EFEITOS DO DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) VERMELHO NA ESTIMULAÇÃO DE FIBROBLASTOS: ÊNFASE NA REPARAÇÃO TECIDUAL.

EFFECTS OF A RED LIGHT TRANSMITTER (LED) ON THE STIMULATION OF FIBROBLASTS: WITH EMPHASIS ON TISSUE REPAIR.

ALBERTO, Talita
Faculdade de Jaguariúna

CORBO, Barbara Fioritti Blotta
Faculdade de Jaguariúna

MACINA, Elizabeth Cristina Dallari
Faculdade de Jaguariúna

LEITE, Juliana Valéria
Faculdade de Jaguariúna

INACIO, Rodrigo Fabrizzio
Faculdade de Jaguariúna/Unicamp

RESUMO: O presente estudo teve por objetivo analisar a resposta dos fibroblastos em relação à exposição á luz de LED, observando se há crescimento ou não quando expostos á sua incidência, para avaliar se de fato há estimulo do crescimento dos fibroblastos que por sua vez, atuam na regeneração dos tecidos. Foi avaliado por meio do estudo da curva de crescimento em cada dia de aplicação, utilizando células *Vero*, que são fibroblastos assim como os contidos no tecido humano. Houve dois grupos de células *Vero* em placas de Petri, sendo um grupo exposto á luz de LED e outro grupo controle que não foi exposto. Os resultados obtidos demonstraram que o LED proporcionou maior crescimento de fibroblastos com relação ao grupo controle, constatando que sua ação otimiza o tempo de crescimento das células.
Palavras Chave: LED; LED em tecido humano; Fibroblastos; Reparação tecidual.

ABSTRACT: The present study aimed to analyze the response of fibroblasts in relation to exposure to LED light, observing whether or not there is growth when exposed to it, to evaluate if indeed there is growth stimulation of fibroblasts that in turn act on tissue regeneration. This will be evaluated through the study of the growth curve on each day of application, using kidney cells *Vero*, which are similar to fibroblasts contained in human tissue. There will be two groups of Vero cells in Petri dishes, one group exposed to LED light and the other control group not exposed. The results showed that the LED provided greater fibroblast growth compared to the control group, noting that his action optimizes the time of cell growth.
Key Words: LED; LED human tissue; Fibroblasts; Tissue repair.

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um fenômeno complexo que visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. Ela consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. (MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Os fibroblastos são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização. (AMADEU *et al*., 2003).

Várias pesquisas para tratamentos de feridas têm sido desenvolvidas a caráter internacional. Esta mesma linha de pesquisa vem sendo realizada dentro de hospitais nacionais, como o de Jundiaí, no hospital São Francisco de Paula, referência em cirurgias torácicas. Na maioria das pesquisas o que mais tem sido utilizado é o tratamento através de LED terapia. O estudo da LED terapia se destaca em reparação tecidual por sua ação fotobioestimulante que acelera o crescimento celular induzindo a auto reparação. (SIQUEIRA. *et. al.,* 2009).

LED significa em inglês, Light Emitting Diode, ou Diodo Emissor de Luz. O LED é um diodo que quando energizado emite luz de característica monocromática e não coerente com alto grau de pureza que é produzida pelas interações energéticas do elétron, conduzindo uma corrente elétrica em um único sentido com propriedades de cicatrização, atenuação da dor e antivirais. (MOREIRA. 2009)

Recentemente, a terapia celular emergiu como uma estratégia terapêutica para reparação tecidual fazendo parte da denominada medicina regenerativa. Estas estratégias estão diretamente ligadas à evolução das técnicas de cultivo celular, que quando associadas à nanotecnologia e à luz LASER ou LED obtém resultados significativamente superiores. A LASER/LED terapia é considerada uma tecnologia com imensa gama de aplicabilidades desde a indústria à medicina. Pesquisas científicas vêm consolidando a

utilização do LASER/LED de baixa potência na área da saúde, principalmente nas áreas fisioterápica, dermatológica e odontológica, devido à sua capacidade em estimular o processo de proliferação celular *in vivo*. Nos últimos anos tornou-se importante a aplicação de fototerapia no tratamento de ferimentos e lesões osteocondrais pelo aumento significativo da produção de colágeno e o tratamento através da foto-quimioterapia de várias doenças graves, inclusive o câncer.

Estudos demonstram a eficiência do LED de 660nm para o tratamento de feridas afirmando que a Fototerapia promove circulação local, estimula a proliferação celular e aumenta a síntese de colágeno, elastina e ATP propiciando um recurso terapêutico opcional aos convencionais ou ser utilizado em conjunto com estes, com comprovada eficiência no tratamento de úlceras (MINATEL *et al*. 2009; MARQUES *et al*. 2004). Na pele, a luz vermelha tem ação reparadora, cicatrizante e analgésica. A intensidade dos feixes de luz emitida pelo LED na pele é mais baixa, já que suas células mantêm uma boa interação com a luz (ELDER. *et al*. 2001).

A utilização de dispositivos à base de LED também apresenta benefícios para a economia ambulatorial, por necessitar de pouco consumo de energia, apresenta vida útil longa, baixo custo e potencia de irradiação altamente segura, o que favorece sua utilização em hospitais e ambulatórios. (MOREIRA, 2009).

A aplicação de LED atuando junto aos tecidos humanos, desperta o interesse na comunidade científica, mas ainda precisa ser mais explorada, portanto deve ser avaliada sua eficácia e contribuição à população. O conhecimento deste novo recurso se faz fundamental principalmente para os da área de dermatologia funcional, responsáveis pela recuperação tecidual. A aplicação com os LEDs vermelhos vem demonstrando sucesso na recuperação tecidual mais profunda através dos resultados obtidos junto à pacientes, reduzindo em torno de 50% o tempo de cura. (MOREIRA. 2009).

A cultura de células apresenta nos dias atuais uma grande importância, tratando-se de uma ferramenta de estudo frequentemente utilizada em várias áreas de investigação das Ciências da Saúde. Espera-se que o recurso

contribua fisiologicamente no processo de reparação tecidual, demonstrando sua atuação em nível celular.

Outro aspecto importante a ressaltar será a importância deste recurso fototerapêutico na saúde pública, já que se trata de equipamentos de baixo custo e muito promissor dentro das pesquisas clínicas.

O presente estudo não oferece riscos á pacientes por ser pesquisa com linhagem celular imortalizada, não envolvendo voluntários humanos e nem animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do experimento dos tubos criogênicos da linhagem *VERO* (fibroblastos de rim de macaco verde africano) armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas pelo método convencional e colocadas em cultivo em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: Dulbeccos's modified Eagle Medium – Nutricell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell) e 1% de antibiótico (Nutricell). As células foram incubadas em estufa, em ambiente úmido, a 37°C, com atmosfera contendo 95% de O2 e 5% de dióxido de carbono (CO2). O monitoramento das células ocorreu a cada 24 horas através de microscópio Nikon invertido de fase.

Ao atingirem a subconfluência, condição na qual cerca de 75% da superfície de cultivo está coberta por células e, para evitar a confluência, situação onde o crescimento celular ser inibido pelo contato entre as células, foi realizado o subcultivo, também chamado de repique celular. Neste momento, o meio de cultura foi aspirado e a monocamada de células lavado com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBS) (Nutricell), pH 7,3 . As células foram incubadas por 2 minutos em contato com solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Nutricell). A função da tripsina de digerir e clivar as proteínas de adesão celular e do EDTA de quelar os cátions divalentes livres possibilitando que as células aderidas sejam liberadas. Em seguida a tripsina foi inativada com acréscimo de 5 ml de meio de cultura contendo 10% de SFB. O conteúdo do frasco foi transferido para um frasco cônico de 15 ml e o conteúdo precitado no fundo (pélete) ressuspendido em um ml de meio de

cultura. Esse conteúdo foi transferido para outras garrafas de 25 cm² objetivando o aumento da população celular. Para uma maior viabilidade das células o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

Técnica de coloração

Para a técnica de coloração foi adotado o Azul de Toluidina, para identificação do núcleo e do citoplasma dos fibroblastos, mantido por 60 segundos. Após esse procedimento, as células foram lavadas por duas vezes com solução tampão (PBS) e secadas em estufa a 36°C. Após isso foi feita a captação das fotos.

Contagem e Plaqueamento

Para realização dos experimentos foram utilizadas placas de petri. As células cultivadas foram contadas em hemocitômetro (câmara de Neubauer), utilizando o método de exclusão de células coradas com azul de tripan (FRESCHNEY, 2005).

As células cultivadas foram então tripsinizadas, como descrito anteriormente nos métodos de repique, e o precipitado de células resultante da centrifugação é ressuspendido em 1 ml de meio de cultura. Parte desta suspensão de células (100 µl) foi transferido para um tudo Eppendorf, onde foi adicionado 800 µl e 100 µl. Cada uma das câmaras, numeradas de 1 a 4, recebeu através de uma micropipeta 13 µl da solução contida no eppendorf. As células contidas foram submetidas a equação da câmara:

$$NT: \frac{\text{Número de células contadas X 10 (diluição) X } 10^4}{4 \text{ (número de quadrados do hemocitômetro contados)}}$$

Quando contadas as células com seu número total, foi usado a fórmula a seguir:

$$\text{Total de células}.10^4 \text{ ---------- } 10^3\ \mu l$$

$$\text{Quantidade célula p/ experimento ----------x da solução de célula } \mu l$$

Equipamento de LED

O aparelho de LED que foi usado neste experimento é produzido pela empresa Ecco Fibras®, registrado na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) sob o número 80323310003 . O aparelho é composto por quatro “Clusters” (arcadas), sendo elas o LED azul, o vermelho, o âmbar e o infravermelho. Para este experimento, somente o LED vermelho (660 nm) foi utilizado.

Protocolo de irradiação

Após 24 horas de plaqueamento e antes de cada irradiação, todos os meios de cultura foram trocados. Cada grupo recebeu múltipla radiação do LED, sendo esta em sentido cruzado.

No momento da aplicação, as placas foram suspensas e sua superfície inferior irradiada com o LED vermelho 660 nm. Após a aplicação as células foram devidamente acomodadas na incubadora. Esse protocolo foi realizado a cada 24 horas por 8 dias.

As células controle foram mantidas fora da incubadora sofrendo as ações do meio externo, como as células tratadas com o LED vermelho 660 nm, levando em consideração tempo e condições ambientais.

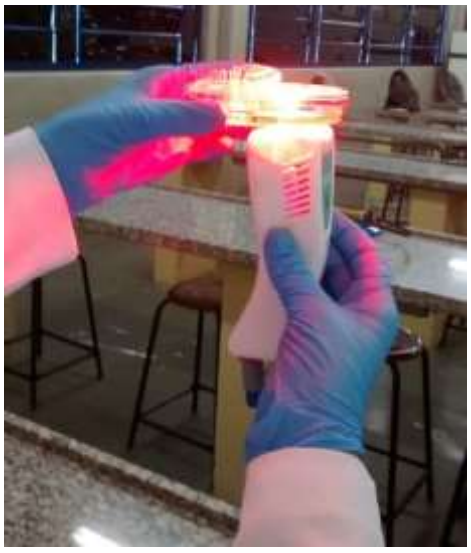

Figura 1: Aplicação do LED através do método varredura em células *Vero* cultivadas em placas de Petri. Fonte: Arquivo pessoal.

Curva de crescimento

As células foram fotografadas em campos aleatórios, tanto do grupo tratado quanto do grupo controle, sendo totalizadas 32 fotos. As células foram contadas através de programas especiais (Image Tool).

Quantificação dos resultados

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. A análise de eventuais diferenças intergrupos foi realizada pela Anova, seguido pelo teste t-Student. Assim, assumiu-se $p<0,05$ (*), $p<0,01$(**), $p<0,001$(***), utilizando-se as funções estatísticas do programa BioEstat.

RESULTADOS

O presente estudo demonstrou o aumento da proliferação de fibroblastos conforme a prancha e o gráfico abaixo. No tempo 1 ambos os grupos encontram-se na mesma proporção de crescimento celular. No tempo 2 nota-se uma discreta diferença entre o grupo LED e o grupo controle, sendo o grupo LED o de maior proliferação. No tempo 3 o grupo LED apresenta um crescimento importante, recobrindo boa parte da superfície analisada. No tempo 4 o grupo LED ultrapassa os valores obtidos no grupo controle, recobrindo toda a superfície e apresentando maior quantidade de células. Os resultados obtidos demonstraram que o LED proporcionou maior crescimento de fibroblastos com relação ao grupo controle, constatando que sua ação otimiza o tempo de crescimento das células.

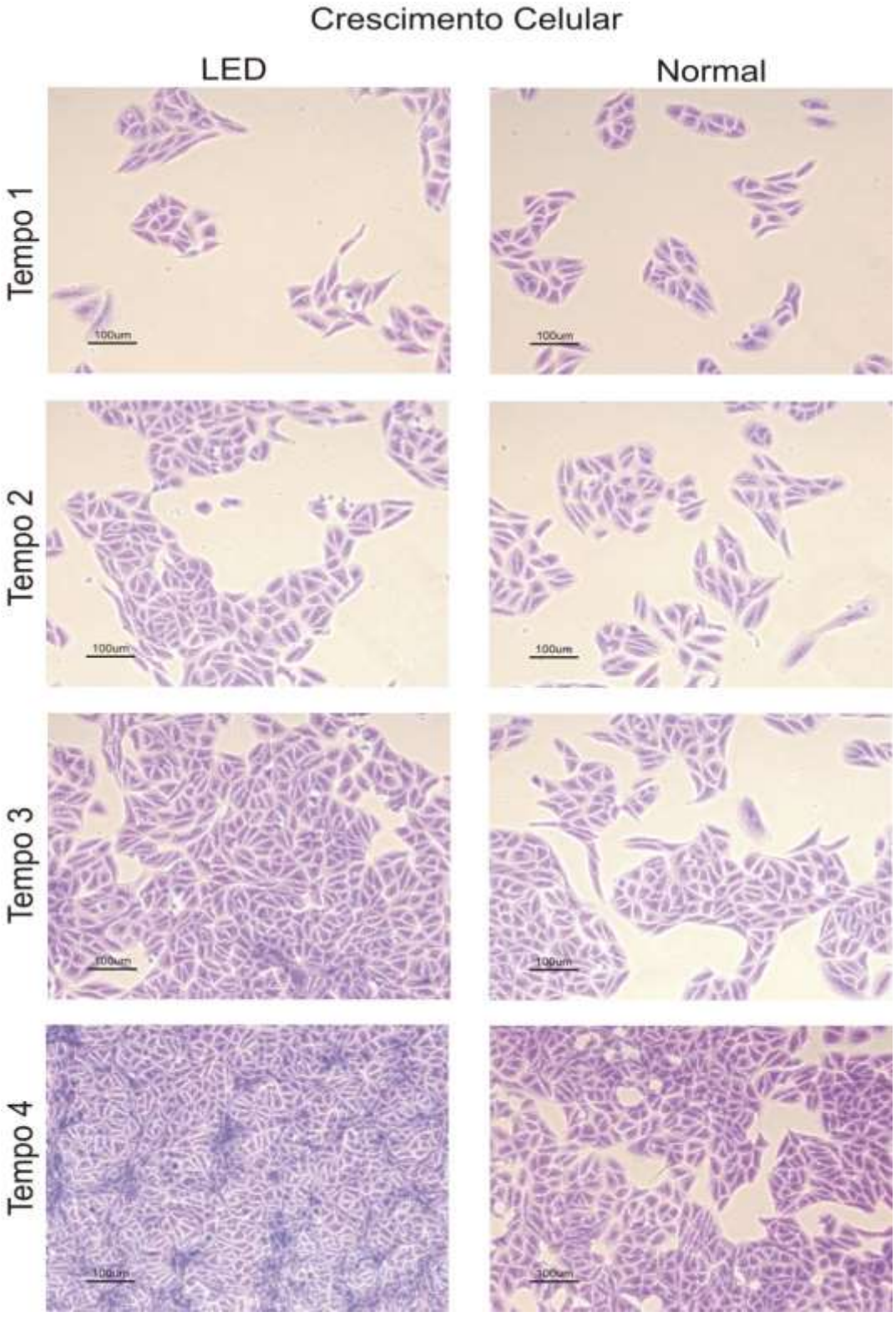

Figura 2: Prancha comparativa de crescimento celular evidenciando o crescimento mais significativo em células submetidas ao LED. Tempo 1 após 2 dias, tempo 2 após 4 dias, tempo 3 após 6 dias e 4 após 8 dias do inicio da aplicação. Fonte: Arquivo pessoal.

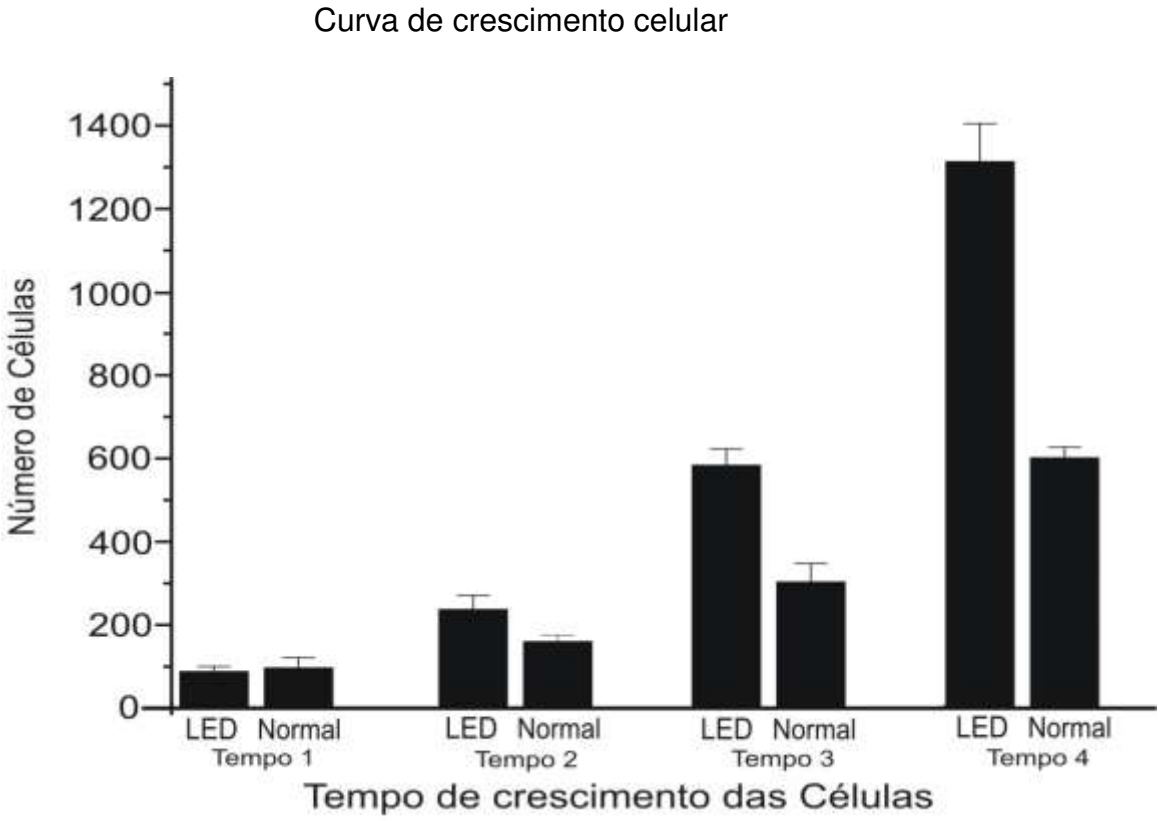

Figura 3: Gráfico da curva de crescimento de cada tempo de aplicação. Fonte: Arquivo pessoal.

DISCUSSÃO

A terapia com luz representa uma das mais antigas modalidades usadas para tratamento de várias condições de saúde. O uso de luz de laser de baixa intensidade e Diodo emissor de luz (LED) é agora aplicado em milhares de pessoas pelo mundo a cada dia, para várias condições patológicas ou estéticas.

Segundo (SMITH, 1991) foi demonstrado que cromóforos da cadeia respiratória mitocondrial, bem como da membrana celular são capazes de absorver a luz na região do infravermelho e próxima ao vermelho. Conforme (LUBART *et al.*, 1992) há formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), alterações do pH intracelular e das concentrações de cálcio podem ser parte dos caminhos da transdução de sinal das respostas biológicas induzidas pela luz (laser) de baixa intensidade.

O processo de bioestimulação laser é um fenômeno fotobiológico, como a luz de LED, não sendo necessário que a luz seja coerente. Os fotoaceitadores primários fazem parte dos componentes da cadeia respiratória, que dependendo da dose podem ser estimulados ou inibidos. A radiação laser é apenas uma desencadeadora para regulação do metabolismo celular e por esse motivo é que são necessárias apenas baixas doses de energia. O Efeito sobre a célula vai depender do estado fisiológico que se encontra. Os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade poderiam ser explicados por um aumento da proliferação celular, ou por mudanças das atividades fisiológicas de células excitáveis (RIBEIRO, 2000).

Devido a grande ocorrência de úlceras cutâneas em humanos, há a necessidade de buscar terapias eficazes e benéficas que auxiliam na redução do tempo de cicatrização, diminuindo os transtornos aos pacientes. Conforme o estudo realizado por Vinck *et al* (2003), que utilizou cultura de fibroblastos obtidos de embriões de frango, onde foi aplicado LED de 660 nm. Foi constatado um aumento na proliferação dos fibroblastos após aplicação desta fototerapia. Relatam ainda que tais resultados indicam um potencial benéfico do tratamento com LEDs para casos de úlceras cutâneas em humanos, caso sejam feitas aplicações com uma dosimetria adequada.

Whelan *et al*. (2001), analisaram bioquimicamente a resposta em tratamento de feridas com LED de 880 nm e fluência 4J/cm² nos dias 0, 4, 7, e 14. Eles perceberam que os fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) apresentavam níveis significativos em todos os dias de análise, principalmente no quarto dia, demonstrando resultados positivos no aumento da taxa de crescimento da cicatrização das feridas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o estudo empregado conclui-se que o uso do Diodo Emissor de Luz (LED) vermelho otimiza o tempo de crescimento dos fibroblastos de células *Vero*, comprovando sua eficácia quando comparada ao grupo controle que não recebeu a estimulação. Visto que fibroblastos atuam na reparação tecidual, pode-se deduzir que em células humanas também haverá

uma resposta de crescimento, porém há necessidade de maiores estudos diretamente em seres humanos para comprovar sua real atuação.

REFERÊNCIAS

ABBADE, Luciana Patrícia Fernandes. LASTORIA, Sidnei. **Abordagem de pacientes com ulcera da perna de etiologia venosa.** Anais Brasileiros de Dermatologia, 2006. edição: 6, pagina: 509- 522. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/ v81n6/v81n06a02.pdf>. Acesso em: 11 Novembro 2013.

BASTOS, Jessica. **Estudo comparativo de sistemas a base de Lasers, LEDs e Ultra-som (US) de baixa intensidade no reparo tecidual de tendão calcâneo.** 89p. Dissertação (Mestrado) 2008. Programa de Pós graduação Interunidades em Bioengenharia- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. Acesso em: 20 de Outubro de 2013.

LUBART, R. Wollman Y. Friendmann H. Rochkind S. Laulicht, I. **Effects os visible and near-infrared lasers on cell cultures.** 1992. J Photochem Photobiol B. 12:305-10. Acesso em: 11 de Novembro de 2013.

MOREIRA, Mauro Ceretta. **Utilização de Conversores Eletrônicos que alimentam LEDS de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica**. 2009. Disponível em: <http://cascavel.cpd.ufsm.br/tede/tde_arquivos/7/TDE-2010-02-09T100359Z-2426/Publico/MOREIRA,%20MAURO%20CERETTA.pdf.> Acesso em: 12 Outubro 2013.

PAGNANO, Leonardo de Oliveira; ARTONI, Silvana Martinez Baraldi; PACHECO,Maria Rita; SANTOS,Edanir dos Santos; OLIVEIRA, Daniela; LUI,Jeffrey Frederico. **Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula**. Revista :Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.6, p.1662-1666, setembro 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n6/a26v38n6.pdf>. Acesso em: 10 Maio de 2014.

RIBEIRO, M.S. **Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele.** 2000. (Tese Doutorado). São Paulo: Instituto de Pesquisa Nuclear, IPEN/USP. Acesso em: 12 de Outubro de 2013.

SMITH K.C.**The photobiological basis of low level lase radiation therapy**. 1991. Laser Ther. 3:19-24. Acesso em: 12 de Outubro de 2013.

SIQUEIRA, Cláudia Patrícia Cardoso Martins; FILHO, Dari de Oliveira Toginho ;

LIMA, Franciele Mendes de; SILVA, Francisco Pereira ; DURANTE, Henrique; DIAS,Ivan Frederico Lupiano ; DUARTE, José Leonil; KASHIMOTO,Roberto Kiyoshi; CASTRO, Valdênea Aparecida Bordinassi de. **Efeitos biológicos da luz: aplicação de terapia de baixa potência empregando LEDs (Light Emitting Diode) na cicatrização da úlcera venosa: relato de caso.** 2009. Acesso em: 20 Outubro 2013.

ZIMMET, S.E. **Venous leg ulcers: modern evaluation and management.** Dermatologic Surgery. 1999; Edição:25, pagina:236-241. Acesso em: 20 Outubro 2013.