



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Ana Carolina Picolo Pasian**

**CONTRIBUIÇÃO DO LED 850 nm, PULSÁTIL, NA CULTURA  
DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), linha de pesquisa: Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Rossi Ferreira

**Botucatu  
2018**

Ana Carolina Picolo Pasian

CONTRIBUIÇÃO DO LED 850 nm, PULSÁTIL, NA  
CULTURA DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), linha de pesquisa: Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadora: Profa.Dra. Rosana Rossi Ferreira

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pasian, Ana Carolina Picolo.

Contribuição do LED 850 nm, pulsátil, na cultura de células-tronco mesenquimais / Ana Carolina Picolo Pasian.  
- Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rosana Rossi Ferreira

Capes: 90194000

1. Células-Tronco. 2. Terapia com luz de baixa intensidade. 3. Células - Cultura e meios de cultura. 4. Terapia celular. 5. Fototerapia.

Palavras-chave: Bioestimulação; Célula-Tronco Mesenquimal; Cultura Celular; LED ; Terapia Celular.

*Dedicatória*

*Dedico este trabalho à memória da minha mãe, Silene Ap. Pico Pasian, não são poucos os admiradores que ela deixou, dentre os quais, sou uma dos mais ardorosas.*

*Mãe, você foi meu maior exemplo de amor, fé e dedicação.*

*Não há ciência, que possa me ensinar os valores e princípios que você me deixou como herança.*

*Agradecimientos*

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me darem força e sabedoria para lidar com as dificuldades que encontrei nessa caminhada. Por solidificarem cada vez mais minha fé, me trazendo a confiança de que Seus planos são maiores e melhores que os meus.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes me ensinando e me proporcionando sempre as melhores oportunidades, além do carinho, presença e amor incondicional. Em especial ao meu pai José Ademir, por ser exemplo de pai, homem e de força estando sempre ao meu lado, trazendo segurança e paz. Obrigada por me apoiar em todas as minhas decisões, e por tornar real todos os meus sonhos. Amo vocês.

À minha irmã Marina, que com seu jeito e com as suas atitudes me ensina e me motiva a ser melhor a cada dia. Obrigada por ser meu porto seguro. Você é a melhor herança que nossos pais poderiam ter me deixado. Amo você.

À minha avó Aparecida por ser exemplo de vida para todos nós, por ser força nas nossas batalhas e ao mesmo tempo segurança e calma.

Em memória da minha avó Aurora, aos meus tios, tias e primos que sempre se fazem presentes, me apoiando e me incentivando. Sei que vocês torcem muito por mim.

As minhas amigas, Juliana, Julia, Nicololy, Heloísa, Mariana, Camila, Lais Galli e Rafaella, que há anos caminham comigo, me apoiam, e tornam meus dias mais leves e felizes.

À minha orientadora, professora e amiga Dra. Rosana Ferreira que me proporcionou a oportunidade de estar em Botucatu. Obrigada por todos os ensinamentos, pela generosidade, compreensão e carinho nesses anos todos juntas. Minha eterna gratidão por confiar em mim.

À professora Dra. Elenice Deffune por sempre estar por perto tornando a caminhada profissional e pessoal mais leve. Obrigada por ser espelho, por me apoiar e me guiar também nessa nova fase profissional.

As minhas amigas do laboratório e da vida, Helga, Laís e Heloísa, aprendi muito com vocês e agradeço pela alegria e momentos de descontração e felicidade que vocês me propuseram em meio ao turbilhão de mudanças pelas quais passei. Vocês são, sem dúvida, grandes amigas que levarei sempre comigo. Muito obrigada.

A toda equipe do Laboratório de Engenharia celular que esteve comigo ao longo desses 6 anos de caminhada. Em especial a Ana Livia pela disponibilidade em me ajudar nas atividades propostas com disciplina e organização. Seus conhecimentos e colaboração tornaram possível a realização desse trabalho. Vou guardar todos você no meu coração.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo, em especial a Marjorie e Aline pelo apoio e prestatividade de sempre. Sem a disponibilidade de vocês este trabalho não seria concluído. Muito obrigada!

Ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos da USP, pela parceria e confiança em nosso trabalho.

Aos animais sacrificados para a realização deste trabalho.

A todas as demais pessoas que me ajudaram de alguma maneira nesse momento de minha jornada. Meu muito obrigado.



*Epígrafe*

*"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."*

*José de Alencar*

*Resumo e Abstract*

## Resumo

A medicina regenerativa é uma área em crescente expansão no Brasil e no mundo, a qual procura ampliar a capacidade natural de regeneração dos tecidos através da utilização de células, fatores de proliferação e biomateriais. Um dos ramos da medicina regenerativa é a terapia celular, vertente que utiliza células-tronco, visando a substituição de tecidos funcionalmente ou estruturalmente lesados, apresentando um caráter terapêutico. Na medicina LASERs e LEDs vem sendo estudados como ferramenta terapêutica, mostrando possuir capacidade bioestimulatória. Este campo é caracterizado por uma variedade de metodologias, que são utilizadas em uma gama considerável de aplicações. Na técnica de fotoestimulação, utiliza-se a luz para ativar moléculas e funções celulares, apresentando o potencial de afetar a proliferação e diferenciação e o metabolismo da célula, estimulando a fosforilação oxidativa e podendo reduzir a resposta inflamatória local. Entretanto para que essa resposta ocorra, inúmeros trabalhos afirmam sobre a importância da seleção de um comprimento de onda ideal, uma vez que a utilização de um comprimento inapropriado pode acarretar em resultados contrários aos esperados, como a bioinibição. Diante destes achados o presente trabalho propôs-se a avaliar a ação do LED 850nm, no regime pulsátil, nas doses de 3, 5 e 10J/cm<sup>2</sup> na cultura de célula-tronco mesenquimal (CTM) com Soro Fetal Bovino (SFB) e com Hormônios derivados de plaquetas (HDP), e na cultura de células de Linfoma linfoblástico tipo B, RAJI Cells na dose de 10J/cm<sup>2</sup>. Em ambos experimentos de exposição a luz, o comprimento de onda 850 nm inibiu a proliferação celular. Na cultura de CTM o LED tornou o desdobramento celular mais lento e acarretou na diminuição da confluência celular, especialmente nas doses de 5 e 10J/cm<sup>2</sup>. Na cultura de linfoma Linfoblástico tipo B, em apenas 1 semana de exposição o mesmo comportamento de bioinibição foi encontrado na dose de 10J/cm<sup>2</sup>. O grupo não tratado apresentou 7,0 X 10<sup>5</sup> células, em média, por frasco enquanto que as células submetidas à irradiação sofreram diminuição do tempo de desdobramento sendo a concentração destas de 4,2X10<sup>5</sup>, em média, por frasco.

Palavras-chaves: célula-tronco mesenquimal, cultura celular, terapia celular, bioestimulação, LED.

## **Abstract**

Regenerative medicine is a promising growing area worldwide, with the aim of restore and regenerate tissues and whole organs through the use of cells, proliferation factors and biomaterials. One branch of regenerative medicine is cell therapy, that uses stem cells, aiming at the substitution of functionally or structurally damaged tissues, presenting therapeutic future. LASERs and LEDs are available as therapeutic tools, showing biostimulating ability. The photo-stimulation technique uses light to activate molecules and cellular functions, presenting potential to affect proliferation, cell differentiation and metabolism, stimulating oxidative phosphorylation and reducing the local inflammatory response. Data shows the importance of selecting an ideal wavelength, such as the use of an inappropriate choice, can lead to undesired results, such as bioinhibition. In the present work, we evaluated the action of LED 850nm, pulsatile, at the doses of 3, 5 and 10J/cm<sup>2</sup> in mesenchymal stem cells (CTM) with Bovine Fetal Serum (FBS) and with derived platelets – Hormones (HDP) and B-cell lymphoblastic cell culture, 10J /cm<sup>2</sup>, RAJI cells. In all light exposure experiments, wavelength of 850 nm inhibited cell proliferation. CTM culture, LED had a low proliferation rate, resulting in a decrease in cellular confluence, especially at 5 and 10J/cm<sup>2</sup>. Lymphoblastic lymphoma type B cells, in only one week of exposure presented the same behavior of bioinhibition at 10J/cm<sup>2</sup>. The control group had 7.0 x 10<sup>5</sup> cells on per vial, while cells subjected to irradiation underwent the unfolding time at a concentration of 4.2 x 10<sup>5</sup> on average per vial.

Key words: mesenchymal stem cells, cell culture, cell therapy, biostimulation, LED

## *Lista de Abreviaturas*

## Lista de Abreviaturas

ADP - Adenosina difosfato

ATP - Adenosina trifosfato

APC - Aloficocianina

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social

CD - *Cluster of Differentiation*

CTM - Célula- tronco mesenquimal

CT - Células-tronco

CEPOF Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica

CEUA - Comitê de Ética em pesquisa no uso de animais

CF - Citometria de Fluxo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CA - Contador Automático

CTL - Controle

DMEM-F12 - *Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EGF - *Epidermal growth factor*

FMB - Faculdade de Medicina de Botucatu

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

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

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FNS - Fundo Nacional de Saúde

HC - Hospital das Clínicas

HE - Hematoxilina-Eosina

HEPES - *4-(2-hidroxietyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HDP - Hormônios derivados de plaquetas

IL – interleucina

IFSC - Instituto de Física de São Carlos

IP - Iodeto de Propídeo

LEC - Laboratório de Engenharia Celular

LAC - Laboratório de Atividades Complementares

LASER - *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LBE - LASER de baixa energia

LAT - Laboratório de Apoio Tecnológico

LED - *Light Emitting Diode*

MIF - Intensidade de fluorescência

NASA - *National Aero Space Agency*

NT - Não tratado

PE - Ficoeritrina

PERCP - Proteína Clorofila Peridinina

PRP - Plasma rico em Plaquetas

PDGF - *Platelet-derived growth factor*

POP - Procedimento Operacional Padrão

RNA - Ácido ribonucleico

SFB - Soro Fetal Bovino



TA - Tecido Adiposo

UNIPEX - Unidade de Pesquisa Experimental

USP - Universidade de São Paulo

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

VEGF - Fator De Crescimento Endotelial Vascular

***Lista de Figuras***

## Lista de Figuras

Figura 1 - Ação dos Diodos Emissores de Luz.....	33
Figura 2 - Imagem do Countess™ disponibilizadas pelo sistema durante a contagem celular.....	39
Figura 3 - Detalhe da <i>biotable</i> produzidas pelo CEPOF/LAT.....	40
Figura 4 - Representação esquemática do plaqueamento das CTM e bioestimulação.....	42
Figura 5 - Representação esquemática dos procedimentos realizados até a bioestimulação.....	43
Figura 6 - Esquema comparativo do crescimento das células pré e pós experimento.....	45
Figura 7 - Fotomicrografia das culturas irradiadas e controle.....	51
Figura 8 - Identificação macroscópica de “membrana” formada por polimerização do HDP em meio de cultura.....	53
Figura 9 - Fotomicrografia de <i>scaffold</i> formado na cultura de CTM suplementado com HDP, irradiado a 10J/cm <sup>2</sup> .....	53
Figura 10 - Cultura CTM <sub>1</sub> suplementada com HDP.....	54
Figura 11 - Cultura CTM <sub>2</sub> suplementada com HDP.....	54
Figura 12 - Cultura CTM <sub>3</sub> suplementada com HDP.....	55
Figura 13 – Representação do resultado da Imunofenotipagem com três marcadores negativos (CD34, CD45 e CD11b) .....	57
Figura 14 – Representação do resultado da Imunofenotipagem com três marcadores positivos (CD90, CD71 e CD106) .....	58
Figura 15 - Cultura de células de Linfoma Linfoblástico tipo B.....	61

*Lista de quadros*

## Lista de Quadros

Quadro 1 - Dose e tempo de exposição durante a bioestimulação .....	41
Quadro 2 - Representação da coloração quanto a morte celular.....	44
Quadro 3- Média da Intensidade de Fluorescência nas amostras não tratadas e irradiadas com 3,5 e 10J/cm <sup>2</sup> , com painel de caracterização fenotípica de CTM.....	56

## *Lista de Gráficos*

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM <sub>1</sub> irradiada e não irradiada .....	46
Gráfico 2 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM <sub>3</sub> irradiada e não irradiada .....	47
Gráfico 3 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM <sub>2</sub> irradiada e não irradiada .....	48
Gráfico 4 – Taxas de confluência das 3 amostras de CTM tratadas e não tratadas.....	49
Gráfico 5 – Gráfico 5 – Relação entre número de ampolas (10 <sup>6</sup> células por unidade) congeladas e dose.....	50
Gráfico 6 – Imunofenotipagem de CTM por citometria de Fluxo.....	60
Gráfico 7 – Contagem celular em D0 e D+7 da cultura da linhagem RAJI tratada e não tratada. ....	62

## *Sumário*

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>26</b>
1.1 Medicina Regenerativa e Terapia Celular.....	26
1.2 Células-tronco mesenquimais (CTM) .....	27
1.3 Hormônios derivados de plaquetas e soro fetal bovino .....	29
1.4 LED .....	30
1.5 Possível utilização do LED em células tumorais .....	34
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	36
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>37</b>
3.1 Infraestrutura e Instalações do Laboratório .....	37
3.2 Obtenção das Amostras .....	37
3.3 Caracterizações da CTM – TA pré-experimento .....	39
3.4 Aplicação do LED Pulsátil nas culturas de CTM .....	40
3.5 Cultura de Linhagem RAJI – CEPA ATCC® CCL-86™ .....	43
3.6 Análise Estatística .....	44



<b>4. Resultados e Discussões .....</b>	<b>45</b>
4.1 Aspectos morfológicos das culturas de CTM durante o experimento .....	50
4.1.1 Culturas utilizando Soro Fetal Bovino (SFB) .....	50
4.1.2 Culturas utilizando Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP) .....	52
4.2 Imunofenotipagem .....	55
4.3 Cultura de Linhagem de Linfoma Linfoblástico tipo B, <i>Raji cells</i> .....	61
4.3.1 Contagem e viabilidade celular .....	61
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>64</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Medicina Regenerativa e Terapia Celular

A engenharia de tecidos, terapia com células-tronco, fatores de regeneração, matrizes extracelulares e clonagem terapêutica são denominações que foram unidas em um único termo, a medicina regenerativa. Nestas técnicas diferentes tipos de células são isolados de amostras de tecido para a produção de culturas em monocamada de um único tipo de célula. Atualmente, sem dúvida, podemos afirmar que a medicina regenerativa apresenta-se como uma das áreas mais promissoras na pesquisa biomédica. (OLIVEIRA, 2012) Um dos ramos da medicina regenerativa é a terapia celular, vertente que utiliza células-tronco, visando à substituição de tecidos funcionalmente ou estruturalmente lesados, apresentando um caráter terapêutico. Este tipo celular tem a capacidade de exercer o papel das células danificadas pois detêm a capacidade de auto renovação e potencial de diferenciação em outros tipos celulares, podendo assim constituir novos tecidos (NUNES, 2014).

Dentro da Engenharia de Tecidos uma das áreas de constante alvo de estudo é a aplicação de hemoterapia na terapêutica experimental e clínica. Realizando um breve histórico da engenharia de tecidos com a utilização de hemocomponentes, ainda em 1997, Whithman D.H. et al. relataram suas experiências de integrar o plasma rico em plaquetas (PRP) com cola de fibrina dando início a inúmeros experimentos relacionados a esta área. Ainda nessa linha Marx et al. (2004) demonstraram que o PRP era capaz de induzir a regeneração óssea. Em 2001, Deffune e Rossi iniciam a aplicação do plasma humano na composição de curativos bioativos cuja base fundamental é o conjunto de proteínas do sangue. Em 2003, este mesmo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, recebeu a aprovação do CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para estudos em seres humanos na linha de biocurativos (GARCIA, 2004). Assim, em 2005 iniciam-se avaliações da cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas em meio enriquecido com hormônios

derivados de plaquetas (HDP) na diferenciação osteogênica e análise de adesão celular a pinos de titânio para implantes dentários (FRANZOLIN, 2008).

Em 2011, o grupo de pesquisa do LEC iniciam a produção de novos *scaffolds* utilizando hormônios derivados de plaquetas (HDP) na engenharia de tecidos com foco na restauração de lesões crônicas de pele utilizando celulose bacteriana e quitosana (ARAÚJO, 2007; CARVALHO, 2009; MOROZ, 2009; CARVALHO, 2009; MOROZ, 2010; ASSUNÇÃO, 2011; MOROZ, 2012; NUNES, 2014).

## **1.2 Células-tronco mesenquimais (CTM)**

Células-tronco (CT) são por definição, células indiferenciadas. Segundo Vats et al. (2002), quanto ao seu potencial, as CT podem ser classificadas como: totipotentes em que podem dar origem a todas as células/tecidos que contribuem para a formação do organismo por exemplo zigoto; ou pluripotentes as quais originam a maior parte das células/tecidos do organismo como as CT embrionárias; e ainda multipotentes, em que tem a capacidade de formar um número reduzido de células/tecidos, restritos de uma camada germinativa como por exemplo as da medula óssea ou as células-tronco mesenquimais (CTMs).

As CTMs são células encontradas em tecidos adultos, sendo frequentemente utilizadas em pesquisa devido a sua capacidade de regeneração, auto renovação de tecidos e alto índice de proliferação (BARRY & MURPHY, 2004; KERN et. al., 2006).

As CTMs além de expressarem receptores para citocinas e fatores de crescimento, secretam uma grande variedade de quimiocinas, Dessa forma, as mesmas interagem com as células residentes e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com essa sinalização (TAKAHASHI et al., 2007).

Ao analisar os dados de literatura, nota-se que a medula óssea vem sendo uma das principais fontes de obtenção de CTM, porém para a sua retirada é um procedimento altamente invasivo ao paciente. (BARRY & MURPHY, 2004; KERN et al., 2006). Devido a esta dificuldade surge a

importância da obtenção deste tipo celular presente no tecido adiposo, que, além de representar uma fonte abundante de células para transplantes autólogos, e ser facilmente obtido por lipoaspiração, é um método mais barato e menos invasivo se comparado à punção da medula óssea. (HA, et al., 2003). Além disso, tecido adiposo também apresenta número de células adequado para transplante, e alta capacidade de proliferação celular *in vitro*; características estas que contribuem para o sucesso das pesquisas e futuras aplicações. (BARRY & MURPHY, 2004; KERN et al., 2006).

Segundo Coleman (1995), o tecido adiposo pode estar disponível em quantidades 100mL a 1L por meio da lipossucção, apresentando mínima morbidade. Huss (2000), afirma que as CTMs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células.

Segundo Covas (2006), todas as células apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica, esta é uma maneira de marca-las, ou seja, é possível identificar as células pelos marcadores que elas contêm. Contudo, diferentemente de outras células, apresentam poucos marcadores específicos, sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos (ALHADLAQ & MAO, 2004; MEIRELLES et al., 2006).

Essa identificação ocorre através da técnica denominada Imunofenotipagem onde são utilizados anticorpos monoclonais que reconhecem estes antígenos de superfície da membrana das células (MEIRELLES *et al.*, 2006).

Através de estudos de Chamberlain (2007) e Bydlowski (2009), sabe-se que a população de CTM isolada expressa em sua superfície marcadores como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- $\beta$ ), CD73 (SH3 e SH4), CD90, Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese), e CD7.

Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, como, por exemplo: CD11b (marcador de célula imune-integrina Mac-1), CD14

(receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD34 (receptor de células endoteliais) e CD45 (presentes em todas as células hematopoiéticas). Portanto, a ausência principalmente dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície dessas células mesenquimais permite distingui-las das precursoras hematopoiéticas (KOLF et al., 2007). Com todas estas características apresentadas, as CTMs tornaram-se o foco das pesquisas atuais, fornecendo perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular, (MONTEIRO et al., 2009).

### **1.3 Hormônios derivados de plaquetas (HDP) e soro fetal bovino (SFB)**

Atualmente, a cultura celular está se tornando uma ferramenta fundamental para pesquisa e uso terapêutico onde dentro da rotina da cultura celular, o SFB é rotineiramente utilizado. Este apresenta alta concentração de fatores de crescimento e baixa concentração de gamaglobulinas, comparado a outros soros animais,. Devido a isso é utilizado como suplemento padrão de meio de cultura celular, normalmente em concentração de 5% a 20% no meio de cultura. (VANNI, 2016)

Sua composição apresenta variados componentes como hormônios, vitaminas, aminoácidos, lipídios, proteínas de transporte além de fatores de proliferação e de crescimento. Como as concentrações dos nutrientes podem mudar de lote para lote, e a composição do SFB não é totalmente conhecida (podendo conter vírus ou príons), complicações imunológicas podem ocorrer, uma vez que o soro possui proteínas que estimulam a imunogenicidade humana de modo persistente (NIMS, R. W.; HARBELL, J. W., 2017). Desde 1991, Johnson, e colaboradores, já comprovaram através de seus estudos feitos pacientes queimados que receberam transplante de queratinócitos cultivados *in vitro*, que os mesmos desenvolveram respostas imunes contra proteínas séricas presentes na cultura, as quais levaram à rejeição desses enxertos. Ainda acerca do tema, Vanni, 2016 afirma que nenhuma solução financeiramente acessível e eficaz foi encontrada, uma vez que os chamados substitutos do soro fetal para cultura de células ultrapurificados são extremamente caros (aproximadamente 1.500 dólares o frasco de 500 ml) tornando seu uso proibitivo. Desta forma fica evidente a

importância de alternativas que poderão substituir o SFB na cultura de células-tronco, visando principalmente a aplicação clínica e minimizando assim, a possibilidade de complicações imunológicas relacionadas com o uso de componentes xenobióticos.

O HDP, por sua vez é secretado pelas plaquetas. Estas são pequenos fragmentos celulares anucleados, com aproximadamente 1-3µm de diâmetro e sua função primária de hemostasia e a secundária de angiogênese, imunidade inata e cicatrização de tecidos danificados. No seu citosol encontram-se numerosas organelas incluindo grânulos alfa e densos, peroxissomos, lisossomos e mitocôndrias. Os grânulos densos contêm o ADP, ATP, histamina, serotonina e cálcio. Já os  $\alpha$  contêm fator 4 plaquetário, PDGF, VEGF, EGF, TGF- $\beta$ , fibrinogênio, fibronectina, inibidor I do ativador de plasminogênio (PAI I), Fatores V, VIII, Fator von Willebrand, entre outras proteínas (VANNI, 2016) . Devido a essa grande quantidade de fatores de crescimentos que as plaquetas apresentam, as mesmas tornaram-se alvo na aplicação na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, tanto na clínica como na pesquisa. O HDP, quando utilizado em concentração ideal na cultura promove a gelificação do meio resultando em um aspecto 3D.

O cultivo de células *ex-vivo* vem sendo realizado há muitos anos, porém, a possibilidade de crescimento de tecidos tridimensionais complexos vem sendo desenvolvimento somente recentemente. *Scaffold*, portanto, traduz-se por uma matriz tridimensional, podendo ser natural ou sintética. Nesta estrutura as células providas com as condições e sinais adequados para sua viabilidade, irão secretar determinados componentes de matriz extracelular e criar, de fato, um tecido vivo, a ser reimplantado no sítio defeituoso do paciente (NUNES, 2017.)

#### **1.4 LED**

A óptica é um campo que lida não somente com a propagação da luz, mas também com sua produção e mecanismos de interação com a matéria. Sua grande aplicabilidade nos tempos atuais, deve-se muito, à existência de equipamentos que emitem a radiação pela técnica denominada LASER (do termo em inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), a qual apresenta propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico (BAGNATO, 2001). A técnica do LASER, produz feixes de

luz coerente e monocromático, ou seja, ao visualizar o espectro será observado apenas por uma linha, composto por apenas um comprimento de onda bem definido. (BAGNATO, 2001). Já a luz produzida pelo LED é um tipo de luz divergente e não coerente, e apesar de não ser monocromática como um laser, consiste de uma banda espectral relativamente estreita (CASTRO, 2016).

Na medicina o LASER foi por muito tempo utilizado apenas como uma ferramenta de corte cirúrgico em diferentes procedimentos médicos. Contudo, recentemente tem sido estudado como ferramenta terapêutica, mostrando possuir capacidade bioestimulatória, bem como em terapias modernas tais como a fotodinâmica. O campo da bioestimulação é caracterizado por uma variedade de metodologias, e geralmente usa-se de várias fontes de luz (LED ou LASER) com diferentes parâmetros como: comprimento de onda, a potência de saída de onda contínua, ou modos de funcionamento (pulsado ou contínuo) (GARCIA, 2015). A principal vantagem do LED consiste na ausência de um filamento, fato este que reduz o efeito joule (produzido pelo atrito entre os elétrons). Seu rendimento é maior, pois uma porcentagem muito mais alta de energia elétrica está indo diretamente para a geração de luz, o que diminui consideravelmente a demanda de consumo. Assim, os LEDs vem apresentando-se eficazes para a bioestimulação e para a terapia fotodinâmica, permitindo uma gama considerável de aplicações. (BAGNATO et al., 2006). Ainda segundo Bagnato (2001), nas áreas ligadas à saúde, a óptica tem estado presente de forma bastante significativa nos últimos anos, isto porque na técnica de fotoestimulação, utiliza-se a luz para ativar moléculas e funções celulares, e a mesma tem o potencial de afetar a proliferação celular e a diferenciação uma vez que afeta diretamente o metabolismo da célula (VELOSO, 2010).

Segundo a literatura, a bioestimulação também pode proporcionar ao organismo uma melhor resposta à inflamação, com conseqüente redução de edema e minimização da dor, desta forma esse tipo de terapia apresenta-se como uma alternativa para processos que apresentem necessidade de regeneração tecidual (SILVA et al., 2007).

Há mais de 20 anos, o princípio da bioestimulação vem sendo promovida, inicialmente pelo LASER. A técnica bioestimulatória, iniciou-se na área da dermatologia, mais especificamente, no processo de reparo de feridas cutâneas.

Depois, foi sugerido que a bioestimulação também poderia ser útil para acelerar a cicatrização de feridas bucais como aftas, herpes labial, parestesias, e pós operatórios (CAMELO, 2007).

Para compreender a interação da radiação com o tecido biológico é necessário levar em consideração as propriedades ópticas do tecido, o comprimento de onda da radiação de excitação, a densidade de potência (irradiância) e de energia (fluência) entregues a este tecido (LUBART, 1992). Pesquisas realizadas por Catão (2004), e Baros (2008), utilizando LASERs de baixa potência, demonstram seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes, com baixas densidades de energia, e comprimentos de onda capazes de penetrar nos tecidos, contribuindo diretamente no processo de reparo tecidual. Além disso, pesquisas apontam que o LASER de baixa energia (LBE) aumenta o metabolismo celular, estimula a fosforilação oxidativa e reduz a resposta inflamatória local, alterando positivamente as propriedades eletrofisiológicas do tecido irradiado (CAPON et al., 2001; REDDY, 2003).

Estudos *in vitro* de culturas de queratinócitos revelaram a técnica estimula a liberação de citocinas (IL-6 e IL-8) e fatores de crescimento e diferenciação que por sua vez estão diretamente relacionados ao processo de reparo cutâneo (PEREIRA, et al., 2002; MOORE, et al., 2005). E ainda segundo Giannelli et al. (2013) a irradiação com LBE pode aumentar a proliferação de células-tronco em cultura, incluindo CTMs, CTs cardíacas e da polpa dentária.

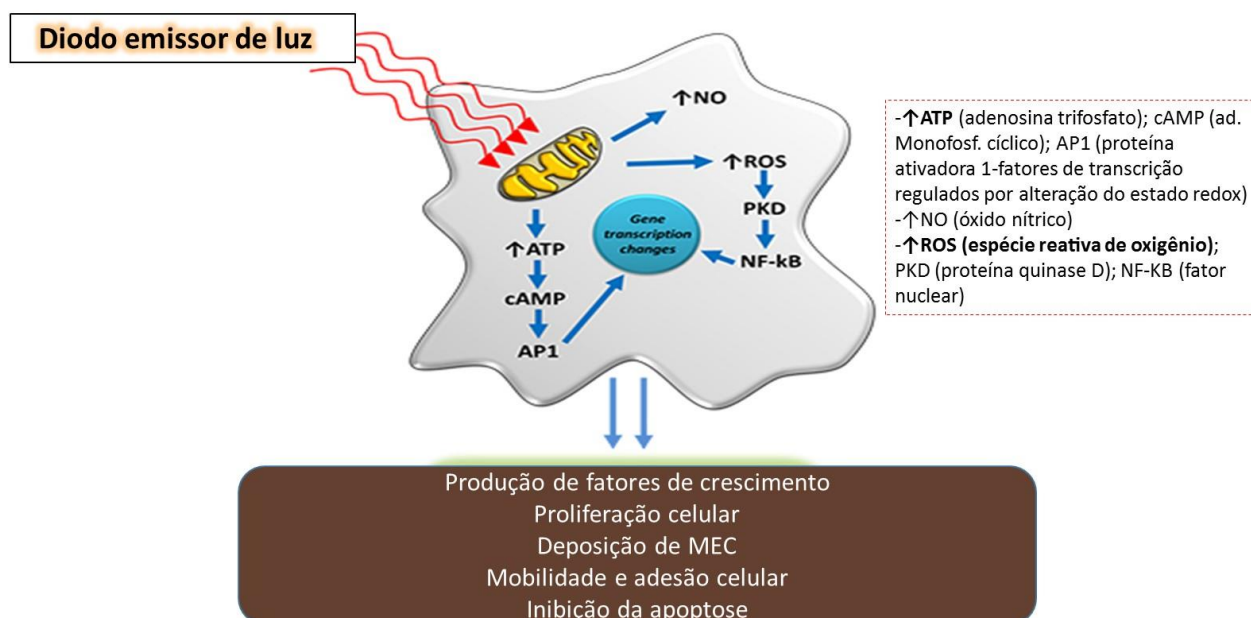
Devido a essas propriedades semelhantes ao LASER, o uso do LED em pesquisas e como recurso terapêutico ampliou-se na última década principalmente por ser um instrumento economicamente mais acessível. Mesmo os LEDs não produzindo feixes de luz coerentes, colimados e perfeitamente monocromáticos como os equipamentos LASER, estudos desenvolvidos pela NASA (*National Aero Space Agency*) nos Estados Unidos demonstraram fortes evidências de que a eficiência dos LEDs em processos de foto estimulação celular e de proliferação de crescimento celular *in vitro* é semelhante à dos LBE. (VINCK, et al., 2003). Estudos recentes apresentam uma série de resultados demonstrando que, a aplicação da luz proveniente do LED em tecidos biológicos influencia positivamente no aumento da taxa de proliferação de células, o aumento



da taxa de produção de fibroblastos, aumento da taxa de síntese de RNA e DNA, e síntese de ATP (MION, 2014).

A absorção de fótons pode produzir efeitos fototérmicos, fotomecânicos, fotofísicos e fotoquímicos, no tecido biológico. Esses efeitos vão depender do comprimento de onda ( $\lambda$ ) do feixe de luz, da irradiância ( $W/cm^2$ ) e da fluência de energia depositada no tecido ( $J/cm^2$ ) (VELOSO, 2010). No efeito fotoquímico essas alterações podem acarretar em síntese de DNA, síntese proteica e enzimática, e a produção de ATP intracelular, isto porque à absorção de fótons de um determinado comprimento de onda de luz, por moléculas intracelulares específicas (fotoceptores), promovem estimulação de atividades enzimáticas e de reações óxido-redução (redox) do metabolismo celular (KARU, 2003). Já os efeitos fotofísicos, por sua vez, são responsáveis pela mudança de potencial na membrana celular, alterando mobilidade iônica e influenciando indiretamente no aumento da produção de ATP como demonstra a figura 1 (GARCIA, 2015).

Figura 1: Ação dos Diodos Emissores de Luz



Fonte: adaptado de University of Birmingham (2015) por GARCIA, 2015.

## 1.5 Possível utilização do LED em células tumorais

Células malignas ou neoplásicas são por sua vez são células que foram definidas, ainda em 1930 pelo patologista Rupert, como uma massa anormal de tecido cujo crescimento excede ao crescimento normais dos tecidos e persiste mesmo quando cessada a causa que o provocou (BOGO, 2009).

A célula cancerígena frequentemente apresenta características como ausência de diferenciação e proliferação incontrolada. Estas podem ser desenvolvidas a partir da inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogêneses ou até mesmo agentes físicos, químicos e biológicos (SIEBER et al., 2003).

As primeiras etapas do desenvolvimento de drogas e terapias anticâncer são em grande parte, realizadas utilizando culturas celulares de linhagens. Desta forma é possível avaliar inúmeros parâmetros para atestar a sua eficácia, que vão desde a efetiva morte celular, até alteração do metabolismo e inibição da proliferação *in vitro* (BOGO, 2009).

KUZNETSOVA, D. S. (2015) relata a importância da seleção de um comprimento de onda apropriado nas diferentes fontes de luz e a especificidade das reações celulares em determinados comprimentos de onda de irradiação, relacionando diretamente essa escolha a uma terapia eficaz e útil para as diferentes condições médicas. Na literatura, frequentemente são mencionados os efeitos benéficos da fototerapia LED como em doenças da pele, como acne (SADICK, 2009) e na cicatrização de feridas (BAEZ; REILLY, 2007), entretanto JEONG, M.O., et al em 2012, apresentaram seus estudos sobre a capacidade inibitória do LED 830 e 850nm, que diminui efetivamente a síntese de melanina em melanócitos *in vitro*. Ainda neste ano, Magrini. et al., afirmam que a luz pode influenciar o metabolismo celular dependendo da sua fluência. Nos estudos do grupo as células de mama malignas (MCF-7) foram expostas à luz a partir de um LASER He-Ne (633 nm) com fluências de 5, 28,8 e 1000 mJ / cm<sup>2</sup>. Para 5 mJ/cm<sup>2</sup>, as células MCF-7 sofrem bioinibição com taxas metabólicas diminuídas, já na fluência de 1000 mJ/cm<sup>2</sup>, as células apresentam bioestimulação acompanhada por uma elevação da taxa metabólica.

Os resultados advindos dos estudos iniciais deste projeto, utilizando CTM, corroboraram com tais dados encontrados na literatura. Ficou evidente uma possível capacidade bioinibitória do mesmo, acarretando em futuras possibilidades de sua aplicação em células neoplásicas.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Avaliar a ação do LED 850nm, no regime pulsátil, como bioestimulador do crescimento de CTM, na presença de Soro Fetal Bovino e, na sua ausência sendo substituído pelo hormônio derivados de plaquetas (HDP).

### **2.2 Objetivos específicos**

- Aplicação do bioestimulador LED 850 nm de incidência pulsada sobre as culturas de células-tronco mesenquimais de rato em cultura *standard* (padrão), sobre o *scaffold* de HDP;
- Avaliar o desempenho do arcabouço biológico para cultura de células, e o resultado da sua interação com o LED;
- Verificar os efeitos da luz de LED 850 nm nas taxas de diferenciação das CTM;
- Obtenção de dados quantitativos e qualitativos pós-irradiação das culturas de CTM;
- Analisar os efeitos promovidos pela incidência da luz de LED nas culturas de CTM e na Linhagem RAJI.

### **3. Material e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Celular (LEC), associado ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu. As culturas celulares seguiram critérios estabelecidos pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) do LEC do Hemocentro de Botucatu e este trabalho recebeu aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa no uso de animais da FMB (CEUA), cujo número do certificado é 166/2016 CEUA.

#### **3.1 Infraestrutura e Instalações do Laboratório**

O Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro conta com a instalação de dois laboratórios internos de uso contínuo: LAC (Laboratório de Atividades Complementares) e Área Limpa, na qual foram realizadas todas as etapas de isolamento e cultura celular bem como o experimento com o LED. O LAC integra a seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu e iniciou suas atividades em dezembro de 1992. Durante este período, fontes de financiamento de pesquisas vigentes no país, em especial FAPESP, CNPq, BNDES, FINEP e FNS deram suporte à pesquisa.

#### **3.2 Obtenção das Amostras**

As células de CTM de rato obtidas estavam criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  na presença de dimetilsulfóxido como criopreservante de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão do LEC. Estas amostras foram denominadas CTM<sub>1</sub>, CTM<sub>2</sub> e CTM<sub>3</sub>. O critério de seleção das amostras preservadas foi incluir aquelas que haviam sido submetidas ao protocolo de dissociação mecânica, e expandidas até a 4ª passagem e que se apresentaram com bom desempenho em cultura: menor tempo de desdobraimento e sem anormalidades morfológicas. Optou-se pelo uso de células criopreservadas baseado no fato de que as amostras recém obtidas possuem uma grande quantidade de células sanguíneas e endoteliais. A cultura celular com a

adesão das mesmas, executa a *purge* natural das CTM que aderem ao plástico, apresentando amadurecimento cronológico ou fisiológico (envelhecimento/senescência celular), tornando desta forma a amostra homogênea. Durante esse processo, para a manutenção e crescimento celular, as células plaqueadas em frascos T 75 cm<sup>2</sup> foram tratadas com meio de cultura DMEM-F12 contendo aditivos como antibióticos, antimicóticos, aminoácidos, soro fetal bovino, entre outros.

A troca do mesmo foi realizada 3 vezes por semana, por meio da aspiração e reposição de meio novo (ALVES, 2017). Antes da troca do meio, os frascos foram observados por microscopia invertida de contraste de fase utilizando microscópio Axiovert 200-Zeiss®. Esta observação tem como objetivo o monitoramento do aspecto fibroblastóide das CTM bem como o controle e prevenção de possíveis contaminações dos frascos por bactérias, micoplasmas e fungos diversos que podem estar presentes em nossa pele, materiais de laboratório, equipamentos de proteção individual, ar e superfícies.

No momento em que a cultura atingia confluência ideal (80%), as células foram submetidas ao tratamento enzimático com uso da enzima Tripsina EDTA 0,25% (Gibco®) para proceder à passagem (repicagem) para outro frasco com superfície maior, a fim de promover a expansão celular numérica. Na “tripsinização”, inicialmente os frascos são previamente lavados com HEPES, para a remoção de proteínas do soro fetal que possam neutralizar a ação da enzima. Em seguida, o mesmo é aspirado e a tripsina é adicionada ao frasco, que permanece em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, 37°C por 10 minutos, até ocorrer desprendimento celular da superfície do frasco. Esta observação novamente é realizada por microscopia invertida.

Após o desprendimento, realiza-se a inativação enzimática adicionando-se ao frasco meio HEPES com 10% de SFB (o dobro da quantidade de tripsina). Esse meio de cultura com células é centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Após isso, o *pellet* celular é ressuspenso em HEPES e procedida a contagem e a determinação da viabilidade por azul de tripan (Gibco®) em câmara de Neubauer para posterior plaqueamento com DMEM-F12.

Os procedimentos de contagem e avaliação da viabilidade celular foram realizados primeiramente ao final de cada “tripsinização” ou antes do início do

experimento do qual se necessita saber a quantidade aproximada de células por área do frasco. A contagem celular foi realizada por contador Automático (CA), Countess™, além da câmara de Neubauer nela utiliza-se das propriedades da ótica e análise de imagem para automatizar a contagem celular, possibilitando ainda a quantificação em porcentagem da viabilidade da amostra: células vivas, mortas, e o número total com precisão, utilizando o corante azul de tripan como técnica de coloração padrão.

Figura 2 - Imagem do Countess™ disponibilizadas pelo sistema durante a contagem celular



Legenda: A = aspecto frontal do Countess com a lâmina contendo as células; B= aspecto das células vivas e mortas identificadas pelo sistema de contagem.

Fonte: Arquivo Pessoal, 2018.

### 3.3 Caracterizações da CTM – TA pré-experimento

Anteriormente à criopreservação, as células foram cultivadas por 4 passagens consecutivas para expansão e obtenção de células-tronco mesenquimais antes do início do experimento proposto com a irradiação do LED. Todas as amostras selecionadas já tinham sua identidade de CTM previamente comprovadas através dos métodos de imunofenotipagem com a expressão de marcadores de superfície celular, e realizada a análise do potencial de diferenciação por meios indutores – tri-linhagem. Para isso foram utilizados métodos padronizados e Procedimentos Operacionais Padrão bem estabelecidos nos laboratórios de Engenharia Celular e Citometria de Fluxo da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

### 3.4 Aplicação do LED Pulsátil nas culturas de CTM

Após o descongelamento das ampolas de CTM estabelecidas até a 4ª passagem, as mesmas foram preparadas e destinadas ao experimento proposto. As irradiações foram realizadas com auxílio de 2 equipamentos portáteis tipo protótipo, também conhecidos como mesas difusoras “*biotable*” (Figura 3), com potência de  $30 \text{ mW/cm}^2$ , constituída por LEDs que emitem luz em 850nm (invisível ao olho), sendo um equipamento com emissão de luz pulsátil, de propriedade do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), com o qual foi estabelecida parceria neste projeto de pesquisa e com outros projetos do Laboratório.

Figura 3 - Detalhe da *biotable* produzidas pelo CEPOF/LAT



Fonte: arquivo pessoal, 2018.

As *biotables* foram desenvolvidas e validadas pela equipe do CEPOF/LAT (Laboratório de Apoio Tecnológico) em projeto de parceria estabelecido com Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e sua equipe. Para avaliar a variabilidade da bioestimulação das células em cultura, foram escolhidas e estabelecidas, mediante estudos da literatura, as doses 3,0; 5,0 e 10,0  $\text{J/cm}^2$



(GARCIA, 2015) A metodologia de aplicação do LED nas culturas *in vitro* seguiram as normas de segurança de acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 185/01.

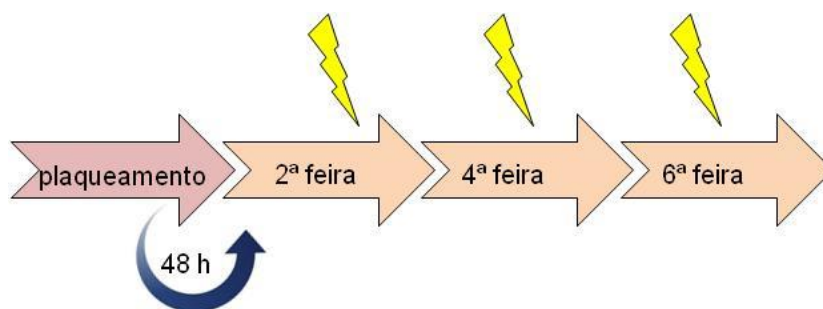
A exposição dos frascos de cultura à luz do LED teve duração de tempo diferente para cada uma das 3 doses aplicadas conforme pode ser observado no quadro 1. De acordo com o quadro é possível conhecer os tempos de exposição dedicados aos frascos a partir das diferentes doses. Esses tempos foram calculados previamente pela equipe do CEPOF. Para a realização das irradiações, os frascos eram retirados das estufas, colocados um a um, sobre a *biotable*,

Quadro 1 - Dose e tempo de exposição durante a bioestimulação

Dose	Tempo de exposição em minutos
3 J/cm <sup>2</sup>	1min 40 seg
5 J/cm <sup>2</sup>	2min 47 seg
10 J/cm <sup>2</sup>	5 min 34 seg

Para a execução do experimento as CTMs foram plaqueadas na concentração de 10<sup>5</sup> células/frasco T75 cm<sup>2</sup>. O meio de cultura utilizado para o experimento foi o DMEM-F12 (Gibco®) livre de fenol, substância essa responsável pela coloração em tom alaranjado do meio, em associação com 10% de SFB. Em virtude de o fenol ser uma substância refringente à irradiação, inclusive com o LED, a presença do mesmo no meio de cultura poderia interferir no resultado do experimento, portanto a necessidade de sua ausência. O meio de cultura dos frascos foi trocado três vezes por semana, acompanhado previamente de observação microscópica, por microscopia invertida utilizando microscópio Axiovert 200-Zeiss™ e registros fotográficos sempre que indicados, vide figura 5.

Figura 4– Representação esquemática do plaqueamento das CTM e bioestimulação



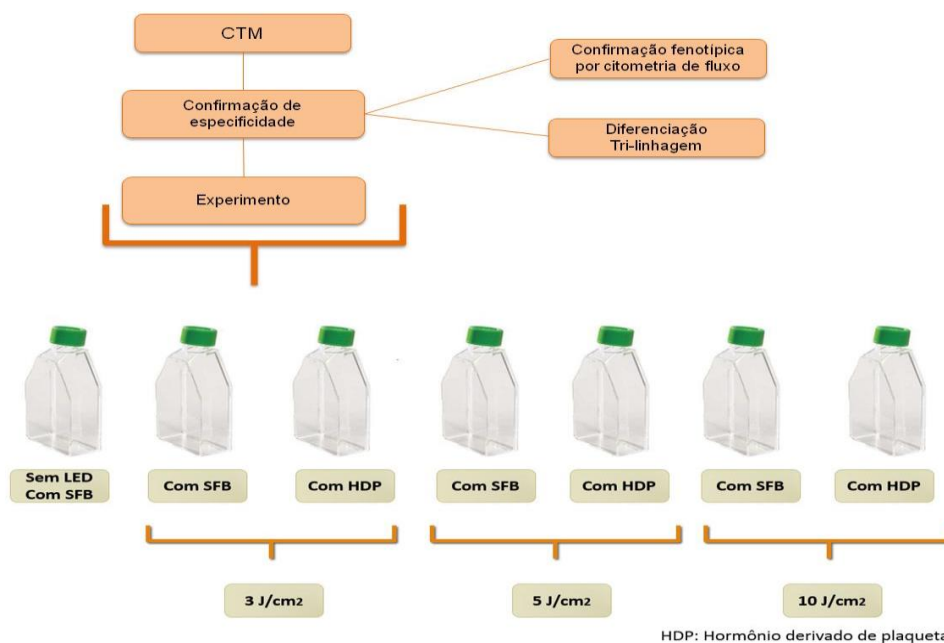
O monitoramento frequente dos frascos permitiu avaliar o aspecto celular, a morfologia, a confluência das células e eventual aparecimento de indicadores tóxicos tais como depósitos intracelulares, vacuolizações ou sinais de desdiferenciação e/ou contaminação evidenciados pela mudança de comportamento da CTM-TA, tipicamente aderente ao plástico, tornando-se células em suspensão.

Durante o experimento, os frascos que não receberam irradiação pelo LED (controles) foram retirados das estufas e colocados dentro da capela de fluxo laminar e permaneceram assim expostos pelo tempo máximo de todas as doses, sendo ela a de  $10 \text{ J/cm}^2$  (5 min e 34 segundos). Este procedimento foi realizado para equalizar de forma homogênea o estresse causado às células. A não manipulação do frasco, sem retirá-lo da estufa poderia trazer um viés de resultado que não era real.

O desenvolvimento da cultura durante a bioestimulação tornou o comportamento celular heterogêneo, desta forma, nas culturas onde houve confluência suficiente para a realização do tratamento enzimático, o experimento se estendeu por 4 passagens a contar da 4ª passagem (momento zero = M0) obtida após prévia expansão da cultura. Neste caso, em todas as passagens as células foram tratadas com tripsina e repicagem, desde M0 até P4. A cada passagem, parte das células era replaqueada e outra parte era destinada à criopreservação. A sequência de etapas do experimento recebeu a denominação subsequente: M0 → P1, P1 → P2, P2 → P3, P3 → P4.

Na figura 5 pode se observar as diferentes etapas/procedimentos do experimento proposto, de forma clara e abrangente.

Figura 5 – Representação esquemática dos procedimentos realizados até a bioestimulação.



Fonte: arquivo pessoal, 2018

### 3.5 Cultura de Linhagem RAJI – CEPA ATCC® CCL-86™

Tendo em vista divergências na literatura especializada sobre o efeito do LED a 850nm, analisou-se o efeito da irradiação estudada em células neoplásicas para se avaliar inibição ou não do crescimento celular, além de índice de apoptose e necrose. Foi adquirida a linhagem RAJI, certificada ATCC CCL-86 e expandida em cultura em meio RPMI-1640 10% de soro fetal bovino. A cultura foi submetida a exposição a do LED luz pulsátil, no comprimento de onda 850, na dose de 10 J/cm<sup>2</sup>. O experimento procedeu-se por uma semana sendo que a aplicação da luz ocorreu seguindo o mesmo modelo proposto a cultura de CTM: a cada 48 hs. Portanto para tais análises a amostra foi submetida ao LED durante três vezes neste período. O experimento foi realizado em triplicata experimental e procedida a contagem celular pelo mesmo método já citado e a análise de apoptose e necrose por citometria de fluxo (CF) usando kit anexina V e iodeto de propídio (IP) BD®.

O fenômeno da morte celular pode ser desencadeado por diversos fatores como agressão tóxica, imunológica, infecciosa ou por danos no DNA. Para realização da CF, foram utilizados dois reagentes para determinar a morte celular: Anexina V FITC (fluorescência verde), Iodeto de Propídeo (fluorescência vermelha)

todos do mesmo fabricante (Kit BD Pharmingen®). A anexina V é uma proteína  $Ca^{2+}$  utilizada para marcação da apoptose, sendo realizada pela dosagem de fosfatidilserina. Estes fosfolipídeos são predominantemente observados na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Desta forma, nas células em início de apoptose, a membrana celular ainda está intacta, porém sofre uma desorganização onde por consequência a fosfatidilserina é translocada para a superfície exterior da bicamada. Com a utilização desta técnica, alterações morfológicas associadas ao início da apoptose podem ser detectadas antes da perda da integridade da membrana. Já o uso de Iodeto de Propídeo permite diferenciar células intactas das não intactas, isto o IP é uma molécula que se intercala em qualquer DNA desde que a membrana da célula esteja permeável. A coloração simultânea com Anexina V-FITC e com o corante PI permite a discriminação de células intactas (viáveis), no início de apoptose, e células tardiamente apoptóticas ou necróticas como demonstra o quadro 2 a baixo:

Quadro 2: Representação da coloração quanto a morte celular

<b>Células Viáveis</b>	<b>Apoptose Inicial</b>	<b>Células tardiamente apoptóticas ou necróticas</b>
FITC - e PI -	FITC + PI -	FITC + PI +

### 3.6 Análise Estatística

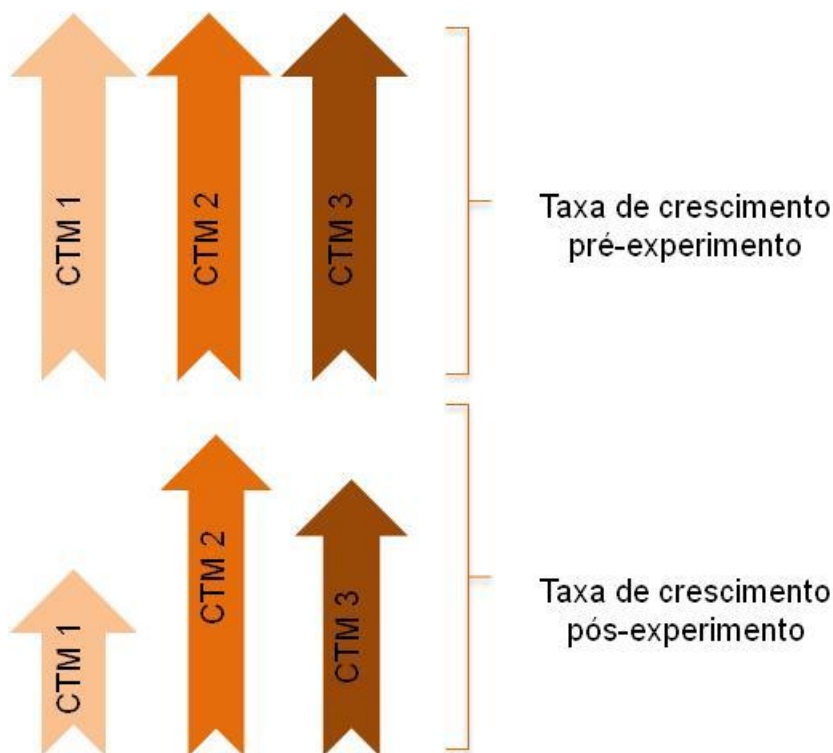
Os dados foram analisados pelo método de análise estatística descritiva simples com o objetivo de sintetizar valores de mesma natureza, permitindo uma visão global da variação e descrevendo os dados por meio de tabelas e de gráficos.

#### 4. Resultados e Discussões

Foram analisadas três amostras de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de rato criopreservadas no banco de células.

Os resultados deste trabalho foram descritos de acordo com os testes realizados, em sequência lógica (pré irradiação e pós irradiação com LED), o que facilitou a organização dos dados para análise e discussão. Respeitando a padronização inicial foram selecionadas ampolas de CTM-TA de 3 animais criopreservadas na 4ª passagem. O primeiro resultado, esquematizado na figura 6 mostra que anteriormente ao experimento, as células tinham comportamento homogêneo e taxas de crescimento equiparáveis. No entanto, no pós-procedimento este comportamento se tornou heterogêneo. Uma em três amostras manteve o perfil de crescimento próximo (CTM<sub>2</sub>), mas ainda sim, inferior ao momento pré-experimento. Isto leva a crer que a bioestimulação com 850nm comprometeu a taxa de proliferação das células independentemente de dose.

Figura 6– Esquema comparativo do crescimento das células pré e pós experimento



Quanto à taxa de confluência, ou seja, o tempo que as células levaram para atingir 80% de adesão à superfície do frasco, as 3 amostras analisadas

apresentaram comportamentos distintos, onde CTM<sub>1</sub> (gráfico 1) e CTM<sub>3</sub> (gráfico 3) apresentaram baixo crescimento em relação ao controle após o início da bioestimulação, impossibilitando a realização das 4 passagens como o proposto inicialmente no trabalho. Já a amostra de CTM<sub>2</sub>, (gráfico 2) apresentou o mesmo comportamento de crescimento (mais lento em relação ao controle) porém foi possível a realização das 4 passagens no período proposto de 41 dias bioestimulação.

Gráfico 1 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM<sub>1</sub> irradiada e não irradiada

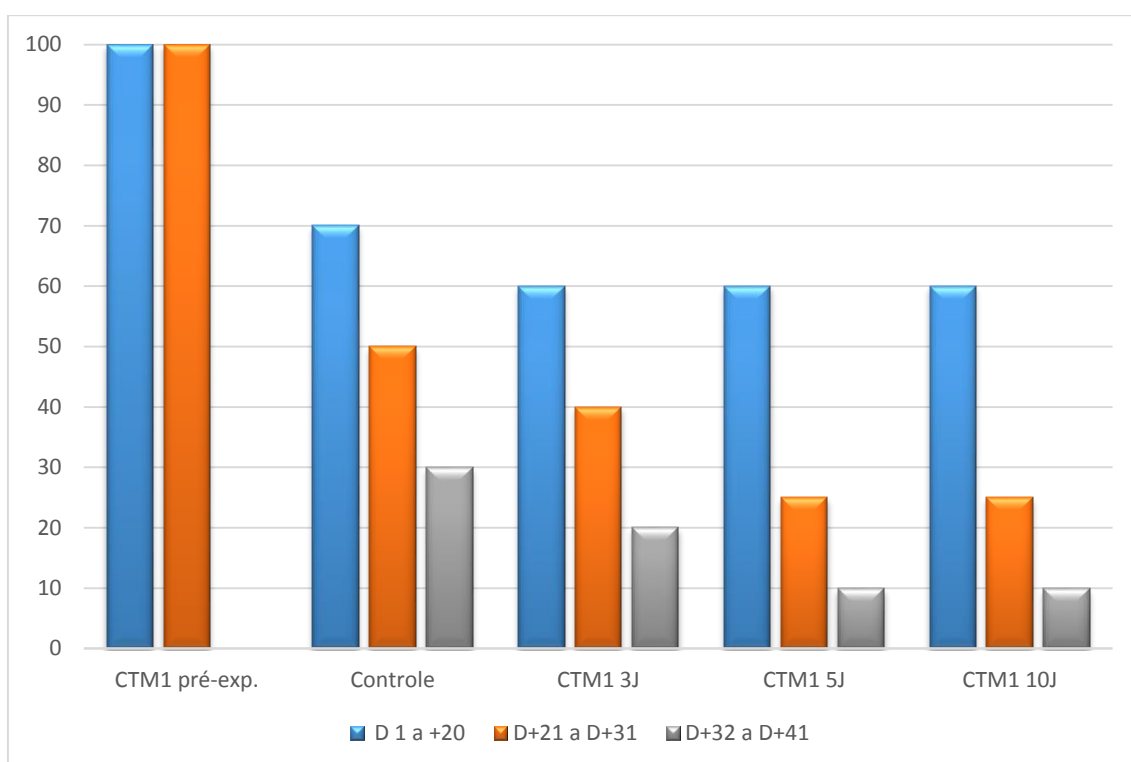


Gráfico 2 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM<sub>2</sub> irradiada e não irradiada

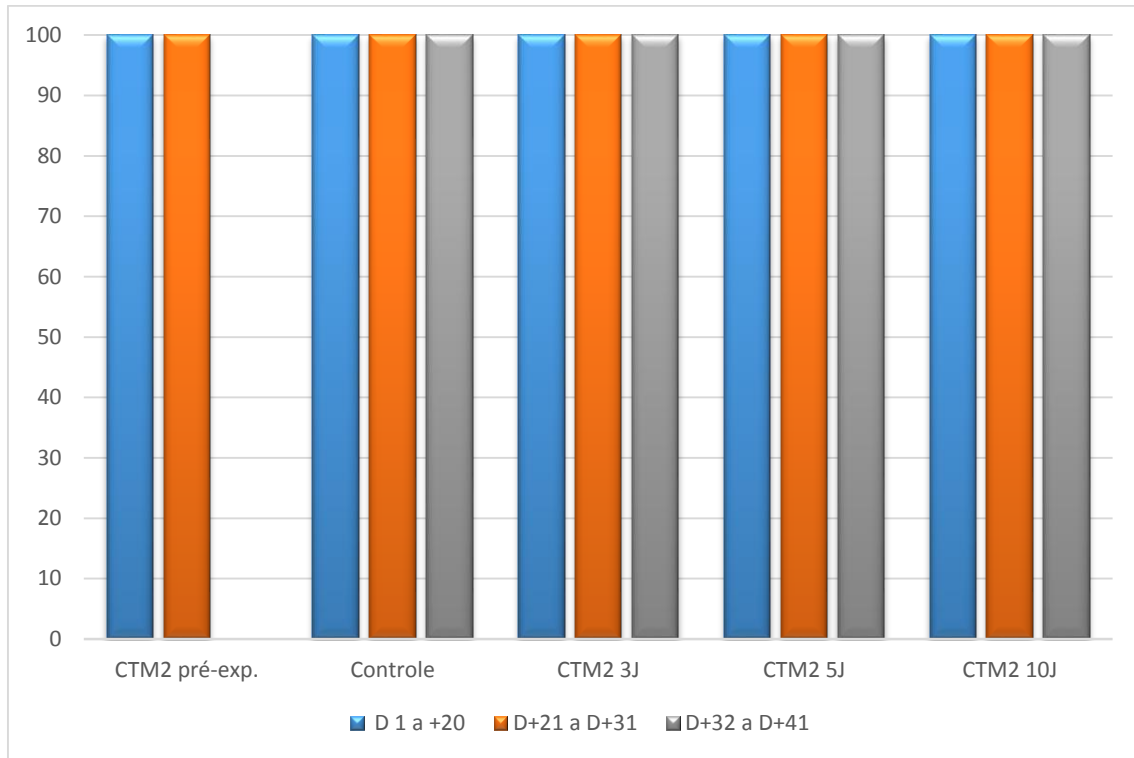
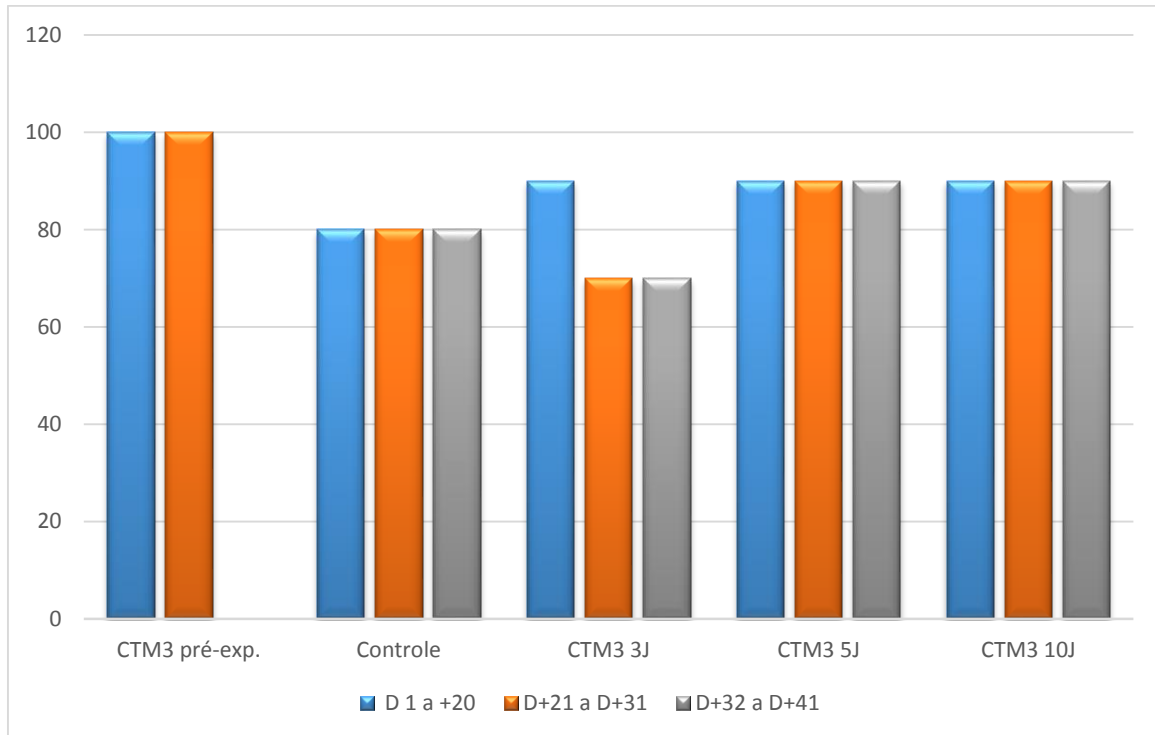


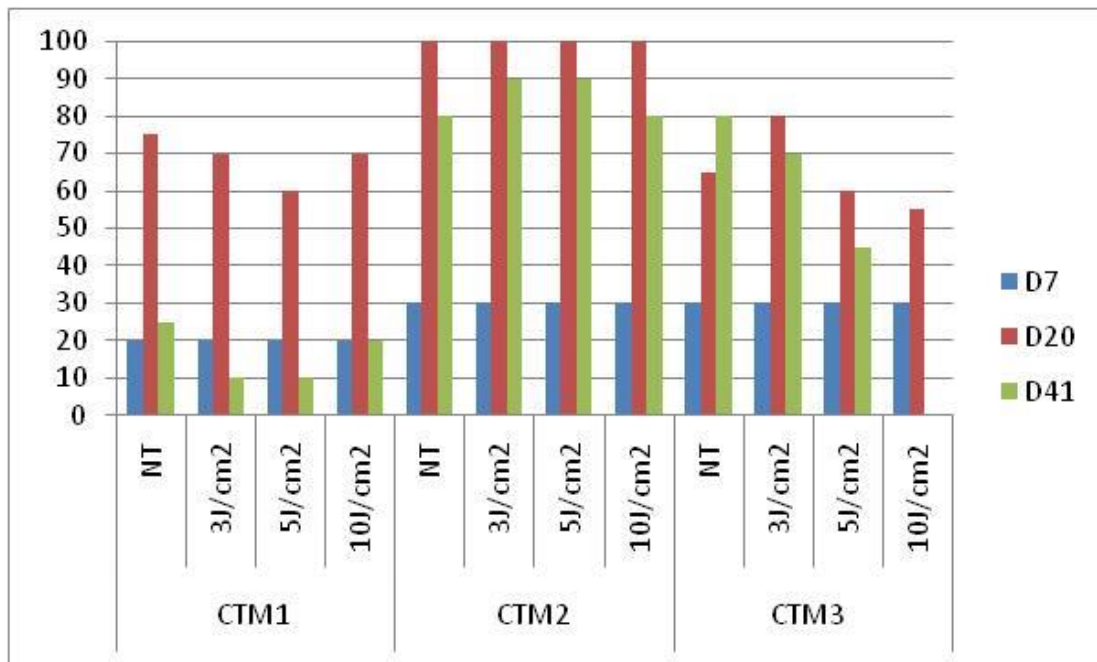
Gráfico 3 – Desempenho do percentual de Confluência da CTM<sub>3</sub> irradiada e não irradiada



Analisando os gráficos é possível observar que em todas as amostras de CTM, o período máximo foi de 14 dias de bioestimulação para que não houvesse diminuição da taxa de crescimento em todas as doses testadas, sendo que após a terceira semana a taxa de proliferação diminuiu significativamente. O gráfico abaixo representa os controles (identificados como não tratados = NT) e as respectivas amostras de CTM nas irradiações recebidas. O valor corresponde a taxa de confluência (%).

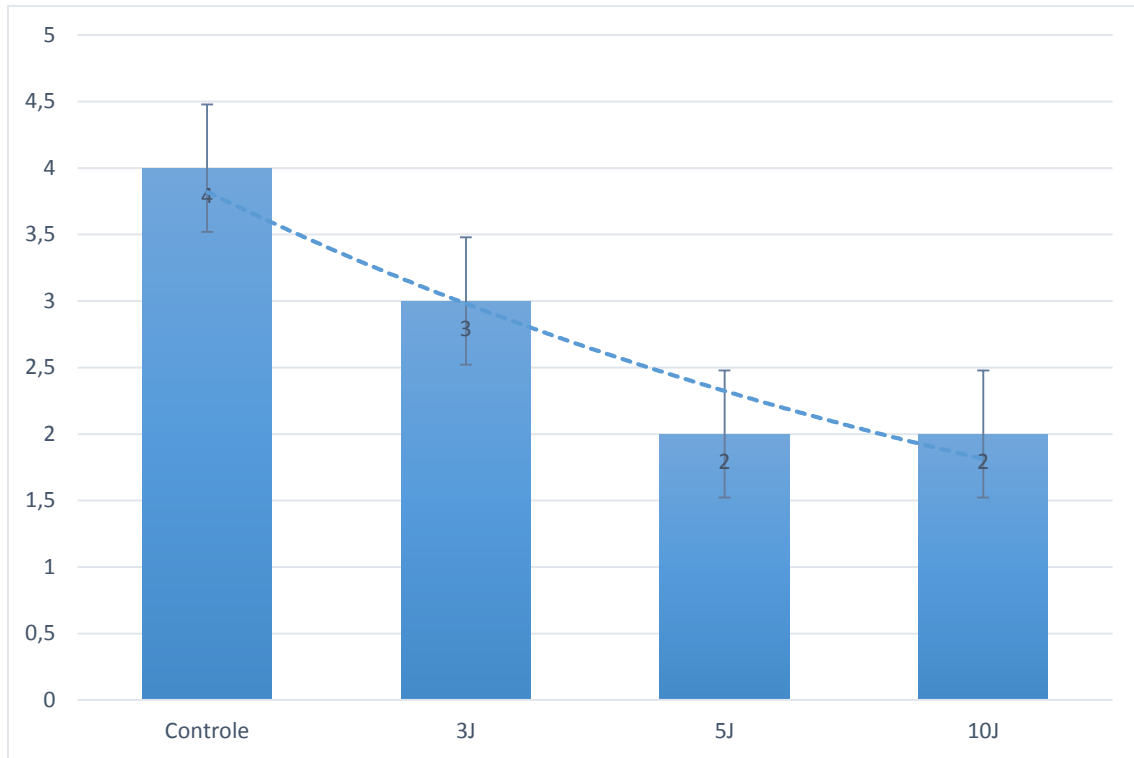


Gráfico 4 – Taxas de confluência das 3 amostras de CTM tratadas e não tratadas



Observando o gráfico acima (gráfico 4) podemos inferir que o desempenho das amostras avaliadas e o número de células visíveis apresentou relação inversa com o aumento da dose ofertada, ou seja quanto maior a dose de irradiação utilizada menor a confluência observada nos frascos. Outra constatação é de que com o aumento da dose (máxima 10J/cm²) o número de ampolas congeladas a cada passagem era menor se comparado às doses de 5J/cm², 3J/cm² e controle respectivamente (ver gráfico 5), portanto o tratamento com irradiação no comprimento de onda 850 nm, tornou o desdobraimento celular das CTM mais lento.

Gráfico 5 – Relação entre número de ampolas (10<sup>6</sup> células por unidade) congeladas e dose



#### 4.1 Aspectos morfológicos das culturas de CTM durante o experimento

Este item faz uma breve apresentação, por meio de imagens fotodocumentadas durante a realização de todo o experimento, sempre acompanhadas de observações das placas no que diz respeito ao aspecto morfológico, confluência, presença ou não de indícios de contaminação, distribuição das CTMs na superfície das placas, considerando se houve ou não agregações/formações de colônia ou distribuição mais homogênea.

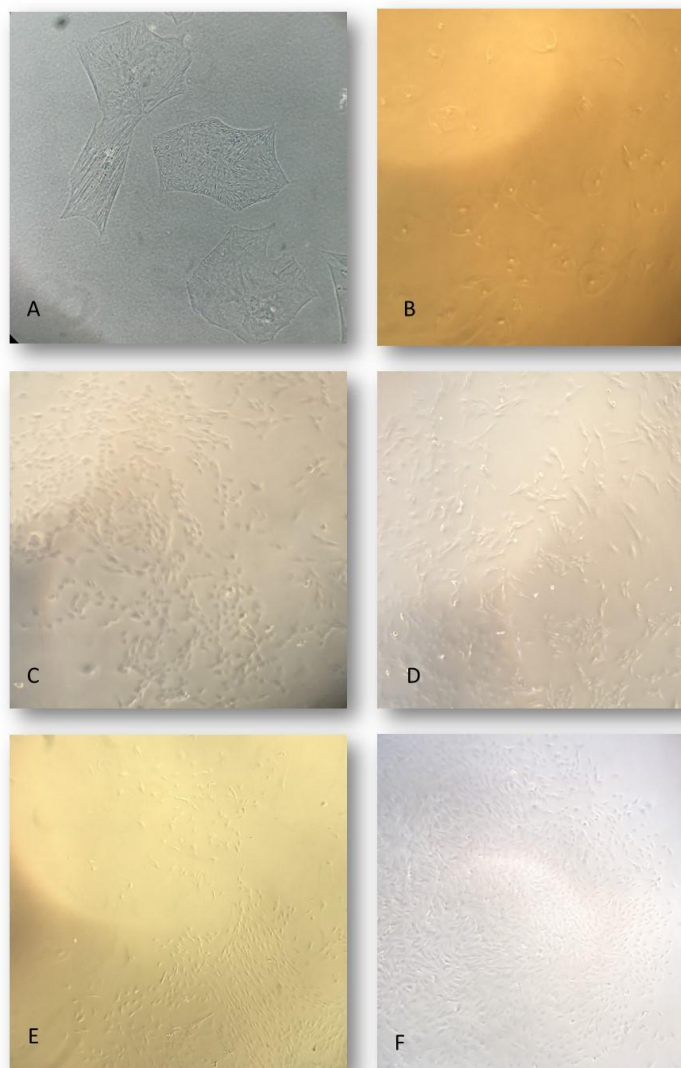
##### 4.1.1 Culturas utilizando Soro Fetal Bovino (SFB)

O grupo em que foi utilizado o SFB suplementando o meio de cultura, foi adicionado 10% do mesmo em todas as doses e no grupo controle. Não houve alteração morfológica em relação aos tratamentos, porém houve alterações

morfológicas para cada animal evidenciando que há diferenças biológicas e diferentes respostas aos tratamentos para cada indivíduo podendo estar relacionado com o polimorfismo intra-espécie.

Observa-se na figura 7 que as CTM do animal 1 adquiriram um aspecto “fibroso”, com citoplasma abundante, evidente riqueza de fibras de actina. Este aspecto é sugestivo de comissionamento estromal (BIANCO, 2001). No entanto, as mesmas células irradiadas, adquiriram um contorno menos poliédrico, mais arredondado lembrando epitélio mesodermal, o que pode sugerir um processo de transformação nas células, tornando-as malignas (LIMA, 2015).

Figura 7 – Fotomicrografia das culturas irradiadas e controle



Legenda: A = Controle, aumento 200X; B CTM1 3J/cm<sup>2</sup>, aumento 50X; C = CTM2 3J/cm<sup>2</sup> aumento 50X; F = controle, aumento 50X; E = CTM3 3J/cm<sup>2</sup>, aumento 50X e F = controle, aumento 50 X

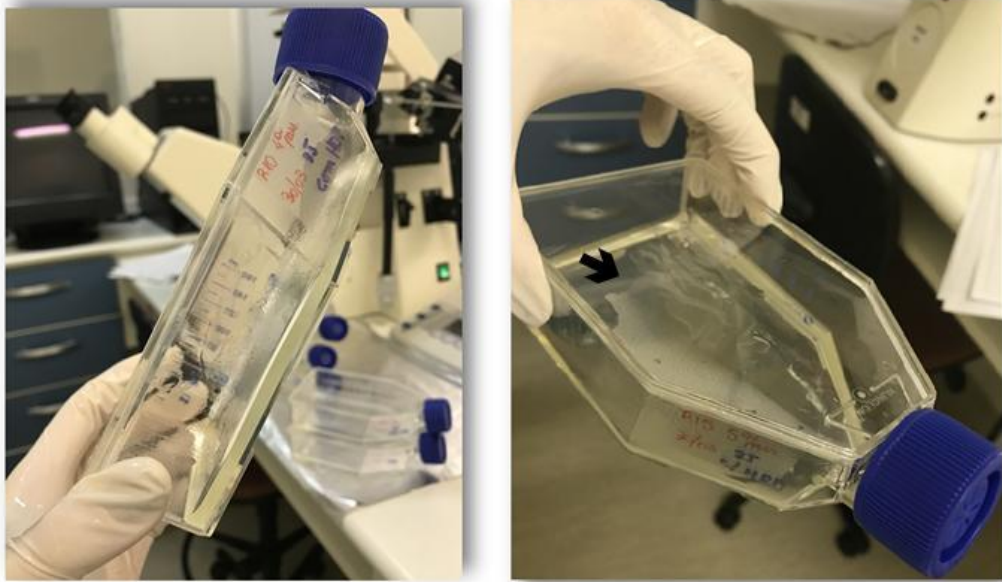
#### 4.1.2 Culturas utilizando Hormônios Derivados de Plaquetas (HDP)

As culturas suplementadas com HDP a 10% possibilitaram o desenvolvimento de um ambiente 3D (Figura 8). Neste caso, em todos os tratamentos houve aumento da confluência celular nas duas primeiras semanas de experimento, porém a polimerização do mesmo impossibilitou a realização de tripsina. Este fato é consequência dos resquícios de anticoagulante (CPD-A1) nas amostras obtidas para a produção do HDP. Este anticoagulante ao entrar em contato com meio de cultura rico em cálcio, quelante do mesmo, atua junto com a trombina formando o coágulo de fibrina. Este *scaffold* formado compromete as análises subsequentes por citometria de fluxo, pois podem determinar a presença de microagregados.

Assim, após a realização do experimento ficou evidente que o sistema HDP/LED torna-se difícil para a utilização na rotina de cultura celular, pois sua interação impossibilita a tripsinização (Figura 9). Existe a possibilidade do uso da collagenase do tipo I, no entanto esta mudança de protocolo torna muito mais caro o procedimento, além de que trabalhos anteriores (CLETO, 2006) mostram que a obtenção de CTM com uso de collagenase determina 3,7 vezes mais dano de DNA analisados pela técnica *Komet Assay*.

Segundo a literatura (GARCEZ; RIBEIRO; NÚÑEZ, 2012) os efeitos bioestimulantes ou bioinibidores da exposição ao LED dependem diretamente da adequação dos parâmetros da irradiação, sendo necessário observar as características ópticas do tecido, ou no caso a dimensão (tamanho e profundidade) da cultura submetida a luz. Para que haja uma influência ideal e total de absorção dos fótons pelas células *in vitro* a utilização da luz de LASER poderá se mostrar mais eficaz quando selecionada no comprimento de onda ideal.

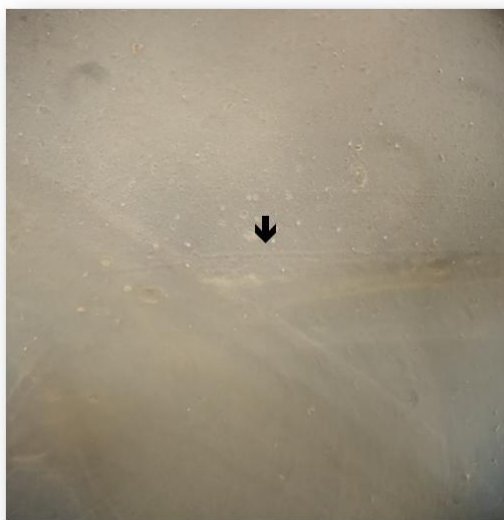
Figura 8 - Identificação macroscópica de “membrana” formada por polimerização do HDP em meio de cultura.



Legenda: Fotografias de frascos de cultura com suplemento de HDP com polimerização após 24 hrs. Seta idica membrana.

Fonte: arquivo pessoal, 2018

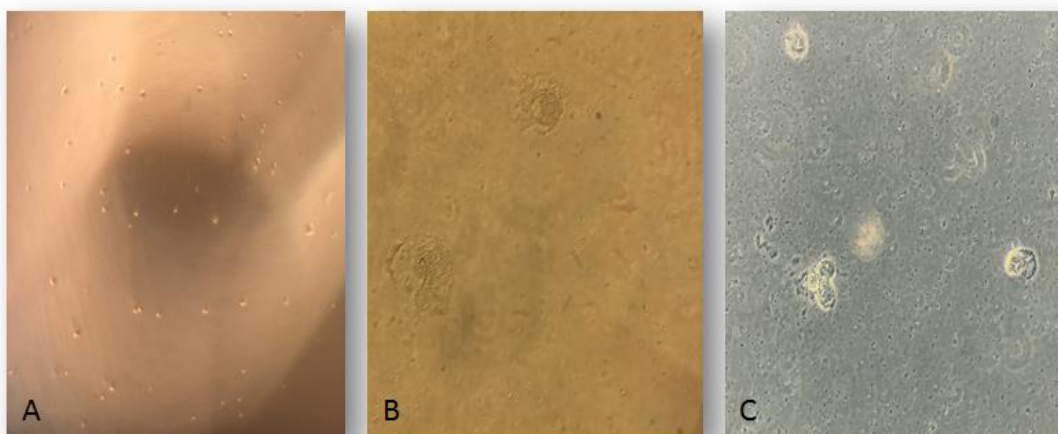
Figura 9 – Fotomicrografia de *scaffold* formado na cultura de CTM suplementado com HDP, irradiado a  $10\text{J}/\text{cm}^2$



Legenda: Fotomicrografia de cultura de CTM com suplemento de HDP. Observa-se o detalhe da polimerização indicado pela seta. Procedimento submetido à irradiação,  $10\text{ J}/\text{cm}^2$ . Microscopia invertida com contraste de fase, aumento 50x. Fonte: arquivo pessoal, 2018.

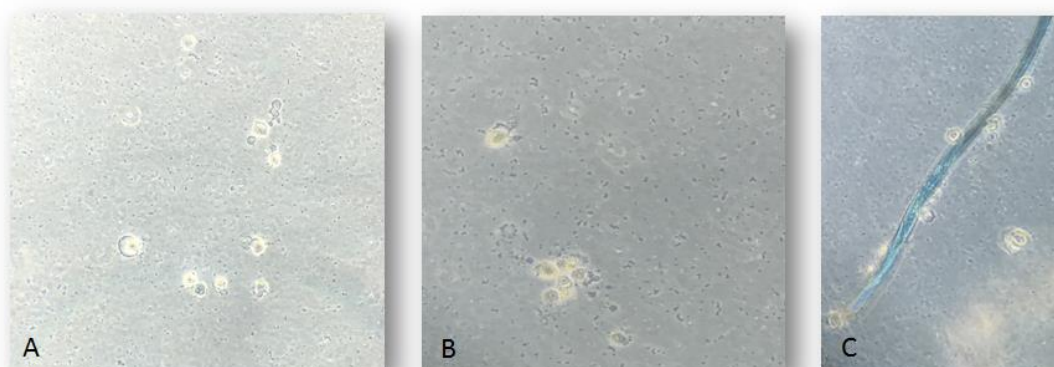
Na sequência foram analisadas imagens obtidas no microscópio invertido, o aspecto morfológico das três amostras utilizadas neste ensaio. Observa-se que sistematicamente o aspecto das células muda de fibroblastóide (aspecto clássico na cultura em monocamada diretamente sobre o plástico) para aspecto globoso. Este aspecto é altamente sugestivo de que este suplemento possa comissionar e/ou induzir as células de forma mais natural para a diferenciação óssea e cartilaginosa (GARCIA, 2015).

Figura 10 - Cultura CTM<sub>1</sub> suplementada com HDP



A. 5 J/cm<sup>2</sup>, aumento 50x. B - 3J/cm<sup>2</sup>, aumento 200x. C- 5 J/cm<sup>2</sup>, aumento 100x.  
Fonte: arquivo pessoal, 2018.

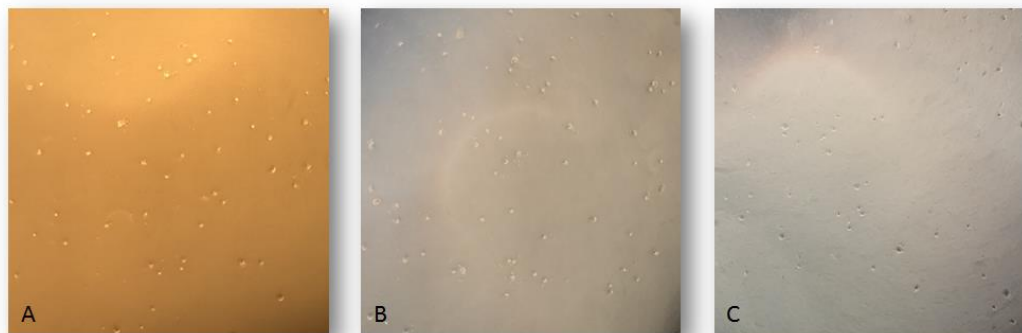
Figura 11 - Cultura CTM<sub>2</sub> suplementada com HDP



A. 5 J/cm<sup>2</sup>, aumento 100x, células em divisão. B - 3 J/cm<sup>2</sup>, aumento 100x, pequena colônia formada. C- 5 J/cm<sup>2</sup>, aumento 100x, na fotografia o fio gaze, em azul, apontado na seta evidência preferência das células pelo ambiente tridimensional e comprova a capacidade de mobilidade celular no meio em questão.

Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Figura 12 - Cultura CTM<sub>3</sub> suplementada com HDP



- A. 10J/cm<sup>2</sup>, aumento 50x, 48 horas pós plaqueamento. B - 10 J/cm<sup>2</sup>, aumento 50x, 7 dias de experimento. C-10 J/cm<sup>2</sup>, aumento 50x, 40 dias de experimento: diminuição do brilho celular e vitalidade celular.

Fonte: arquivo pessoal, 2018.

## 4.2 Imunofenotipagem

A avaliação pós-experimento se deu a partir de um painel imunofenotípico multicolor composto pelos marcadores: Positivos CD90- PERCP, CD106 – PE, CD71-FITC e Negativos CD11b – APC, CD34 – FITC, CD45 – PE. (WOODBURY et al., 2000; PEISTER et al., 2004; POLISETTI et al., 2010). As amostras preparadas para o ensaio continham 10<sup>5</sup> células por tubo e todos os anticorpos utilizados foram da marca BD® com afinidade para antígenos de rato.

Para a realização do testes, as células foram lavadas com solução isotônica, marcadas com o trio de anticorpos determinados (1<sup>o</sup> trio: CD90, CD106 E CD71; 2<sup>o</sup> trio: CD11B, CD34 e CD45). Os resultados destas análises estão apresentados abaixo na forma de quadro e histogramas (quadro 4 e figura 11 e 12).

Como pode ser observado no quadro 3, registrado pelo *Software CellQuest®* em percentuais, evidenciam que tanto para as amostras não tratadas (NT) ou controle como para aquelas que receberam as diferentes doses de irradiação, não houve mudança de perfil fenotípico de forma expressiva.



Quadro 3 – Média da Intensidade de Fluorescência nas amostras não tratadas e irradiadas com 3,5 e 10J/cm<sup>2</sup>, com painel de caracterização fenotípica de CTM

Expressão antigênica marcada		CTM	Precursor Eritróide	VCAM vaso	Monócito e Célula Dendrítica	Vaso CTH	Pan - Leucocitário	
	CTL auto	CTL ISO	CD90-PercP	CD71-FITC	CD106-PE	CD11b-APC	CD34 FITC	CD45-PE
NT	0,17	0,2	99,97	72,67	61,41	1,59	0,36	7,79
3 J/cm <sup>2</sup>	0,37	0,42	99,96	61,03	52,61	3,07	0,42	3,53
5 J/cm <sup>2</sup>	0,1	0,25	99,99	65,64	56,83	0,39	0,22	4,1
10 J/cm <sup>2</sup>	0,06	0,15	99,97	66,93	71,13	0,82	0,3	8,72

Pode-se observar que não houve diferença representativa nos valores pré e pós irradiação, exceto com o aumento de expressão do CD 106 que corresponde a uma VCAM, proteína adesiva com afinidade vascular. Vale ressaltar que esta mesma proteína foi inibida quando irradiada nos 3J/cm<sup>2</sup>, e 5 J/cm<sup>2</sup>, e estimuladas a 10 J/cm<sup>2</sup>. Já CD 11B, identificado como marcador de monócitos e de células dendríticas, apesar da discreta alteração apresenta o dobro do CTLE não tratado em 3J/cm<sup>2</sup>.

A análise dos histogramas evidencia que não houve efetivamente o deslocamento do mesmo para a direita de forma significativa, conforme dados do quadro anterior, comprovando a negatividade na expressão dos marcadores utilizados (figura 13).



Figura 13 – Representação do resultado da Imunofenotipagem com três marcadores negativos (CD34, CD45 e CD11b)

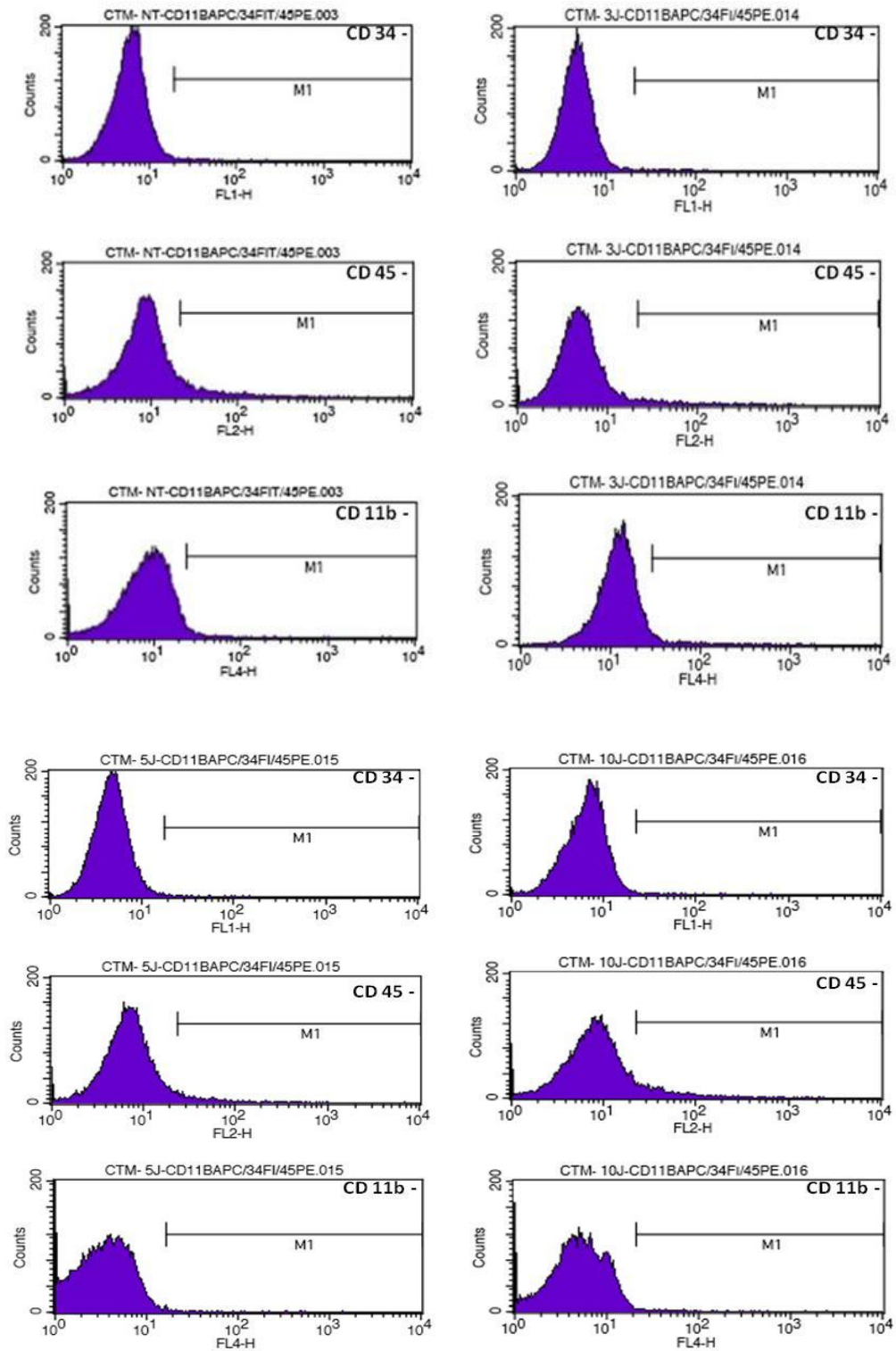
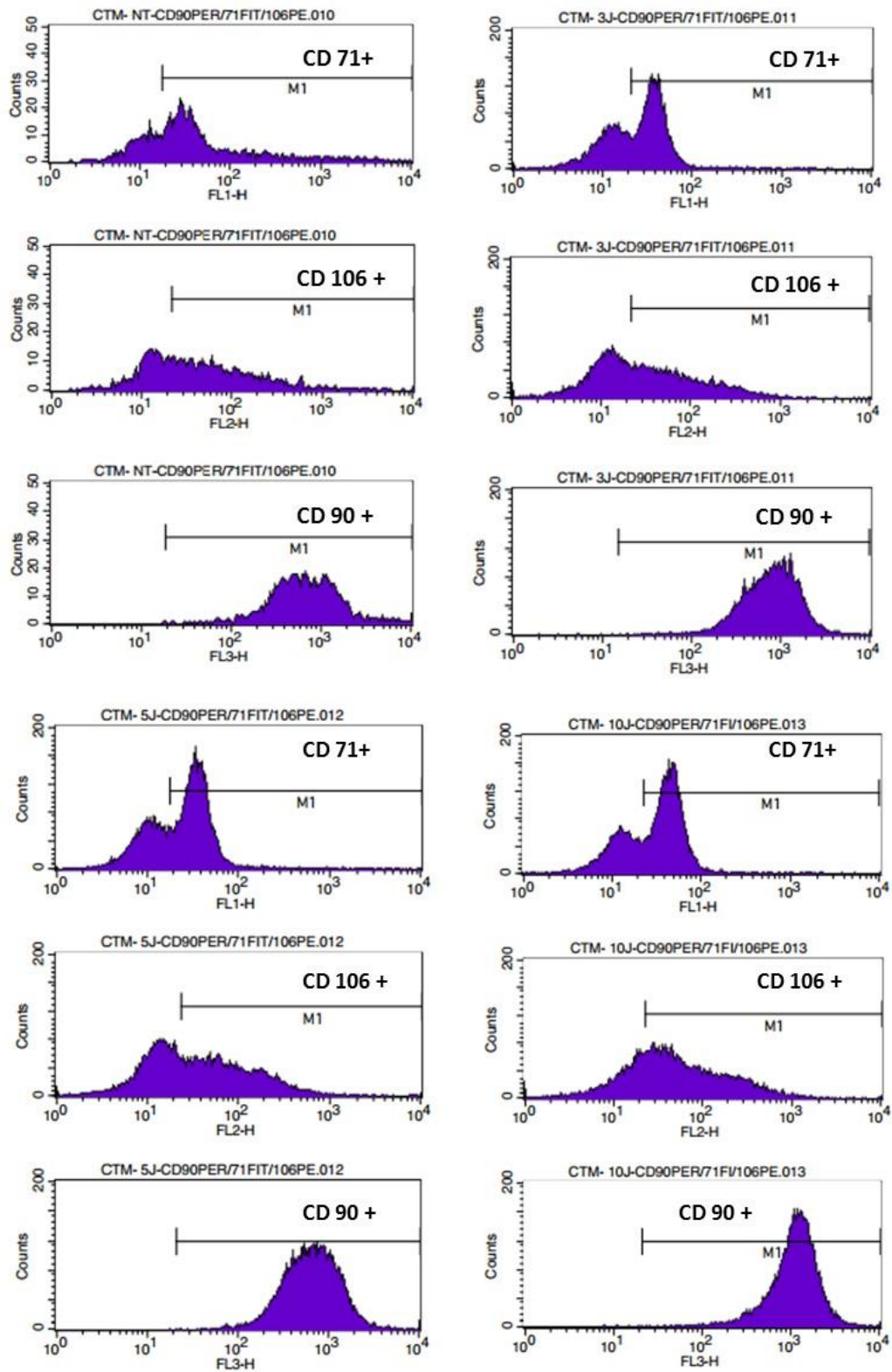


Figura 14 – Representação do resultado da Imunofenotipagem com três marcadores positivos (CD90, CD71 e CD106)



A análise dos três marcadores positivos (CD90, CD71 e CD106) (Figura 14) evidencia que a irradiação não alterou o perfil de expressão do antígeno CD90. Para CD71 identificou-se que para todas as doses houve uma diminuição da expressão, sendo que o maior efeito inibitório foi registrado na dose de 3J/cm<sup>2</sup>, equivalendo a 61,03% de positividade contra 72,67%. Este marcador representa um receptor de transferrina ubiquitário e prevalente em precursores eritróides (MARSEE, 2010) (Quadro 3).

Para o marcador CD106, importante no comissionamento de vasos por marcar as VCAMs, observa-se que as doses de 3 e 5J/cm<sup>2</sup> exerceram efeito bioinibitório sobre as células enquanto que a dose de 10J/cm<sup>2</sup> exerceu estímulo indutor da expressão do antígeno de forma específica. Estudos adicionais devem avaliar este efeito quando da diferenciação de CTM em células endoteliais que podem ser de grande importância para as técnicas de engenharia celular (YANG, 2013).

Hanz, Z. C. et al, 2017 registram que as CTM estão sendo testadas em vários sistemas biológicos e configurações clínicas com o objetivo de explorar seus potenciais terapêuticos para uma variedade importante de doenças. No entanto, destacam os autores que estas células também são conhecidas por serem populações heterogêneas, com funções muitas vezes variáveis. No contexto dessa complexidade multidimensional, uma questão recorrente é o local de obtenção das células ou se a população de CTMs é adequada para indicações clínicas específicas sabendo-se que as características biológicas das CTMs variam com o doador (variabilidade inter indivíduos), a fonte de tecido, a condição de cultura e as subpopulações. Os autores relatam que a população de CTM com CD106 positivo foi mais prevalente na subpopulação de amostras de células tronco mesenquimais placentárias, moderadamente expressas em medula óssea, e pouca expressão foi identificada nas CTM de origem adiposa. Este fato mostra-se diferente do encontrados no presente trabalho, pós irradiação. As CTM CD106+ possuem atividades imunomodulatórias e pró-angiogênicas significativamente aumentadas em comparação com aquelas negativas. Os dados registrados com a irradiação a 10 J/cm<sup>2</sup> podem assumir papel de relevância quando for necessária a expansão em cultura, por exemplo, para o tratamento da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro. As CTM CD 106 com maior positividade secretam mais citocinas anti-inflamatórias.

Gráfico 6 – Imunofenotipagem de CTM por citometria de Fluxo



No gráfico acima (Gráfico 6), os controles AUTO e ISO negativos, apresentam-se dentro do esperado. É possível observar que não houve alteração de expressão do marcador típico de CTM, o CD90. Quanto ao CD 71, receptor de transferrina, observa-se que o melhor desempenho é no grupo controle, apontando que a exposição à luz de LED 850nm diminuiu a expressão deste marcador.

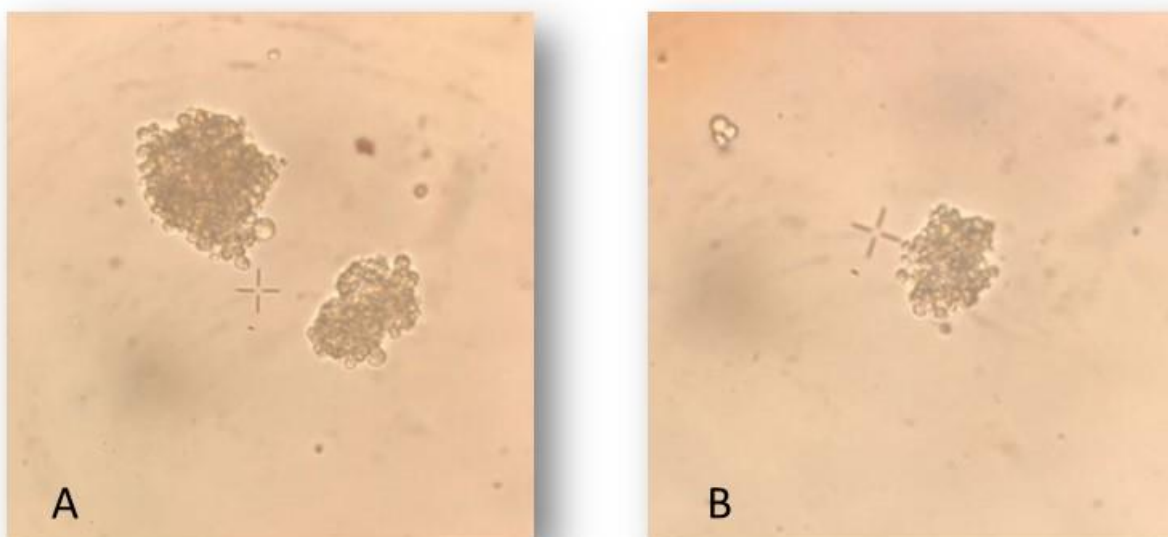
Por sua vez o marcador CD106, aumenta sua expressão na dose de 10J/cm<sup>2</sup>, podendo estar relacionado com processos de aterosclerose e disseminação hematogênica de tumores, portanto pode não ser indicada para utilização em tumores sólidos, podendo ocasionar possivelmente o aumento de metástases (TAS, 2014)

O marcador CD11b, apresenta um valor numérico percentual baixo (3,59%) na dose de 3 J/cm<sup>2</sup>, entretanto esse valor é o dobro encontrado no controle e nas doses de 5J/cm<sup>2</sup> e 10J/cm<sup>2</sup>. A luz nestas condições pode estar estimulando uma diferenciação monocítica e ou em células dendríticas. Este fato já foi observado no experimento de Garcia (2015) portanto não trata-se de uma achado aleatório. Para ao CD34 e com o CD45 as expressões apresentaram-se normais, exceto na luz na fluência de 10J/cm<sup>2</sup>.

### 4.3 - Cultura de Linhagem de Linfoma Linfoblástico tipo B, *Raji cells*.

Tendo em vista o efeito bioinibitório e não estimulador da irradiação com LED 850nm, optou-se por avaliar, em triplicata experimental, a ação do LED na cultura de células de Linfoma Linfoblástico tipo B. Estas células se aderem umas as outras formando colônias ou corpos organóides de difícil desagregação (Figura 15). No entanto, durante as avaliações microscópicas pode-se observar ligeira diminuição do aglomerado ou corpo organóide característicos dos linfomas em cultura *in vitro* do grupo tratado em comparação ao grupo que não foi submetido a exposição a luz de LED.

Figura 15 - Cultura de células de Linfoma Linfoblástico tipo B.



A – Grupo controle – Não tratado 7 dias após o início do experimento

B – Grupo exposto ao LED 80nm, pulsátil 7 dias após o início do experimento

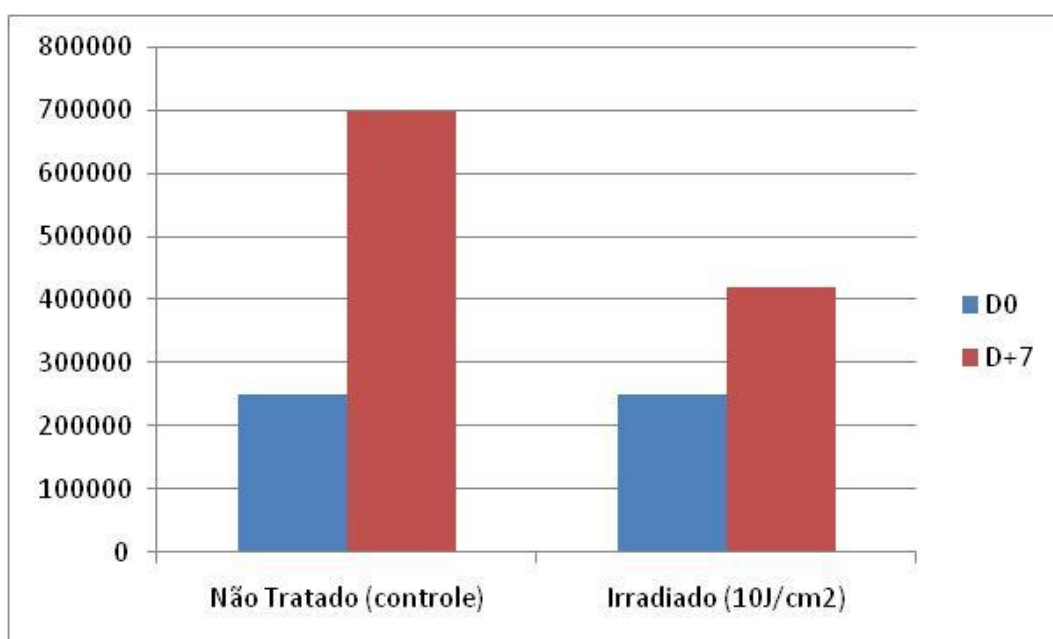
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

#### 4.3.1 Contagem e viabilidade celular

Para este experimento foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células/frasco de  $25 \text{ cm}^2$ . As células foram monitoradas por microscopia invertida e no final do experimento foram submetidas a contagem celular. O grupo não tratado apresentou  $7,0 \times 10^5$  células, em média, por frasco enquanto que as células submetidas à irradiação sofreram diminuição do tempo de desdobraimento sendo a concentração destas de  $4,2 \times 10^5$ , em média, por frasco (Gráfico 7). Estas células foram analisadas

por citometria de fluxo para a determinação dos índices de apoptose e necrose. O procedimento resultou em dados pouco reprodutíveis. Não foi evidenciado aumento da apoptose. Estudos adicionais devem analisar estes mesmo marcadores além de outros (capase-3, por exemplo) a via de morte destas células, ou se houve apenas uma redução no tempo de desdobraimento das mesmas, sem aumentar necessariamente o índice de morte celular. As análises futuras devem envolver o ciclo celular para compreensão dos resultados obtidos.

Gráfico 7 – Contagem celular em D0 e D+7 da cultura da linhagem RAJI tratada e não tratada.



Fonte: arquivo pessoal, 2018.

## 5. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que:

- ✓ O LED pulsátil de 850 nm foi aplicado com sucesso tanto nas culturas de CTM Standard (Sistema SBF-LED) como nas culturas de CTM com arcabouço biológico de HDP (Sistema HDP-LED) utilizando as *biotables*. As doses escolhidas de acordo com Garcia, 2015 foram 3,0; 5,0 e 10,0 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados mostraram superioridade do sistema SFB – LED comparado ao sistema HDP-LED;
- ✓ Em relação ao tempo de confluência entre as passagens (80%) observou-se uma inibição efetiva nas culturas por ação do LED, em especial nas amostras 10 J/cm<sup>2</sup>. Também foi observado que 20 dias é o período máximo em qualquer uma das 3 doses testadas nesse comprimento uma vez que, após isso, a taxa de proliferação celular diminui;
- ✓ Para os marcadores de CTM positivos, o LED exerceu um efeito bioinibitório sobre CD106 nas doses 3 e 5J/cm<sup>2</sup> enquanto que a dose de 10J/cm<sup>2</sup> exerceu estímulo indutor da expressão do antígeno de forma específica. Quanto ao CD90 não houve alteração e sobre CD 71, exposição à luz diminuiu a expressão em todas as doses testadas.
- ✓ Para os marcadores de CTM negativos, como o CD 11b, a maior alteração ocorreu na dose de 3 J/cm<sup>2</sup>, apresentando um valor numérico percentual baixo (3,07%). Para CD34 e CD45 as expressões apresentaram-se normais.
- ✓ O LED foi aplicado com sucesso na cultura de células da linhagem de Linfoma Linfoblástico tipo B, *Raji cells*, utilizando as *biotables*. A dose escolhida foi de 10,0 J/cm<sup>2</sup> sendo o efeito inibitório do LED verificado.
- ✓ Em uma semana de exposição o LED 850nm inibiu a proliferação de células da linhagem de Linfoma Linfoblástico tipo B de, em média 7,0 X 10<sup>5</sup> para 4,2X10<sup>5</sup> células por frasco.

## 6. Referências Bibliográficas

ALHADLAQ, A.; MAO, J.J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Development*. v. 13, p. 436-448, 2004.

ALVES, L. G. E. et al. Isolation and culture of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow of dogs. *Cienc. anim. Bras.* v.18, p. 1-14, 2017.

ARAÚJO, I. C. F. Tratamento de Úlceras Crônicas com uso de Biocurativo [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2007).

BAEZ, F.; REILLY, L. R. The use of light-emitting diode therapy in the treatment of photoaged skin. *J Cosmet Dermatol*. v. 6, p. 189–194, 2007.

BAGNATO, V. S. et al. New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 21, Suplemento 1, 2006 – 3.

BAGNATO, V. S. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. *Editores Livraria da Física*. São Paulo, ed. 1, 2008.

BAGNATO, V. S. Os Fundamentos da Luz Laser. *Física na Escola*. v. 2, n. 2, 2001.

BARROS, F. C. et al. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. *R Ci Med Biol*. v. 7, p. 85-9, 2008.

BARRY F. P, MURPHY J. M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. v. 36 (4), p. 568-584, 2004.

BIANCO, M.D. P. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem cells journal*. 2001.

BOGO, D. Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural [dissertação] Universidade federal do mato grossos do sul. Campo Grande 2009



- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev.Bras.Hematologia e Hemoterapia*. v. 31, Supl. 1, p. 25-35, 2009.
- CAMELO, F. P. Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos [Dissertação]. Natal/ RN (Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007).
- CAPON, A. et al. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med.*, v. 28, n. 2, p. 168-75, 2001
- CARVALHO, A.M, et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology*. v. 132 (2), p. 303-306, 2009.
- CASTRO I, C, V. DE. Avaliação da utilização das fototerapias Laser ( $\lambda$  780 nm) e LED ( $\lambda$  850  $\pm$  10 nm) no processo inflamatório induzido por carragenina na articulação temporomandibular de rato [tese]. (Programa integrado de pós-graduação em odontologia universidade federal da bahia, 2016).
- CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clinica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral*. v. 3, p. 214-8, 2004
- CHAMBERLAIN, G. et al. Mesenchymal Stem Cells: their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features and Potential for Homing. *Stem Cells® Tissue-specific Stem Cells* p. 22, 2007.
- CLETO, N. G. N. Terapia celular no tratamento de feridas crônicas. [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2006).
- COLEMAN, S.R. Long-term survival of fat transplant: controlled demonstrations. *Aesth Plast Surg*. v. 19, p. 421-5, 1995.
- COVAS, D. T. Células tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo. Ed: Atheneu, p. 35-48, 2006.
- DOMINICI, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. v. 8(4), p. 315-7, 2006

DREWA T. The Urothelium Cell culture on the starch scaffold. *Acta Pol Pharm.* v. 63; p. 153-155, 2006.

FERREIRA, R.R., et al. Bioactive dressings: Study of the pharmaceutical form, shelf life and quality control. *Wound Repair and Regeneration.* v. 18 (6), p. a80-a80, 2010.

FRANZOLIN, S.O.B, et al. Cell differentiation of human haematopoietic stem cell (hHSC) to osteoblast in different surfaces of titanium implant. *Rev. dental press periodontia implantol.* v. 2 (2), p. 68-79, 2008.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S. NÚÑEZ, S. C. Laser de baixa potência: princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia. Ed: Elsevier Ltda. 2012.

GARCIA, H. V. Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2015).

GARCIA, M.A. Uso de biocurativo em úlceras de pressão Biocurativo [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2004).

GIANNELLI, M. et al. Photoactivation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells With Diode Laser: Effects and Mechanisms of Action. *Journal of Cellular Physiology.* v. 228, p. 172–181, 2013.

HA, A. et al. Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.* v. 9, p.1301-12, 2003.

HAN, Z.C.; DU, W. J.; HAN, Z. B.; LIANG, L. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells. *Biomed Mater Eng.* v.28, Supl.1, p. S29-S45, 2017.

HUSS, R. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34–hematopoietic and mesenchymal stem. *Stem Cells.* v.18, n.1, p.1-9, 2000

JEONG, M.O., et al. Light-emitting Diodes at 830 and 850 nm Inhibit Melanin Synthesis In vitro. *Acta Derm Venereol.* v. 92, p. 675–680, 2012.

JOHNSON, A.L. Principles of bone grafting. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* Philadelphia, v.6, n.1, p.90-99, 1991.

KARU, T. Low power laser therapy. *Biomedical Photonics Handbook*, 2003. Disponível em <<http://www.isan.troitsk.ru/dls/publ/300.pdf>>

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* v. 24 p. 1294-1301, 2006.

KOLF, C. K. et al. Mesenchymal stromal cells Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation *Cartilage Biology and Orthopaedics Branch, National Institute of Arthritis, and Musculoskeletal and Skin Diseases. Arthritis Research & Therapy.* v. 9 p. 204, 2007.

KUZNETSOVA, D. S. et al. Comparative Analysis of Biotissue Laser Resection Using Strongly Absorbing Optical Fiber Tips. *Optics and Photonics Journal.* v. 5, p. 1-5, 2015.

LETOKHOV, V. S. Laser biology and medicine. *Nature.* v. 316, p. 325–330, 1985.

LIMA, L. C. A. DNA damage response following UV-light exposure: putting out the fire before cell collapse. *Revista da Biologia.* v.14 (1) p. 6-16, 2015.

LUBART, R. et al. Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy. *Laser Therapy.* v.7, p.101-106. 1995.

MAGRINI, T.D. et al. Low-level laser therapy on MCF-7 cells: a micro-Fourier transform infrared spectroscopy study. *J Biomed Opt.* v 17(10):101516, 2012.

MARSEE, D.K.; PINKUS, G. S, Y. U H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol.* v. 134(3), p. 429-35, 2010.

MARX, R. E. et al Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* v. 62(4), p. 489-96, 2004.

MEIRELLES, L.S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* v. 26, p. 2287-2299, 2008. Disponível em: <<http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/2007-1122v1>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

- MION, W. Foto seleção de mielomas e hibridomas murinos na produção de anticorpos monoclonais [Dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2014)
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*. Santa Maria, Online, v. 40, n. 1, 2009.
- MOORE, P. et al. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.* v. 36, n. 1, p. 8-12, 2005.
- MOROZ, A. et al. Evaluation of Two Novel Proposals of Three Dimensional (3D) Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell Culture and Chondrogenesis: Plateletrich Plasma (Prp3d) and Bacterial Cellulose (Bc) in Comparison to Alginate Beads (AlgB) *Transfusion*. V. 49, p. 23A-24A, 2010.
- MOROZ, A. et. Al Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improved approach in cartilage tissue engineering. *Platelets*. v. 24 (3), p. 219-225, 2012.
- NIMS, R. W.; HARBELL, J. W. Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* v. 53(8), p. 682-690, 2017. Disponível em: doi: 10.1007/s11626-017-0184-8. Acesso em: 22 jan. 2018.
- NUNES, H. C. Comparative Study of Blood-Derived Scaffolds for de culture of Human Adipose Derive Stem Cells (ASCS) and Dermal Fibroblasts. *Genetics and Molecular Reasearch*. v 16, 2017.
- NUNES, H. C. Estudo comparativo de três diferentes scaffolds para Crescimento de célula tronco mesenquimal, Fibroblastos e queratinócitos. [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2014).
- OLIVEIRA, M. P. Evolutionary aspects in regenerative medicine. *Arquivos Catarinenses de Medicina*. v. 41 (1), 2012.
- PEISTER, A. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. v. 103, n. 5, p. 1662-1668, 2004.

PEREIRA, A. N. et al. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med*; v. 31, n. 4, p. 263-7, 2002.

POLISETTI, N. et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *V. 58*, n. 2, p. 201-208, 2010.

REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg. Med.*, v. 33, n. 5, p. 344-51, 2003.

REICHERT, L. S. A., et. al. Periodontal Tissue Engineering After Tooth. *Replantation Journal of periodontology*. v. 82 (5), P. 758-766, 2011.

SADICK N. A. study to determine the effect of combination blue (415 nm) and near-infrared (830 nm) light-emitting diode (LED) therapy for moderate acne vulgaris. *J Cosmet Laser Ther.* v. 11, p. 125–128, 2009.

SIEBER, O.M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I.P.M.; Genomic instability - the engine of tumorigenesis. *Nature Rev.* v. 3, p. 701-708, 2003.

SILVA, E. M. et al. Avaliação histológica da laser-terapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Rev. Sul-Bras. Odontol.* v. 4, p. 29-35, 2007.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* v. 131, p.1-12, 2007.

TAS, F.; KARABULUT, S.; BILGIN, E.; DURANYILDIZ, D. Serum levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) may have diagnostic, predictive, and prognostic roles in patients with lung cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Tumour Biol.* v. 35(8), p. 7871-5, 2014.

UNIVERSITY OF BIRMINGHAM, Photobiomodulation and low level light therapy (LLLT) research. Disponível em: <<https://www.birmingham.ac.uk/research/activity/dentistry/research/photobiomodulation/index.aspx>>. Acesso em: 18 de Jan. 2018.

VANNI, I. S. R. Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de Lisado Plaquetário. [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2016).

VATS, A. et al. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaringol.*, v. 27, p. 227-234, 2002.

VELOSO, M. N. Influência da luz LED em culturas de células-tronco mesenquimais in-vitro. [dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2010).

VINCK, E. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. *Lasers in Medical Science*. London, v. 18, n. 2, p. 95-99, 2003.

VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power

WHITMAN, D.H.; BERRY R. L.; GREEN, D.M.; Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillo facial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. v. 55(11), p. 1294-9, 1997.

WOODBURY, D. et al. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*. v. 61, p. 364–370, 2000.

YANG, Z. X., et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *Plos One*. 2013 v. 8(3), 2013.