüentemente, uma única cor é percebida se a radiação eletromagnética estiver no espectro visível. A emissão de fótons, com movimentação em “fase” no espaço e no tempo de maneira organizada e ordenada, caracteriza a coerência. Finalmente, a colimação refere-se à unidirecionalidade da luz. Indica que ela é paralela ao seu eixo de formação, sendo assim, não divergente, estreita e concentrada (EDUARDO et al., 2015).

3.3 Fibroblastos

Os fibroblastos são células de origem mesenquimatosa, residentes em diversos tecidos, sendo a principal e mais abundante célula do tecido conjuntivo (VARGA & LAFYATIS, 2015). São células capazes de modular seu metabolismo e apresentar diferentes fenótipos, como fenótipo de células não contráteis, de células contráteis, como os miofibroblastos e alguns fenótipos intermediários, como os protomiofibroblastos (McANULTY, 2007).

Com relação as células fibroblásticas não contráteis, elas podem ser encontradas em dois estados, o fibroblasto propriamente dito, que apresenta alta intensidade metabólica, e o fibrócito, uma célula com metabolismo quiescente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). O fibroblasto é a principal célula envolvida na produção de componentes da MEC, entre eles colágenos, fibronectina, tenascina, proteoglicanos e laminina, bem como, na produção de enzimas proteases capazes de degradar a matriz como as metaloproteinases e seus inibidores, assegurando a manutenção homeostática tecidual (McANULTY, 2007; ROSS & PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

A síntese de substâncias colagenosas pelo fibroblasto ocorre a uma taxa excepcionalmente alta e constante. Foi evidenciado que cada fibroblasto pode sintetizar aproximadamente 3,5 milhões de moléculas de pró-colágeno por dia. Contudo, a quantidade secretada é rigorosamente regulada por enzimas lisossômicas, e acredita-se que, a depender das circunstâncias, entre 10 e 90% de todas as moléculas pró-colágenas são degradadas intracelularmente antes mesmo de serem secretadas (MAYS et al., 1991; McANULTY & LAURENT, 2002).

O metabolismo dos fibroblastos é regulado por mecanismos complexos, que abrangem as interações célula-célula e célula-MEC, e também por uma multiplicidade de mediadores, com funções inibitórias ou estimuladoras, que podem estar presentes no local. Estes mediadores podem ser derivados de outras células, dos próprios fibroblastos, da circulação, ou ainda, decorrentes de infiltração de células inflamatórias (McANULTY & LAURENT, 2002; McANULTY, 2007).

Sobre suas características morfológicas, podemos destacar um citoesqueleto fusiforme ou estrelado, com longos prolongamentos, com núcleo oval e plano, complexo de golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, atuando na síntese e secreção de moléculas componentes da MEC e nucléolos pouco proeminentes (Figura 3) (MURRAY, KNIGHT & LAURENT, 2009; ROSS & PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

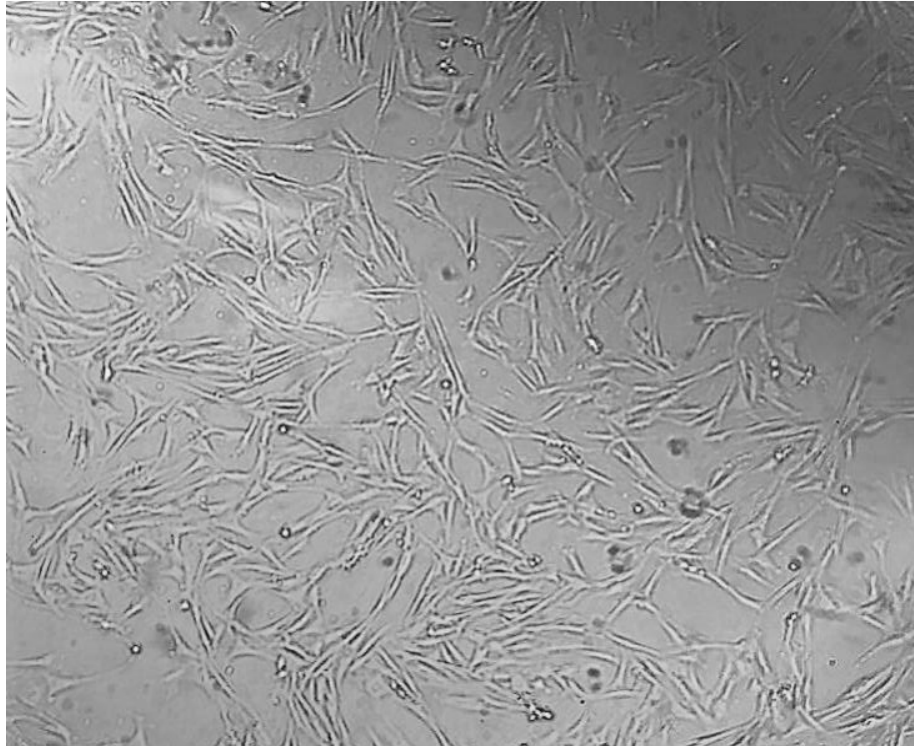


Figura 3 - Fotomicroscopia de cultivo de fibroblasto equino, adquirida por meio de microscópio invertido, em aumento de 100x.

Por outro lado, os fibrócitos são células não contráteis que apresentam seu metabolismo diminuído. São células menores, com formato ovoide ou fusiforme sem prolongamentos, núcleo pequeno e mais escuro. Nessas células, as organelas estão menos desenvolvidas e há redução significativa de síntese proteica (ROSS & PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). No entanto, responsiva a estímulos, pode modificar seu metabolismo retornando as altas taxas metabólicas e/ou modificando-se em fenótipos contráteis, o que marca outra importante característica dessas células, a capacidade de transdiferenciação (CHAMBERS et al., 2003; McANULTY, 2007).

Além das funções de síntese, secreção e regulação da MEC, essas células executam outros papéis essenciais como conferir resistência mecânica aos tecidos; estabelecer um papel central nos mecanismos envolvidos no reparo tecidual (GATTORNO & MARTINI, 2016); e destaques também são dados a capacidade do fibroblasto servir como uma célula sentinela, com habilidade de liberação de quimiocinas, que iniciam o recrutamento de outros grupos celulares (PRESHAW & TAYLOR, 2011).

Sabe-se que, algumas enfermidades estão relacionadas a desarmonias nas respostas de reparo tecidual e das funções dos fibroblastos, causando desequilíbrios na deposição de proteínas da MEC e alterações na arquitetura tecidual, que podem

promover alterações na função do tecido e em casos mais severos, a morte tecidual (BARNES et al., 2009; MURAOKA & IEDA, 2014). Em 2007, em uma importante revisão de literatura para o tema, Mcanulty, levantava a problemática da escassez de terapias específicas que tivessem como alvo patologias associadas a fibroblastos, mas já observava o crescente interesse de pesquisas relacionada a compreensão dos mecanismos patológicos que envolvem essas células e a expectativa em agentes que poderiam melhorar o tratamento de doenças relacionadas a esses desequilíbrios.

Ainda hoje os estudos não foram suficientes para desvendar todos esses mecanismos, mas há resultados promissores envolvendo, por exemplo, os fibroblastos e o câncer, a prevenção e o tratamento de fibroses em diversos órgãos (MURAOKA & IEDA, 2014; TAMPE & ZEISBERG, 2014; GOURDIE; DIMMELER & KOHL, 2016; KALLURI, 2016; PIEK, BOER & SILLJÉ, 2016; TRAVERS et al., 2016).

3.4 Principais efeitos da fotobiomodulação em culturas celulares

De acordo com a primeira lei da fotoquímica, os fótons advindos da irradiação precisam ser absorvidos por fotorreceptores, para só então, desencadear efeitos nos sistemas (SUTHERLAND, 2002). Essas moléculas fotorreceptoras ou também conhecidas como cromóforos celulares, como dito, são moléculas básicas para promoção da fotobiomodulação e absorvem a luz por bandas de absorção eletrônica compatíveis com determinados espectros luminosos, de maneira específica. Os efeitos desencadeados após a absorção podem ser classificados em primários, secundários e terciários (ARTES-RIBAS et al., 2013).

As respostas primárias referem-se ao contato e absorção dos fótons pelos fotorreceptores. Diferentemente dos demais efeitos, que podem ocorrer horas ou dias após a irradiação, nos efeitos primários os processos ocorrem na presença da luz e desencadeiam alterações na função e na configuração molecular do receptor, como consequência de eventos fotoquímicos e fotofísicos, bem como alterações metabólicas (MANTEIFEL, BAKEEVA, & KARU, 1997; CHUNG et al., 2012). Os efeitos secundários compreendem as reações celulares, como por exemplo, ativação de vias de sinalização, alterações na permeabilidade de membrana mitocondrial (KOKKINOPOULOS et al., 2013; FERRARESI et al., 2016) e/ou em funções enzimáticas (HU et al., 2011; VIEIRA et al., 2018). Por fim, as respostas terciárias são sistêmicas, como vasodilatação, redução do edema, analgesia, proliferação celular,

redução de processos inflamatórios e menor tempo de reparação tecidual (ARTES-RIBAS et al., 2013; PASSARELLA & KARU, 2014).

Até o momento, a teia que envolve os mecanismos de ação da fotobiomodulação sobre as células e tecidos, não foi totalmente desenhada. Mas, uma etapa importante na compreensão desses fenômenos veio da constatação de que a luz vermelha e a infravermelha próxima de baixa intensidade de potência, atua nas células por meio de um fotorreceptor primário, a enzima Citocromo C Oxidase (CCO) (KARU 1999; KARU, PYATIBRAT & KALENDU 2003, 2004; EELLS et al., 2004; KARU, PYATIBRAT & AFANASYEVA, 2005; LIANG et al., 2006). A CCO, membro terminal da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, é a organela fotorreceptora que medeia muitos, se não todos, os efeitos benéficos dessa terapia, como levantado pelas revisões de Poyton e Ball (2011) e Farivar, Malekshahabi e Shiari (2014).

Alterações na proliferação, adesão celular, viabilidade, bem como o incremento na taxa de síntese de RNA e DNA são as respostas celulares estudadas de forma mais sistemática em culturas celulares submetidas à fotobiomodulação, em diversos comprimentos de onda, intensidades e doses, como já levantado em importantes revisões (FARIVAR, MALEKSHAHABI & SHIARI 2014; KARU, 2014; KARU, 2015; FREITAS & HAMBLIN, 2016).

O incremento na proliferação celular é um efeito fisiológico muito importante para fotobiomodulação, que tem sido bastante empregada na prática clínica com esse objetivo. Esse fenômeno tem sido demonstrado em muitos tipos celulares, por meio de experimentações *in vitro*, incluindo osteoblastos (STEIN et al., 2005; RENNO et al., 2007; ALEKSIC et al., 2010), células-tronco cardíacas (TUBY, MALTZ & ORON, 2007), células endoteliais (SCHINDL et al., 2003; FENG, ZHANG & XING, 2012), células-tronco mesenquimais (BARBOZA et al., 2014; BORZABADI-FARAHANI, 2016), células de Schwann (VAN BREUGEL & BAR, 1993; YAZDANI et al., 2012) e fibroblastos (CHEN et al., 2011; BELLETTI et al., 2015; NADERI et al., 2017).

O acréscimo na produção de ATP também é considerado um dos achados mais corriqueiros e significativos após a fotobiomodulação (FARIVAR, MALEKSHAHABI & SHIARI, 2014). Ao ser ativada pelos fótons, a CCO tem sua atividade aumentada, estimulando a produção de ATP (HOURELD et al., 2012; FERRARESI et al., 2015). Alguns pesquisadores acreditam que os efeitos vão um pouco além, sugerindo que os fótons irradiados disponibilizem mais elétrons para serem reduzidos no centro catalítico, sendo um outro caminho que justifica o

incremento de ATP após a irradiação (BRUNORI et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009; KARU, 2010). Alguns autores referenciaram como resultado da fotobiomodulação o aumento na produção de ATP em alguns tipos celulares, incluindo células-tronco (WANG et al., 2017a, 2017b), linfócitos (BENEDICENTI et al., 2008), neurônios (ORON et al., 2007; YU et al., 2015), mastócitos (WANG et al., 2015), osteossarcoma (TSAI et al., 2015), fibroblastos (CHEN et al., 2011), osteoblastos (KUNIMATSU et al., 2018) e mioblastos (SILVA et al., 2016).

Outro ponto bastante analisado em estudos que investigam os efeitos da fotobiomodulação em culturas celulares é sobre a viabilidade celular. Vários estudos demonstram que os grupos tratados apresentam uma maior viabilidade celular, quando comparados com o grupo não tratado. Efeito este observado, por exemplo, em culturas de: mioblastos (SILVA et al., 2016), de linhagens celulares de câncer oral (SPERANDIO et al., 2013), fibroblastos (ESMAEELINEJAD et al., 2014; NADERI, et al., 2017), células da linhagem Hela (ZHANG, XING & GAO, 2008), melanócitos (ALGHAMDI et al., 2015), células-tronco epidérmicas (LIAO et al., 2014) e de células-tronco de ligamento periodontal (SOARES et al., 2015).

Muitas pesquisas demonstraram alterações no perfil de expressão gênica de diferentes células subsequente a irradiação. A pesquisa de Song e seus colaboradores (2003), com fibroblasto humano, mostrou que a expressão de 111 genes foi afetada após tratamento com luz vermelha. Entre eles, genes envolvidos no processo de proliferação celular, ação antioxidante, síntese e reparo de DNA. Também, utilizando fibroblastos, Houreld, Ayuk e Abrahamse (2014), observaram que 76 genes foram modulados pela irradiação laser, 43 deles, regulados positivamente, incluindo genes envolvidos na produção de fatores de crescimento, síntese de colágeno, adesão celular e na elaboração de moléculas envolvidas na transdução de sinais. Pesquisando os efeitos da fotobiomodulação, tendo macrófagos como modelo experimental, Fernandes et al. (2015), demonstraram que a irradiação laser regulou a expressão de genes capazes de reduzir a produção de fator de necrose tumoral alfa e de prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2.

Na atual pesquisa, optou-se por investigar os efeitos do laser de Arseneto de Gálio e Alumínio, por este, estar entre os mais comumente empregados na prática clínica e em pesquisas, com o objetivo de investigar os efeitos terapêutico da fotobiomodulação em experimentações *in vitro* e *in vivo*, tanto no espectro de luz vermelha visível, compatível com o empregada por nós, como nos comprimentos de

onda situados fora do espectro de luz visível (AGAIBY et al., 2000; ALBERTINI et al., 2004; MIYATA et al., 2006; ALEKSIC et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; DIÓGENES et al., 2011; MARTINS et al., 2011; ALGHAMDI & KUMAR, 2012; FREITAS & HAMBLIN, 2016; FORTUNA et al., 2018). Em complemento, nosso grupo de pesquisa tem uma linha que analisa as respostas *in vivo* desse tipo de laser, em espécies animais como a canina, equina (LIMA et al., 2016; ARAUJO et al., 2017), felina e ovina em parceria com outros setores da Universidade. Pensando nesse conjunto, tem-se como objetivo futuro extrapolar os resultados dessa pesquisa para análises *in vivo*, como já realizado por ABELA et al. (1985); RICEVUTI et al. (1989), SCHWARZ et al. (2003), PEREIRA et al. (2014), ROCHA (2014) e FERNANDES et al. (2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com o apoio do Laboratório Multiusuário do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás, e no Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular (LAGENE) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

4.1 Grupos experimentais

O delineamento experimental foi disposto de maneira inteiramente casualizado, com cinco grupos e dois momentos de irradiação. O primeiro momento de irradiação ocorreu 24 horas após o plaqueamento das células em placas de cultivo celular; e o segundo momento de irradiação, aconteceu 48 horas após o plaqueamento das células. As posteriores análises para obtenção de resultados aconteceram com o objetivo de avaliar as respostas das células 24 horas após uma e duas irradiações com laser.

Abaixo estão descritos os cinco grupos experimentais:

1. Grupo Controle (GC) - composto por: (1) GC 24 horas, removido da placa de cultivo 24 horas após o plaqueamento das células; (2) GC 48 horas, removido da placa em conjunto com os grupos que receberam uma irradiação de laser e (3) GC 72 horas, removido da placa em conjunto com os demais grupos que receberam duas irradiações de laser.
2. Grupo Laser 0,5 J/cm²: as células receberam densidade de energia de 0,5 J/cm², nos dois momentos, com tempo de 32 segundos cada aplicação.
3. Grupo Laser 2 J/cm²: as células receberam densidade de energia de 2 J/cm², nos dois momentos, com tempo de 127 segundos cada aplicação.
4. Grupo Laser 5 J/cm²: as células receberam densidade de energia de 5 J/cm², nos dois momentos, com tempo de 317 segundos cada aplicação.
5. Grupo Laser 10 J/cm²: as células receberam densidade de energia de 10 J/cm², nos dois momentos, com tempo de 633 segundos cada aplicação.

4.2 Cultivo celular

Foram utilizados fibroblastos em cultivo primário extraídas do tecido cutâneo de cavalos (*Equus caballus*), com aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal, certificado N° 1141/2015-CEUA/UNESP-Botucatu, fornecidas pelo Prof. Dr. João Ferreira de Lima Neto. As células estavam criopreservadas à -196°C em botijão contendo nitrogênio líquido.

No processo de descongelamento das células, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em banho-maria a 37°C por quatro minutos, sob lenta agitação, favorecendo o descongelamento uniforme da amostra. Em seguida, todos os procedimentos para a realização do cultivo de fibroblastos foram realizados em cabine de segurança biológica, classe 2. Na cabine, o conteúdo de cada ampola descongelada foi transferido para um tubo Falcon estéreo de 15 mililitros (mL), contendo 5 mL de meio completo de cultivo, previamente aquecido em banho-maria a 37°C, constituído de: DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose - SIGMA®), enriquecido com 20% de Soro Fetal Bovino (SBF) (GIBCO™ - Invitrogen Corporation, Grand Island, USA), e 1% de solução de antibiótico e antimicótico (penicilina (10.000 UI/mL)/estreptomicina (10 mg/mL) e anfotericina B (25 µg/mL) - SIGMA®).

Os tubos falcon foram centrifugados por 10 minutos a 1700 rpm, com o propósito de separar as células do restante da solução. O sobrenadante de cada tubo foi descartado e o pellet celular ressuspendido em 2 mL de meio total. Uma alíquota de 30 microlitros (µL) de cada amostra foi separada para detecção da viabilidade celular.

Depois de ressuspendidas, as amostras foram transferidas para garrafas de cultivo celular de 25 cm², identificadas e preparadas com meio completo nas proporções anteriormente mencionadas, compondo 5 mL de meio total por garrafa, e finalmente, incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. Após armazenagem na estufa a primeira manipulação ocorreu após 72 horas, estabelecendo um período de repouso e adaptação das células.

Para a manutenção das culturas, foi priorizado a renovação total do meio de cultura das garrafas a cada 72 horas, observando-se o aspecto do meio e o desenvolvimento das células. Passado o período de adaptação, as culturas eram suplementadas com 10% de SFB, com observações a cada 24 horas. O

acompanhamento da multiplicação celular foi realizado através de microscópio óptico invertido, e ao atingirem 80-95% de confluência era realizada a repicagem, ou sub-cultivo das garrafas (Figura 4), com utilização de solução de Tripsina (Gibco® TrypLE™ Select), aquecida em banho-maria a 37°C para retirada das células aderentes. Em seguida, a solução foi transferida a um tubo falcon de 15 mL, contendo 5 mL meio de cultivo suplementado com 20% de SFB, para inativação da ação da tripsina sobre as células recuperadas. O conteúdo foi centrifugado a 1700 rpm por 10 minutos para obtenção do pellet celular, que foi dividido entre garrafas de 25cm² e incubadas novamente. Este procedimento foi repetido até que se obtivesse o número de células adequado para a realização do estudo, o que ocorreu na quarta passagem de células.

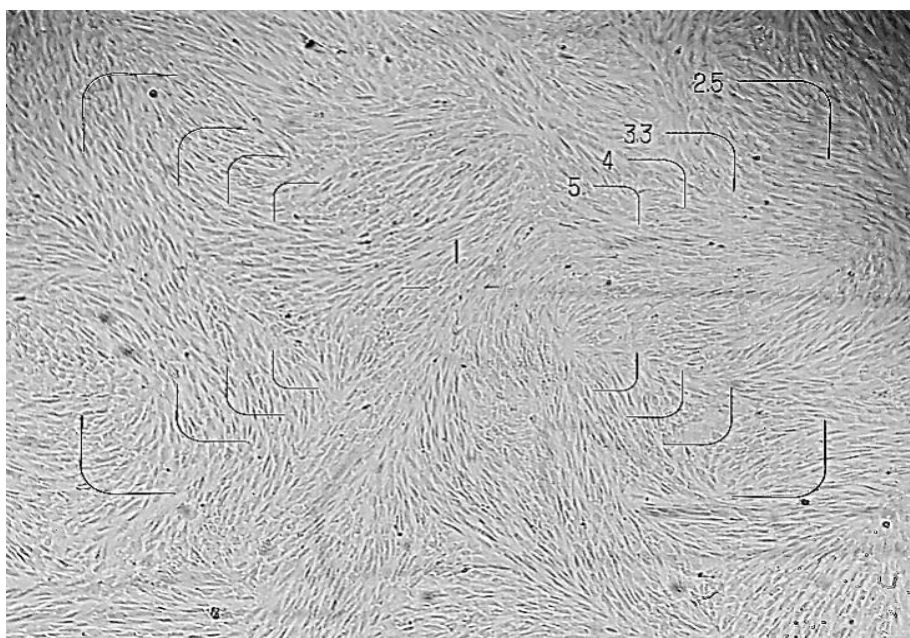


Figura 4 - Fotomicroscopia adquirida por meio de microscópio invertido, em aumento de 40x, demonstrando cultivo de fibroblasto equino, atingido sub-confluência de 95% em garrafa de cultivo celular.

As células em quarta passagem não utilizadas foram congeladas em biofreezer a -80°C, para utilização durante as etapas subsequentes do período experimental. Quando necessário, eram submetidas ao processo de descongelamento, equivalente ao mencionado anteriormente, cultivadas em garrafas de cultivo, para estabilização das células, para posteriormente serem transferidas para placas de 24 poços.

Para a criopreservação das células, os tubos criogênicos eram devidamente identificados com a concentração (em torno de 1×10^6 células), passagem celular e data. O meio de criopreservação era preparado em 1 mL, composto por 50% DMEM,

40% SFB e 10% DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma®). Depois de adicionar o concentrado celular aos tubos contendo o meio preparado, submeteu-se as células a um processo de redução gradual de temperatura. Para tanto, os tubos foram transferidos para geladeira, onde permaneceram por 20 minutos, com temperatura média de 4°C, e então remanejadas para um biofreezer, onde a temperatura se encontrava em torno de -20°C, por 30 minutos. Após esse período, foram transferidos e mantidos em biofreezer a -80 graus.

4.3 Plaqueamento celular e irradiação com laser

Ao atingirem a quarta passagem, as garrafas foram tripsinizadas e submetidas ao teste de quantificação e viabilidade celular. Para o período experimental as células foram depositadas em placas de cultivo de 24 poços, com densidade de 3×10^4 células viáveis por poço. Para receber o concentrado celular, os poços selecionados foram preparados com 1 mL de meio completo (suplementado com 10% de SFB, e 1% de solução de antibiótico e antimicótico). Após o plaqueamento celular as placas eram devidamente identificadas e armazenadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂, onde permaneceram sem manipulação por 24 horas.

Para a irradiação das células com o laser, as placas a serem irradiadas foram organizadas em pares, nomeadas placa A e placa B, cada uma destinada para analisar as respostas em um dos momentos de irradiação (uma ou duas irradiações) a que os grupos foram submetidos. A placa A recebeu irradiação apenas às 24 horas do plaqueamento, e a placa B foi exposta a irradiações às 24 e 48 horas do plaqueamento. Ambas foram cultivadas no mesmo local, sob as mesmas condições experimentais.

As células da placa A que receberam uma irradiação de laser, foram coletadas 24 horas após a irradiação, sendo assim, às 48 horas após o plaqueamento celular. Já as células da placa B que receberam duas irradiações de laser, foram coletadas 24 horas após a última irradiação, às 72 horas do plaqueamento celular. A disposição dos poços que foram utilizados nas placas pode ser observada na figura 5.

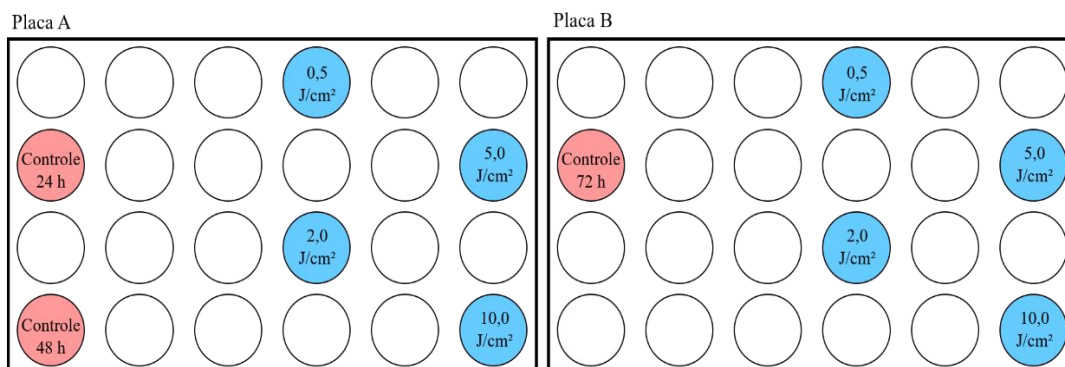


Figura 5 - Esquema representativo das placas de 24 poços, mostrando os poços plaqueados com fibroblasto equino. Os poços em rosa, representam os grupos controle (não irradiados) e os poços em azul, são os grupos de irradiações. A placa A, recebeu uma irradiação, ao passo que a placa B, recebeu duas irradiações.

Para a irradiação laser foi utilizado o modelo Physiolux Dual, fabricado com diodo semiconductor de Arseneto de Gálio e Alumínio (AlGaAl), da marca Bioset – Tecnologia em Bio-equipamentos (São Paulo), previamente calibrado pelo fabricante. Os parâmetros do laser utilizados estão na tabela abaixo:

Tabela 1 - Parâmetros de irradiação do Aparelho Laser (AlGaAl) utilizando para as irradiações durante a fase experimental

Parâmetro	Descrição
Potência	30 mW
Comprimento de onda	670 nm
Modo de emissão da luz	Contínuo
Diâmetro do Feixe de luz	0,5 cm²

As densidades de energia estabelecidas para irradiação foram de 0,5; 2; 5 e 10 J/cm². As irradiações nas diferentes placas foram feitas sempre na mesma ordem, variando apenas o tempo de exposição à luz. O tempo de duração da irradiação de cada grupo variou de acordo com a densidade de energia e foi calculado utilizando a fórmula:

$$\Delta \text{ Tempo (s)} = \frac{\text{Dose (J)} \times \text{Área cm}^2}{\text{Potência mW}}$$

Para proporcionar uma irradiação sem interferência de iluminação externa, foi confeccionada uma caixa de borracha não tóxica (E.V.A - Etil Vinil Acetato) de cor preta, que foi colocada sobre a placa de cultivo no momento da irradiação. Do mesmo material, foi elaborado um apoio de tamanho igual ao da placa de cultivo, que foi colocado embaixo da placa no momento da irradiação. Para cada grupo foi produzido um apoio, e em cada um deles havia apenas um orifício, que se encaixava no poço que seria irradiado naquele momento, fazendo com que a passagem da luz penetrasse na placa apenas por aquele orifício, reduzindo a refração da luz para os demais poços (Figura 6).

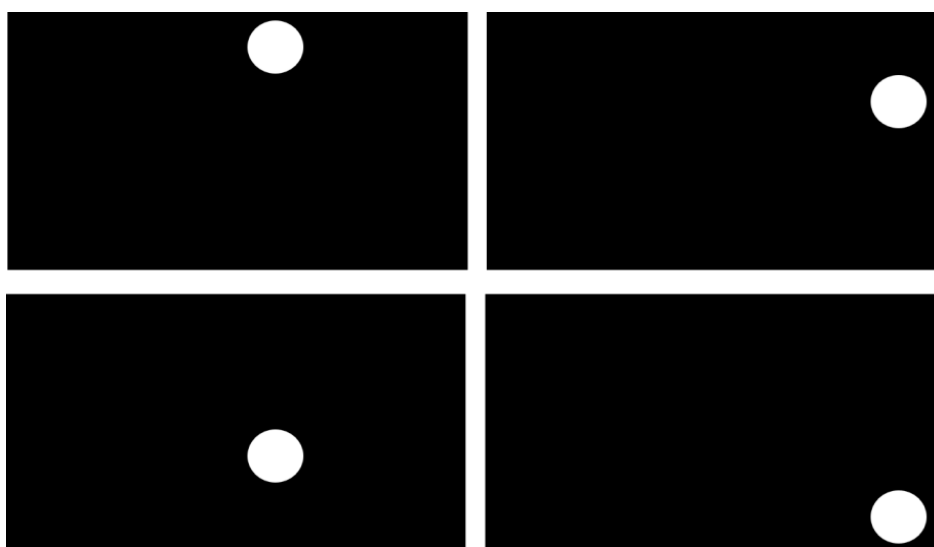


Figura 6 - Apoios feitos em E.V.A, de igual tamanho ao das placas de 24 poços. Cada um deles é específico para irradiação de um determinado grupo experimental.

Para as irradiações foi montado um sistema onde a ponteira do laser e a placa, estivessem fixos. A ponteira foi fixada a uma haste de ferro de 20 cm de altura, presa com uma abraçadeira ajustável. Foi confeccionado um suporte de acrílico de 25 cm de altura e 20 cm de largura, para abrigar a ponteira, e para apoiar as placas de cultivo, contendo um orifício central de $1,9 \text{ cm}^2$ (correspondente ao diâmetro dos poços das placas), onde se encaixava, a ponteira do laser. Os poços receberam irradiação de baixo para cima, fazendo com que a luz fosse aplicada o mais próximo possível da monocamada celular, sem a necessidade de transpor o meio de cultura e sem a necessidade de abertura das tampas das placas, reduzindo assim, os riscos de contaminação da cultura, como adotado em estudos anteriores (MARQUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006; EDUARDO et al., 2008; VOLPATO et al., 2011; MARQUES, 2016; MARQUES, 2017) (Figura 7).

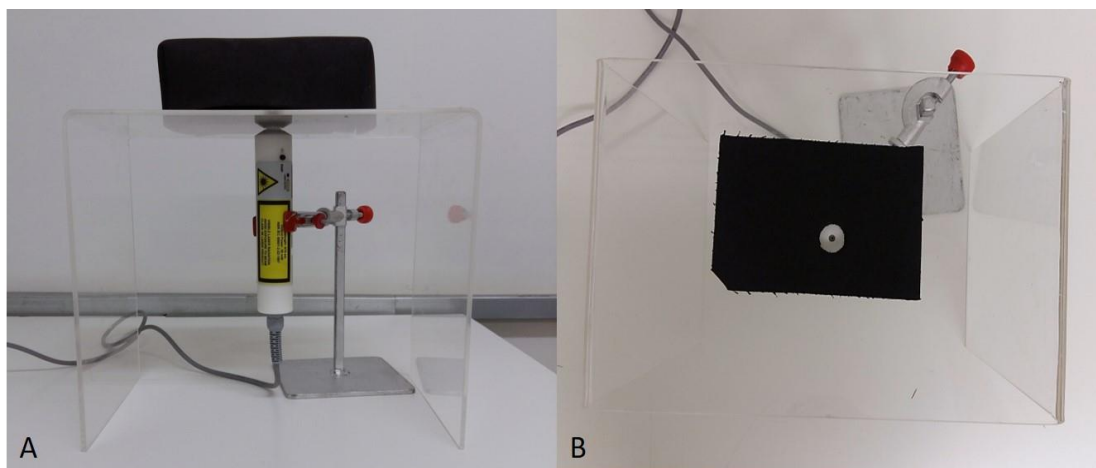


Figura 7 - Sistema montado para irradiação das placas; (A) visão frontal, observa-se a ponteira do laser fixada pela haste de ferro posicionada abaixo do suporte de acrílico, formando um ângulo de 90° em relação a placa, e a caixa de E.V.A posicionada sobre a placa; (B) visão superior, nota-se o eixo de saída da luz laser na extremidade da ponteira, através do orifício presente no suporte de acrílico e no apoio de E.V.A.

A ponteira do laser foi posicionada formando um ângulo de 90° em relação as placas. Com a disposição do laser na parte inferior das placas, a irradiação se dava diretamente na monocamada celular, em um ponto único, localizado na porção central do poço. A distância da ponteira para a placa era de 1 cm.

O aparelho laser foi mantido fora da cabine, mas a ponteira e o sistema de suporte foram previamente limpos com álcool 70%, submetidos à esterilização com radiação ultravioleta (UV) e posicionados no interior da cabine. Durante a irradiação as placas pares (A e B) foram colocadas ao mesmo tempo no fluxo, e permaneceram durante o tempo de irradiação das duas. Assim sendo, as duas placas, foram submetidas às mesmas condições de estresse.

4.4 Quantificação e viabilidade celular subjetiva

Após as etapas de tripsinização das células, ressuspensão e homogeneização adequada das amostras, ainda na cabine, uma alíquota de 30 uL era separada em um microtubo de 200 uL, para determinação da concentração celular. Para obtenção da concentração celular das amostras, foi realizada contagem direta das células em Câmara de Neubauer. Nesse método, conta-se diretamente a quantidade células presentes em determinada amostra.

Fora da cabine de segurança biológica, era acrescido aos 30 uL de concentrado celular a mesma quantidade de marcador Azul de Tripán (1:1) (Sigma Aldrich®). As células viáveis são impermeáveis a esse marcador, enquanto que as células não viáveis apresentam permeabilidade a ele, e exibem coloração azul após tratamento.

Com o objetivo de quantificar e averiguar a de forma subjetiva a viabilidade das células, após adição do marcador, a amostra foi homogeneizada, e a Câmara de Neubauer preparada com uma porção da amostra para leitura por meio de microscópio biológico binocular com aumento de 40x, sendo contadas as células presentes nos quatro quadrantes maiores das extremidades da câmara.

Nessa metodologia foram estipuladas a preparação de duas câmaras com a contagem das duas malhas de cada uma, totalizando 16 quadrantes de contagem. A concentração celular foi estabelecida conforme a fórmula:

$$N^{\circ} \text{ cel/ml} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células contabilizadas}}{\text{Quadrantes analisados}} \times 2 \times 10.000$$

Para o cálculo da viabilidade celular, foram utilizados: o número total de células viáveis, dividido pela somatória entre o total de células viáveis e a totalidade de células coradas pelo Azul de Tripán. O produto dessa divisão foi multiplicado por 100, fornecendo a viabilidade celular da amostra em percentagem, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis}}{(\text{n}^{\circ} \text{ células viáveis} + \text{n}^{\circ} \text{ células coradas})} \times 100$$

4.5 Índice de mutagenicidade pelo Teste de Micronúcleo

Para a realização do teste de micronúcleo *in vitro*, seguiu as recomendações de Cruz et al., (1994), com algumas adaptações.

Na placa de cultivo de 24 poços foi adicionado 30 µL de Ct-B (300Mg/mL), 24 horas antes da tripsinização das células. Imediatamente após o processo de

tripsinização dos poços de cultura, as células foram transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL, centrifugadas por 15 minutos a 1000 rpm e ressuspensas em 500 µL de meio de cultura puro. Uma alíquota de 30 µL de cada amostra foi separada para análise de viabilidade celular.

Em 400 µL do concentrado celular foram acrescentados 3,5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCL 0,075M) e após 45 segundos, foram adicionados 3 mL de Solução de Carnoy (3:1 - metanol:ácido acético), um fixador. O material foi homogeneizado e submetido à centrifugação durante 15 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e repetido o procedimento. Após a segunda lavagem o sobrenadante foi novamente desprezado, mantendo o concentrado celular em 500 µL dessa solução.

Depois de fixadas, as células permaneceram sob refrigeração a 4°C até confecção das lâminas. Para tanto, as lâminas foram previamente limpas com álcool 70% e armazenadas em “berços” porta lâmina, cobertas com água deionizada em refrigeração, com temperatura em torno de 4°C. No momento da confecção das lâminas, posicionou-as em banho-maria a 60°C, homogeneizou-se cuidadosamente a amostra e com a pipeta à aproximadamente 40 cm de altura, gotejou-se 3 gotas da amostra sobre a lâmina, de forma que as gotas recaíssem sobre as duas extremidades e o centro da lâmina. Depois do gotejamento, as lâminas foram identificadas, secas e coradas com o Kit Panótico rápido. As lâminas foram exploradas em microscópio óptico com aumento de 100 vezes e analisadas 1.000 células binucleadas por amostra experimental.

Seguindo os critérios recomendados por Salvadori (2003) selecionou-se células binucleadas com delimitações nucleares e citoplasmáticas intactas, que não estivessem sobrepostas. De acordo com Cruz et al. (1994), alguns critérios devem ser obedecidos para a classificação correta da frequência de micronúcleos, como o tamanho do micronúcleo, que deve ser inferior a 1/3 do núcleo da célula, não refratário, coloração semelhante à do núcleo e independente do núcleo, ou seja, não deve tocá-lo.

4.6 Avaliação de genotoxicidade pelo Ensaio Cometa

O índice de danos a molécula de DNA dos fibroblastos foi analisado por ensaio cometa alcalino adaptado de Singh et al. (1988).

Após o processo de tripsinização dos poços de cultura, as células foram transferidas para tubos tipo falcon de 15 mL, submetidas a centrifugação por 15 minutos a 1000 rpm e ressuspensas em 500 µL de meio de cultura. Uma alíquota de 30 µL de cada amostra foi separada para análise de viabilidade celular.

Padronizou-se a confecção de três lâminas por amostra, com o objetivo final de analisar individualmente 100 células de cada grupo. Sendo assim, para as análises que seguiram, a solução com as células foi cuidadosamente homogeneizada e transferida para microtubos de 200 µL fracionada em três alíquotas de 20 µL.

Para cada uma das alíquotas foi adicionada 120 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5%, mantida em banho-maria a 38°C. Homogeneizou-se levemente a solução e o concentrado celular, e em sequência, uma alíquota de 120 µL foi disposta sobre a lâmina, formando uma linha por toda a sua extensão. A lâmina havia sido previamente preparada com uma camada fina e homogênea de solução de agarose normal a 1,5%. Posteriormente, uma lamínula foi colocada rapidamente sobre o material, espalhando-o naturalmente por toda a lâmina.

As laminas foram então levadas para geladeira por 5 a 10 minutos, e posteriormente, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas acomodadas em um berço porta lâminas, onde permaneceram submersas em solução de lise, protegidas da luz, para prevenção de danos adicionais a molécula de DNA e submetidas à refrigeração, com temperatura média de 4°C durante 24 horas.

Para a próxima etapa, chamada de corrida de eletroforese, a cuba de eletroforese foi previamente preparada em um banho de gelo, de forma que todo o fundo e as laterais estivesse em contado com o gelo. As lâminas retiradas da solução de lise, foram posicionadas na cuba sempre com o lado fosco da identificação voltado para o sentido do Catodo (positivo), em seguida despejou-se cuidadosamente o tampão de eletroforese gelado, na cuba, até cobrir as lâminas. As lâminas permaneceram por 30 minutos em repouso nessa solução e posteriormente ligou-se a cuba de eletroforese ajustada com voltagem de 25 V e amperagem de 300 mA, por 30 minutos para a “corrida”.

Após essa “corrida”, as lâminas foram submetidas a tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM de NaOH e 1mM de EDTA), mantidas em repouso durante 15 minutos. Depois, lavou-se cuidadosamente as lâminas com água destilada,

e as posicionou de forma inclinada para favorecer a secagem. Depois de secas, as lâminas foram colocadas em recipientes contendo álcool absoluto, por 10 minutos, finalizando a fixação.

O processo de coloração ocorreu com solução de Brometo de Etídio a 2%. Após a coloração, as lâminas foram submetidas à análise dos danos na molécula de DNA utilizando o software Zen 2012®, com o auxílio do microscópio Zeiss Axio Scope A1. Priorizou-se que em cada lâmina, seriam selecionadas para as análises células em uma faixa de espaço presente nas duas extremidades e o centro da lâmina. Posteriormente, as imagens foram analisadas utilizando o “software” Comet Score TM (Tritek Corporation). O programa fornece a possibilidade de analisar 16 parâmetros relativos a danificações do DNA por célula, e neste trabalho os parâmetros selecionados para investigar a genotoxicidade do laser foram: comprimento do cometa, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive (Figura 8).

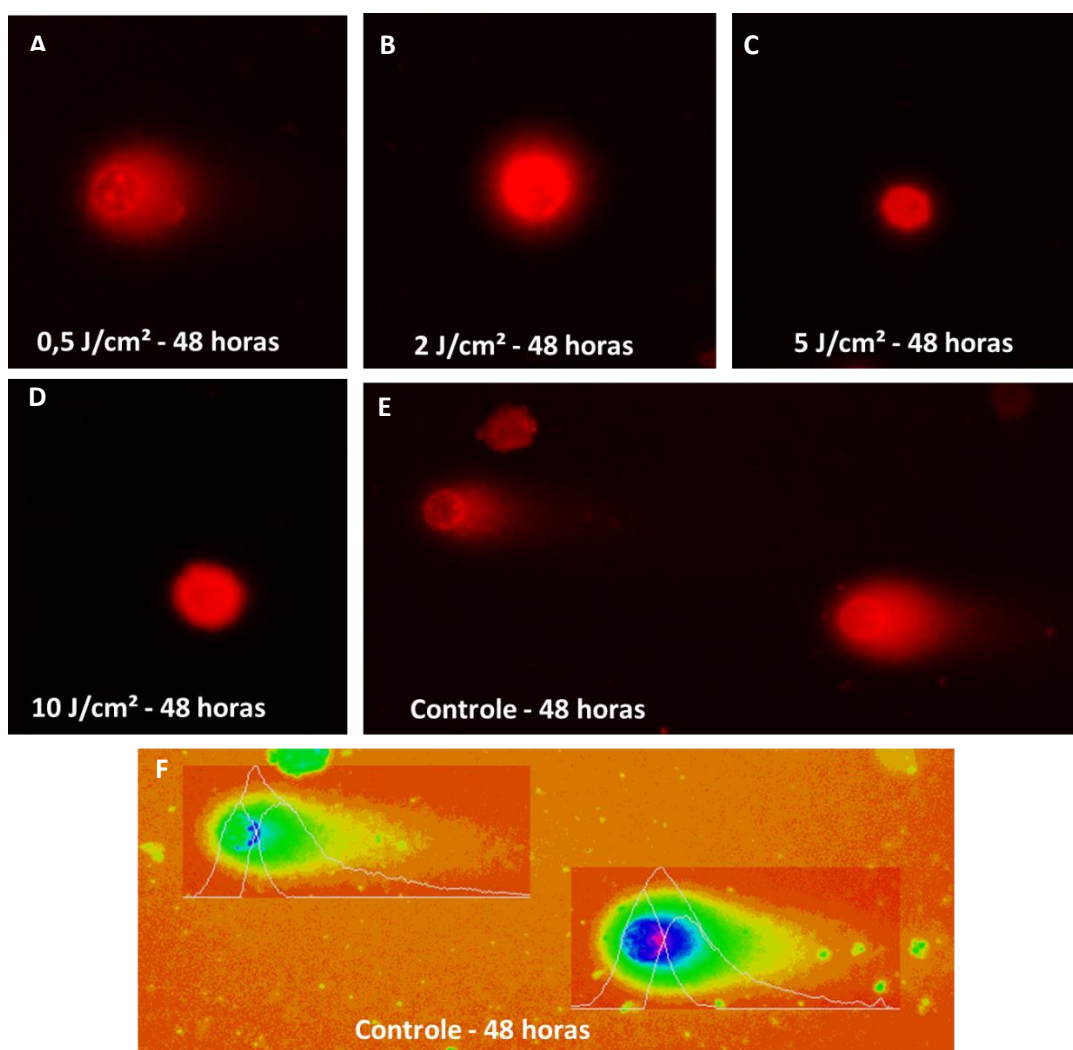


Figura 8 - Imagens analisadas durante o Ensaio Cometa capturadas com auxílio do microscópio Zeiss Axio Scope A1, pelo software Zen 2012® (A, B, C, D, E); em F, imagem de nucleóides analisados utilizando o “software” Comet Score™.

4.7 Análise estatística

As análises foram feitas em amostras de células cultivadas em placas de 24 poços, organizadas em tréplicas, irradiadas com diferentes intensidades de energia e coletadas para o processamento das análises em 24, 48 ou 72 horas do momento do plaqueamento. Os dados para as análises de quantificação, viabilidade celular e ensaio cometa estão apresentados por médias $\pm$ erros padrões da média comparados por ANOVA seguida do teste de Tukey quando necessário, o teste de micronúcleo, os resultados das frequências foram comparados pelo teste Qui-quadrado, ambos a 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados de viabilidade celular por exclusão com o corante Azul de Tripan

Pode-se observar uma redução não significativa no percentual de viabilidade de 1,98% do controle 24 horas para o controle 48 horas, e uma melhora significativa de 3,63% do controle 72 horas em relação ao controle 48 horas ($p=0,004$). Ao analisar os grupos que receberam uma irradiação, observou-se que houve acréscimo do percentual em todos os grupos tratados, com destaque para a relevância estatística presente nos grupos 0,5 e 2 J/cm², que apesar da semelhança com os demais grupos irradiados, diferiram do controle 48 horas em 3,52 e 3,41%, respectivamente ($p<0,05$). Nesse momento de observação, entre os grupos de irradiação, a melhor taxa de viabilidade ocorreu no grupo 0,5 J/cm², correspondente a 96,90%, enquanto o grupo 5 J/cm² apresentou a média mais baixa, igual a 95,40%. Por outro lado, por meio da análise de variância não houveram evidências que rejeitassem a hipótese de nulidade para os cinco grupos experimentais investigados após duas irradiações ($p>0,05$), não existindo diferença estatística entre eles. Nesse bloco, o grupo 10 J/cm² apresentou o melhor desempenho (97,50%) e o grupo 2 J/cm² deteve a menor viabilidade (96,00%).

A Tabela 2 demonstra as médias correspondentes à viabilidade celular de todos os grupos experimentais, isoladamente nos três momentos de observação dos resultados.

Tabela 2 - Média $\pm$ EPM da viabilidade celular subjetiva dos grupos experimentais, comparados por ANOVA ($p\leq 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	95,50 $\pm$ 0,94 ^{ab}	93,60 $\pm$ 1,15 ^{Ba}	97,00 $\pm$ 0,56 ^b	0,004
0,5 J/cm ²	95,50 $\pm$ 0,94	96,90 $\pm$ 0,23 ^A	97,10 $\pm$ 0,27	>0,05
2 J/cm ²	95,50 $\pm$ 0,94	96,80 $\pm$ 0,71 ^A	96,00 $\pm$ 0,30	>0,05
5 J/cm ²	95,50 $\pm$ 0,94	95,40 $\pm$ 0,18 ^{AB}	97,10 $\pm$ 0,34	>0,05
10 J/cm ²	95,50 $\pm$ 0,94	95,60 $\pm$ 1,03 ^{AB}	97,50 $\pm$ 0,15	>0,05
p	>0,05	<0,05	>0,05	

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística no teste Tukey ($p<0,05$)

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística no teste Tukey ($p<0,05$)

O gráfico 1 mostra a trajetória da viabilidade celular dos grupos experimentais nos três momentos observacionais.

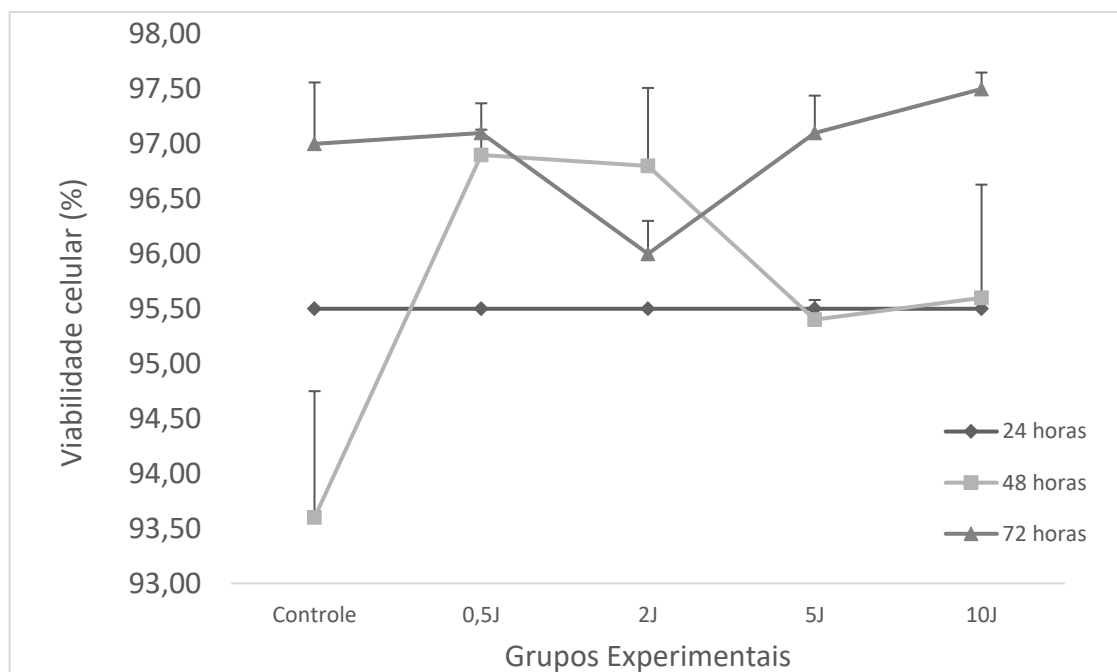


Gráfico 1 – Média da viabilidade celulares obtida pelo método de exclusão pelo corante Azul de Tripán, dos grupos tratados com laser a 670 nm, expostos a 0,5, 2, 5, 10 J/cm² submetidos a uma irradiação e os grupos controles 24, 48 e 72 horas.

5.2 Resultados da quantificação celular pelo método de contagem direta em Câmara de Neubauer

Essa experimentação *in vitro* mostrou que as densidades de energia, as quais as culturas celulares de fibroblasto equino foram expostas por uma vez, não desencadearam diferenças significativas na concentração celular, tanto na comparação entre as densidades, ao compará-las com o controle 48 horas, e tão pouco, no emparelhamento com o controle 24 horas ($p < 0,05$). Por outro lado, todas as culturas expostas a duas irradiações diferiram significativamente do controle 24 horas ($p < 0,001$), havendo ainda, diferenças estatísticas dentro do bloco de irradiação correspondente a elas, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Média $\pm$ EPM das concentrações celulares, comparadas por ANOVA ($p \leq 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	23312,50 $\pm$ 919,47 ^a	45011,33 $\pm$ 2467,98 ^{ab}	69003,18 $\pm$ 897,12 ^{ba}	0,042
0,5 J/cm²	23312,50 $\pm$ 919,47 ^a	48021,33 $\pm$ 4195,88 ^a	124056,54 $\pm$ 20515,27 ^{baB}	<0,001
2 J/cm²	23312,50 $\pm$ 919,47 ^a	46082,67 $\pm$ 1427,38 ^a	94113,27 $\pm$ 7612,81 ^{baB}	<0,001
5 J/cm²	23312,50 $\pm$ 919,47 ^a	38260,67 $\pm$ 1878,75 ^a	115234,27 $\pm$ 14249,90 ^{baB}	<0,001
10 J/cm²	23312,50 $\pm$ 919,47 ^a	37941,67 $\pm$ 5318,04 ^a	96135,27 $\pm$ 5915,32 ^{baB}	<0,001
p	p>0,05	p>0,05	p<0,015	

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Observando as comparações entre os grupos analisados após uma irradiação, notou-se, um declínio numérico na concentração celular dos grupos 5 e 10 J/cm² de 14,99 e 15,70%, respectivamente, em relação com o controle correspondente. Nesse bloco de irradiação, o grupo que apresentou maior concentração celular foi o 0,5 J/cm², com 6,68% mais células que o controle 48 horas (Gráfico 2).

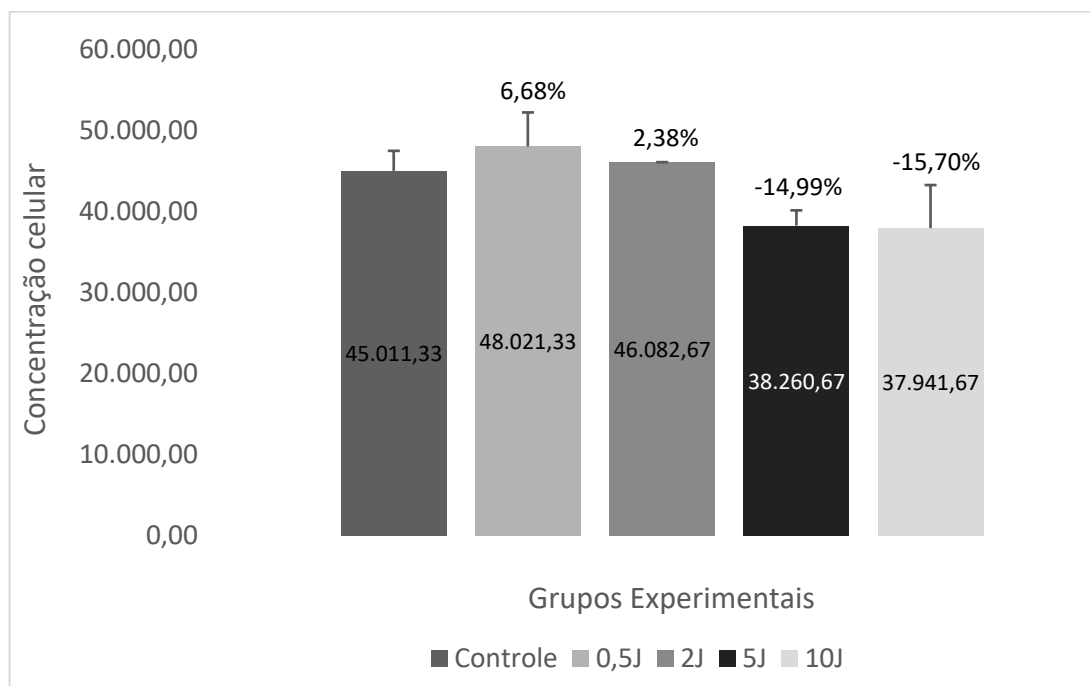


Gráfico 2 - Média das concentrações celulares contabilizadas em Câmara de Neubauer, dos grupos tratados com laser a 670 nm, expostos a 0,5, 2, 5, 10 J/cm² submetidos a uma irradiação e o grupo controles 48 horas, e, o percentual de células em relação ao controle.

Ao explorar os dados dos grupos expostos a duas irradiações, tem-se, que o grupo 0,5 J/cm² manteve-se como o possuinte da maior concentração celular entre os grupos de irradiação, exibindo 79,78% mais células que o controle, seguido do grupo

5 J/cm², com aumento de 66,99%, e ambos apresentaram distinção significativa do controle correspondente a eles ($p < 0,015$). Os grupos 2 e 10 J/cm², também apresentaram incremento numérico do concentrado celular em relação ao controle 72 horas, no entanto, sem relevância estatística, correspondente a 36,38 e 39,32%, respectivamente (Gráfico 3).

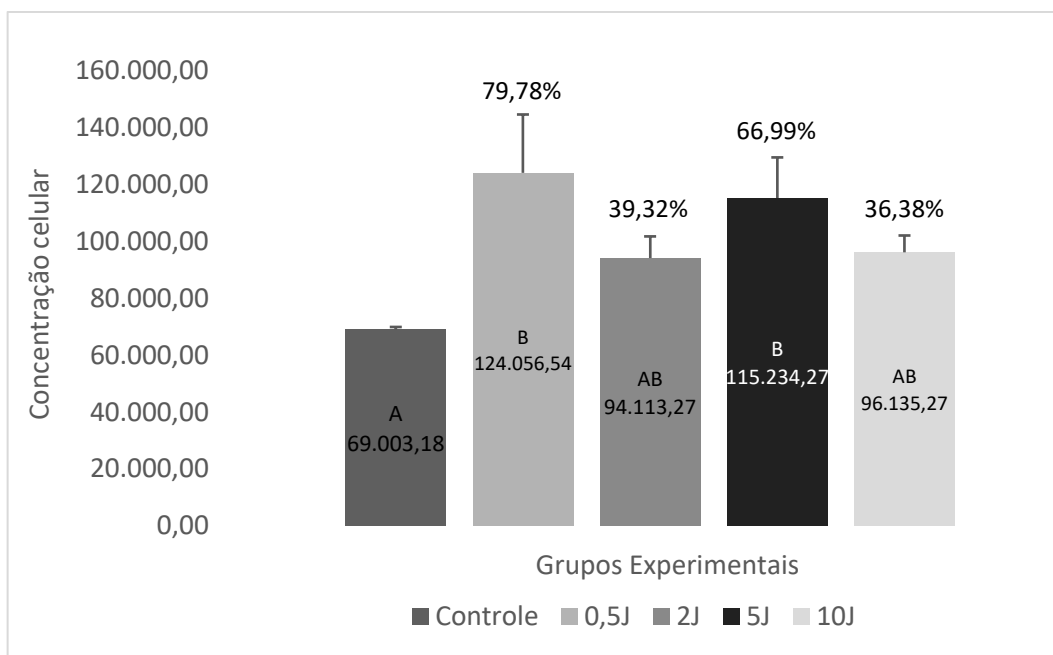


Gráfico 3 - Média das concentrações celulares contabilizadas em Câmara de Neubauer, dos grupos tratados com laser a 670 nm, expostos a 0,5, 2, 5, 10 J/cm² submetidos a duas irradiações e o grupo controle 72 horas, e, o percentual de células em relação ao controle.

Ainda sobre concentração celular, é importante ressaltar que ao comparar-se os blocos de irradiação, temos que, o grupo controle 72 horas apresentou 53,30% mais células que o grupo controle 48 horas. Somado a isso, todos os grupos expostos a duas irradiações apresentaram crescimento igual ou maior que 50,92% em comparação com o controle correspondente, enquanto que no bloco correspondente a uma irradiação, houveram declínios em comparação com o controle, e o aumento não passou de 6,68%. Quando a comparação ocorre entre os blocos de irradiação, no entanto, entre os mesmos grupos, nota-se um aumento significativo, e maior que 100% em todos os grupos expostos a duas irradiações em relação ao mesmo grupo submetido uma vez a luz laser, como demonstrado no Gráfico 4.

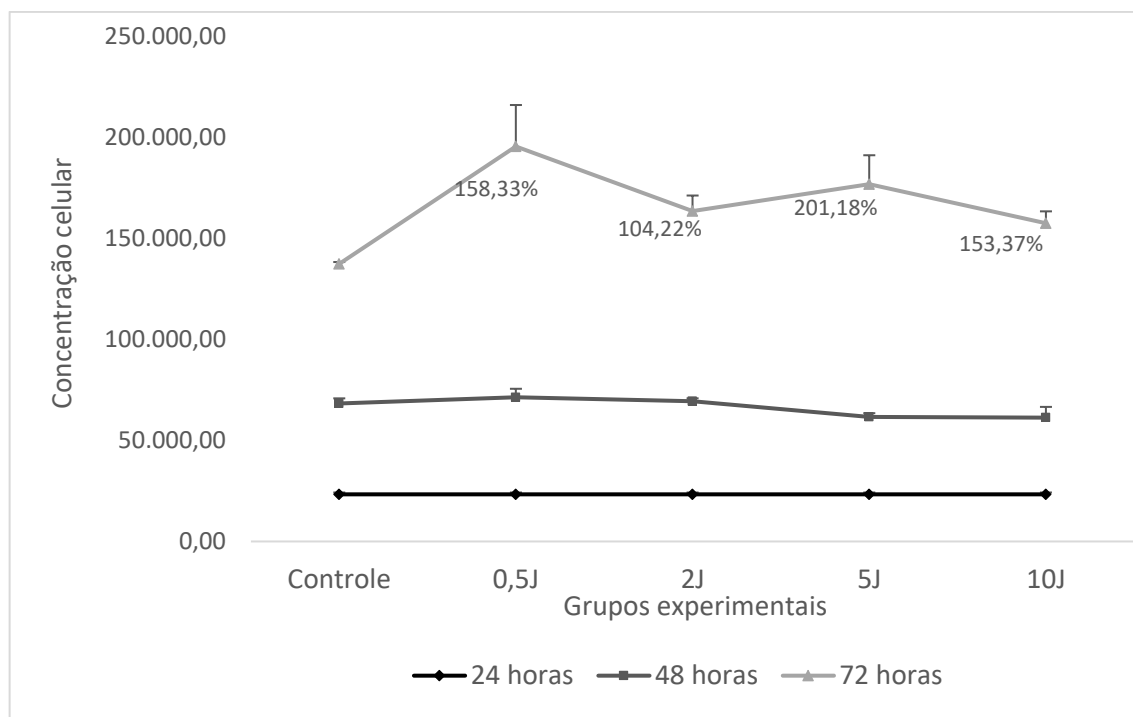


Gráfico 4 – Média e erro padrão da média do controle 24 horas e dos demais grupos experimentais nos dois momentos de irradiação. Em destaque o percentual de crescimento dos grupos expostos a duas irradiações em relação aos grupos expostos a uma irradiação.

5.3 Resultados do índice de mutagenicidade pelo Teste de Micronúcleo

Quanto as investigações acerca do potencial mutagênico da luz laser nos parâmetros selecionados, não houve evidências de que essa terapia induza o aparecimento de micronúcleos em fibroblastos oriundos do tecido cutâneo equino, em nenhum dos grupos experimentais, nos dois momentos de exposição, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência de observação de alterações nucleares em cada 1000 células binucleadas analisadas no teste de micronúcleo comparadas pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	11 ^a	25 ^{Cb}	31 ^{Bb}	<0,01
0,5 J/cm ²	11	16 ^{BC}	11 ^A	>0,05
2 J/cm ²	11	7 ^{AB}	10 ^A	>0,05
5 J/cm ²	11	5 ^A	8 ^A	>0,05
10 J/cm ²	11	14 ^{BC}	9 ^A	>0,05
p	>0,05	<0,01	<0,01	

Letras minúsculas distintas indicam diferenças na mesma linha;

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças na mesma coluna;

As frequências de células binucleadas com micronucleações foram comparadas pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$), e mostrou que as culturas irradiadas uma vez, nas diferentes densidades de energia reduziram a quantidade de micronúcleos, havendo uma redução significativamente estatística nos grupos 2 e 5 J/cm², em comparação com o controle 48 horas. O grupo 5 J/cm² apresentou maior redução, diferiu estatisticamente dos demais grupos nesse momento de observação, e mostrou 80% menos células com a presença de micronúcleo, em comparação com o controle 48 horas ($p < 0,01$). Quanto à comparação entre os grupos analisados após 72 horas do plaqueamento, evidenciou que a redução da frequência de micronúcleos se deu de maneira significativa em todos os grupos de irradiação, em relação ao controle 72 horas ($p < 0,01$). Destaque, para o grupo 5 J/cm², que nesse momento, apresentou também a menor taxa de presença de micronúcleos, uma redução de 74,19% em relação ao controle correspondente a essa observação (Gráfico 5).

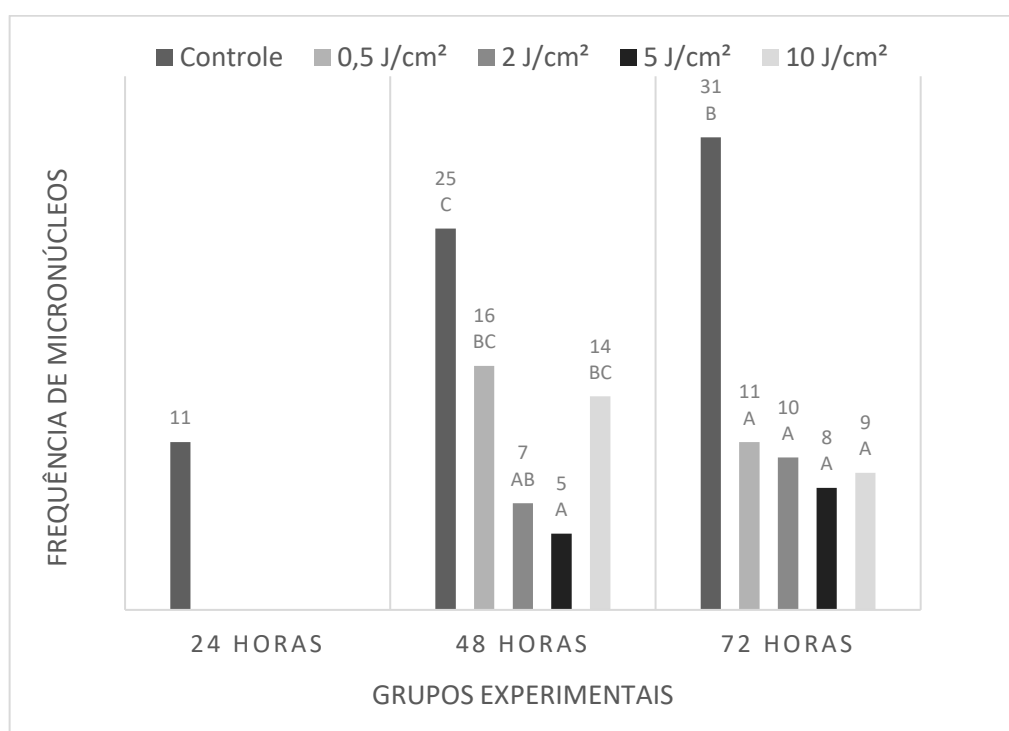


Gráfico 5 - Frequência de micronúcleos pesquisados em 1000 células binucleadas por amostra, de cada grupo experimental, agrupadas por momentos de observação.

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças no mesmo grupamento

Pode-se verificar que, tanto as culturas expostas a uma irradiação, quanto as irradiadas por duas vezes, a medida que a densidade de energia aumenta entre os grupos 0,5; 2 e 5 J/cm² a frequência de micronúcleos reduz em relação ao controle nos dois momentos de estudo, aparentando existir uma relação concentração dependente entre essas duas variáveis. Observa-se ainda, que a frequência foi

elevada na densidade de energia de 10 J/cm² nos dois blocos de irradiação. Finalmente, ao observarmos as comparações entre os controles, observa-se um aumento numérico na frequência de micronúcleos, onde, os controles 48 e 72 horas são iguais estatisticamente e diferem do controle 24 horas (Gráfico 5).

5.4 Avaliação de genotoxicidade pelo Ensaio Cometa

Os resultados dos dados obtidos pelo Ensaio Cometa serão apresentados separadamente, por parâmetros de análise. Na Tabela 5, estão evidenciadas as médias acompanhadas do erro padrão da média, de todos os grupos experimentais, nos diferentes momentos de observação, do parâmetro: comprimento do Cometa.

Tabela 5 - Média $\pm$ EPM, do parâmetro “”, do Ensaio Cometa, comparadas por ANOVA ($p \leq 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	104,82 $\pm$ 3,37 ^b	154,43 $\pm$ 6,45 ^{cB}	81,81 $\pm$ 1,79 ^{aB}	<0,001
0,5 J/cm²	104,82 $\pm$ 3,37 ^b	85,44 $\pm$ 1,14 ^{aA}	81,01 $\pm$ 2,28 ^{aB}	<0,001
2 J/cm²	104,82 $\pm$ 3,37 ^b	89,91 $\pm$ 1,71 ^{aA}	85,01 $\pm$ 1,53 ^{aBC}	<0,001
5 J/cm²	104,82 $\pm$ 3,37 ^c	81,05 $\pm$ 1,64 ^{aA}	88,62 $\pm$ 1,56 ^{bC}	<0,001
10 J/cm²	104,82 $\pm$ 3,37 ^c	89,26 $\pm$ 1,21 ^{bA}	75,08 $\pm$ 0,97 ^{aA}	<0,001
p	>0,05	<0,001	<0,05	

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Na comparação entre as médias do primeiro bloco de irradiação, constata-se que ocorreu uma redução significativa do comprimento do cometa em todos os grupos de irradiação em comparação com o controle 48 horas, sendo mais evidente no grupo 5 J/cm². Por outro lado, no momento de observação correspondente às 72 horas, percebeu-se que os grupos 2 e 5 J/cm² aumentaram significativamente o comprimento do cometa em relação ao controle correspondente, sendo mais evidente no grupo 5 J/cm². Já, de maneira inversa, as médias do grupo 10 J/cm² mostraram redução significativa da variável analisada, com relação ao controle 72 horas e aos demais grupos de irradiação ($p < 0,05$) (Gráfico 6). Ao analisar os dados do controle 24 horas com os demais controles, nota-se que após 48 horas, há um aumento no comprimento do cometa de 47,32%, e, ao atingir 72 horas de plaqueamento a média do grupo reduz 21,95%, ambas significativas ($p < 0,001$).

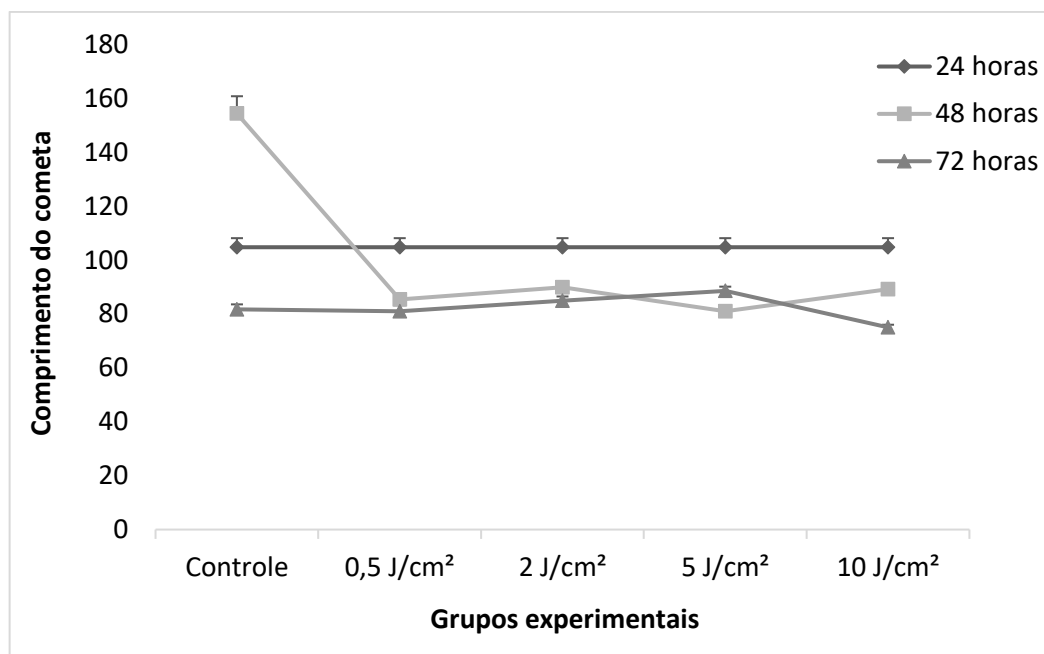


Gráfico 6 - Média e erro padrão do controle 24 horas e dos grupos experimentais nos dois momentos de irradiação, com relação a variável “Comprimento do Cometa” analisada no Ensaio Cometa.

Quando a variável analisada foi “% de DNA na cauda”, percebe-se que na comparação entre os grupos experimentais do primeiro bloco de irradiações, todos os grupos de irradiação mantiveram-se estatisticamente semelhantes e reduziram o percentual em relação ao controle 48 horas de forma significativa ($p < 0,001$). Os grupos 0,5; 2; 5 e 10 J/cm² analisados no momento 72 horas também apresentaram dessemelhança estatística quando comparados com o controle correspondente ($p < 0,019$), como pode ser visto na Tabela 6.

Tabela 6 - Média $\pm$ EPM, da variável “% de DNA na cauda”, do Ensaio Cometa, comparados por ANOVA ($p \leq 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	3,83 $\pm$ 0,44 ^a	25,57 $\pm$ 1,38 ^{Bb}	5,50 $\pm$ 1,79 ^{Ca}	<0,001
0,5 J/cm²	3,83 $\pm$ 0,44	5,10 $\pm$ 0,50 ^{A*}	3,82 $\pm$ 0,37 ^B	0,064*
2 J/cm²	3,83 $\pm$ 0,44 ^{ab}	4,89 $\pm$ 0,39 ^{Ab}	2,84 $\pm$ 0,31 ^{ABa}	<0,001
5 J/cm²	3,83 $\pm$ 0,44 ^b	5,25 $\pm$ 0,35 ^{Ac}	1,75 $\pm$ 0,26 ^{Aa}	<0,014
10 J/cm²	3,83 $\pm$ 0,44 ^{ab}	4,41 $\pm$ 0,30 ^{Ab}	3,01 $\pm$ 0,37 ^{ABa}	0,012
p	>0,05	<0,001	<0,019	

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

*Indica tendência estatística linha ($0,05 < p < 0,10$)

Entre os grupos que permaneceram na placa de cultivo por 72 horas, o grupo 5 J/cm² apresentou a menor média de percentagem de DNA na cauda, entre os grupos de irradiação com média 68,18% menor que a apresentada pelo grupo controle 72 horas ($p < 0,019$). Outro ponto importante a ser observado, é que na comparação entre

os três momentos de observação experimental, os grupos pertencentes a observação 48 horas apresentaram médias estatisticamente maiores que seus grupos correspondentes nos demais momentos de observação, exceto o grupo 0,5 J/cm² que demonstrou apenas uma tendência estatística ($p=0,064$) em relação ao mesmo grupo submetido a duas exposições (Gráfico 7).

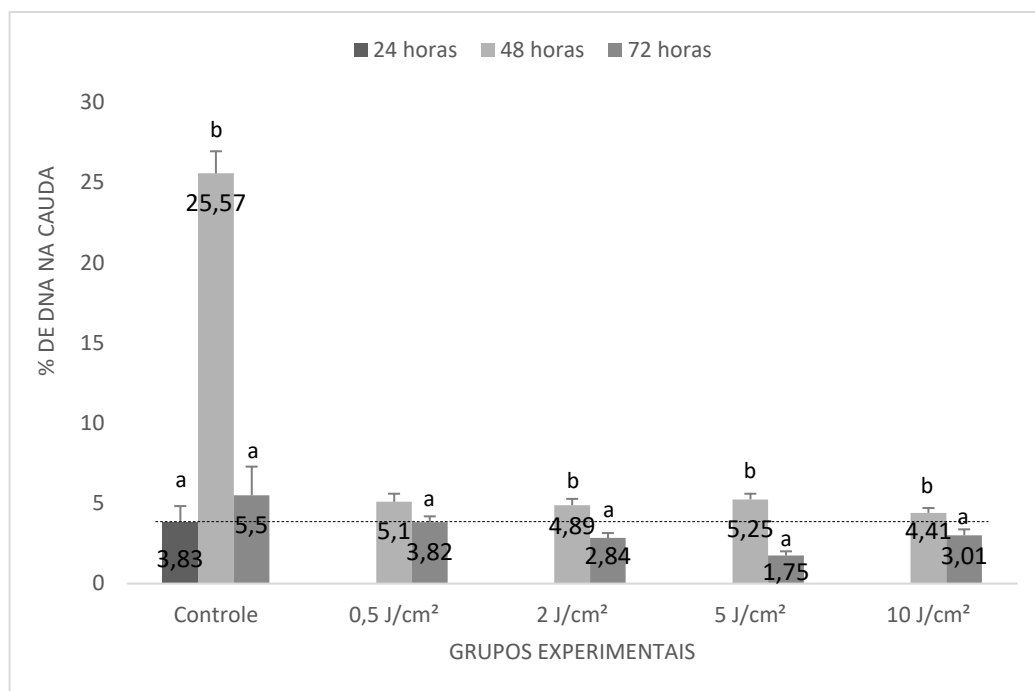


Gráfico 7 - Médias dos resultados obtidos para a variável “% de DNA na cauda”. Os três momentos de observação estão agrupados por grupos experimentais. As letras minúsculas representam a comparação das médias dentro do mesmo grupo experimental. Letras minúsculas distintas no mesmo agrupamento indicam diferença estatística no teste Tukey ($p<0,05$). *Indica tendência estatística linha ($0,05<p<0,10$)

A última variável analisada no Ensaio Cometa foi o “Momento de Olive”, e tem-se que, ao comparar os grupos pertencentes ao momento 48 horas todos os grupos de irradiação diferenciaram-se significativamente do controle ($p<0,001$). Ainda sobre os grupos analisados nesse momento, observa-se que a média do grupo controle foi 12,3 vezes maior que a média do controle 24 horas e 10,6 vezes maior que o controle 72 horas, demonstrando diferença estatística entre eles ($p<0,001$). A menor média entre os grupos de única irradiação ficou por conta do grupo 10 J/cm². Por outro lado, entre as densidades de energia irradiadas duas vezes, apenas as 2, 5 e 10 J/cm² diferiram significativamente do controle correspondente. Nesse momento o grupo de irradiação que deteve a menor média de alteração foi o grupo 5 J/cm², como pode ser visto na Tabela 7 e no Gráfico 8.

Tabela 7 - Média $\pm$ EPM, da variável “momento de Olive”, do Ensaio Cometa comparados por ANOVA ($p \leq 0,05$)

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas	p
Controle	$1,04 \pm 0,15^a$	$12,80 \pm 0,88^{Bb}$	$1,20 \pm 0,11^{Ca}$	$<0,001$
0,5 J/cm²	$1,04 \pm 0,15^{ab}$	$1,48 \pm 0,18^{Ab}$	$0,95 \pm 0,15^{BCa}$	$<0,001$
2 J/cm²	$1,04 \pm 0,15^b$	$1,09 \pm 0,10^{Ab}$	$0,83 \pm 0,10^{Ba}$	0,020
5 J/cm²	$1,04 \pm 0,15^b$	$1,09 \pm 0,16^{Ab}$	$0,39 \pm 0,06^{Aa}$	0,004
10 J/cm²	$1,04 \pm 0,15^b$	$1,02 \pm 0,07^{Ab}$	$0,58 \pm 0,08^{ABa}$	$<0,05$
p	$>0,05$	$<0,001$	$<0,001$	

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística no teste Tukey ($p < 0,05$)

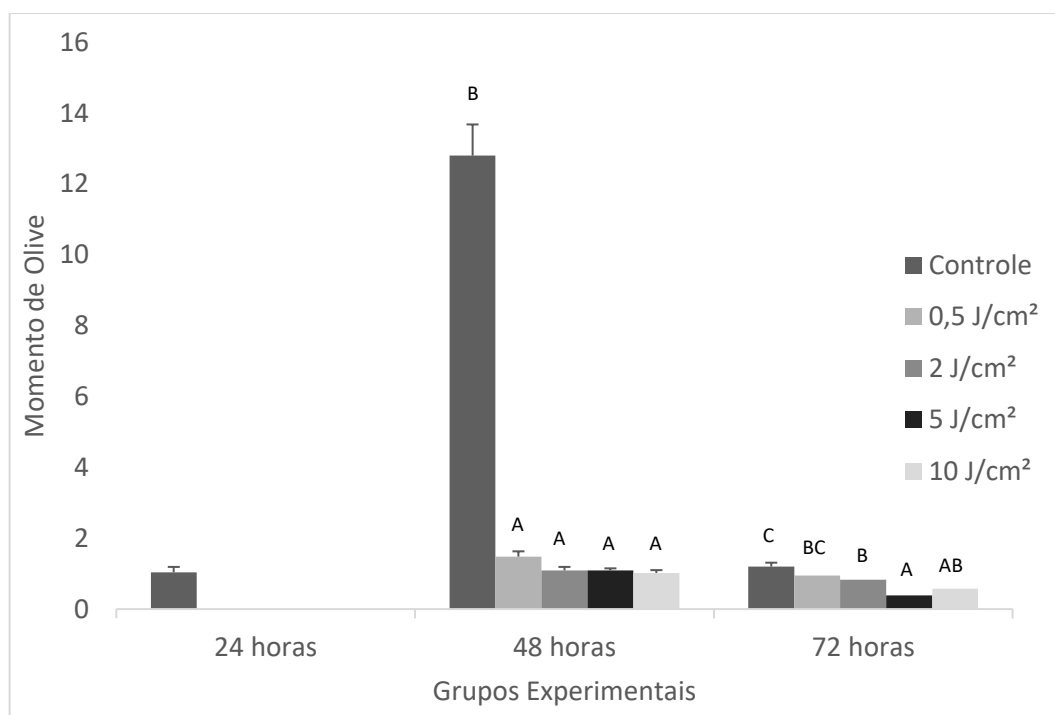


Gráfico 8 - Médias dos resultados obtidos para o parâmetro “momento de Olive”. Os grupos de exposição estão agrupados de acordo com o momento observacional. Letras distintas, indicam diferença estatística entre os grupos experimentais de mesmo momento observacional.

6 DISCUSSÃO

Resultados semelhantes aos dessa pesquisa, foram encontrados na pesquisa desenvolvida por Esmaeelinejad et al. (2014), ao utilizarem um laser He-Ne de comprimento de onda 638,8 nm nas densidades de energia de 0,5; 1 e 2 J/cm². Esses pesquisadores concluíram que a irradiação aumentou significativamente a viabilidade celular de fibroblastos oriundos da pele humana, com maior destaque para o grupo de células que recebeu densidade de energia 0,5 J/cm².

ALGHAMDI et al. (2015), expôs melanócitos humanos a um laser de comprimento de onda de 635 nm, com potência de 25mW, e densidades de energia de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 J/cm². Como resultado, notou-se que após uma irradiação com as densidades de energia 0,5; 1,0; 1,5 e 2 J/cm² a viabilidade apresentou melhora significativamente após 24 horas, e, se manteve semelhante ao controle nos demais grupos expostos, como no presente trabalho.

Marques et al. (2017) utilizou um laser de InGaAlP, com comprimento de onda de 660 nm, para irradiar culturas de fibroblastos oriundos da polpa de dentes decíduos humanos, nas densidades de energia de 1,25; 2,50; 3,75; 5 e 6,25 J/cm². A viabilidade celular foi avaliada 24, 48 e 72 horas após a irradiação. Em semelhança com a atual pesquisa, usaram culturas primárias em quarta passagem e o mesmo método de análise estatística para avaliar os resultados. Concluíram que nos parâmetros escolhidos o laser não foi capaz de afetar a viabilidade das células.

Também não foram observadas alterações na viabilidade celular ao empregar um laser de InGaAlP, com 660 nm de comprimento de onda, 30mW de potência e densidade de energia de 0,5 e 1 J/cm², após uma e duas irradiações em células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (Ginani et al., 2017) e em células-tronco derivadas da polpa de dente decíduo humano (Ginani et al., 2018). Nos dois trabalhos a viabilidade foi analisada pelo método de exclusão por incorporação do corante Azul de Tripan, em câmara de Neubauer, 24 horas após cada momento de irradiação. As duas experimentações trazem resultados compatíveis com o da atual pesquisa no que se refere-se a viabilidade após duas exposições do laser.

Ferreira e seus colaboradores em 2009, avaliaram o efeito da fototerapia com laser de AsGaAl em comprimento de onda de 660 nm e 40mW de potência na viabilidade de fibroblastos, com densidades de energia de 3,8; 6,3 e 10 J/cm². As

avaliações procederam 24 horas após uma irradiação, demonstrando não haver diferenças significativas na viabilidade entre as densidades testadas e o controle, como pode ser observado na atual pesquisa em todas as densidades empregadas por duas vezes.

Por outro lado, a pesquisa publicada por Ayuk, Houreld e Abrahamse (2018), aponta que a viabilidade celular de fibroblasto humano oriundo do tecido cutâneo aumentou significativamente, após uma exposição a luz laser de 660 nm de comprimento de onda, em densidade de energia de 5 J/cm². Os autores empregaram o método de exclusão pelo corante Azul de Tripan, no entanto, analisado por um contador automático de células. Outras experimentações com cultivo celular também encontram como resposta da irradiação ao laser, um aumento do percentual de viabilidade (ZHANG, XING & GAO 2008; SPERANDIO et al., 2013; LIAO et al., 2014; SOARES et al., 2015; ZACCARA et al., 2015; FERNANDES et al., 2016).

Usando laser de AsGaAl com comprimento de onda de 660 nm, potência de 50mW e densidade de energia de 3 e 21 J/cm, Frigo et al. (2010), investigaram os efeitos sobre dois tipos celulares: fibroblastos oriundos de quelóide humano e fibroblastos derivados da pele de camundongos. Os fibroblastos oriundos de quelóides irradiados com 3 J/cm² mostraram viabilidade significativa pelo teste de exclusão por Azul de Tripan, ao passo que 21 J/cm² em fibroblastos derivados da pele reduziu a viabilidade, em comparação com o controle. Os dados de citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio, evidenciaram uma redução significativa no percentual de células nas fases proliferativas do ciclo celular (S/G-2/M) nos grupos irradiados com 21 J/cm², nos dois tipos celulares. Percebe-se que a dose de 3 J/cm² diminuiu significativamente a morte celular, mas não estimulou o ciclo celular em fibroblastos oriundos de quelóide humano. Resposta relevante, se correlacionarmos ao fato que o tecido de granulação exuberante em equinos se comporta semelhante ao quelóide humano (CELESTE et al., 2011). Em acréscimo, percebe-se que a dose de 21 J/cm², duas vezes maior que a dose de 10 J/cm² utilizado na atual pesquisa, foi suficiente para induzir a morte e inibir a proliferação celular.

Diferente dos resultados atuais, ao empregar um laser AsGaAl, com comprimento de onda 670 nm, com 20mW de potência nas doses 0,5; 2; 4 e 8 J/cm² uma vez sobre cultivo de células endoteliais da veia umbilical humana, Schindl et al. (2003), obtiveram como resultado aumento significativo da proliferação celular em todas as densidades de energia avaliadas.

Em concordância com os resultados apresentados, Pourreau-Schneider et al. (1989), demonstraram que a proliferação de fibroblastos oriundos de gengiva humana, submetidos à irradiação com laser de He-Ne de comprimento de onda de 632,8 nm, não apresentou diferença significativa com relação ao controle, após uma irradiação, semelhante a presente investigação. Em acréscimo, os autores apontaram que as células que receberam duas e três irradiações dobraram seu número em comparação com as que receberam uma irradiação apenas, como também observado na atual pesquisa. Os cultivos celulares que receberam duas irradiações apresentaram significativamente mais células, que os cultivos expostos a uma irradiação. O melhor resultado nessa comparação ocorreu no grupo 5 J/cm², com incremento de 201,18% em relação com o mesmo grupo submetido a uma irradiação.

Usando o laser de AsGaAl com comprimento de onda de 685 nm, com 30mW de potência, com feixe de luz cobrindo uma área de 0,5 cm², semelhante ao empregado na presente pesquisa, MARQUES (2014), analisou a irradiação de laser em cultivo celular de fibroblastos oriundos do tecido conjuntivo do pulmão de camundongo, suplementada com 10% de SFB nas densidades de energia: 0,1; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 20 e 30 J/cm². Como resultado, observou que as densidades de energia 5; 7; 10; 20 e 30 J/cm² não diferiram do controle de maneira significativa com relação a proliferação celular após uma irradiação, resultado semelhante ao da atual pesquisa. Estudaram ainda, se esses tratamentos foram capazes de ativar eventos relacionados a morte celular, por meio da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo, onde observaram padrão de marcação bastante semelhante ao grupo controle. Além disso, avaliaram a viabilidade celular e atividade metabólica mitocondrial e lisossomal, e concluíram que nesses parâmetros, o laser não afetou o metabolismo e a viabilidade, mas, exerceu possivelmente, um efeito inibitório sobre a proliferação celular.

MIURA (2014), analisando cultura de célula-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos esfoliados de humanos, obteve como resultado, aumento significativo da proliferação celular ao empregar 10 J/cm², nos dois tempos de irradiação analisados, usando um Laser de InGaAlP com comprimento de onda de 660 nm, com 40 mW de potência, ao compará-los com o grupo controle não irradiado. Apesar da semelhança entre os parâmetros usados, o autor, irradiou as culturas por 4 e 8 segundos, tempo aproximadamente, 80 vezes menor que o empregado em nossa pesquisa, o que pode justificar a diferença entre os resultados encontrados.

Outros autores também encontraram aumento da proliferação em fibroblastos, empregando densidades de energia próximas as utilizadas na atual pesquisa, no entanto, com períodos menores de exposição a luz (KREISLER et al., 2003; ALMEIDA-LOPES et al., 2011).

Em contraste com os resultados encontrados no presente trabalho, Sergio et al. (2016), expos amostras de sangue periférico de ratos a irradiação com laser AlGaInP, com comprimento de onda 660 e 830 nm, com potência de 100mW, densidades de energia de 25, 50 e 100 J/cm². Utilizando o ensaio cometa, perceberam que o laser aumentou significativamente os danos ao DNA nas densidades de energia de 25 e 50 J/cm² do laser vermelho e 50 J/cm² do infravermelho próximo, quando comparadas com o controle não irradiado. Por outro lado, constatou-se que a densidade de energia de 100 J/cm² foi capaz de desenvolver menos danos as células nos dois comprimentos de onda, em relação ao controle. O que os levaram a concluir, que os danos genômicos produzidos pela irradiação laser parece estar mais relacionados com a fluência e densidade de energia, do que com o comprimento de onda.

Mussttaf, Jenkins e Jha (2017) analisaram os efeitos da terapia a laser com um diodo de comprimento de onda de 750 nm, com 40mW de potência e densidades de energia de: 0,6; 1,2; 3,6; 8,9; 17,8 e 26,8 J/cm², com relação a proliferação celular, viabilidade e genotoxicidade em cultivo de linfócito humano. As análises procederam 12 e 24 horas após a exposição. Para concentração e viabilidade celular utilizaram a contagem direta por microscopia, empregando o corante Azul de Tripan. Detectaram nos grupos irradiados um considerável aumento na contagem de células em relação ao controle, e que esse aumento foi maior nas densidades de energia 0,6; 1,2 e 3,6 J/cm² de forma dose dependente, e a partir dessas doses, houve diminuição da concentração celular. Com relação a viabilidade, as células mantiveram-se semelhantes ao controle. Contudo, a densidade maior, teve a menor percentagem de viabilidade entre os grupos. A genotoxicidade foi medida pelo ensaio cometa e a “% de DNA na cauda” foi o parâmetro escolhido para avaliação. No estudo citado, o laser foi capaz de estimular dano a molécula de DNA nas densidades de energia de 8,9; 17,8 e 26,8 J/cm², e, as densidades de energia mais baixas mantiveram-se semelhantes ao controle. Na atual pesquisa, nem mesmo a maior dose empregada por um ou dois dias consecutivos apresentou médias maiores que o controle, para esse mesmo parâmetro analisado.

Garcia (2015) investigou os efeitos da fotobiomodulação em cultivo primário de células-tronco mesenquimal de rato, em 4ª passagem, nas densidades de energia de 1; 3; 5 e 10 J/cm², operando a um comprimento de onda de 630 nm e 30mW de potência. Usou o ensaio cometa para avaliar o potencial genotóxico da terapia, e selecionou como variável de análise, a intensidade da cauda. Entre os grupos tratados, todos apresentaram médias menores que o grupo controle, com redução significativa para os grupos 3, 5 e 10 J/cm². As médias das amostras que receberam densidade de 5 J/cm² mostraram-se significativamente mais reduzidas do que qualquer um outro tratamento. Como conclusão, levantaram a hipótese de que a luz foi capaz de bioestimular a células, levando-as ao reparo de danos reversíveis na molécula de DNA. Na presente pesquisa, também foi observada uma redução nas médias dos danos em todos os grupos testados nos três parâmetros de análises selecionados. A densidade de energia de 5 J/cm² também demonstrou a menor média entre os grupos irradiados em relação ao controle após duas irradiações nos parâmetros: momento de Olive e % de DNA na cauda, no entanto, apresentou a maior média entre os grupos no parâmetro comprimento do cometa. Por outro lado, quando observada após uma irradiação, apresentou a menor média entre os grupos na variável comprimento do cometa.

O autor acima realizou ainda uma experimentação com o mesmo laser e densidades de energia, em modo de emissão pulsátil e empregou o teste de micronúcleo para análise de mutagenicidade nos dois modos de emissão. Os resultados mostraram que a luz pulsátil e contínua a 1 J/cm² determinou aumento no aparecimento de micronúcleos, em comparação ao controle. Ao analisar os dados, os pesquisadores pontuaram que fatores como a tripsinização, passagem das células, atrito mecânico, manipulação das placas de cultivo, entre outros, são fatores suficientes para causar estresse e danos mutagênicos irreversíveis às células.

Em cultivo de fibroblastos pulpaes humanos, Carvalho (2016), teve como objetivo investigar o efeito da substância *Aloe vera* associada a um medicamento de uso odontológico a base de hidróxido de cálcio, combinados ou não à fotobiomodulação laser. Para averiguação da genotoxicidade, empregou o teste de micronúcleo 24 e 48 horas após a exposição das células ao tratamento. O laser utilizado era de InGaAlP com comprimento de onda de 660 nm, densidade de energia de 3 J/cm² e 40mW de potência. A experimentação mostrou que o laser não aumentou

a frequência de micronúcleos e não alterou a viabilidade celular da associação da *Aloe vera* com o hidróxido de cálcio.

Sabe-se que a radiação ionizante induz dano ao DNA (KOHLI, GUPTA & DUBE, 2000; DUBE et al., 2001; SAHU, MOHANTY & GUPTATAHA, 2009; AL-ANI & AL-SIAIDY 2012). Para tanto, a fotobiomodulação tem sido investigada para reparar ou prevenir avarias resultantes da exposição à radiação ionizante, e avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade estão entre os efeitos mais investigados. Dube et al. (2001) utilizaram o ensaio cometa para investigar o efeito do laser He-Ne com comprimento de onda 632,8 nm, com 10mW de potência, energia de 1kJ/m² por 30 e 60 minutos em linfoblasto B humano, que posteriormente teriam ou não indução de dano no DNA por irradiação U.V.A de 343 nm de comprimento de onda. Na experimentação envolvendo apenas a irradiação laser, no parâmetro “momento da cauda”, não foi observada diferenças entre o grupo não irradiado e os expostos, sendo assim, concluíram que irradiação laser He-Ne por si só não resulta em dano ao DNA de linfoblasto B humano. Ao expor os grupos previamente irradiados com o laser e à irradiação U.V.A., os pesquisadores notaram que ocorreu uma diminuição nos danos ao DNA induzidos por U.V.A, em comparação com os controles irradiados apenas com U.V.A.. Sugeriram assim, que a irradiação com laser He-Ne nos parâmetros selecionados, além de não estimular danos a molécula de DNA, protege as células de danos induzidos pela radiação U.V.A., e, que possivelmente a ação protetora do laser, age em processos que impedem o início de injúrias ao DNA.

Silva et al. (2016) estudaram os efeitos da fotobiomodulação laser em fibroblasto oriundo da gengiva humana expostos previamente a radiação ionizante. O laser utilizado foi de AsGaAl com 660 nm de comprimento de onda, com 40mW de potência e densidade de energia de 30, 90 e 150 J/cm², empregando uma dose 24 horas após a radiação ionizante sobre as células. Passadas 24 horas da exposição ao laser, o controle positivo, exposto apenas à radiação ionizante, apresentou 48,5% menos células viáveis em relação ao controle negativo. Nos resultados de associação das irradiações, o grupo irradiado com laser a 30 J/cm² não diferiu do controle negativo (não exposto), e os grupos de 90 e 150 J/cm² apresentaram em média 46,8% mais células viáveis em relação ao controle positivo (exposto apenas a radiação ionizante). O grupo constatou ainda, haver aumento relevante na expressão da proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) após a exposição ao laser. Essa proteína está diretamente envolvida com o “maquinário” de reparo de DNA das células e com

a progressão do ciclo celular (fase de síntese), o que pode explicar a citoproteção observada nas células que foram expostas ao laser depois da irradiação ionizante.

Vários são os fatores que podem diminuir a instabilidade genômica e desencadear danos ao DNA. Para tanto, as células possuem um sistema de reparo endógeno bastante eficiente, onde proteínas de reparo do DNA removem constantemente boa parte das lesões reversíveis. Um exemplo são os radicais livres, que em excesso causam danos oxidativos ao DNA. Esses danos podem ser reparados por vias de reparo de excisão de nucleotídeos e reparo de excisão de base. Contudo quando acontecem lesões não oxidativas, a estabilidade genômica é mantida através de pontos de verificação, mas, para que isso ocorra, o ciclo celular “para” para acontecer o reparo da molécula de DNA, e, prevenir/impedir que esses danos sejam transferidos para células filhas (COOKE et al., 2003; LAN et al., 2004). Pensando nessa correlação, observa-se que o grupo 5 J/cm² no período 48 horas, apresentou 14,99% menos células que o controle, sendo o grupo com menor frequência de micronúcleos entre as densidades testadas. No entanto, percebe-se que o laser estimulou a mitose celular em todos os grupos irradiados por duas vezes, reduzindo significativamente tanto os danos de caráter reversíveis como os danos permanentes nas células em relação com os controles.

Já foi evidenciado haver uma ampla gama de caminhos possíveis, que podem ser desencadeados simultaneamente ou individualmente, dependendo das células-alvo, do seu estado fisiológico e parâmetros de luz selecionados. Estudos mais aprofundados têm sido realizados com o intuito de investigar os mecanismos de ação por trás de respostas celulares e sistêmicas relacionadas a fotobiomodulação laser, como o trabalho de Trajano et al. (2016) que demonstrou haver aumento da expressão gênica relacionada ao reparo de excisão de bases e reparo de excisão de nucleotídeos, em mioblastos após a exposição ao laser, sugerindo que a fotobiomodulação modula os mecanismos de reparo do DNA. Sergio et al. (2016), estudaram o aumento da expressão do RNA mensageiro em “reparação cruzada 1 e 2” e a expressão de RNA mensageiro em “reparação de complemento cruzado 2”, desencadeada após exposição ao laser. Chen et al. (2011) demonstrou que a fotobiomodulação laser foi capaz de ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B) via geração de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos embrionários de camundongos. Cury et al. (2013) estudaram alguns mecanismos por trás da estimulação a angiogênese desencadeada pelo laser, e concluíram que o laser aumenta a expressão de fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator indutor de hipóxia (HIF-1 α), ao mesmo tempo que diminuiu a atividade de metaloproteinases (MMP-2). Szymczyszyn et al. (2016), com investigação acerca da expressão de fatores de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) após a irradiação laser. Revisões importantes como as de Freitas e Hamblin (2016) e Trajano et al. (2018), englobam investigações recentes e relevantes sobre os mecanismos de ação e respostas à fotobiomodulação laser.

7 CONCLUSÃO

O laser de AsGaAl irradiado sobre o cultivo de fibroblasto equino oriundo do tecido cutâneo equino, com comprimento de onda de 670 nm e 30mW de potência em modo de emissão contínuo, demonstrou:

- Não afetar negativamente a viabilidade celular, e mostrou maior percentual de viabilidade nos grupos submetidos as densidades de energia de 0,5 e 2 J/cm², quando expostos a irradiação 24 horas após o plaqueamento;
- Os cultivos celulares submetidos a duas irradiações, sendo elas às 24 e 48 horas após o plaqueamento, com densidades de energia de 0,5 e 5 J/cm² apresentaram concentrações celulares maiores que o controle correspondente. Além disso, todos os grupos submetidos a duas irradiações apresentaram significativamente mais células, que os grupos expostos apenas a irradiação às 24 horas do plaqueamento;
- O laser não produziu efeitos genotóxicos sobre o material genético das células em nenhuma densidade de energia, avaliadas pelo Teste de Micronúcleo. Parece se comportar como um agente com atividade antimutagênica quando administrado densidades de energia de 2 e 5 J/cm² às 24 horas, e, 0,5; 2; 5 e 10 J/cm² às 24 e 48 horas do momento do plaqueamento. No entanto, mais pesquisas precisam ser desenvolvidas para afirmar essa relação;
- Em todas as densidades de energia irradiadas às 24 horas do momento do plaqueamento, o laser pareceu exercer efeito citoprotetor sobre o DNA celular nos três parâmetros de análise do teste cometa. O mesmo foi observado na densidade de energia de 10 J/cm² irradiado às 24 e 48 horas.

REFERÊNCIAS

1. ABDEL, R. A. O. R. O.; ISSA, E. M. J.; NOURI, S. A. S. A. M. Histopathological study of the influence of platelet rich-plasma and low level laser therapy on healing of experimentally fractured proximal sesamoid bone in equine. **The Iraqi Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 160-168, 2017.
2. ABELA, G. S.; NORMANN, S. J.; COHEN, D. M.; FRANZINI, D.; FELDMAN, R. L.; CREA, F.; FENECH, A.; PEPINE, C. J.; CONTI, C. R. Laser recanalization of occluded atherosclerotic arteries *in vivo* and *in vitro*. **laboratory investigation**, v. 71, n. 2, p. 403-411, 1985.
3. AGAIBY, D.; GHALI, L. R.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, n. 4, p. 357-363, 2000.
4. AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.
5. ALEKSIC, V.; AOKI, A.; IWASAKI, K.; TAKASAKI, A. A.; WANG, C. Y.; ABIKO, Y.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 4, p. 559-569, 2010.
6. ALEKSIC, V.; AOKI, A.; IWASAKI, K.; TAKASAKI, A. T.; WANG, C. Y.; ABIKO, Y.; ISHIKAWA, I.; IZUMI, Y. Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. **Lasers in Medical Science**, v. 25, n. 4, p. 559-569, 2010.
7. ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Laser ins medical Science**, v. 27, p. 237-249, 2012.
8. ALGHAMDI, K. M.; KUMAR, A.; ASHOUR, A. E.; ALGHAMDI, A. A. A comparative study of the effects of different low-level lasers on the proliferation, viability, and migration of human melanocytes *in vitro*. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 5, p. 1541-1551, 2015.
9. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZANGARO, R. A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers Surgery Medicine**, v. 29, p. 179-184, 2001.
10. ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Low-level light/laser therapy versus photobiomodulation therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 33, n. 4, p. 183-184, 2015.
11. ANDERS, J. J.; LANZAFAME, R. J.; ARANY, P. R. Luz de baixo nível / terapia com laser versus terapia de fotobiomodulação. **Photomed Laser Surg**, v. 33, p. 183-184, 2015.
12. ARTES-RIBAS, M.; ARNABAT-DOMINGUEZ, J. e PUIGDOLLERS, A. Analgesic effect of a low-level laser therapy (830 nm) in early orthodontic treatment. **Lasers Medicine and Science**, v. 28, n. 1, p. 335-41, 2013.
13. ASGHARI, A.; TAKHTFOOLADI, M. A.; HOSEINZADEH, H. A. Effect of photobiomodulation on ischemia/reperfusion-induced renal damage in diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 9, p. 1943-1948, 2016.
14. AVCI, P.; GUPTA, A.; SADASIVAM, M.; VECCHIO, D.; PAM, Z.; PAM, N.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 32, p. 41-52, 2013.

15. AYUK, S. M.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. Effect of 660 nm visible red light on cell proliferation and viability in diabetic models *in vitro* under stressed conditions. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 5, p. 1085-1093.
16. BAGNATO, V. S. Os Fundamentos da luz laser. **Física Na Escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9, 2001.
17. BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; CASTRO e SILVA, O. New perspectives for optical techniques in diagnostic and treatment of hepatic diseases. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 214-216, 2010.
18. BARBOZA, C. A. G.; GINANI, F.; SOARES, D. M.; HENRIQUES, A. C. G.; FREITAS, R. A. Laser de baixa intensidade induz à proliferação *in vitro* de células-tronco mesenquimais. **Einstein**, v.12, n.1, p.75-81, 2014.
19. BARNES, P.; DRAZEN, J. M.; RENNARD, S. I.; THOMSON, N. C. **Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management**. 2.ed. London: Academic Press, 2009. 800p.
20. BELLETTI, S.; UGGERI, J.; MERGONI, G.; VESCOVI, P.; MERIGO, E.; FORNAINI, C.; NAMMOUR, S.; MANFREDI, M.; GATTI, R. Effects of 915 nm GaAs diode laser on mitochondria of human dermal fibroblasts: analysis with confocal microscopy. **Lasers Med Sci.**, v. 30, p. 375-381, 2015.
21. BENEDICENTI, S.; PEPE, I. M.; ANGIERO, F.; BENEDICENTI, A. Intracellular ATP Level Increases in Lymphocytes Irradiated with Infrared Laser Light of Wavelength 904 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 5, p. 451-453, 2008.
22. BERGH, A., RIDDERSTRÅLE, Y., & EKMAN, S. Defocused CO² laser on equine skin: a histological examination. **Equine Veterinary Journal**, v. 39 n. 2, p. 114-119, 2007.
23. BORSA, P. A.; LARKIN, K. A.; TRUE, J. M. Does Phototherapy Enhance Skeletal Muscle Contractile Function and Postexercise Recovery? A Systematic Review. **Journal of Athletic Training**, v. 48, n. 1, p. 57-67, 2013.
24. Borzabadi-Farahani, A. Effect of low-level laser irradiation on proliferation of human dental mesenchymal stem cells; a systemic review. **J Photochem Photobiol B.**, v. 162, p. 162, p. 577-582, 2016.
25. BRITO, A.; ALVES, A. N.; RIBEIRO, B. G.; BARBOSA, D. V. D. E.; MAGALHAES, E. M. R.; FERNANDES, K. P. S.; BUSSADORI, S. K.; GOULARDINS, J. B.; MESQUITA-FERRARI, R. A. Effect of photobiomodulation on connective tissue remodeling and regeneration of skeletal muscle in elderly rats. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 3, p. 513-521, 2018.
26. BRUGNERA JÚNIOR, A.; SANTOS, A. L. C.; BOLOGNA, E. D. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. 1ed. São Paulo: Santos; 2004.
27. BRUNORI, M.; GIUFFRÉ, A.; SARTI, P. Cytochrome c oxidase, ligands and electrons. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 324-336, 2005.
28. CARVALHO, N. C. **Análise da citotoxicidade e genocitotoxicidade da aloe vera associada a medicamento endodôntico e fotobiomodulação a laser**. 65f. 2016. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal de Sergipe, Aracajú.
29. CASTELLO, P. R.; DAVID, P. S.; MCCLURE, T.; CROOK, Z.; POYTON, R. O. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 277-287, 2006.
30. CASTRO-e-SILVA, O.; ZUCOLOTO, S.; MARCASSA, L. G.; MARCASSA, J.; KURACHI, C.; MELO, C. A. S.; RAMALHO, F. S.; RAMANHO, L. N. Z.; Bagnato, V. S. Spectral response for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, p. 50-53, 2003.
31. CATORZE, M. G. Laser: Fundamentos e indicações em dermatologia. **Medicina**

- Cutanea Ibero Latino Americana**, v. 37, p. 5-27, 2009.
32. CATUNDA, T.; PATAIA, A.; ROMERO, A.; SARTORI, J.; NUNES, L. A. O. Laser de Semicondutor Vis vel: um Instrumento Didático de Baixo Custo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 20, n. 3, p. 230-237, 1998.
 33. CELESTE, C. J.; DESCHENE, K.; RILEY, C. B.; THEORET, C. L. Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, p. 89-97. 2011.
 34. CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S. TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643-655, 2003.
 35. CHEN, A. C.-H.; ARANY, P. R.; HUANG, Y.-Y.; TOMKINSON, E. M.; SHARMA, S. K.; KHARKWAL, G. B.; SALEEM, T.; MOONEY, D.; YULL, F. E.; BLACKWELL, T. S.; HAMBLIN, M. R. (2011). Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. 1-8, 2011.
 36. CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light). **Therapy**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012.
 37. COLLIER, M. A.; HAUGLAND, L. M.; BELLAMY, J.; JOHNSON, L. L.; ROHRER, M. D.; WALLS, R. C.; BARTELS, K. E. Effects of holmium: YAG laser on equine articular cartilage and subchondral bone adjacent to traumatic lesions: A histopathological assessment. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 9, n. 5, p. 536-545, 1993.
 38. COOKE, M. S.; EVANS, D. M.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **THE FASEB Journal**, v. 17, n. 10, 1195-1214, 2003.
 39. CRUZ, A. D.; MCARTHUR, A. G.; Silva, C. C.; CURADO, M. P.; GLICKMAN, B. W. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiânia (Brazil) radiological accident. **Mutation Research**, v. 313, p. 57-68, 1994.
 40. CURY, V.; MORETTI, A. I. S.; ASSIS, L.; BOSSINI, P.; CRUSCA, J. S.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. (2013). Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, p. 164-170, 2013.
 41. DIÓGENES, R.; UCHOA, A.; DANTAS, E. M.; CRISTINA, K.; LUCENA, R.; GRANVILLE-GARCIA, A. F.; SILVA, J. S. P. (2011). Aplicação do laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Odontol. Clín. Cient.**, Suplemento, p. 511-516, 2011.
 42. DUARTE, F. J.; FRANK J.; HILLMAN, L. W.; LIAO, P. F.; KELLEY, P. Dye Laser Principles : With Applications. **Elsevier Science**, 1990.
 43. DUBE, A.; BOCK, C.; BAUER, E.; KOHLI, R. GUPTA, P. K.; GREULICH, K. O. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 40, p. 77-82, 2001.
 44. EDUARDO, C. P.; BELLO-SILVA, M. C.; RAMALHO, K. M.; LEE, E. R. R.; ARANHA, A. C. C. A terapia fotodinâmica como benefício complementar na clínica odontológica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** v. 69, n. 3, 2015.
 45. EELLS, J. T.; WONG-RILEY, M. T. T.; VERHOEVE, J.; HENRY, M.; BUCHMAN, E. V.; KANE, M. P. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by nearinfrared light therapy. **Mitochondrion**. v. 4, p. 559-567. 2004.
 46. EINSTEIN, A. The Quantum Theory of Radiation. **Physikalische Zeitschrift**, v. 18, n. 121, p. 63-77, 1917.

47. ESMAEELINEJAD, M.; BAYAT, M.; DARBANDI, H.; BAYAT, M.; MOSAFFA, N. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. **Lasers in Medical Science**, v. 29, p. 121-129, 2014.
48. FARIVAR, S.; MALEKSHAHABI, T.; SHIARI, R. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 58-62, 2014.
49. FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.
50. FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
51. FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage fusion bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2002.
52. FENG, J.; ZHANG, Y.; XING, D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. **Cell Signal**, v. 6, p. 1116-1125, 2012.
53. FERNANDES, K. P. S.; SOUZA, N. H. C.; MESQUITA-Ferrari, R. A.; SILVA, D. F. T.; ROCHA, L. A.; Alves, A. N.; SOUSA, K. B.; BUSSADORI, S. K.; HAMBLIN, M. R.; Nunes, F. D. Photobiomodulation with 660-nm and 780-nm laser on activated J774 macrophage-like cells: Effect on M1 inflammatory markers. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 153, p. 344-351, 2015.
54. FERRARESI, C.; HUANG, Y. Y.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation in human muscle tissue: an advantage in sports performance? **Journal of Biophotonics**, v. 9, p. 11-12, 2016.
55. FERRARESI, C.; KAIPPERT, B.; AVCI, P.; HUANG, Y. Y.; SOUSA, M. V. P.; BAGNATO, V. S.; PARIZOTTO, N. A.; HAMBLIN, M. R. Low-level Laser (Light) Therapy Increases Mitochondrial Membrane Potential and ATP Synthesis in C2C12 Myotubes with a Peak Response at 3-6 h. **Photochemistry and Photobiology**, v. 91, n. 2, p. 411-416, 2015.
56. FERREIRA, M. P. P.; FERRARI, R. A. M.; GRAVALOS, E. D.; MARTINS, M. D.; BUSSADORI, S. K.; GONZÁLEZ, D. A. B.; FERNANDES, K. P. S. Effect of Low-Energy Gallium-Aluminum-Arsenide and Aluminium Gallium Indium Phosphide Laser Irradiation on the Viability of C2C12 Myoblasts in a Muscle Injury Model. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 6, p. 901-906, 2009.
57. FORTUNA, T.; GONZALEZ, A. C.; Sá, M. F.; ANDRADE, Z. de A.; REIS, S. R. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. **International Wound Journal**, v. 15, n. 2, p. 274-282, 2018.
58. FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1-17, 2016.
59. FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 5.ed. New York: Wiley-Liss, 2005. Cap 8 (p. 105-113), 12 (p. 175-197), 18 (p. 291-306).
60. FRETZ, P. B.; LI, Z. Low energy laser irradiation treatment for second intention wound healing in horses. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 10, p. 650-653, 1992.
61. FRIGO, L.; CORDEIRO, J. M.; FAVERO, G. M.; MARIA, D. A.; LEAL-JUNIOR, E. C. P.; JOENSEN, J.; BJORDAL, J. M.; ROXO, D. C.; MARCOS, R. L.; Lopes-Martins, R. A. B. High doses of laser phototherapy can increase proliferation in melanoma stromal connective tissue. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 1-9, 2018.

62. GARCIA, H. V. **Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED.** 132f. 2015. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica - Faculdade de Medicina). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.
63. GATTORNO, M.; MARTINI, A. Inflammation and Its Mediators. In: PETTY, R. P.; LAXER, R. M.; LINDSLEY, C. B.; WEDDERBURN, L. R. **Textbook of Pediatric Rheumatology.** 7. ed. Elsevier, 2016. p. 14-32
64. GINANI, F.; SOARES, D. M.; ROCHA, H. A. O.; SOUZA, L. B.; BARBOZA, C. A. G. Low-level laser irradiation induces *in vitro* proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Lasers in Medical Science**, v. 33, p. 95-102, 2017.
65. GINANI, F.; SOARES, D. M.; ROCHA, H. A. O.; SOUZA, L. B.; BARBOZA, C. A. G. Low-level laser irradiation promotes proliferation of cryopreserved adipose-derived stem cells. **Einstein**, v. 15, a. 3, p. 334-338, 2017.
66. GONÇALVES, R. V.; NOVAES, R. D.; MATTA, S. L. P.; BENEVIDES, G. P.; FARIA, F. R.; PINTO, M. V. M. Comparative Study of the Effects of Gallium-Aluminum-Arsenide Laser Photobiomodulation and Healing Oil on Skin Wounds in Wistar Rats: A Histomorphometric Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 597-602, 2010.
67. GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental.** Canos: Ulbra, 2003. p.173-200.
68. GOURDIE, R. G.; DIMMELER, S.; KOHL, P. Novel therapeutic strategies targeting fibroblasts and fibrosis in heart disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, p. 620-638, 2016.
69. HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation or low-level laser therapy. **Journal of Biophotonics**, v. 9, p. 11-12, p. 1122-1124, 2016.
70. HECHT, J. **The Laser Guidebook.** Singapore: McGraw-Hill Editions, 1986
71. HOURELD, N. N.; AYUK, S. M.; ABRAHAMSE, H. Expression of genes in normal fibroblast cells (WS1) in response to irradiation at 660 nm. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 130, p. 146-152, 2014.
72. HOURELD, N., AYUK, S., & ABRAHAMSE, H. (2018). Cell Adhesion Molecules are Mediated by Photobiomodulation at 660 nm in Diabetic Wounded Fibroblast Cells. **Cells**, v. 7, n. 4, p. 1-17, 2018.
73. HU, L.; LIANG, M.; MOURAUX, A.; WISE, R. G.; HU, Y.; IANNETTI, G. D. Taking into account latency, amplitude, and morphology: improved estimation of single-trial ERPs by wavelet filtering and multiple linear regression. **J. Neurophysiol.** v.106, p. 3216-3229, 2011.
74. JANN, H. W.; BARTELS, K.; RITCHEY, J. W.; PAYTON, M.; BENNETT, J. M. Equine wound healing: influence of low level laser therapy on an equine metacarpal wound healing model. **Photonics & Lasers in Medicine**, v. 1, n. 2, p. 117-122, 2012.
75. JORGE, A. C. T.; CASSONI, A.; RODRIGUES, J. A. Aplicações dos lasers de alta potencia em odontologia. **Revista Saúde**, v. 4, n. 3, p. 1-12, 2010.
76. JUQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Basica: texto e atlas.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2013. 556p.
77. KALLURI, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, p. 582-598, 2016.
78. KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, v. 498, p. 61-77, 2001.
79. KANEPS, A. J.; HULTGREN, B. D.; RIEBOLD, T. W.; SHIRES, G. M. Laser therapy in

- the horse: histopathologic response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 3, p. 581-582, 1984.
80. KARU, T. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low Power Laser Therapy). **Journal of selected topics in quantum electronics**, v. 20, n. 2, p. 1-7, 2014.
 81. KARU, T. I. Invited Review Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 5, p. 1091-1099, 2008.
 82. KARU, T. I.; KOLYAKOV, S. F. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 4, p. 355-361, 2005.
 83. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surgery Medicine**, v. 36, p. 307-314, 2005.
 84. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L.V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers Surgery Medicine**, v. 36, p. 307-314, 2005.
 85. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.
 86. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1-17, 1999.
 87. KAZEMI, K. N.; KAZERIMI, BABAZADEH, K.; LAJEVARDI, M.; DABAGHIAN, F. H.; MOSTAFAVI, E. Application of Low-Level Laser Therapy Following Coronary Artery Bypass Grafting (CABG) **Surgery. Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 8-91, 2014.
 88. KOHLI, R.; GUPTA, P. K.; DUBE, A. Helium-Neon Laser Preirradiation Induces Protection against UVC Radiation in Wild-Type E. coli Strain K12AB1157. **Radiation Research**, v. 153, n. 2, p.181-185, 2000.
 89. KOKKINOPOULOS, I.; COLMAN, A.; HOGG, C.; HECKENLIVELY, J.; JEFFERY, G. (2013) A inflamação retiniana relacionada à idade é reduzida pela luz de 670 nm através do aumento do potencial de membrana mitocondrial. **Neurobiol Aging**, v. 34, p. 602-609, 2013.
 90. KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A. B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an *in vitro* study. **Journal Clin Periodontol**, v. 30, n. 4, p. 353-358, 2003.
 91. KUNIMATSU, R.; GUNJI, H.; TSUKA, Y.; YOSHIMI, Y.; AWADA, T.; SUMI, K.; NAKAJIMA, K.; KIMURA, A.; HIRAKI, T.; ABE, T.; NAOTO.; YANOSHIYA, M.; Tanimoto, K. Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 5, p. 959-966, 2018.
 92. LAN, L.; NAKAJIMA, S.; OOHATA, Y.; TAKAO, M.; OKANO, S.; MASUTANI, M.; YASUI, A. *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 38, p. 13738-13743, 2004.
 93. LAPCHAK, P. A.; BOITANO, P. D. Transcranial Near-Infrared Laser Therapy for Stroke: How to Recover from Futility in the NEST-3 Clinical Trial. **Acta neurochirurgica**. Supplement, v. 121, p. 7-12, 2016.
 94. LAPCHAK, P. A.; TABOADA, L. Transcranial near infrared laser treatment (NILT)

- increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. **Brain Research**, v. 1306, p.100-105, 2010.
95. LIAO, X.; XIE, G. H.; LIU, H.W.; CHENG, B.; LI, S. H.; XIE, S.; XIAO, L. L.; FU, X. B. Helium-Neon Laser Irradiation Promotes the Proliferation and Migration of Human Epidermal Stem Cells *In Vitro*: Proposed Mechanism for Enhanced Wound Re-epithelialization. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 4, p. 219-225, 2014.
 96. LINDHOLM, A. C.; SWENSSON, U.; DE MITRI, N.; COLLINDER, E. Clinical Effects of Betamethasone and Hyaluronan, and of Defocalized Carbon Dioxide Laser Treatment on Traumatic Arthritis in the Fetlock Joints of Horses. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 49, n. 4, p. 189-194, 2002.
 97. MACHADO, M. V. M.; VULCANO, L. C.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. Efeito da laserterapia em tendinite experimental no tendão flexor digital superficial em equinos: estudo histológico e ultra-sonográfico. **Archives of Veterinary Science**, v. 5, p. 111-115. 2000.
 98. MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, G.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J Photochem Photobiol B**, v. 38, p. 25-30, 1997.
 99. MARQUES, J. M. **Ação do laser 685nm e 830nm na fotobiomodulação em linhagem celular I929 sob estresse nutricional**. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Pesquisa e desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
 100. MARQUES, J. M.; PACHECO-SOARES, C.; SILVA, N. S. Evaluation of the photobiomodulation in L929 cell culture. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 12, p. 1638-1643, 2014.
 101. MARQUES, M. M.; MENEGUZZO, D. T.; SIMÕES, A.; RAMALHO, K. M. Mecanismo de ação da fototerapia com laser em baixa intensidade (FTLBI). In: EDUARDO, C. P. **Laser em Odontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
 102. MARTINS, T. O. F. S.; MESQUITA, D. A.; FERRARI, R. A. M.; PINTO-JUNIOR, D. S.; CORREA, L.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; DOMINGUES, M. Phototherapy with low-level laser affects the remodeling of types I and III collagen in skeletal muscle repair. **Lasers Medical and Science**, v. 26, p. 803-814, 2011.
 103. MAYS, P.K.; MCANULTY, R. J.; CAMPA, J. S.; LAURENT, G. J. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. **Biochemical Journal**, v. 276, n. 2, p. 307-313, 1991.
 104. MCANULT, R. J.; LAUTENT, G. J. Fibroblast. In: BARNES. P.; DRAZEN, J. M.; RENNARD, S. I.; THOMSON, N. C. **Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management**. London: Academic Press, 2002. p. 139-144.
 105. MCANULTY, R. J. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 4, p. 666-671, 2007.
 106. MGGUFF, P. E., DETERLING, R. A., & GOTTLIEB, L. S. Tumoricidal Effect of Laser Energy on Experimental and Human Malignant Tumors. **New England Journal of Medicine**, v. 273, n. 9, p. 490-492, 1965.
 107. MIGNON, C.; UZUNBAJAKAVA, N. E.; RAAFS, B.; BOTCHKAREVA, N. V.; TOBIN, D. J. Photobiomodulation of human dermal fibroblasts *in vitro*: decisive role of cell culture conditions and treatment protocols on experimental outcome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-14, 2017.
 108. MIRAGLIOTTA, V.; PIRONE, U.; DONADIO, E. ABRAMO, F.; RICCIARDI, M. P.; THEORET C, L. Osteopontin expression in healing wounds of horses and in human

- keloids. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, p. 72-77, 2016.
109. MIURA, C. A. S. **Efeito do laser de baixa potência sobre células tronco da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED)**. 2014. 70f. Tese (Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru.
 110. MORAES, J. M.; BRAVO, M. O.; HUAIXAN, L. N.; VILLA FILHO, P. C.; XIMENES, F. H. B.; TEIXEIRA NETO, A. R.; LIMA, E. M, M.; GODOY, R. F. Ultra-som terapêutico e laser de baixa intensidade no tratamento do abscesso equino. **PUBVET**, v. 8, 2014.
 111. MORAIS, T. M.; ANTONIO, S. **Fundamentos da odontologia em ambiente hospitalar**. Elsevier Brasil, 2015. p440.
 112. MOSMANN, T. Ensaio colorimétrico rápido para crescimento celular e sobrevivência: aplicação em ensaios de proliferação e citotoxicidade. **J Immunol Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.
 113. MURAOKA, N.; IEDA, M. Direct Reprogramming of Fibroblasts into Myocytes to Reverse Fibrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 76, p. 21-37, 2014.
 114. MURRAY, L. A.; KNIGHT, D. A.; LAURENT, G. J. Fibroblast. In: BARNES. P.; DRAZEN, J. M.; RENNARD, S. I.; THOMSON, N. C. **Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management**. 2.ed. London: Academic Press, 2009. p. 193-200.
 115. MUSSTAF, R. A.; JENKINS, D. F. L.; JHA, A. N. Photo-stimulatory effect of LLLT on the proliferation rate of human monocytic leukaemia cells. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 2, p. 175-181, 2018.
 116. NADERI, M. S., RAZZAGHI, M., DJAVID, G. E.; HAJEBRAHIMI, Z. A Comparative Study of 660 nm Low-Level Laser and Light Emitted Diode in Proliferative Effects of Fibroblast Cells. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 8 (Suppl 1), p. 46-50, 2017.
 117. NAJEEB, S.; KHURSHID, Z.; ZAFAR, M. S.; AJLAL, S. Applications of Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Lasers) for Restorative Dentistry. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 3, 201-211, 2016.
 118. NATARAJAN, A. T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3-16, 2002.
 119. O'CONNOR, M.; PATIL, R.; YU, J.; HICKEY, R.; PREMANAND, K.; KAJDACSY-BALLA, A.; BENEDETTI, E.; BARTHOLOMEW, A. Mesenchymal Stem Cells Synergize with 635, 532, and 405 nm Laser Wavelengths in Renal Fibrosis: A Pilot Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, p. 556-563, 2016.
 120. ORON, A.; ORON, U.; STREETER, J.; TABOADA, L.; ALEXANDROVICH, A.; TREMBOVLER, V.; SHOHAMI, E. Near Infrared Transcranial Laser Therapy Applied at Various Modes to Mice following Traumatic Brain Injury Significantly Reduces Long-Term Neurological Deficits. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, n. 2, p. 401-407, 2012.
 121. ORON, U.; ILIC, S.; TABOADA, L.; STREETER, J. Ga-As (808 nm) Laser Irradiation Enhances ATP Production in Human Neuronal Cells in Culture. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 25, n. 3, p. 180-182, 2007.
 122. ORON, U.; MALTZ, L.; TUBY, H.; SORIN, V.; CZERNIAK, A. Enhanced Liver Regeneration Following Acute Hepatectomy by Low-Level Laser Therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, n. 5, p. 675-678, 2010.
 123. PARENTE, J. D.; MÖLLER, K. A Control System Design to Establish Dose-Response Relationships in Wound Healing Therapy. **Biomedical Science and Engineering**, v. 10, p. 76-85, 2017.
 124. PASSARELLA, S, KARU T.. Absorption of monochromatic and narrow band radiation

- in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. **J Photochem Photobiol B.**, v. 140, p. 344-358, 2014.
125. PAULA, S. Comparação do laser e do led no processo de cicatrização em feridas cutâneas : uma revisão. **Revista Eletroninha Ciência e Saúde**, v. 9, n. 1, p. 55-61, 2016.
 126. PEREIRA, P. R.; PAULA, J. B.; CIELINSKI, J.; PILONETTO, M.; VON BAHTEN, L. C., PEREIRA, P. R.; VON BAHTEN, L. C. Effects of low intensity laser in *in vitro* bacterial culture and *in vivo* infected wounds. **Revista Do Colégio Brasileiro de Cirurgições**, v. 41, p. 49-55, 2014..
 127. PIEK, A.; BOER, R. A.; SILLJÉ, H. H. W. The fibrosis-cell death axis in heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 21, n. 2, p. 199-211, 2016.
 128. POURREAU-SCHNEIDER, N.; SOUDRY, M.; REMUSAT, M.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence International**, v. 20, n. 12, p. 887-893, 1989.
 129. POYTON, R. O.; BALL, K. A. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. **Discovery Medicine**, v. 11, n. 57, p. 154-159, 2011.
 130. PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **Journal Clinical Periodontology**, v. 38, p. 60-84, 2011.
 131. QUIRK, B. J.; SONOWAL, P.; JAZAYERI, M. A.; BAKER, J. E.; WHELAN, H. T. Cardioprotection from Ischemia-Reperfusion Injury by Near-Infrared Light in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 9, p. 505-511, 2014.
 132. RAMALHO, K. M. **Terapia com laser em baixa intensidade na prevenção dos efeitos causados pela elevada concentração de glicose na proliferação e migração de fibroblastos**. 2007. 36f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 133. RAMPERSAD, S. N. A rapid colorimetric microtiter bioassay to evaluate fungicide sensitivity among *Verticillium dahliae* isolates. **Plant Disease**. v. 95, n. 3, p. 248-255, 2011.
 134. REIS FILHO, R.; FERREIRA, M.; PASCOLI, A.; VIÉRA, R.; PAZZINI, J.; OLIVEIRA, R.; SALARDANI, I.; SILVA, P.; ROSSETO, L.; ALBERNAZ, S.; VASCONCELOS, R. O.; FERRAUDO, A.; MORAES, P. C.;NARDI, A. Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 603-612, 2017.
 135. RENNO, A. C. M.; MCDONNELL, P. A.; PARIZOTTO, N. A.; LAAKSO, E. L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. **Photomed Laser Surg.**, v. 25, n. 4, p. 275-80, 2007.
 136. RIBEIRO, A. R.; COELHO, L.; BERTOLAMI, O.; ANDRÉ, R. Luz: História, Natureza e Aplicações. **Gazeta de Física**, v. 39, p. 6-13, 2015.
 137. RIBEIRO, L.R., Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. **Mutagenese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 201-219.
 138. RICEVUTI, G.; MAZZONE, A.; MONAIA, C.; FRATINO, P.; DEGIULIO, R.; DELL'ACQUA, R.; LEONARDI, G.; JUCCI, S.; Sacchi, S. *In vivo* and *in vitro* HeNe laser effects on phagocyte functions. **Inflammation**, v. 13, n. 5, p. 507-527, 1989.
 139. ROCHA, J. G. **Efeitos do laser de baixa potência na leishmaniose experimental:**

- avaliação sobre a lesão cutânea (*in vivo*) e efeitos sobre leishmânia (*in vitro*).** 2014. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
140. ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia - Texto e Atlas. 6. ed. 2012. 1008p.
 141. RYAN, T.; SMITH, R. An investigation into the depth of penetration of low level laser therapy through the equine tendon *in vivo*. **Irish Veterinary Journal**, v. 60, n. 5, p. 295-299, 2007.
 142. SAHU, K.; MOHANTY, S. K.; GUPTA, P. K. He-Ne laser (632.8 nm) pre-irradiation gives protection against DNA damage induced by a near-infrared trapping beam. **Journal of Biophotonics**, v. 2, a. 3, 140-144, 2009.
 143. SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 201-223.
 144. SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol.**, v. 48, n. 2, p. 334-336, 2003.
 145. SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **The British Journal of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 334-336, 2003.
 146. SCHWARZ, F.; SCULEAN, A.; BERAKDAR, M.; SZATHMARI, L.; GEORG, T.; BECKER, J. *In vivo* and *in vitro* effects of an Er:YAG laser, a GaAlAs diode laser, and scaling and root planing on periodontally diseased root surfaces: A comparative histologic study. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 5, p. 359-366, 2003.
 147. SERGIO, L. P. S.; CAMPOS, V. M. A.; VICENTINI, S. C.; MENCALHA, A. L.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. Low-intensity red and infrared lasers affect mRNA expression of DNA nucleotide excision repair in skin and muscle tissue. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 3, p. 429-435, 2016.
 148. SERGIO, L. P. S.; SILVA, A. P. A.; AMORIM, P. F.; CAMPOS, V. M. A.; MAGALHÃES, L. A. G.; PAOLI, F.; FONSECA, A. S. DNA damage in blood cells exposed to low-level lasers. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 4, 361-368, 2015.
 149. SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1593, (Suplem. 2-3), p. 131-139.
 150. SILVA, C. R.; CABRAL, F. V.; CAMARGO, C. F. M.; NÚÑEZ, S. C.; YOSHIMURA, T. M.; LIMA, A. C. L.; RIBEIRO, M. S. Exploring the effects of low-level laser therapy on fibroblasts and tumor cells following gamma radiation exposure. **Journal of Biophotonics**, v. 9, p. 1157-1166, 2016.
 151. SILVA, I. Uma nova luz sobre o conceito de fóton: Para além de imagens esquizofrênicas. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 37, n. 4, p. 1-11, 2015.
 152. SILVA, J.; ERDTAMNN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 422p.
 153. SILVA, L. M. G.; SILVA, C. A. A.; SILVA, A.; VIEIRA, R. P.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Photobiomodulation Protects and Promotes Differentiation of C2C12 Myoblast Cells Exposed to Snake Venom. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, 2016.
 154. SILVEIRA, P. C. L.; SILVA, L. A.; TUON, T.; FREITAS, T. P.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Efeitos da laserterapia de baixa potência na reposta oxidativa epidérmica

- induzida pela cicatrização de feridas. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 13 n. 4, p. 281-287, 2009.
155. SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, p. 184-191, 1988.
 156. SISTER E. Princípios das fontes emisoras de luz. In: Kalil, C. L. P. V. **Laser e outras fontes de luz na dermatologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 1-46.
 157. SOARES, D. M.; GINANI, F.; HENRIQUES, Á. G.; BARBOZA, C. A. G. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. **Lasers in Medical Science**, v. 30, n. 3, p. 1171-1174, 2015.
 158. SONG, S.; ZHANG, Y.; FONG, C. C.; TSANG, C. H.; YANG, Z.; YANG, M. cDNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles in Human Fibroblast Cells Irradiated with Red Light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 5, p. 849-857, 2003.
 159. SOUZA, A. B.; BERTALIA, S. S.; NICOLAU, R. A.; RIBEIRO, N. R.; PEDRO, S. G. M. Ação Do Laser De Baixa Potência No Processo Inflamatório. **Revisão: Medicina**, v. 85, n. 6, p. 1471-1474, 1997.
 160. SPERANDIO, F. F.; GIUDICE, F. S.; CORRÊA, L.; PINTO, D. S.; HAMBLIN, M. R.; SOUSA, S. C. O. M. Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. **Journal of Biophotonics**, v. 6, p. 10, p. 1-9, 2013.
 161. STEIN, A.; BENAYAHU, D.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n. 2, p. 161-166, 2005.
 162. STUDART, N. Uma concisa abordagem histórica e conceitual da luz e de algumas de suas aplicações: Apresentação de artigos convidados na edição comemorativa do Ano Internacional da Luz. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 37, n. 4, p. 1-3, 2015.
 163. SUTHERLAND, J. C. Biological effects of polychromatic light. **Photochem Photobiol.**, v. 72, n. 2, p. 164-170, 2002.
 164. SZYMCHYSZYN, A.; DOROSZKO, A.; SZAHIDEWICZ-KRUPSKA, E.; ROLA, P.; GUTHERC, R.; JASICZEK, J.; DERKACZ, A. Effect of the transdermal low-level laser therapy on endothelial function. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 7, p. 1301-1307, 2016.
 165. TAMPE, D.; ZEISBERG, M. Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, p. 226-237, 2014.
 166. THEORET, C. L.; OLUTOYE, O. O.; PARNELL, L. K.; HICKS, J. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 7, p. 783-789, 2013.
 167. TRAJANO, L. A. S. N.; SERGIO, L. P. S.; SILVA, C. L.; CARVALHO, L.; MENCALHA, A. L.; STUMBO, A. C.; FONSECA, A. S. Low-level laser irradiation alters mRNA expression from genes involved in DNA repair and genomic stabilization in myoblasts. **Laser Physics Letters**, v. 13, a. 7, 075601(pp6), 2016.
 168. TRAJANO, L. A. S. N.; SERGIO, L. P. S.; STUMBO, A. C.; MENCALHA, A. L.; FONSECA, A. S. Low power lasers on genomic stability. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 180, p. 186-197, 2018.
 169. TRAVERS, J. G.; KAMAL, F. A. ROBBINS, J.; YUTZEY, K. E.; BLAXALL, B. C. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. **Circulation Research**, v. 118, n. 6, p. 1021-1040, 2016.
 170. TSAI, S. R.; YIN, R.; HUANG, Y. Y.; SHEU, B. C.; LEE, S. C.; HAMBLIN, M. R. Low-

- level light therapy potentiates NPe6-mediated photodynamic therapy in a human osteosarcoma cell line via increased ATP. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, n. 12, p. 123-130, 2015.
171. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. (2007) low-Level Laser Irradiation (LLLI) Promotes Proliferation of Mesenchymal and Cardiac Stem Cells in Culture. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, p. 373-378, 2007.
 172. VAN BREUGEL, H. H.; BÄR, P. R. He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat Schwann cells in a dose-dependent manner. **Journal Neurocytol.**, v. 22, n. 3, 185-190, 1993.
 173. VARGA, J.; LAFYATIS, R. Etiology and pathogenesis of systemic sclerosis. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. 6.ed. Elsevier, 2015. p. 1177-1189.
 174. VIEIRA, K. A.; BASTOS, C. M.; VITOR, M. G. C.; DEANA, A. M.; FERNANDES, K. P. S.; RODRIGUES, M. F. S. D.; PAVESI, V. C. S.; BUSSADORI, S. K. Use of low-level laser therapy on children aged 1 to 5 years with energy-protein malnutrition: A clinical trial. **Medicine (Baltimore)**, v. 97, p. 1-5, 2018.
 175. WANG, L.; HU, L.; GRYGORCZYK, R.; SHEN, X.; SCHWARZ, W. Modulation of Extracellular ATP Content of Mast Cells and DRG Neurons by Irradiation: Studies on Underlying Mechanism of Low-Level-Laser. **Therapy. Mediators of Inflammation**, p. 1-9, 2015.
 176. WANG, Y.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y.; LYU, P.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation of human adipose-derived stem cells using 810 nm and 980 nm lasers operates via different mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, n. 2, p. 441-449, 2017a.
 177. WANG, Y.; HUANG, Y. Y.; WANG, Y.; LYU, P.; HAMBLIN, M. R. Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 77-81, 2017b.
 178. YAZDANI, S. O.; GOLESTANEH, A. F.; SHAFIEE, A.; HAFIZI, M.; OMRANI, H. A.; SOLEIMANI, M. Effects of low level laser therapy on proliferation and neurotrophic factor gene expression of human schwann cells *in vitro*. **J Photochem Photobiol B.**, v. 107, p. 9-13, 2012.
 179. YOSHIYASU, R. Y. A. **Um estudo *in vitro* sobre os efeitos da irradiação pelo laser de Er: YAG combinado com a terapia com flúor na resistência ácida do esmalte de dentes submetidos a aparelho ortodôntico fixo**. 2001. 69f. Dissertação. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.
 180. YU, Z.; LI, Z.; LIU, N.; JIZHANG, Y.; MCCARTHY, T. J.; TEDFORD, C. E.; LO, E. H.; WANG, X. Near infrared radiation protects against oxygen-glucose deprivation-induced neurotoxicity by down-regulating neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity *in vitro*. **Metabolic Brain Disease**, v. 30, n. 3, p. 829-837, 2015.
 181. ZANOTTI, G. B.; OLIVEIRA, P. I.; REIS, S. F. S.; SILVA, F. S.; ARAÚJO, A. R. Efeitos do laser de baixa potência sobre a regeneração da cartilagem na osteoartrose / Effects of low level laser therapy for regeneration of cartilage in osteoarthritis. **Fisioterapia Brasil**, v. 12, n. 2, p. 139-146, 2011.
 182. ZHANG, J.; XING, D.; GAO, X. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 2, p. 518-528, 2008.