

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REABILITAÇÃO FUNCIONAL

Fabiana dos Santos Ferreira

**FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DE PELE HUMANA
ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Santa Maria, RS
2020

Fabiana dos Santos Ferreira

**FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DE PELE HUMANA ENVOLVIDAS NO
PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Funcional, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Reabilitação Funcional**.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Hedioneia Maria Foletto Pivetta
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Francine Carla Cadoná

Santa Maria, RS
2020

Ferreira, Fabiana dos Santos
FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DE PELE HUMANA ENVOLVIDAS
NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL / Fabiana dos Santos
Ferreira.- 2020.
80 f.; 30 cm

Orientadora: Hedioneia Maria Foletto Pivetta
Coorientadora: Francine Carla Cadoná
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Reabilitação Funcional, RS, 2020

1. Diodos Emissores de Luz 2. Fibroblastos 3.
Radiodermatite 4. Radioterapia I. Pivetta, Hedioneia
Maria Foletto II. Cadoná, Francine Carla III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FABIANA DOS SANTOS FERREIRA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Fabiana dos Santos Ferreira

**FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DE PELE HUMANA ENVOLVIDAS NO
PROCESSO DE REPARO TECIDUAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Funcional, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Reabilitação Funcional**.

Aprovado em 18 de setembro de 2020:



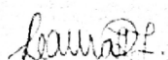
Hedioneia Maria Foletto Pivetta, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Francine Carla Cadoná, Dra. (UFN)
(Coorientadora)



Gustavo Orione Puntel, Dr. (UFSM)



Laura Ferreira de Rezende Franco (UNIFAE)

Santa Maria, RS 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes que realizam radioterapia, com a esperança de que em um futuro próximo possamos aliviar o sofrimento deste período cheio de incertezas e dor. E também à todos os colegas fisioterapeutas que buscam nos recursos próprios da nossa profissão, proporcionar mais saúde e qualidade de vida à população.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Hedionéia Pivetta pela oportunidade de pesquisa unindo as áreas de dermatofuncional e oncologia. Também por toda sua amorosidade e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho. Certamente aprendi muito mais do que método científico, conviver com ela é uma lição de humildade e amor ao próximo.

Agradeço à minha coorientadora Professora Francine Cadoná por todo empenho e paciência durante o trabalho. Desde o projeto, as coletas em laboratório em que eu não tinha absolutamente nenhuma experiência, a interpretação dos resultados obtidos e as correções sugeridas no trabalho pronto. Foi um prazer conviver com uma pessoa tão competente e delicada ao mesmo tempo.

Agradeço à minha colega de mestrado Thaís Martins pela parceria, amizade e grande contribuição neste trabalho. É muito bom ter com quem contar.

Agradeço à minha banca de qualificação Professores Gustavo Puntel e Juliano Tibola que contribuíram sobremaneira com a metodologia deste trabalho, com sugestões preciosas que foram seguidas e permitiram melhor comparação entre os comprimentos de onda e doses da fotobiomodulação.

Agradeço aos meus pacientes que me instigam a buscar sempre mais qualificação para poder atendê-los com mais eficácia.

Agradeço à minha equipe da Clínica Revigora Corpo e Face que precisou ficar mais independente e assumir novas responsabilidades para que eu pudesse me dedicar também ao mestrado.

Agradeço aos meus pais por todo apoio e incentivo na continuidade dos meus estudos.

Agradeço aos meus irmãos que me motivam a fazer sempre mais no intuito de ser um exemplo positivo para o crescimento deles.

Agradeço ao meu companheiro de vida, meu esposo, por todo amor e atenção, por assumir a maior parte das atividades domésticas para que eu pudesse me dedicar ao mestrado e também pela contribuição direta neste trabalho com seu olhar objetivo e crítico de engenheiro.

E por último, agradeço ao meu filho Bento, que na barriga da mamãe trouxe uma paz indescritível, tornando tudo mais leve neste período final do mestrado.

“Apercebi-me há muito tempo que as pessoas que realizam coisas raramente ficam à espera que as coisas lhe aconteçam. Elas saem e acontecem as coisas.”

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS DE PELE HUMANA ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

AUTORA: Fabiana dos Santos Ferreira
ORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Hedioneia Maria Folleto Pivetta
COORIENTADORA: Prof^ª. Dra. Francine Carla Cadoná

Introdução: O tratamento com a fotobiomodulação por LED é um recurso amplamente utilizado no reparo tecidual com resultados promissores, no entanto, na fisioterapia oncológica, mais precisamente na prevenção de radiodermite, o uso desse recurso ainda é recente e os resultados obtidos precisam ser melhor elucidados. Diante disso, faz-se necessário avaliar e compreender os efeitos que a fotobiomodulação por LED exerce sobre as células da pele envolvidas no processo de reparo tecidual. **Objetivo:** Verificar os efeitos da fotobiomodulação por diodos emissores de luz em células de pele humana envolvidas no processo de reparo tecidual. **Materiais e Método:** Este projeto de pesquisa caracteriza-se como um estudo de caráter experimental *in vitro* em que células de pele humana, fibroblastos da linhagem HFF-1, foram expostas a diferentes comprimentos de onda: LED vermelho, comprimento de onda 658 nm e LED azul 470 nm. Os ensaios realizados incluem métodos colorimétricos, fluorimétricos e microscópicos para análise dos parâmetros relacionados à viabilidade e proliferação celular e a formação de radicais livres. Acredita-se que os dados obtidos nessa pesquisa servirão como referencial teórico científico para novos estudos, inclusive ensaios clínicos em humanos que são de interesse destes pesquisadores para o futuro. Além disso, poderão servir como amparo científico para a prática clínica, onde a fotobiomodulação por LED possa ser uma alternativa não farmacológica, segura e de baixo custo para a prevenção da radiodermite. **Resultados:** A luz azul demonstrou potencial de proteção celular principalmente pela redução da formação de radicais livres e proteção da membrana celular observada com o número reduzido de DNA dupla fita extracelular. Já a luz vermelha demonstrou menor potencialidade de proteção celular, pelo risco da associação entre maior formação de óxido nítrico com a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio, além de apresentar maior quantidade de DNA extracelular. **Conclusão:** Foi observado potencial efeito benéfico da luz azul 18 J/cm² para a prevenção de lesões celulares como as que ocorrem na radiodermite. Apesar da consolidada ação da luz vermelha no tratamento de feridas, essa parece não ser a melhor opção em profilaxia. Ensaios clínicos são encorajados para que os benefícios observados a nível celular possam ser comprovadamente benéficos na prevenção da radiodermite em humanos.

Palavras-chave: Diodos Emissores de Luz. Fibroblastos. Radiodermite. Radioterapia.

ABSTRACT

PHOTOBIMODULATION IN HUMAN SKIN CELLS INVOLVED IN THE TISSUE REPAIR PROCESS

Author: Fabiana dos Santos Ferreira
Advisor: Hedioneia Maria Foletto Pivetta
Co-Advisor: Francine Carla Cadoná

Treatment with an LED photobiomodulation is a widely used resource without tissue repair with promising results. However, in cancer physiotherapy, it is more in the prevention of radiodermatitis, the use of the resource is still recent and the results are more precise. Therefore, it is necessary to evaluate and understand the effects that LED photobiomodulation has on the skin cells involved in the tissue repair process. Objective: To verify the effects of light-emitting photobiomodulation on human skin cells involved in the tissue repair process. Methods: This research project is characterized as an in vitro experimental study in which human skin cells, HFF-1 fibroblasts will be exposed to different wavelengths: red LED, 658 nm wavelength and LED blue 470 nm, during monitoring for a maximum of 30 days. The tests to be performed include colorimetric, fluorimetric and microscopic methods of verification of parameters related to cell viability and proliferation and free radical formation. It is believed that the data displayed in this research serve as a scientific reference for further studies, including human clinical trials that are of interest for the future. In addition, it is possible to use as a scientific comparison for clinical practice, where LED photobiomodulation may be a safe, low non-pharmacological alternative for radiodermatitis prevention. Results: The blue light demonstrated potential for cell protection mainly by reducing the formation of free radicals and protecting the cell membrane observed with the reduced number of double-stranded DNA strands. The red light, on the other hand, showed less potential for cell protection, due to the risk of the association between greater formation of nitric oxide with increased formation of reactive oxygen species, in addition to having a greater amount of extracellular DNA. Conclusion: A potential beneficial effect of 18 J/cm² blue light was observed for the prevention of cell injuries such as those that occur in radiodermatitis. Despite the consolidated action of red light in the treatment of wounds, this does not seem to be the best option in prophylaxis. Clinical trials are encouraged so that the benefits seen at the cellular level can prove to be beneficial in preventing radiodermatitis in humans.

Keywords: Light-emitting diode. Fibroblasts. Radiodermatitis. Radiotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlInP- Alumínio Índio Fósforo

ATP - Adenosina trifosfato),

CA - Câncer

CTC - Common Toxicity Criteria

DCF - Diclorodihidrofluoresceína

DCFH - Diclorofluoresceína

DCFH-DA - Diclorofluoresceína diacetato

DMSO - Dimetilsulfóxido

EROs - Espécies reativas de oxigênio

InGaNe- Índio Gálio e Neonio

LASER- Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LED - Light Emitting Diode

MDA - Malondialdeído

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NCI -.National Cancer Institute

NBT - Cloreto de Nitrobluetetrazoliun

ON - Óxido nítrico

RT- Radioterapia

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UFN – Universidade Franciscana

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do percurso metodológico.....	27
Figura 2 - Placas de Petri com cultivo celular de fibroblastos. As tampas das placas foram identificadas quanto à cor da luz, à dose irradiada e ao período analisado.....	28
Figura 3 - Irradiação da luz led vermelha no cultivo celular de fibroblastos na placa de Petri sem tampa dentro do fluxo laminar.	30
Figura 4 - Irradiação da luz led azul no cultivo celular de fibroblastos na placa de Petri sem tampa dentro do fluxo laminar.....	30

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo geral	13
1.1.2 Objetivos específicos	13
1.2 JUSTIFICATIVA	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 FIBROBLASTOS NA PELE ÍNTEGRA	15
2.1.1 Fibroblastos	15
2.2 FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL.....	16
2.3 RADIODERMITE.....	17
2.4 FOTOBIMODULAÇÃO POR <i>LIGHT EMITTING DIODE</i> (LED)	19
2.4.1 Luz Vermelha	19
2.4.2 Luz azul	21
2.5 FOTOBIMODULAÇÃO EM RADIODERMITE	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	28
3.3 CULTIVO CELULAR	28
3.4 EXPOSIÇÕES A LUZ	29
3.5 TESTES EXPERIMENTAIS.....	31
3.5.1 Avaliação da viabilidade celular	31
3.5.2 Avaliação do metabolismo oxidativo	32
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
3.7 CRITÉRIOS ÉTICOS.....	33
4 ARTIGO	34
CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO LOCAL DE PESQUISA	55
ANEXO B – REGISTRO DO PROJETO	56
ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	57

1 INTRODUÇÃO

A fotobiomodulação (FBM) vem sendo amplamente pesquisada no processo de reparo tecidual de lesões de pele, seja com pesquisas *in vitro* ou diretamente sobre lesões em ratos, coelhos ou mesmo de seres humanos (ROBIJNS et al., 2018; KUFFLER, 2016; HAMBLIN; NELSON; STRAHAN, 2018).

O efeito da FBM sobre a pele depende do comprimento de onda empregado. Os comprimentos de onda que resultam na luz vermelha apresentam a potencialidade de estimular os tecidos biológicos, principalmente pelo aumento de síntese de ATP (adenosina trifosfato), a moeda energética celular, responsável por favorecer a síntese proteica, em processos como a reepitelização da epiderme e também na formação de colágeno (WEISS et al., 2005; YEH, WU, CHENG, 2010). Já, a luz azul tem atraído a atenção da comunidade científica, com um número cada vez maior de estudos. A principal característica da fotobiomodulação por luz azul é a capacidade de inibir alguns processos celulares, como, por exemplo, ação anti-proliferativa em células endoteliais humanas e redução da liberação de citocinas pró inflamatórias (LIEBMANN; BORN; KOLB-BACHOFEN, 2010). Estudos demonstraram que esse comprimento de onda também é capaz de promover a recuperação de lesões agudas da pele e aumentar a hidratação tecidual, o que pode modular o processo inflamatório exacerbado (FISCHER et al., 2013; KEEMSS et al., 2016).

Um tipo específico de lesão de pele é interesse deste estudo, ou seja, aquelas provocadas pela ação da radioterapia (RT). Quando o paciente é submetido ao tratamento do câncer por esta terapêutica, outras células, que não as cancerígenas, também são atingidas pela radiação e, muitas vezes, a destruição destas células, causa graves complicações. As manifestações clínicas da radiodermite variam desde um eritema leve à descamação (seca ou úmida), podendo evoluir até a necrose tecidual (BRAY et al., 2016; SCHNUR et al., 2011). Dados da Britannica Academic (2018) mostram que entre 70 e 100% dos pacientes com câncer de mama, submetidas a RT, desenvolvem radiodermite. Inúmeros fatores influenciam no aparecimento deste tipo de lesão, alguns inerentes ao tratamento, como a dose total e a energia da radiação (SALVO et al., 2010; McQUESTION, 2011; HYMES; STROM; FIFE, 2006; BROWN; RZUCIDLO, 2011) assim como outros que dependem da condição prévia do paciente, como a idade avançada, tabagismo, doenças crônicas e outros tratamentos antineoplásicos concomitantes (WONG et al., 2013). Apesar dos avanços significativos nas técnicas de RT e da prevenção realizada nos centros de tratamento, a radiodermite ainda é o

maior efeito adverso agudo enfrentado pelo paciente com câncer de mama, levando muitas vezes a diminuição da qualidade de vida ou mesmo a interrupção do tratamento (HILLETZ et al., 2016).

A fotobiomodulação por luz vermelha e infravermelha vem sendo pesquisada na prevenção da radiodermite, os protocolos consistem em aplicações diárias por todo o período de tratamento radioterápico. Alguns protocolos irradiam a luz imediatamente antes e outros imediatamente depois das sessões de radioterapia. Desta forma, os pacientes são submetidos à fotobiomodulação por períodos longos, em média de vinte a vinte oito dias consecutivos (YEH; WU; CHENG, 2010; CAETANO et al., 2009). Contudo, os comprimentos de onda que geram a luz azul, ainda não foram investigados para a prevenção e tratamento da radiodermite. Visto a fisiopatologia desta e a potencialidade terapêutica da luz azul, acredita-se que esta sim, tenha grande potencial para a prevenção e o controle da evolução das lesões de pele causadas pela radioterapia.

Considerando a importância da conclusão do tratamento radioterápico em pacientes oncológicos e a alta ocorrência de radiodermite que pode levar à interrupção desse tratamento, faz-se necessária a busca por novas terapêuticas para prevenção da radiodermite. Esse estudo foi motivado pela potencialidade terapêutica da luz azul em proteger a pele das agressões provocadas pela radiação verificada a partir de um estudo piloto com uma paciente em tratamento para o câncer de mama por radioterapia com luz azul sempre antes das sessões de radioterapia. Concomitantemente, a um estudo experimental dos efeitos da fotobiomodulação por luz LED vermelha que vem sendo estudada em pacientes para a prevenção da radiodermite e a luz LED azul, a qual acreditamos ser a mais apropriada para prevenção das lesões causadas pela radioterapia na pele.

Assim sendo, este trabalho de conclusão de curso de mestrado é composto pelos elementos representativos da dissertação em si, agregados ao artigo científico a ser submetido ao periódico *Lasers in Medical Science*, cujas normas são incorporadas ao Anexo C.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos da fotobiomodulação por diodos emissores de luz em células de pele humana envolvidas no processo de reparo tecidual.

1.1.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos do LED vermelho e azul na viabilidade e proliferação celular de fibroblastos expostos a cada comprimento de onda, a partir da análise da redução do MTT.

Investigar a ação do LED vermelho e azul nas taxas de apoptose celular de fibroblastos expostos a cada comprimento de onda, a partir da formação de dsDNA;

Verificar a ação do LED vermelho e azul no metabolismo oxidativo em fibroblastos expostos a cada comprimento de onda, por meio da determinação indireta da produção de óxido nítrico e da determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio.

1.2 JUSTIFICATIVA

A fisioterapia tem colaborado no processo de reabilitação dos pacientes oncológicos, através do planejamento e da execução de ações que visem a prevenção de complicações, ou promovendo a melhora funcional e, por conseguinte melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

O LED é um recurso amplamente utilizado no reparo tecidual com resultados promissores, no entanto, na fisioterapia oncológica, mais precisamente na prevenção de radiodermite, o uso desse recurso ainda é recente e os resultados obtidos precisam ser melhor elucidados. Diante disso, faz-se necessário avaliar e compreender os efeitos que a fotobiomodulação por LED exerce sobre as células da pele envolvidas no processo de reparo tecidual.

Este estudo justifica-se pela potencialidade da luz LED, especialmente no comprimento de onda azul, em oferecer maior proteção à pele contra a agressão da RT. A prevenção da radiodermite pode favorecer a funcionalidade, visto que as lesões de pele podem dificultar e até impedir, a execução de movimentos, atrasando o restabelecimento da

funcionalidade do sistema músculo-esquelético. E também, evitar a interrupção da radioterapia, já que as lesões de pele inviabilizam a continuidade do tratamento. O paciente com câncer (CA) já vivencia uma dolorosa realidade em busca da cura, portanto, todo benefício com potencial de proporcionar conforto e bem-estar a estes pacientes, deve ser investigado.

Acredita-se que os dados obtidos nessa pesquisa servirão como referencial teórico científico para novos estudos, inclusive ensaios clínicos em humanos que são de interesse destes pesquisadores para o futuro. Além disso, poderão servir como amparo científico para a prática clínica, onde a fotobiomodulação por LED possa ser uma alternativa não farmacológica, segura e de baixo custo para a prevenção da radiodermite.

Este estudo desenvolveu-se no período da maior pandemia já vivenciada em nosso tempo, a Covid-19. Sendo assim, sofreu as consequências do fechamento dos laboratórios das instituições de ensino, o que interferiu diretamente no tempo de desenvolvimento da pesquisa e levou a impossibilidade de seguir o protocolo inicial que previa mais um tipo celular a receber a fotobiomodulação, os queratinócitos. Contudo, os resultados obtidos nas coletas anteriores a esse período, possibilitam a defesa dessa dissertação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FIBROBLASTOS NA PELE ÍNTEGRA

A pele é uma membrana de camada dupla, no adulto apresenta espessura variável de 1,5 mm a 4 mm, com peso médio, quando seca, de aproximadamente 2 Kg a 4 Kg. É composta de diferentes células responsáveis pelas suas variadas funções. A espessura, a quantidade e tipo de anexos cutâneos variam de acordo com a região do corpo (HARRIS, 2011).

A pele apresenta duas camadas diferenciadas pelo tipo de tecido. A epiderme, que tem como principal responsável pela sua estrutura os queratinócitos. E a derme, um tecido conectivo altamente vascularizado e fibroso, onde os fibroblastos são as células mais importantes (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

2.1.1 Fibroblastos

Os fibroblastos são as células predominantes da derme, são responsáveis pela síntese da maior parte das substâncias que formam essa camada da pele. A derme é o tecido conjuntivo da pele onde estão localizados os vasos sanguíneos, inervação, corpo dos apêndices da epiderme (folículos pilosos, e glândulas) e células matrizes. Apresenta formato irregular devido às saliências formadas pelas papilas dérmicas (estruturas que aumentam a área de contato entre a derme e a epiderme, reforçando a sua união). Tem espessura que varia de 0,5 mm a 3,00 mm, é mais espessa em homens e na parte anterior do tronco. A derme é formada de duas camadas com limites não muito bem definidos: A derme papilar e a derme reticular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; HARRIS 2011).

A derme papilar é responsável pela conexão da derme com a epiderme, a denominação deve-se as inúmeras interdigitações ou papilas dérmicas desta camada. É formada por tecido conjuntivo frouxo, com a presença de fibras oxitalana compostas de elastina e glicoproteínas (proteínas mistas, com moléculas de carboidratos acopladas) sintetizadas pelos fibroblastos. A disposição perpendicular das fibras oxitalanas com relação a membrana basal, fixam a derme a esta membrana (KESSEL, 2001).

Diferente da derme papilar, a derme reticular é um tecido conjuntivo denso. Na derme, os fibroblastos sintetizam principalmente fibras colágenas do tipo I dispostas horizontalmente

a membrana basal, garantindo resistência à pele. É nesse tecido rico em colágeno, que estão os corpos dos apêndices dérmicos, os vasos sanguíneos, os músculos eretores dos pêlos e fibras elásticas. Todos estes elementos estão mergulhados em uma substância de cimentação, a matriz extracelular também sintetizada por fibroblastos. Composta por fibronectina e elementos chamados de glicoproteínas (ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana), a matriz extracelular exerce importante papel na manutenção do volume da derme e na permeabilidade e osmolalidade intersticial dos fluidos, sendo fundamental no transporte de água e eletrólitos (KESSEL 2001; HARRIS, 2011).

2.2 FIBROBLASTOS NO REPARO TECIDUAL

O reparo tecidual se faz necessário quando há uma agressão direta aos tecidos ou quando em um processo inflamatório crônico, os macrófagos destroem o parênquima e o estroma celular. Em tecidos formados por células lábeis, aquelas capazes de se dividir como a pele, a reparação completa, pelo menos em teoria, pode acontecer. Contudo, quando o processo de cicatrização é defeituoso ou excessivo, pode resultar em fibrose e o excesso de deposição de colágeno pode interferir na funcionalidade dos órgãos (REISNER, 2016).

O processo de reparo tecidual é composto por diferentes fases, a homeostática, em que há a formação da crosta da ferida, com agregação de plaquetas que liberam citocinas e fatores de crescimento responsáveis pela ativação de células importantes em outras fases do processo, como os fibroblastos. A fase inflamatória tem predominância de macrófagos que fagocitam os restos celulares e liberam quimiotáticos que sinalizam a angiogênese (REISNER, 2016).

Mas é na fase proliferativa que os fibroblastos e queratinócitos são fundamentais. Com a formação dos novos vasos, os fibroblastos passam a liberar colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, compondo o tecido de granulação, que é o indicador histológico do reparo tecidual. A contração futura da ferida depende dos miofibroblastos derivados de fibroblastos que contém a proteína α -actina de músculo liso (ROBBINS, 2013).

Após o leito da ferida ser preenchido pelo tecido de granulação, começa a ocorrer o processo de reepitelização, onde os queratinócitos da borda da lesão migram para o centro, ao mesmo tempo que células-tronco do bulbo de folículos pilosos e de glândulas sudoríparas se transformam em queratinócitos e migram da base, até se encontrarem e então cobrirem a lesão. O processo de reparo tecidual é concluído com a fase de remodelamento, onde as fibras

colágenas, liberadas pelos fibroblastos na fase anterior, predominam e o tecido de granulação é convertido em tecido cicatricial (ROBBINS, 2013; REINSER, 2016).

A força tênsil da pele que sofreu a lesão pode chegar até 75% da força original com maturação e contração contínuas. Durante o processo de maturação, as enzimas metaloproteinases são responsáveis por equilibrar a produção e degradação de colágeno. A ausência deste equilíbrio pode causar complicações como cicatrizes alargadas (por degradação excessiva), cicatrizes hipertróficas (desalinhamento das fibras colágenas) e quelóides (proliferação excessiva de colágeno que tem propensão genética) (REISNER, 2016).

2.3 RADIODERMITE

A radiodermite é considerada um dos principais efeitos colaterais da radiação ionizante aplicada sobre a pele durante o tratamento do CA. Estima-se que aproximadamente 95% dos pacientes tratados com RT possam desenvolver algum grau de radiodermite (SINGH et al., 2016; SEITÉ; BENSADOUN; MAZER, 2017).

A pele é um órgão particularmente sensível aos danos induzidos pela radiação ionizante porque está em constante processo de renovação celular (SEITÉ; BENSADOUN; MAZER, 2017). A pele saudável apresenta um ténue equilíbrio entre a renovação e a morte celular e os danos agudos induzidos pela radiação começam a ocorrer na epiderme desde a primeira sessão de RT, com a destruição de queratinócitos basais, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) de curta duração, quebras irreversíveis no DNA celular e surgimento da resposta inflamatória (SEITÉ; BENSADOUN; MAZER, 2017; LEVENTHAL; YOUNG, 2017; BRAY et al., 2016). Os queratinócitos basais são as células da epiderme com maior capacidade de se multiplicar através do processo mitótico. A partir delas, todas as outras camadas de células da epiderme são geradas, inclusive a última, a camada córnea, responsável pela função barreira da pele. Desse modo, a destruição da camada basal, compromete toda a epiderme, e com ela, a integridade física da pele. O que, entre outras complicações, pode levar a quadros de infecção por patógenos. (HARRIS, 2004).

A patogênese da radiodermatite envolve uma combinação entre a ação direta da radiação e a subsequente resposta inflamatória, que afeta os elementos celulares da epiderme, derme e a rede vascular (SINGH et al., 2016). A dose inicial de radiação produz dano tecidual

imediatamente por meio da produção de elétrons e EROs que atacam as estruturas celulares, e cada fração subsequente de radiação gera maior recrutamento de células inflamatórias. A agudização do processo inflamatório, com presença permanente de células fagocitárias, aumenta a destruição tecidual (HARRIS, 2004). Desse modo, com o efeito cumulativo da radiação, ocorrem alterações estruturais, histológicas e vasculares na pele e nos tecidos conjuntivos adjacentes (SEITÉ; BENSADOUN; MAZER, 2017).

As manifestações clínicas da radiodermite variam desde um eritema leve à descamação (seca ou úmida), podendo evoluir até a necrose tecidual (BRAY et al., 2016; SCHNUR et al., 2011). Ao nível dos tecidos, a lesão na pele inclui a destruição das células basais e o esgotamento das células cutâneas. O eritema surge devido a dilatação dos vasos dérmicos e aumento na produção e liberação de histamina (SINGH et al., 2016). Como a migração das células basais para a superfície da pele fica comprometida pela radiação, inicialmente observa-se uma descamação do tipo seca, com a continuidade das sessões de RT ocorre o extravasamento de exsudatos gerando a descamação úmida na sequência. O dano vascular endotelial pode induzir a hipóxia tecidual, resultando em necrose tardiamente (SINGH et al., 2016; BRAY et al., 2016).

A avaliação da radiodermite é classificada em graus através de inspeção visual e o instrumento utilizado para este fim é o Common Toxicity Criteria – CTC com critérios definidos pelo *National Cancer Institute* (NCI), são eles: Grau 1: Eritema leve ou descamação seca. Grau 2: Eritema moderado, descamação úmida irregular confinada a dobras e rugas da pele e edema moderado. Grau 3: Descamação úmida em outras áreas que não dobras e rugas da pele, sangramento por trauma menor ou abrasão. Grau 4: Necrose da pele ou ulceração da derme em toda a sua espessura, sangramento espontâneo a partir da área envolvida e indicação de enxerto de pele. Grau 5: Morte do paciente em decorrência da lesão de pele (HUANG et al., 2015).

As alterações cutâneas ocasionadas pela RT comprometem a integridade da pele, podendo ocasionar quadros alérgicos, aumento do risco de infecção e comprometimento da QV (AISTARS, 2006; SINGH et al., 2016). Portanto, a necessidade de terapias que objetivem frear este processo, pode trazer inúmeros benefícios aos pacientes portadores de câncer de mama.

2.4 FOTOBIMODULAÇÃO POR *LIGHT EMITTING DIODE* (LED)

Fotobiomodulação é o nome dado à ação da luz nos tecidos biológicos. A primeira fonte de luz utilizada para este fim foi o LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). E o primeiro equipamento de laser foi criado em 1960 por Theodore Maiman (J Hecht, 2005). O fenômeno físico para a formação dos feixes de laser é a emissão estimulada, que excita os elétrons de gases utilizando eletricidade ou reações químicas, promovendo a liberação de fótons, originando luz monocromática, coerente e de baixa divergência. Apesar de começarem a serem utilizados para fotobiomodulação muito tempo depois, os primeiros relatos históricos sobre LED foram escritos em 1907 por Henry Rodada e 1927 por Oleg Losev. Estes pesquisadores perceberam que quando uma corrente elétrica passava /por cristais de carboneto de silício, estes brilhavam. O princípio físico do LED é a eletroluminescência, um fenômeno de materiais semicondutores. Atualmente, na maioria das vezes são gerados por InGaN e AlInP (HEINSKANEN; HAMBLIN, 2018).

Os benefícios terapêuticos do LASER na cicatrização de feridas vêm sendo reportado desde 1960, enquanto a fotobiomodulação por luz LED (*Light Emitting Diode*) passou a ser investigada a partir de 1990 (YEH; WU; CHENG, 2010). Diversos estudos foram realizados comparando a ação do laser e do LED em tecidos vivos. Concluindo que os benefícios terapêuticos das duas fontes de luz são equivalentes, já que o mecanismo de fotobiomodulação está relacionado ao comprimento de onda e a dose de energia. Desta forma, o uso terapêutico da luz LED vem crescendo, porque além de apresentar os mesmos benefícios que o LASER, os equipamentos de LED ainda são considerados de baixo custo (NISHIOKA et al., 2012). Ainda, a capacidade de irradiar grandes áreas ao mesmo tempo e a segurança para uso domiciliar, faz com que alguns autores defendam que o LED veio para ficar (HEINSKANEN; HAMBLIN, 2018).

O efeito terapêutico da fotobiomodulação está relacionado ao seu comprimento de onda, e cada comprimento de onda é absorvido por alguma estrutura biológica chamada cromóforo.

2.4.1 Luz Vermelha

O espectro de onda da luz LED vermelha visível é de 620 nm até 770 nm, e pode atingir até 6 mm de penetração nos tecidos irradiados. No caso da luz vermelha, acredita-se

que a absorção seja por moléculas de citocromo-oxidase, presente nas membranas das mitocôndrias, justificando o conhecido aumento na produção de ATP (WEISS et al., 2005).

A luz vermelha é conhecida pelo seu efeito estimulante celular. Seu mecanismo de ação é promover o estímulo mitocondrial, elevando as taxas de produção de Adenosina Trifosfato (ATP) e com isso, aumentando a produção proteica, inclusive da macromolécula de colágeno, o que acelera o processo de reparo tecidual (YEH, WU, CHENG, 2010). Desta forma, a luz vermelha demonstrou até agora, grande potencial para o tratamento de feridas cutâneas, pois promove entre outros benefícios derivados da proliferação celular, a epitelização e a neovascularização (CAETANO et al., 2009; De SOUZA et al., 2010; De SOUZA et al., 2013; SIMOES et al., 2019; HAMBLIN; NELSON; STRAHAN, 2018).

A luz vermelha foi capaz de aumentar a proliferação de fibroblastos, células produtoras de grande parte de estruturas fundamentais no processo de reparo tecidual, como o colágeno. De Souza et al. (2010) irradiaram por sete dias consecutivos ratos Wistar, em que estes foram divididos em quatro grupos, LED vermelho (700 nm, 10 J/cm²), LED verde (530 nm, 10 J/cm²), LED azul 460 nm, 10 J/cm²) e controle. As análises quantitativas revelaram que o grupo que recebeu as doses diárias de luz vermelha, apresentou maior número de células de fibroblastos na área da ferida induzida por incisão. A luz verde também foi capaz de estimular a proliferação de fibroblastos em relação ao grupo controle.

Em um estudo com 60 ratos Wistar, Simões et al. (2019) investigaram os efeitos de dois comprimentos de onda da luz LED, 520 nm (verde) e 630 nm (vermelho) na cicatrização de queimaduras de terceiro grau. Com irradiações diárias, na dose de 60 J/cm² de luz verde e 9 J/cm² de luz vermelha, os pesquisadores concluíram que a luz vermelha foi mais efetiva para acelerar a reepitelização e a contração da ferida.

O estímulo da angiogênese pela luz vermelha pôde ser observado no estudo de Souza et al. (2013). Os pesquisadores irradiaram a região dorsal de vinte e quatro ratos Wistar a cada dois dias, por sete dias. Em análise histológica, os autores compararam os efeitos de diferentes comprimentos de onda, LASER e LED e verificaram maior número de vasos sanguíneos nos grupos irradiados por LED vermelho (700 nm) e LED verde (530 nm) em relação aos grupos irradiados com LASER vermelho e infravermelho na mesma intensidade. O grupo que recebeu o comprimento de onda azul não obteve diferença em relação ao grupo controle. Os autores concluem que tanto o LASER, quanto o LED foram efetivos para estimular a angiogênese em feridas *in vivo* e que a coerência da luz não foi relevante no processo.

Observando que as terapias convencionais, como curativos e fatores de crescimento não eram efetivas para tratar úlceras venosas, Caetano et al. (2009) realizaram um ensaio clínico randomizado duplo cego com fotobiomodulação por LED associando os comprimentos de onda 660 nm (vermelho) e 890 nm (infravermelho) em 32 úlceras venosas crônicas em humanos. O grupo controle não recebeu irradiação do LED, apenas a limpeza da ferida, o grupo placebo recebeu sobre as lesões uma dose baixa de irradiação 0,03 J/cm² e no grupo de estudo as lesões foram irradiadas com a dose terapêutica de 3 J/cm², as irradiações foram realizadas duas vezes por semana. As feridas consideradas pequenas, no total de 8 cicatrizaram independentemente da luz em 60 dias. A maior diferença na taxa de cicatrização foi entre o grupo que recebeu a irradiação em dose terapêutica em relação aos outros dois grupos na avaliação de 30 dias, nesse período, apenas o grupo de tratamento obteve taxa de cicatrização superior a 40%. Em 90 dias, as feridas que receberam o placebo com dose baixa, também tiveram maior taxa de cicatrização do que o grupo controle, contudo, o grupo que recebeu a irradiação em J/cm² apresentou maior contração da ferida no final do estudo. Deste modo, os autores concluíram que a fototerapia por LED acelera o processo de cicatrização, quando comparado às terapias convencionais.

2.4.2 Luz azul

Já a luz azul LED está na faixa de comprimento de onda que vai de 400 nm até 480 nm, e tem menor penetração nos tecidos, podendo atingir até 1 mm de profundidade (LI et al., 2016). O cromóforo que mais absorve a luz azul é a hemoglobina. Esse comprimento de onda parece modular a expressão gênica e interferir em uma ampla gama de vias de sinalização celulares, geralmente com efeito inibitório (LIEBMANN; BORN; KOLB-BACHOFEN, 2010). O efeito mais elucidado da luz azul parece ser em relação a formação de óxido nítrico (NO) por vias não enzimáticas.

Oplaner et al. (2013) pesquisaram os efeitos da luz azul em células humanas *in vitro* e *in vivo*. Nas células de fibroblastos utilizaram diferentes comprimentos de onda, 420 (+10) nm com dose de 45 J/cm², no comprimento de onda 453 (+10) nm a dose utilizada foi de 90 J/cm². Já quando aplicaram em pacientes que seriam submetidos a mamoplastia ou abdominoplastia, utilizaram o comprimento de onda 453 (+10) nm por 30 minutos, irradiando a dose de 104 J/cm² paralelamente a pele na distância de 5 cm. Em todas as situações estudadas os autores verificaram o aumento da produção de óxido nítrico. Observaram que o

comprimento de onda de 420 nm provocou aumento maior na formação de óxido nítrico (ON) do que o comprimento de onda 453 nm nas culturas celulares. Os autores afirmam que a produção de ON é modulada pela presença de cobre e não por uma via enzimática.

Atualmente, estudos já demonstraram que a fotobiomodulação por luz azul – LED é capaz de favorecer a formação da barreira cutânea. Recentemente Falcone et al. (2017) aplicaram luz LED azul 453 nm em 6 sessões de 30 minutos com dose diária de 18J/cm², imediatamente depois do rompimento da barreira cutânea induzida por fita de decapagem após iontoforese de histamina na região do antebraço de 22 voluntários. Segundo os autores, a recuperação da barreira cutânea de forma mais rápida no grupo de estudo em relação ao grupo controle, deve-se a um incremento da resposta hemodinâmica induzida pela luz.

Existem evidências sobre a capacidade da luz azul em promover ação anti-proliferativa em células endoteliais humanas, queratinócitos e fibroblastos (LIEBMANN; BORN; KOLB-BACHOFEN, 2010). Neste estudo os pesquisadores irradiaram as células em 3 doses de 66J/cm² e 3 doses de 100 J/cm², observaram redução do número de células em relação ao controle, no caso dos queratinócitos que receberam 3 doses de 100 J/cm² houve redução de aproximadamente 50% quando comparado ao controle não irradiado. Os autores atribuem a inibição da proliferação pela formação de ON, induzida pela luz azul.

Estudos *in vitro* mostram que vias inflamatórias são reguladas negativamente pela luz azul, que também é capaz de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Fischer et al. (2013) irradiaram células dentríticas derivadas de monócitos, que fazem parte do sistema imunológico da pele, com luz azul nas doses 3,75 J/cm², 7,5 J/cm² e 15 J/cm² por respectivamente 3 minutos, 6 minutos e 15 minutos. Os resultados da pesquisa mostraram que a irradiação por luz azul não afetou a sobrevivência celular. Contudo, a supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias foi dependente da dose, quanto maior a dose, maior a inibição.

Clinicamente, a luz azul foi capaz de aliviar sintomas de psoríase vulgar e dermatite atópica, que são doenças crônicas da pele caracterizadas por hiperproliferação celular e inflamação infiltrativa (KEEMSS et al., 2016; PFAFF et al., 2015).

Em estudo randomizado com 20 pacientes que apresentavam eczema, Keems et al. (2015) aplicaram a luz led azul no comprimento de onda 453 nm em um segmento e mantiveram outro segmento do corpo como controle. O protocolo foi de três irradiações por semana, por quatro semanas consecutivas. Os autores verificaram que tanto as lesões tratadas, como as não tratadas, melhoraram ao longo do estudo. Contudo, as regiões que receberam a luz azul apresentaram melhora mais rápida, mais eficiente e em três pacientes elas

desapareceram totalmente. Os autores afirmam que não houve efeitos adversos da luz azul durante o tempo de estudo, portanto, esta não apresentaria riscos a curto prazo, mas que novos estudos devem ser realizados para investigar os efeitos terapêuticos e adversos da luz azul a longo prazo.

Em 2015 Pfaff et al. realizaram um estudo randomizado com 47 pacientes com psoríase vulgar grau leve, os pesquisadores consideraram o membro contra-lateral como controle. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos, um que recebeu a luz azul em alta intensidade, 200 mW/cm² e outro que foi irradiado com baixa intensidade de luz azul, 100 mW/cm². Os autores concluíram que nos dois grupos, a luz azul apresentou resultado estatisticamente significativo e superior ao controle. Contudo, o grupo que recebeu a luz em maior intensidade obteve os melhores resultados segundo o Índice de Gravidade da Psoríase e também o nível de satisfação dos pacientes com o tratamento foi maior neste grupo.

2.5 FOTOBIMODULAÇÃO EM RADIODERMITE

Nos pacientes com CA de mama, os primeiros estudos foram sobre os benefícios na redução do linfedema, com a luz vermelha aplicada em regiões endurecidas (SMOOT et al., 2015). Existem diversos estudos com luz em mucosite oral, induzida por radiação, com resultados favoráveis no controle destas lesões (BJORDAL et al., 2011; ANTUNES, 2017; BJORDAL, 2018).

A maioria dos estudos sobre a fotobiomodulação nas lesões de pele provocadas pela radiação no paciente oncológico utilizam o LED vermelho ou laranja por sua já conhecida eficiência em promover o reparo tecidual (STROUTHOS et al., 2017; SMOOT et al., 2015; BJORDAL et al., 2011; FIFE et al., 2010).

O uso da fotobiomodulação por LED vermelho em radiodermite é controverso, visto que os estudos divergem quanto aos benefícios desta em pacientes com CA de mama. Recentemente, na Alemanha, pesquisadores que aplicaram o LED vermelho imediatamente antes das sessões de RT, julgaram a técnica eficaz na diminuição da incidência das sequelas cutâneas induzidas pela toxicidade da radiação (STROUTHOS et al., 2017). Porém, alguns autores discordam dessa hipótese, pois não verificaram redução na incidência de lesões cutâneas e nem na interrupção do tratamento radioterápico com o uso da fotobiomodulação antes e depois das sessões de RT. Os autores sugeriram estudos mais aprofundados para

analisar a eficácia da fotobiomodulação por LED na prevenção de dermatite por radiação (FIFE et al., 2010).

DeLand et al. (2007) realizaram um estudo com dezenove pacientes e um grupo controle que realizaram radioterapia após mastectomia. Eles aplicaram fotobiomodulação com um painel de LED no comprimento de onda de 590 nm uma hora após as sessões de radioterapia, durante todo o período de tratamento, que durou em média cinco semanas. Os autores concluíram que a fotobiomodulação logo após a radioterapia é capaz de reduzir a incidência de radiodermite nos graus 1, 2 e 3.

Um painel de LED no comprimento de onda 590 nm também foi utilizado no estudo de Fife et al. (2010), a fotobiomodulação foi realizada por 35 segundos antes e 35 segundos depois das sessões de radioterapia. As aplicações de LED seguiram-se por mais duas semanas após o término da radioterapia, durante todos os dias. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na prevenção da radiodermite e nem na interrupção do tratamento no grupo que realizou a fotobiomodulação em relação ao grupo controle.

Strouthos et al., (2017) trataram com um cluster contendo LED vermelho (660 nm) e infravermelho (850 nm), 25 pacientes que realizaram radioterapia, as sessões eram realizadas 30 minutos antes de cada sessão de radioterapia. Eles avaliaram a evolução da pele através do CTC versão 4.0. No grupo que recebeu fotobiomodulação, 22 pacientes (88%) apresentaram grau 1 e 3 pacientes (12%) grau 2 de radiodermite. Já no grupo de controle, formado por 45 pacientes que estavam em radioterapia, mas não receberam a fotobiomodulação, 25 pacientes (55,6%) desenvolveram reações grau 1, outros 18 paciente (40%) grau 2 e 2 (4,4%) pacientes grau 3 RD. Em relação à intensidade da dor avaliada através da Escala Visual Analógica (EVA), 15 pacientes (60%) do grupo tratado não relatou dor, 5 pacientes (20%) EVA 2, e 5 (20%) EVA 3. No grupo controle, 13 pacientes (28,9%) não relataram dor, 2 (4,4%) EVA 1, (15,6%) EVA 2, 9 pacientes (20%) relataram EVA 3, 12 (26,7%) pacientes EVA 4, e 2 (4,4%) pacientes EVA 5. Os autores concluíram que a fotobiomodulação pode ser efetiva para diminuir a incidência de lesões cutâneas em pacientes que realizam radioterapia.

Visto a patogênese da radiodermite estar relacionada a destruição da epiderme e ao processo inflamatório subsequente, causador de danos na epiderme, derme e sistema vascular (SEITÉ; BENSADOUN; MAZER, 2017), acredita-se que seja possível a prevenção da ocorrência destas lesões caso se consiga aumentar a capacidade de proteção da pele e promover o controle do processo inflamatório. As pesquisas atuais abordam a radiodermite como um processo de destruição tecidual já instaurado, mesmo quando a fotobiomodulação é utilizada

antes de cada sessão de radioterapia, portanto, fazem uso de comprimentos de onda capazes de estimular as células. Desta forma, acredita-se que o potencial de controle da inflamação crônica pela luz azul, seja capaz proteger a pele das agressões causadas pela RT, reduzindo a incidência de radiodermite e a evolução para graus avançados de acometimento, atuando na profilaxia e não apenas no reparo tecidual.

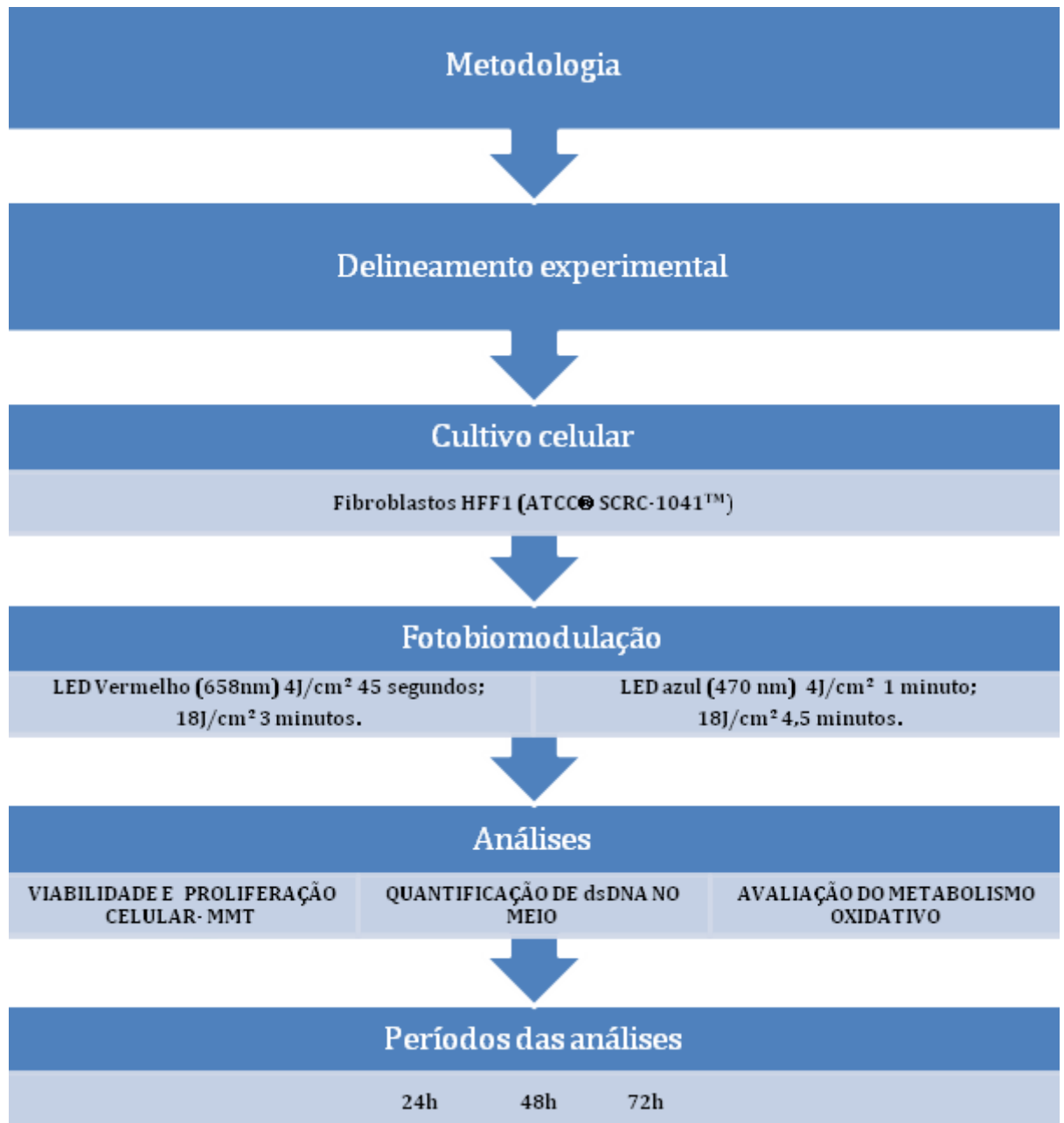
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este projeto de pesquisa caracteriza-se como um estudo de caráter experimental *in vitro* em que células de pele humana, fibroblastos da linhagem HFF-1, foram expostas a diferentes comprimentos de onda: LED vermelho, comprimento de onda 658 nm e LED azul 470nm. Os ensaios realizados incluíram métodos colorimétricos, fluorimétricos e microscópicos de verificação dos parâmetros relacionados a viabilidade e proliferação celular e ao metabolismo oxidativo.

Na Figura 1 está representado um fluxograma com o resumo do percurso metodológico.

Figura 1 - Fluxograma do percurso metodológico.



FONTE: Autor.

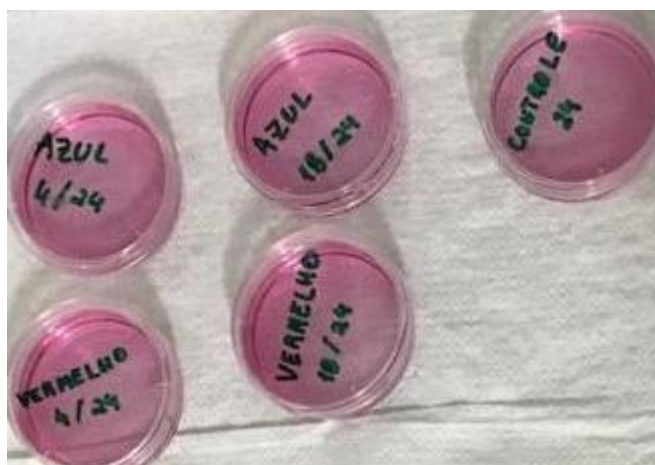
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

As coletas foram realizadas no Laboratório de Cultivo Celular da Universidade Franciscana-UFN e ocorreram no mês de dezembro de 2019.

3.3 CULTIVO CELULAR

A linhagem celular HFF1 (ATCC® SCRC-1041TM), foi obtida a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para o cultivo de tais células foi utilizado o meio de cultivo celular RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R8758, São Paulo, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, F2442, São Paulo, SP, Brasil) e suplementado com 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina (100U/mL e 100mg/mL, respectivamente) (Gibco® Thermo Fisher, 15140122, São Paulo, SP, Brasil) e 1% de antifúngico anfotericina B (Gibco® Thermo Fisher, 15290018, São Paulo, SP, Brasil). As células foram mantidas em incubadora de CO₂, com controle da saturação de CO₂ de 5%, temperatura em 37°C e ambiente umidificado. As linhagens foram acompanhadas microscopicamente quanto a formação de monocamada em frasco de cultivo celular, sendo que ao atingir confluência entre 90-98% tais células foram repicadas, de modo que metade da suspensão celular foi disposta em placas de cultivo tipo Petri (Figura 2).

Figura 2 - Placas de Petri com cultivo celular de fibroblastos. As tampas das placas foram identificadas quanto à cor da luz, à dose irradiada e ao período analisado.



FONTE: Autor.

3.4 EXPOSIÇÕES A LUZ

As células foram expostas uma única vez ao LED vermelho ou ao LED azul.

Foi utilizado, exclusivamente para esse estudo, o equipamento de fotobiomodulação Endophoton - KLD - Brasil, número de série FB4LSD35, validado e autorizado pela ANVISA para uso medicinal. Considerando as características do equipamento Endophoton-KLD, a área efetiva de irradiação é de 5,3 cm². O aplicador LED vermelho contém doze pontos de LED no comprimento de onda 658 nm com 0,04 W de potência cada, totalizando 0,48 W de potência por área efetiva de irradiação. A luz vermelha foi irradiada na dose de 4 J/cm² como preconizado por Zecha et al. (2016), neste equipamento configurando o tempo de 44 segundos de irradiação.

O Aplicador LED azul contém doze pontos de LED no comprimento de onda 470 nm com 0,03 W de potência cada, totalizando 0,36 W de potência por área efetiva de irradiação. A dose utilizada na luz azul foi de 18 J/cm², neste equipamento equivale a 265 segundos, aproximadamente 4,4 minutos de irradiação (FALCONE et al., 2017).

Para melhor comparação entre os resultados das doses preconizadas na literatura, também foram irradiadas células de fibroblastos com luz azul na dose de 4J/cm² e com luz vermelha na dose de 18 J/cm². Os tempos exposição à luz foram respectivamente 1 minuto e 3 minutos.

Foram utilizadas as duas equações que seguem para definição do tempo de irradiação por ponto:

$$\text{Energia} = \text{Potência} \times \text{Tempo} \quad (1)$$

$$\text{Dose} = \text{Energia} / \text{Área} \quad (2)$$

Durante a irradiação das células, o dispositivo de LED foi posicionado paralelamente a placa de cultivo celular, permitindo assim que a luz fosse irradiada de forma perpendicular. Durante as irradiações, as placas de cultivo celular ficaram sem as tampas, permitindo a absorção total da luz pelas células. Para tanto, a irradiação da luz foi realizada dentro do fluxo laminar, a fim de evitar contaminação do material (Figura 3 e Figura 4).

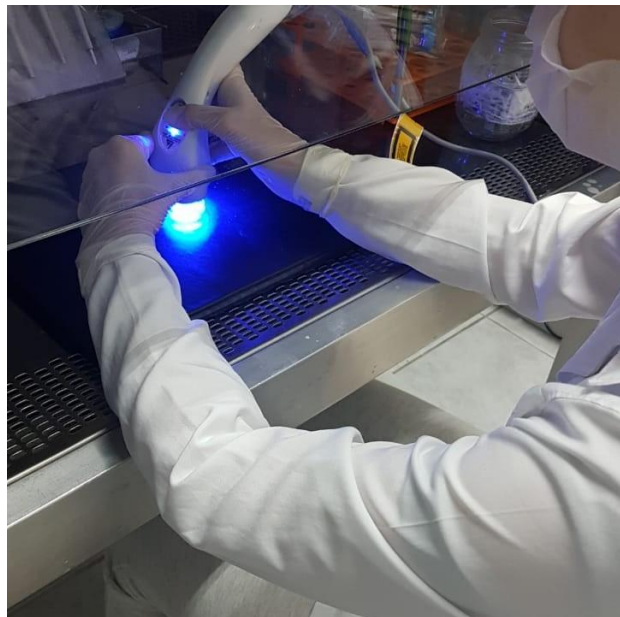
Um único pesquisador foi responsável pela irradiação das células.

Figura 3 - Irradiação da luz led vermelha no cultivo celular de fibroblastos na placa de Petri sem tampa dentro do fluxo laminar.



FONTE: Autor.

Figura 4 - Irradiação da luz led azul no cultivo celular de fibroblastos na placa de Petri sem tampa dentro do fluxo laminar.



FONTE: Autor.

3.5 TESTES EXPERIMENTAIS

Os testes experimentais que contemplam os objetivos do presente projeto de pesquisa estão descritos a seguir. Os mesmos foram realizados sempre pelo mesmo pesquisador.

3.5.1 Avaliação da viabilidade celular

3.5.1.1 Ensaio do MTT

Após a irradiação, células foram avaliadas em 24, 48 e 72h quanto a viabilidade e proliferação celular através do ensaio colorimétrico de MTT (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Sigma-Aldrich, M2128, São Paulo, SP, Brasil), seguindo as instruções descritas por Kang e colaboradores (2010). Este é um ensaio onde o reagente MTT é internalizado pelas células e em seguida metabolizado por enzimas mitocondriais de células viáveis, havendo a formação de cristais de formazan intracelulares. Tais cristais são então solubilizados com a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância é determinada a 570 nm em equipamento leitor de placas.

3.5.1.2 Quantificação de dsDNA no meio extracelular

Além do ensaio de MTT, a quantificação de DNA dupla fita (ds) no meio extracelular é um parâmetro que contribui com a avaliação de índice de mortalidade celular. Para essa determinação foi utilizado o reagente DNA PicoGreen® (Quant-It™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brasil) o qual possui alta afinidade ao dsDNA e ao se intercalar com tal molécula, emite fluorescência. O método a ser seguido baseia-se nas instruções de Cadoná e colaboradores (2014), sendo a intensidade de fluorescência obtida proporcional ao índice de mortalidade celular. A fluorescência foi quantificada através de leitor de placas a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão.

3.5.2 Avaliação do metabolismo oxidativo

3.5.2.1 Determinação indireta da produção de óxido nítrico

Após exposição à luz, a linhagem celular foi avaliada quanto a taxa de produção de óxido nítrico através do método colorimétrico indireto descrito por Choi e colaboradores (2012). Este ensaio baseia-se no uso do reagente de *Greiss* e determinação dos metabólitos nitrato e nitrito, sendo a intensidade da coloração produzida quantificada em leitora de placas a 540 nm.

3.5.2.2 Determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio

As células foram avaliadas quanto a taxa total de espécies reativas de oxigênio através do ensaio da 2'7 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, D6883, São Paulo, SP, Brasil), conforme instruções descritas por Costa e colaboradores (2012). Este ensaio fluorimétrico se baseia na internalização do reagente DCFH-DA, seguido da metabolização do mesmo a diclorofluoresceína (DCFH) através de enzimas intracelulares. Este metabólito ao interagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) se transforma em diclorodihidrofluoresceína (DCF), a qual é capaz de emitir fluorescência. Logo, quanto maior a fluorescência emitida, maior a taxa total de EROs. A intensidade de fluorescência foi quantificada em leitor de placas a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados obtidos foram primeiramente plotados em planilha do programa *Microsoft Excel*, versão 2010. Os dados foram convertidos em porcentagem em comparação ao controle negativo (células em primeira passagem). Em seguida, a análise estatística foi desenvolvida através do programa de produção de gráficos e análises estatísticas *GraphPadPrism*, versão 7.2, via análise de uma via, seguido de post hoc de *Tukey*. Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$.

3.7 CRITÉRIOS ÉTICOS

O projeto faz parte de uma pesquisa integrada e foi devidamente registrado no Gabinete de Apoio a Projetos (GAP) do Centro de ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Santa Maria, Instituição responsável pela pesquisa, sob n. 052569. A realização do estudo deu-se em parceria com a Universidade Franciscana de Santa Maria (UFN) a qual manifestou anuência a realização do estudo (ANEXO A).

O artigo produzido a partir desta dissertação, foi elaborado com os dados puros desta pesquisa.

4 ARTIGO

Photobiomodulation - blue and red LED: protection or cellular toxicity? *In vitro* study with human fibroblasts.

ABSTRACT

Photobiomodulation is widely used in clinical practice, and there is increasing interest in using this tool to treat numerous dysfunctions in living organisms. Therefore, this study aimed to verify the action of blue and red LED light in cells. Human fibroblasts (HFF-1) were irradiated by blue (470 nm) or red (658 nm) light at doses of 4 and 18 J/cm², respectively. Laboratory analyses were carried out to check for viability, proliferation, cell death, and the formation of reactive oxygen and nitric oxide species. The blue light demonstrated cell protection potential by reducing free radical formation and protecting the cell membrane by decreasing double-stranded DNA strands. On the other hand, the red light showed less potential for cell protection due to the risk of associating more significant nitric oxide formation with increased reactive oxygen species formation, in addition to having a greater amount of extracellular DNA. Cell damage prevention is a potential beneficial effect of blue light at 18 J/cm². Despite the consolidated effects of red light in treating wounds, there was a potential toxic effect of this wavelength in the doses studied. Given the above, new studies relating these parameters with pathological cells or aggressors that simulate damage may offer results that can better support clinical practice.

Keywords: Light-Emitting Diodes. Physiotherapy. Inflammation. Fibroblasts.

INTRODUCTION

Photobiomodulation (PBM) has been widely investigated in the tissue repair process of skin lesions [1-3]. Various studies have compared the effects of laser and Light-Emitting Diodes (LED) on living tissue and reported that the therapeutic benefits of both light sources are equivalent since the photobiomodulation mechanism is related to the wavelength and energy dose. Thus, the therapeutic use of LED light is growing since it offers the same benefits as laser treatments and uses low-cost equipment [4]. In addition, the ability to radiate large areas simultaneously and the safety for home use has made several authors defend that the use of LED light for tissue repair is here to stay [5].

Moreover, the therapeutic effects of LED light applications are related to the wavelength that generates a specific light spectrum [1-4]. The red light provides potential stimulation to biological tissues, mainly by increasing ATP (adenosine triphosphate), which is responsible for promoting protein synthesis, in processes such as epidermal re-epithelization and collagen formation [6, 7]. It is believed that absorption occurs due to the cytochrome C oxidase molecules present in the mitochondrial membranes [6].

In addition to collagen formation and epithelialization that increase wound contraction, one of the mechanisms that favor healing by red light is increased angiogenesis. In a recent study, the authors compared the effects of different laser and LED wavelengths and found a more significant number of blood vessels in the groups irradiated by red (700 nm) and green LED (530 nm) compared to groups irradiated with red LED and

infrared laser at the same intensity. The authors concluded that both laser and LED effectively stimulated angiogenesis in wounds *in vivo* through histological analysis and that light coherence was not relevant in the process [8].

The blue light has attracted the attention of the scientific community and has been employed in an increasing number of studies. Its main features include inhibiting cellular processes, exerting antiproliferative activity in human endothelial cells, reducing pro-inflammatory cytokine release [9], promoting the recovery of acute skin lesions, and increasing tissue hydration [10,11]

In vitro studies have shown that inflammatory pathways are negatively regulated by blue light, reducing pro-inflammatory cytokine release. Monocyte-derived dendritic cells were irradiated with blue light at doses of 3.75, 7.5, and 15 J/cm². The results showed that blue-light irradiation did not affect cell survival. However, suppression of the release of pro-inflammatory cytokines was dose-dependent, being the higher the dose, the greater the inhibition [10].

Despite numerous studies with photobiomodulation in living tissues, its effects on cells is not yet fully understood. Therefore, this study seeks to investigate the effects of red and blue LED light on human fibroblasts.

MATERIALS AND METHODS

CELL CULTURE

This study was carried out by irradiating blue and red LED light in the cell line HFF-1 (ATCC® SCRC-1041™), which was obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Cells were cultivated in the culture medium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, R8758, São Paulo, SP, Brazil) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, F2442, São Paulo, SP, Brazil) and supplemented with 1% penicillin-streptomycin antibiotics (100 U/mL and 100 mg/mL, respectively) (Gibco® Thermo Fisher, 15140122, São Paulo, SP, Brazil) and 1% amphotericin B antifungal (Gibco® Thermo Fisher, 15290018, São Paulo, SP, Brazil). The cells were kept in a CO₂ incubator (5% CO₂ in humidified air) at 37 °C. The strains were monitored microscopically for the formation of monolayer in a cell culture flask, and when reaching 90-98% confluence, they were transplanted, so that half of the cell suspension was placed in Petri plates.

FIBROBLAST EXPOSITION TO LIGHT

The cells were exposed once to either the red or blue LED. A photobiomodulation device (Endophoton-KLD®, model FB4LSD35, Brazil) was used exclusively for this study and had an effective irradiation area of 5.3 cm². The red LED light (658 nm, 0.04W) was irradiated at a dose of 4 J/cm², as recommended by Zecha *et al.* [12]. The blue LED light (470 nm, 0.03 W per point) was irradiated at 18 J/cm² [13], which is equivalent to 265 s (approx. 4.4 min).

For a better comparison between the results of the doses recommended in the literature, fibroblast cells were also irradiated with a blue light dose of 4 J/cm² and a red light dose of 18 J/cm². Exposition to light lasted 1 min and 3 min, respectively. The blue light dose of 4 J/cm² delivered energy of 1.8 J per point, while energy 7.2 J per point was obtained for the red light at 18 J/cm².

During cell irradiation, the LED device was positioned parallel to the cell culture plate in order for the light to be irradiated perpendicularly. During irradiation, the plates had no lids to allow full absorption of light by cells. The irradiation was carried out inside the laminar flow and in the dark to not cause interference and avoid material contamination. A single researcher was responsible for cell irradiation.

EXPERIMENTAL TESTS

MTT assay

After irradiation, cells were evaluated at 24, 48, and 72 h for cell viability and proliferation using the MTT colorimetric assay (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, M2128, São Paulo, SP, Brazil) [14]. The MTT reagent was internalized by the cells and metabolized by viable cell mitochondrial enzymes, forming intracellular formazan crystals. These crystals are solubilized by adding dimethyl sulfoxide (DMSO), and the absorbance is determined at 570 nm in a plate reader equipment.

dsDNA quantification in the extracellular medium

The quantification of DNA double strand (DS) breaks in the extracellular medium is a parameter that contributes to cell mortality assessment. Therefore, the PicoGreen DNA reagent (Quant-It™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit, Thermo Fisher, São Paulo, SP, Brazil) was used as it has a high affinity to dsDNA and, when intercalated with such a molecule, it emits fluorescence [15], with the obtained fluorescence intensity being proportional to the cell mortality rate. Fluorescence was quantified using a plate reader at 480 nm excitation and 520 nm emission.

Indirect determination of nitric oxide production

Nitric oxide is a molecule responsible for numerous biological processes. Thus, the rate of nitric oxide production using the indirect colorimetric method was evaluated [16]. This assay is based on using the Greiss reagent and determination of the metabolic nitrate and nitrite. The intensity of the produced color was quantified in a plate reader at 540 nm.

Determination of the rate of reactive oxygen species

The rate of reactive oxygen species was verified using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay (Sigma-Aldrich, D6883, São Paulo, SP, Brazil) [17], which is based on the internalization of the

DCFH-DA reagent, followed by its metabolism to dichlorofluorescein (DCFH) through intracellular enzymes. When interacting with reactive oxygen species (ROS), this metabolite turns into dichlorodihydrofluorescein (DCF), which is capable of emitting fluorescence. Therefore, the greater the fluorescence emitted, the greater the total rate of ROS. The fluorescence intensity was quantified in a plate reader at 488 nm excitation and 525 nm emission.

STATISTICAL ANALYSIS

The data were converted into a percentage compared to the negative control (cells in the first pass). Statistical analysis was carried out using graphics software and performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Tukey's test. The results were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

The analysis of cell viability and proliferation using the MTT Assay are shown in Figure 1.

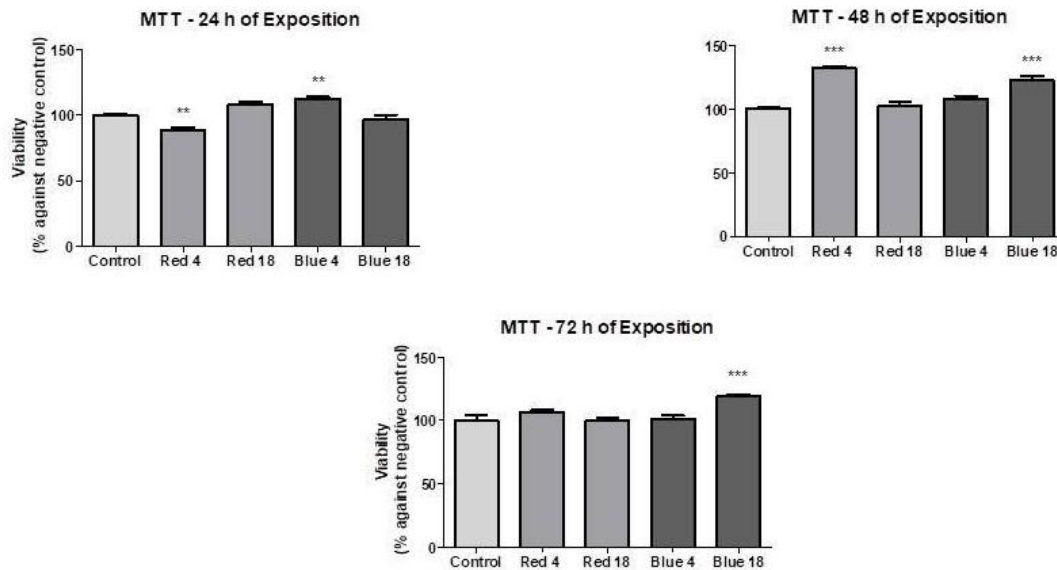


Fig. 1 Cell viability and proliferation verified 24, 48, and 72 h after light exposition. V4- Red LED light (658 nm) dose of 4 J/cm² (1.76 J/point). V18- Red LED light (658 nm) dose of 18 J/cm² (7.2 J/point). A4 Blue LED light (470 nm) dose of 4 J/cm² (1.8 J/point). A18 Blue LED light (470 nm) dose of 18 J/cm² (7.95 J/point). * $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Twenty-four hours after irradiation, fibroblasts irradiated with red light (4 J/cm²) showed less viability than the control group (cells and culture medium only) ($p < 0.01$), although this reversed in 48 h as there was a significant increase in proliferation ($p < 0.001$). Fibroblasts irradiated with blue light (18 J/cm²) showed significant cell proliferation ($p < 0.001$). Seventy-two hours after irradiation, only fibroblasts irradiated with blue light (18 J/cm²) showed cell proliferation compared to the control group ($p < 0.001$).

The cell mortality rate verified by double-stranded DNA in the extracellular medium is shown in Fig.2.

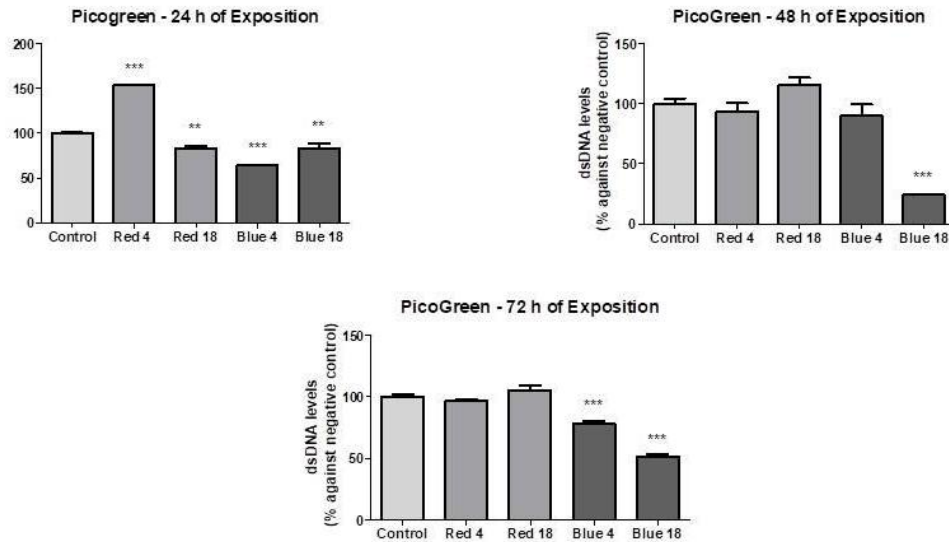


Fig. 2 Extracellular double-stranded DNA 24, 48, and 72 h after light exposition. V4- Red LED light (658 nm) dose of 4 J/cm² (1.76 J/point). V 18- Red LED light (658 nm) dose of 18 J/cm² (7.2 J/point). A4 Blue LED light (470 nm) dose of 4 J/cm² (1.8 J/point). A18 Blue LED light (470 nm) dose of 18 J/cm² (7.95 J/point). * $p \leq 0.5$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

The double-stranded DNA strand shows cell death. Within 24 h of irradiation, the red light group (4J/cm²) showed a higher number of double-stranded DNA strands ($p < 0.001$) than the blue light groups (4 J/cm², $p < 0.001$; 18 J/cm², $p < 0.01$) and the other red group (18 J/cm², $p < 0.001$). In the 48-h analysis, fibroblasts irradiated with 18 J/cm² of blue light ($p < 0.001$) presented a lower level of double-stranded DNA, indicating a protective effect. In 72 h of exposition, the blue light at both doses (4 and 18 J/cm²) reduced cell mortality ($p < 0.001$).

The results of ROS production (DCFH-DA) are shown in Fig. 3.

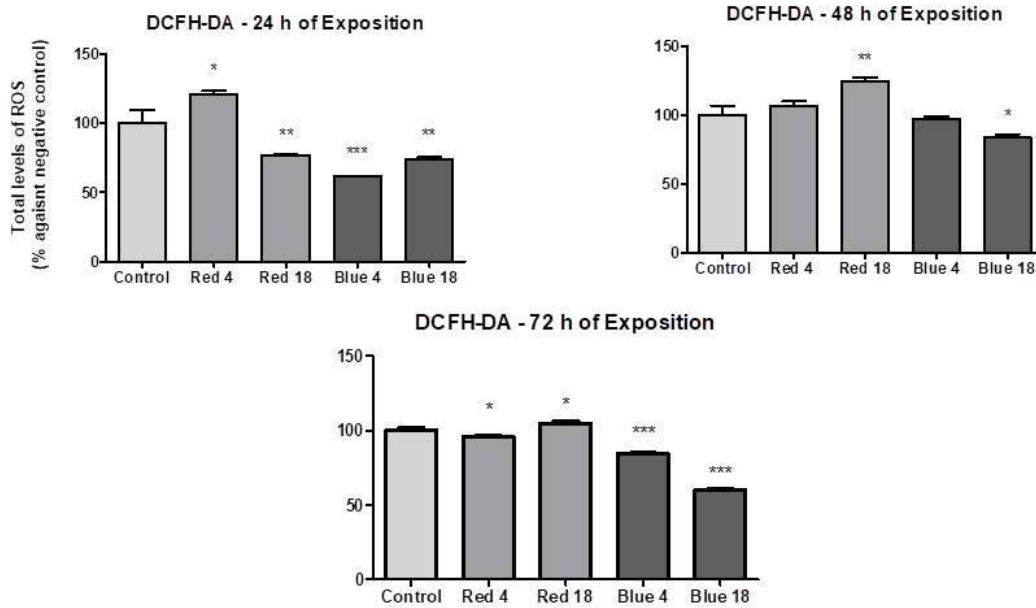


Fig. 3 Reactive oxygen species at 24, 48, and 72 h after exposition to light . V4- Red LED light (658 nm) dose of 4 J/cm² (1.76 J/point). V 18- Red LED light (658 nm) dose of 18 J/cm² (7.2 J/point). A4 Blue LED light (470 nm) dose of 4 J/cm² (1.8 J/point). A18 Blue LED light (470 nm) dose of 18 J/cm² (7.95 J/point). * p ≤ 0.5; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

The total number of ROS was higher in the fibroblast group irradiated with red light (4 J/cm², p<0.05) 24 h after irradiation. However, ROS production decreased in the groups exposed to red light at 18 J/cm² (p<0.01) and blue light at 4 J/cm² (p<0.001) and 18 J/cm² (p<0.01). In 48 h of exposition, there was an increase in ROS production in the group exposed to red light 18J / cm² (p<0.01) and a decrease in the group exposed to blue light 18J / cm² (p<0.05). In 72 h, ROS production decreased in the groups exposed to the red light at 4 J/cm² (p<0.05) and increased at 18 J/cm² (p<0.05). On the other hand, ROS production decreased in both blue light groups (4 J/cm², p<0.001; 18 J/cm², p<0.001).

Nitric oxide (NO) production is shown in Fig. 4.

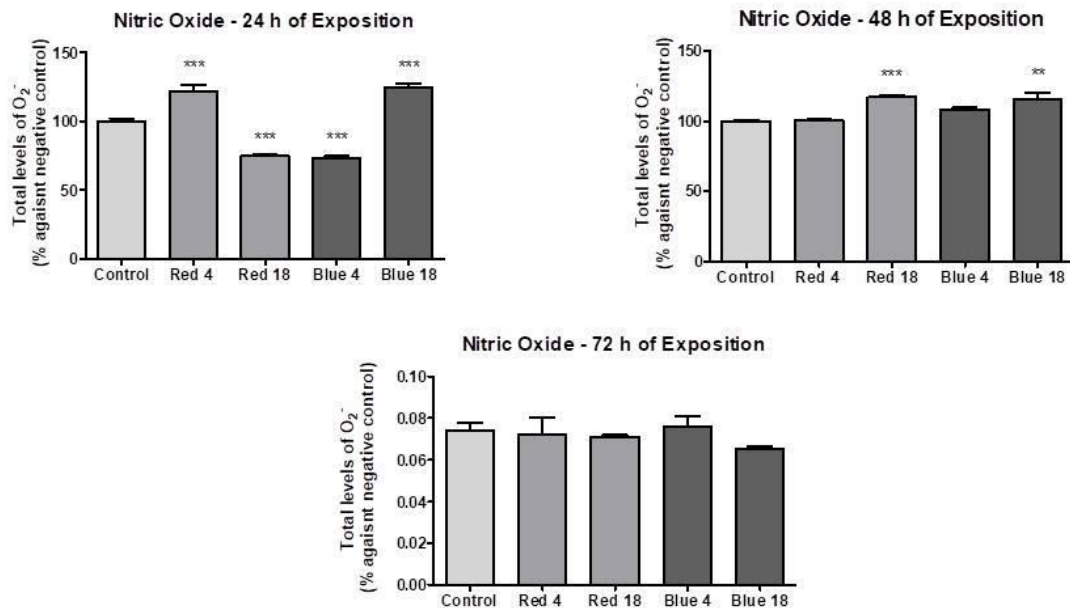


Fig. 4 Nitric oxide formation 24, 48, and 72 h after light exposition. V4- Red LED light (658 nm) dose of 4 J/cm² (1.76 J/point). V 18- Red LED light (658 nm) dose of 18 J/cm² (7.2 J/point). A4 Blue LED light (470 nm) dose of 4 J/cm² (1.8 J/point). A18 Blue LED light (470 nm) dose of 18 J/cm² (7.95 J/point). * p ≤ 0.5; ** p ≤ 0.01; *** p ≤ 0.001.

In 24 h, the groups irradiated by the red (4 J/cm²) and blue lights (18 J/cm²) presented a more significant amount of NO (p<0.001). Simultaneously, cells irradiated with the other red (18 J/cm²) and blue lights (4 J/cm²) showed reduced NO production (p<0.001). Forty-eight hours after irradiation, the cells from the blue light group (18 J/cm²) maintained the highest NO production (p<0.01), followed by the group irradiated with red light (18 J/cm², p<0.001). In 72 h, there was no difference in the amount of NO between the groups.

DISCUSSION

In this study, laboratory analyses were performed to check for viability, proliferation, cell death, and the formation of reactive oxygen species and nitric oxide species after the cultivation of fibroblasts exposed to photobiomodulation. From these data, it is possible to understand a little more about the cellular protection capacity or toxicity caused by LED light cells. The results are encouraging, especially concerning the blue LED light at a wavelength of 470 nm and a dose of 18 J/cm².

An important finding in this study is the protective action of blue light on fibroblasts, as there was a significant reduction of double-stranded DNA in the extracellular medium compared to the control group. In fact, this was observed in both blue light doses used and at all periods assessed. Corroborating our findings, a recent *in vitro* study with fibroblasts reported anti-inflammatory and cytoprotective effects of blue LED light, which favored the maintenance of the integrity of the cell membrane and inhibited apoptotic cell death [18].

Furthermore, it was possible to observe that the blue light (18 J/cm²) at 24 and 48 h periods produced less ROS. In 72 h, the groups irradiated with a blue light at either wavelengths were the only ones that showed significant ROS reduction compared to the control group. According to Wolin [19], NO favors superoxide dismutase enzyme (SOD) production, in addition to inducing ferritin synthesis, preventing the formation of O₂⁻. The increased amount of NO associated with higher ROS production is potentially harmful to living tissues due to the formation of reactive nitric oxide species (RNOS), which is an oxidizer for most biological molecules that may suppress mitochondrial function [20], consequently reducing the ability of the skin to regenerate and possibly aggravating pre-existing injuries.

Some authors argue that NO inactivates enzymes crucial for DNA synthesis and the mechanisms of cell proliferation through its reaction with metals, such as iron, which is present in the enzymes responsible for these processes [21,22]. This corroborates our findings because the group irradiated by the red light (4 J/cm²) after 24 h, which is precisely when these cells presented a greater amount of NO, presented the lowest cell viability compared to the control group. While in the same period of analysis, cells irradiated with the blue light at the same dosage showed reduced NO and significantly higher cell proliferation compared to the control group. In the 48 and 72 h analyses, the NO levels decreased in the group irradiated with the blue light (18 J/cm²), and more significant cell proliferation was observed in the cell group irradiated with this dose compared to the control group. Furthermore, other authors have already observed reduced nitric oxide production by blue light in *in vitro* studies [18]. The decreased amount of NO may be beneficial for protecting the tissue, since high amounts of NO favor the chemotaxis of neutrophils, natural killer cells (NK), and macrophages, thus prolonging the inflammatory response [20].

Another possible explanation for the significant increase in cell proliferation of fibroblasts irradiated with the blue light (18 J/cm²) may be the well-known inhibitory action that may have reduced collagen formation by this cell group, allowing more space between them on the cultivation plate, thus favoring proliferation. In an *in vitro* study, Fischer et al. [10] irradiated monocyte-derived dendritic cells with a blue light at doses of 3.75, 7.5, and 15 J/cm² and found that blue light irradiation did not affect cell survival. However, suppressing the release of pro-inflammatory cytokines was dose-dependent (the higher the dose, the greater the inhibition), thus being contrary to what happened with the other groups irradiated by the red light reported herein and its already known action of increasing collagen production. Moreover, the red light promotes mitochondrial stimulation, increasing adenosine triphosphate (ATP) and protein production rates, including the collagen macromolecule [7]. Optical microscope observation of the culture plates used in the present study revealed the increased density of cells irradiated with the red light, which did not occur in plates irradiated by the blue light. Nevertheless, no tests were performed with reagents in order to quantify the amount of collagen in these plates (Fig. 5).

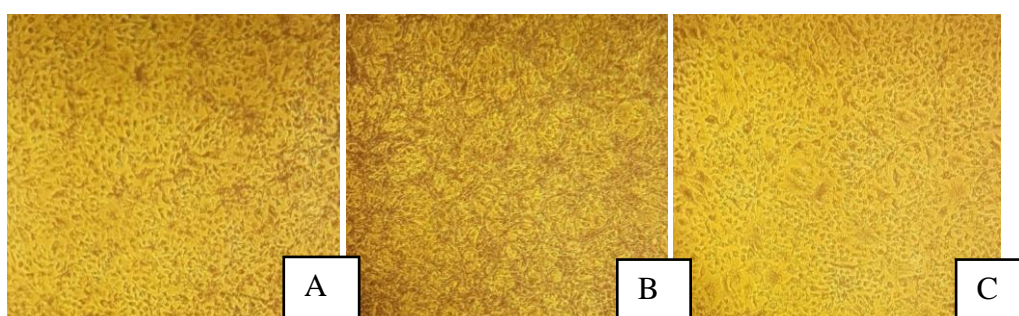


Fig. 5 Images of cells exposed to different LED wavelengths and doses. These images were captured by optical microscopy, through MTT analysis 24h after exposition to light. (A- Control, not exposed to light; B- Red LED 4J / cm²; C- Blue LED 18J / cm²)

According to our findings, the cell protection potential provided by the blue light can be observed, especially at the dose of 18 J/cm², due to the reduced formation of reactive oxygen species and protection of the cell membrane observed with the reduced formation of extracellular DNA. Despite the consolidated action of the red light in treating wounds within the chosen parameters, the red light demonstrated potential cellular toxicity due to favoring free radical and nitric oxide formation that, when associated, may put biological molecules at risk as well as presenting a higher amount of extracellular DNA in the culture medium. Therefore, new studies that simulate damage to cells or radiate pathological cells are of great importance in order that clinical practice with photobiomodulation may be better based.

REFERENCES

1. Robijns, J., Censabella, S., Claes, S., Pannekoeke, L., Bussé, L., Colson, D., Kaminski, I., Bulens, P., Maes, A., Noé, L., Brosens, M., Timmermans, A., Lambrichts, I., Somers, V. and Mebis, J. (2018), Prevention of acute radiodermatitis by photobiomodulation: A randomized, placebo-controlled trial in breast cancer patients (TRANSDERMIS trial). *Lasers Surg. Med.*, 50: 763-771. doi:[10.1002/lsm.22804](https://doi.org/10.1002/lsm.22804)
2. Kuffler DP. (2016) Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen Med.*11(1):107-122. doi: [10.2217/rme.15.82](https://doi.org/10.2217/rme.15.82)
3. Hamblin MR, Nelson ST, Strahan JR. (2018) Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth?. *Photomed Laser Surg.*;36(5):241-245. Doi: [10.1089/pho.2017.4401](https://doi.org/10.1089/pho.2017.4401)
4. Nishioka MA, Pinfildi CE, Sheliga TR, Arias VE, Gomes HC, Ferreira LM. (2012) LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. *Lasers Med Sci.* Sep;27(5):1045-50. Doi: [10.1007/s10103-011-1042-7](https://doi.org/10.1007/s10103-011-1042-7)
5. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci.* 2018 Aug 8;17(8):1003-1017. Doi: [10.1039/c8pp90049c](https://doi.org/10.1039/c8pp90049c)
6. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al. (2005) Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg.*;31(9 Pt 2):1199-1205. Doi: [10.1111/j.1524-4725.2005.31926](https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31926)
7. Yeh, N.G.; Wu, Chia-Hao; Cheng, T.C. (2010) Light-emitting diodes: Their potential in biomedical applications. *Renew Sust Energ.* 14 (8): 2161-66. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.02.015>
8. de Sousa AP, Paraguassú GM, Silveira NT, de Souza J, Cangussú MC, dos Santos JN, Pinheiro AL. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. *Lasers Med Sci.* 2013 May;28(3):981-7. Doi: [10.1007/s10103-012-1187-z](https://doi.org/10.1007/s10103-012-1187-z)
9. Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V. (2010) Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol.*;130(1):259-269. Doi: [10.1038/jid.2009.194](https://doi.org/10.1038/jid.2009.194)

10. Fischer MR, Abel M, Lopez Kostka S, Rudolph B, Becker D, von Stebut E. (2013) Blue light irradiation suppresses dendritic cells activation in vitro. *Exp Dermatol.*;22(8):558-560. Doi: [10.1111/exd.12193](https://doi.org/10.1111/exd.12193)
11. Keemss K, Pfaff SC, Born M, Liebmann J, Merk HF, von Felbert V. (2016) Prospective, Randomized Study on the Efficacy and Safety of Local UV-Free Blue Light Treatment of Eczema [published correction appears in *Dermatology.*;232(4):522]. *Dermatology.* 2016;232(4):496-502. Doi: [10.1159/000448000](https://doi.org/10.1159/000448000)
12. Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. *Support Care Cancer.* 2016;24(6):2793-2805. Doi: [10.1007/s00520-016-3153-y](https://doi.org/10.1007/s00520-016-3153-y)
13. Falcone D, Uzunbajakava NE, van Abeelen F, et al. Effects of blue light on inflammation and skin barrier recovery following acute perturbation. Pilot study results in healthy human subjects. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018;34(3):184-193. Doi: [10.1111/phpp.12367](https://doi.org/10.1111/phpp.12367)
14. Kang KS, Wang P, Yamabe N, Fukui M, Jay T, Zhu BT. (2010) Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation. *PLoS One.*;5(4):e10296. Doi: [10.1371/journal.pone.0010296](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010296)
15. Cadoná, F. C. et al. (2014) Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. *Anal Methods.*; 6 (21): 8559-8568. Doi: [10.1039/C4AY01709A](https://doi.org/10.1039/C4AY01709A)
16. Choi, Woo-Suk, et al. (2012) The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. *Cellimmunol.*; 280 (2): 164-170. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.12.007>
17. Costa F, Dornelles E, Mânica-Cattani MF, et al. (2012) Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. *Reprod Biomed Online.*; 24(4):474-481. Doi: [10.1016/j.rbmo.2012.01.009](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.01.009)
18. Oh PS, Kim EM, Lim S, Sohn MH, Jeong HJ. (2020). Conditioned media from blue light-emitting diode-exposed fibroblasts have an anti-inflammatory effect in vitro [published online ahead of print, 2020 May 4]. *Lasers Med Sci.*;10.1007/s10103-020-03018-x .doi: <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03018-x>
19. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1430-1442. Doi: [10.1161/01.atv.20.6.1430](https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1430)
20. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation (2004). *Life Sci.*;75(6):639-653. DOI: [10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x)
21. James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev.* 1995;59(4):533-547.
22. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-142.

CONCLUSÃO

Com vistas na fisiopatologia da radiodermite estar relacionada a destruição celular pela radiação ionizante com geração de espécies reativas de oxigênio, quebra de DNA celular e reposta inflamatória subsequente, a luz azul no comprimento de onda 470 nm na dose 18 J/cm² parece apresentar maior potencialidade na prevenção deste tipo de lesão na pele. Pois mostrou ser segura por não causar morte celular, apresentou efeito proliferativo de fibroblastos, ação protetora a partir da redução da formação de radicais livres e ainda aumento da produção de óxido nítrico, capaz de regular a resposta inflamatória e provocar recuperação da função barreira da pele. Para que a efetividade da luz azul na prevenção da radiodermite seja confirmada, são necessários estudos randomizados, em que pacientes submetidos à radioterapia possam ser expostos concomitantemente a fotobiomodulação. A continuidade desse estudo é de interesse da pesquisadora na expectativa para que, através de recursos próprios da fisioterapia, contribuir positivamente para a saúde e qualidade de vida do paciente oncológico.

Apesar da atual situação que passamos com a pandemia Covid-19, que interferiu sobremaneira no andamento desta pesquisa, posso afirmar que ela cumpriu seu objetivo, que vai muito além de um título de mestre. Vivenciando os benefícios da fotobiomodulação na prática clínica da fisioterapia dermatofuncional, surge a necessidade de buscar por respostas, o que me foi proporcionado por esta pesquisa in-vitro. Apesar de desafiadora, por diferir por completo das minhas vivências, foi de extrema valia. Visualizar na microscopia o resultado da ação da luz nas células, com diferenças visíveis entre os comprimentos de onda e as doses utilizadas, foi surpreendente. Poder obter números que vão ao encontro do que observamos na prática clínica e fundamentar uma teoria inédita, é estímulo para seguir em frente. Acreditando nas ferramentas que temos nas mãos e no grande potencial de auxílio ao próximo que a profissão de fisioterapeuta nos proporciona.

REFERÊNCIAS

AISTARS, J. The Validity of Skin Care Protocols Followed by Women With Breast Cancer Receiving External Radiation. **Clin J Oncol Nurs**, v.10, n.4, p. 487–92, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16927902> Acesso em: 30 ago. 2018 DOI: 10.1188/06.CJON.487-492

ANTUNES, H.S. et al. Long-term survival of a randomized phase III trial of head and neck cancer patients receiving concurrent chemoradiation therapy with or without low-level laser therapy (LLLT) to prevent oral mucositis. **Oral Oncol**, v. 71, p.11-15, 2017 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688677> Acesso em: 23 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.05.018.

ASSIS, M.R. et al. Late morbidity in upper limb function and quality of life in women after breast cancer surgery. **Braz. J Phys Ther.**, v. 17, n. 3, p. 236-46, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552013000300236&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 04 out. 2018. DOI: 10.1590/S1413-35552012005000088.

BARROS, S.R.A.F; SOARES, M.C. S.; FALCÃO, P.H.B. A magnitude da dor na “porta de entrada” preferencial do Sistema Único de Saúde. **Rev. dor**, São Paulo, v. 16, n. 4, p.285-87, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-00132015000400285&script=sci_arttext&tlng=pt Acesso em: 05 set. 2018 DOI: 10.5935/1806-0013.20150058.

BAZIRE, L. et al. Hydrosorb® versus control (water based spray) in the management of radio-induced skin toxicity: Results of multicentre controlled randomized trial. **Radiother Oncol**, v. 117, n. 2 ,p. 229–33, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26328937> Acesso em: 12 set. 2018 DOI: 10.1016/j.radonc.2015.08.028.

BJORDAL, J.M. et al. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. **Support Care Cancer**, v. 19, n.8, p.1069–1077, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21660670> Acesso em: 29 ago. 2018 DOI: 10.1007/s00520-011-1202-0.

BLECHA, F.P.; GUEDES, M.T.S. Tratamento de radiodermatite no cliente oncológico: subsídios para intervenções de enfermagem. **Rev. Bras. Cancerol.** v.52, n.2, p.151-63, 2006. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_52/v02/pdf/revisao1.pdf Acesso em: 13 ago. 2018.

BRAY, F.N. et al. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. **Dermatol Ther** (Heidelb), v. 6, n. 2, p. 185-206, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4906114/> Acesso em 10 set.2018 DOI: 10.1007/s13555-016-0120-y.

BRITANNICA ACADEMIC. **Breast cancer 2018**. Disponível em: <https://academic-eb-britannica.ez47.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/breast-cancer/16308>. Acesso em: 22 mai. 2018.

BRITO, C.M.M. et al.; Câncer de Mama: Reabilitação. **Acta Fisiátr.**, v. 19, n. 2, p. 66-72, 2012. Disponível em: <http://www.actafisiatrica.org.br/detalhe_artigo.asp?id=167>. Acesso em: 05 set. 2018. DOI: 10.5935/0104-7795.20120013.

BROWN, K.R.; RZUCIDLO, E. Acute and chronic radiation injury. **J Vasc Surg.** v.53, 1 Suppl, p.15S–21S, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843630> Acesso em: 13 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.jvs.2010.06.175.

BRUCE, J. et al. Psychological, surgical, and sociodemographic predictors of pain outcomes after breast cancer surgery: A population-based cohort study. **PAIN.** v. 155, n. 2, p. 232-43, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099954> Acesso em: 25 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.pain.2013.09.028.

CADONÁ, F. C. et al. Genomodifier capacity assay: a non-cell test using dsDNA molecules to evaluate the genotoxic/genoprotective properties of chemical compounds. **Anal Methods**; v. 6, n. 21, p. 8559-8568, 2014.

CAETANO, K.S. et al. Phototherapy improves healing of chronic venous ulcers. **Photomed Laser Surg.** v. 27, n.1, p. 111-18, 2009 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196110> Acesso em: 13 ago. 2018 DOI: 10.1089/pho.2008.2398.

CHAN, R.J. et al. Natural Oil-Based Emulsion Containing Allantoin Versus Aqueous Cream for Managing Radiation-Induced Skin Reactions in Patients With Cancer: A Phase 3, Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 90, n. 4, p. 756-64, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151541> Acesso em: 15 set. 2018. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2014.06.034.

CHOI, Woo-Suk, et al. The regulatory effect of veratricidon NO production in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophage cells. **Cellimmunol**; v. 280, n. 2, p. 164-170, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23399843> Acesso em: 20 abr. 2019 DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.12.007.

CLARO JR, F. et al. Complicações em reconstrução mamária total em pacientes mastectomizadas por câncer de mama: análise comparativa de longo prazo quanto à influência de técnica, tempo de cirurgia, momento da reconstrução e tratamento adjuvante. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 28, n. 1, p. 85-91, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-51752013000100015> Acesso em: 05 out. 2018. DOI: 10.1590/S1983-51752013000100015.

COSTA, F. et al. Influence of Val16Ala SOD2 polymorphism on the in-vitro effect of clomiphene citrate in oxidative metabolism. **Reprod Biomed Online**; v. 24, n. 4, p. 474-481, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22386763> Acesso em: 17 abr 2019 DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.01.009.

COUCEIRO, T.C.M.; MENEZES, T.C.; VALÊNÇA, M.M. Síndrome Dolorosa Pós-Mastectomia. A Magnitude do Problema. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 59, n. 3, p. 358-65, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-70942009000300012 Acesso em: 25 ago. 2018 DOI: 10.1590/S0034-70942009000300012

De SANCTIS, V. et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: literature review and consensus statement. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 100, p. 147–66, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26947812> Acesso em: 19 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.01.010.

De SOUSA AP, PARAGUASSU GM, SILVEIRA NT et al. Laser and LED phototherapies on angiogenesis. **Lasers Med. Sci.** v. 28, n. 3, p: 981–987, 2013. Disponível em: <https://link-springer-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s10103-012-1187-z> Acesso em: 01 maio 2019.

De SOUSA AP, SANTOS JN, DOS REIS JA JR. et al. Effect of LED phototherapy of three distinct wavelengths on fibroblasts on wound healing: a histological study in a rodent model. **Photomed. Laser Surg.** v. 28, n.4, p: 547–552, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Effect+of+LED+phototherapy+of+three+distinct+wavelengths+on+fibroblasts+on+wound+healing%3A+a+histological+study+in+a+rodent+model> Acesso em: 01 maio 2019.

EUROPEAN ORGANIZATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER DATA CENTER. **European Organization for Research and Treatment of Cancer Quality of Life Questionnaire - EORTC (QLQ- C30) Scoring Manual** [Internet]. Brussels. 2001 Disponível em: <http://www.eortc.be/qol/files/SCManualQLQ-C30.pdf> Acesso em: 03 set. 2018.

DeLAND, M. et al. Treatment of Radiation-Induced Dermatitis With Light-Emitting Diode (LED) Photomodulation. **Lasers in Surgery and Medicine** v. 39, p. 164–168, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311276> Acesso em: 11 nov. 2018.

EDWARD C. HALPERIN MD, LUTHER W. BRADY MD. **Perez and Brady's. Principles and Practice of Radiation Oncology**. Editora Lippincott Williams & Wilkins; 6ª ed. ISBN-13: 978-1451116489.

EVANGELISTA, A.L. **Verificar a associação entre o nível de atividade física e qualidade de vida em mulheres com câncer de mama tratadas com intuito de cura**. 2012. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências - Oncologia) - Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP, 2012.

EWERTZ, M; JENSEN, AB. Late effects of breast cancer treatment and potentials for rehabilitation. **Acta Oncol.** v.50, n. 2, p. 187-93, 2011. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/0284186X.2010.533190> Acesso em: 29 ago. 2018.

FALCONE, D. et al. Effects of blue light on inflammation and skin barrier recovery following acute perturbation. Pilot study results in healthy human subjects. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v. 34, n. 3, p.184–93, 2017. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29150968> Acesso em: 31 ago. 2018 DOI: 10.1111/phpp.12367

FERREIRA, V.T.K.et al. Caracterização da dor em mulheres após tratamento do câncer de mama. **Esc Anna Nery.**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p. 107-111, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ean/v18n1/1414-8145-ean-18-01-0107.pdf>> Acesso em: 01 set. 2018. DOI:10.5935/1414-8145.20140016.

FIFE, D. et al.. A randomized, controlled, double-blind study of light emitting diode photomodulation for the prevention of radiation dermatitis in patients with breast cancer. **Dermatol Surg**, v. 36 , n.12, p. 1921–27, 2010 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070458> Acesso em: 30 ago. 2018 DOI: 10.1111/j.1524-4725.2010.01801.x

FIGUEIREDO, S. L. S. **Funcionalidade e qualidade de vida em pacientes submetidas à cirurgia de câncer de mama**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde – Medicina/Biomedicina) – Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, 2013.

FISCHER, M.R. et al. Blue light irradiation suppresses dendritic cells activation in vitro. **Exp Dermatol**. v.22, n. 8, p.558-60, 2013 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23879817> Acesso em: 03 set. 2018 DOI: 10.1111/exd.12193.

FITZPATRICK, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Arch Dermatol**. v.124, n 6, p. 869-71, 1988. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamadermatology/article-abstract/549509> Acesso em: 29 ago. 2018 DOI: 10.1001/archderm.1988.01670060015008.

GOMES, H. A.C.G. et al. Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. **Lasers Med Sci**. v. 29, n. 4, p. 1385-95, 2014 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24526326> Acesso em: 20 ago. 2018 DOI: 10.1007/s10103-014-1535-2.

HAMBLIN, M. R.; NELSON, S. T.; STRAHAN, J.R. Photobiomodulation and Cancer: What Is the Truth? **Photomed Laser Surg**, v. 36, n. 5; p. 241–45, 2018 Disponível em: <https://joovv.com/blogs/joovv-blog/photobiomodulation-cancer-truth> Acesso em: 16 set. 2018 DOI: 10.1089/pho.2017.4401.

HARBECK, N.; GNANT, M. Breast cancer. **The Lancet**, v.389, n. 10074, p:1134-50, 2017. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)31891-8/fulltext#seccesstitle10](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)31891-8/fulltext#seccesstitle10) Acesso em: 11 ago. 2018 DOI: 10.1016/S01040-6736(16)31891-8

HEINSKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? **Photochem Photobiol. Sci.**, 2018, v.17, n. 8, 1003–17, 2018 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30044464> Acesso em: 28 ago. 2018 DOI: 10.1039/c8pp00176f.

HELLERSTEDT-BÖRJESSON, S. et al. Women treated for Breast Cancer Experiences of Chemotherapy-Induced Pain. **Cancer Nurs.** v.39, n.6, p.464-72, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5068191/> Acesso em: 11 set. 2018 DOI:10.1097/NCC.0000000000000322.

HARRIS, M. **Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento.** 3ª edição. Revisada e ampliada. Editora SENAC. São Paulo, 2011.

HILLE-BETZ, U. et al. Late radiation side effects, cosmetic outcomes and pain in breast cancer patients after breast-conserving surgery and three-dimensional conformal radiotherapy. Risk-modifying factors. **Strahlenther Onkol**, v. 192, n.1, p.8–16, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416291> Acesso em: 13 ago. 2018 DOI: 10.1007/s00066-015-0899-y

HUANG, C.J. et al. RTOG, CTCAE and WHO criteria for acute radiation dermatitis correlate with cutaneous blood flow measurements. **Breast.** v. 24, n.3, p.230-6, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25777626> Acesso em: 12 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.breast.2015.01.008.

HYMES, S.R.; STROM, E.A.; FIFE, C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. **J Am Acad Dermatol.** v. 54, n.1, p..28–46, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16384753> Acesso em: 09 ago. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Mama** [Internet] Rio de Janeiro; 2018a. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++ Acesso em: 22 maio 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer.** 4. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: Inca, 2018b, 111p. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Livro_ABC_4ed_4a_prova.pdf Acesso em: 16 set. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço.** 3. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro: Inca, 2008, 628p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap7.pdf> Acesso em: 16 set 2018.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KANG, K. S. et al. Docosahexaenoic Acid Induces Apoptosis in MCF-7 Cells *In Vitro* and *In Vivo* via Reactive Oxygen Species Formation and Caspase 8 Activation. **PlosOne.** V.5, n.4, e10296, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421971> Acesso em: 15 abr. 2019 DOI: 10.1371/journal.pone.0010296.

KEEMSS, K. et al. Prospective, randomized study on the efficacy and safety of local UV-free blue light treatment of eczema. **Dermatology**, v. 232, n. 4, p.496-502, 2016. Disponível em:

<https://www.karger.com/Article/FullText/448000> Acesso em: 04 set. 2018 DOI: 10.1159/000448000.

KESSEL, R.G. **Histologia Médica Básica: A Biologia das Células, Tecidos e Órgãos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KHAN, I; TANG, E; ARANY, P. Molecular pathway of near-infrared laser phototoxicity involves ATF-4 orchestrated ER stress. **Sci Rep.** 5, 10581, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450753/> Acesso em: 13 set. 2018 DOI: 10.1038/srep10581.

KLEINPENNING, M. M. et al. Clinical and histological effects of blue light on normal skin. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine.** v. 26, p. 16-21, 2010. doi:10.1111/j.1600-0781.2009.00474.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1111%2Fj.1600-0781.2009.00474.x> Acesso em: 12 out. 2018.

KLUTHCOVSKY, A.C.G.C.; URBANETZ, A.A.L. Qualidade de vida em pacientes sobreviventes de câncer de mama comparada à de mulheres saudáveis. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v. 34, n. 10, p. 453-458, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032012001000004> Acesso em: 04 de out. 2018. DOI: 10.1590/S0100-72032012001000004.

KUFFLER, D. P. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. **Regen Med.** v.11, n.1, p. 107–22, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681143> Acesso em: 11 set. 2018 DOI: 10.2217/rme.15.82.

LEMIEUX, J. *et al.* Quality-of-Life Measurement in Randomized Clinical Trials in Breast Cancer: An Updated Systematic Review (2001–2009). **JNCI J Natl Cancer Inst.** v. 103, n. 3, p.178 – 231, 2011. Disponível em: <<http://jnci.oxfordjournals.org/content/103/3/178.long>> Acesso em: 02 set. 2018.

LEVENTHAL, J; YOUNG, MR. Radiation Dermatitis: Recognition, Prevention, and Management. **Oncology (Williston Park)**, v. 31, n. 12, p. 885-899, 2017. Disponível em: <http://www.cancernetwork.com/oncology-journal/radiation-dermatitis-recognition-prevention-and-management> Acesso em: 13 set. 2018 .

LI, Y. et al. The Histopathological Investigation of Red and Blue Light Emitting Diode on Treating Skin Wounds in Japanese Big-Ear White Rabbit. **PLoS ONE**, v.11, n. 6, e0157898, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4922561/> Acesso em 01 set. 2018 DOI: 10.1371/journal.pone.0157898.

LIEBMANN, J.; BORN, M.; KOLB-BACHOFEN, V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **J Invest Dermatol.** v.130, n. 1, p.259-69, 2010 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675580> Acesso em: 02 set. 2018 DOI: 10.1038/jid.2009.194.

MARTA, G.N. et al. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 468-474, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302011000400024 Acesso em: 03 set. 2018. DOI: 10.1590/S0104-42302011000400024.

McQUESTION, M. Evidence-based skin care management in radiation therapy: clinical update. **Semin Oncol Nurs**. v. 27, n.2, p. e1-e17, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21514477> Acesso em 10 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.soncn.2011.02.009.

MEJDAHL, M.K. et al. Persistent pain and sensory disturbances after treatment for breast cancer: six year nationwide follow-up study. **BMJ**, v. 346:f1865, 2013. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/346/bmj.f1865.long> Acesso em: 06 set. 2018 DOI: 10.1136/bmj.f1865.

MENDES, I.S. et al. Correlação da dor e qualidade de vida de mulheres pós-tratamento cirúrgico de câncer de mama. **O mundo da Saúde**. v. 38, n.2, p. 189-96, 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/artigos/mundo_saude/correlacao_dor_qualidade_vida_mulheres.pdf Acesso em: 03 set 2018 DOI: 10.15343/0104-7809.20143802189196.

MORABITO, C. et al. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. **Free Radical Biology & Medicine** 48 (2010) 579–589.

MYAKISHEV-REMPEL, M. et al. A preliminary study of the safety of red light phototherapy of tissues harboring cancer. **Photomed Laser Surg.**, v.30, n.9, p. 551–8, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3423866/> Acesso em: 07 set. 2018 DOI: 10.1089/pho.2011.3186.

NASCIMENTO, S.L. et al. Complicações e condutas fisioterapêuticas após cirurgia por câncer de mama: estudo retrospectivo. **Fisioter Pesq.**, v. 19, n.3, p.248-55, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/fp/v19n3/a10v19n3.pdf>. Acesso em: 06 set. 2018. DOI: 10.1590/S1809-29502012000300010.

NISHIOKA, M.A. et al. LED (660 nm) and laser (670 nm) use on skin flap viability: angiogenesis and mast cells on transition line. **Lasers Med Sci**, v. 27, n. 5, p: 1045-50, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22207449> Acesso em: 11 ago. 2018 DOI: 10.1007/s10103-011-1042-7.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Ensaio para peróxidos lipídicos em tecidos animais pela reação de ácido tiobarbitúrico. **Bioquímica analítica** , v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OPLÄNDER C, et al. Mechanism and biological relevance of blue-light (420–453 nm)-induced non enzymatic nitric oxide generation from photo labile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine** V. 65, p. 1363–1377, 2013. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121056> Acesso em: 20 abr. 2019 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.

PFAFF, S. et al. Prospective randomized long-term study on the efficacy and safety of UV-free blue light for treating mild psoriasis vulgaris. **Dermatology**. V. 231, n. 1, p. 24-34, 2015. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/430495> Acesso em: 04 set. 2018 DOI: 10.1159/000430495.

POTTHOFF, K. et al. Randomized controlled trial to evaluate the effects of progressive resistance training compared to progressive muscle relaxation in breast cancer patients undergoing adjuvant radiotherapy: the BEST study. **BMC Cancer**., v.13, p. 162, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617011/> Acesso em: 08 set. 2018. DOI: 10.1186/1471-2407-13-62.

REISNER, M., H. **Patologia: Uma Abordagem por Estudos de Casos (Lange)**. [Minha Biblioteca]. Retirado de <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788580555479/>.

ROBIJNS, J. et al. Prevention of acute radiodermatitis by photobiomodulation: A randomized, placebo-controlled trial in breast cancer patients (TRANSDERMIS trial). **Lasers Surg Med**, v. 9999, p.1-9, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29427390> Acesso em: DOI: 10.1002/lsm.22804

ROBBINS, **Patologia básica** / Vinay Kumar [et al] ; [tradução de Claudia Coana. et al.]. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2013.

ROCHA, D M. et al. Evidências científicas sobre os fatores associados à qualidade de vida de pacientes com radiodermatite. **Rev. Gaúcha Enferm.**, v. 39, e2017-0224, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-14472018000100506 Acesso em: 12 set. 2018. DOI: 10.1590/1983-1447.2018.2017-0224.

SALMONA K, et al. Estudo comparativo entre as técnicas manual e automática de demarcação de borda para avaliação de área de úlceras por pressão. **Enferm. Foco**. v. 7, n. 2, p. 42-46, 2016. Disponível em: <http://revista.cofen.gov.br/index.php/enfermagem/article/view/793> Acesso em: 01 nov. 2018.

SALVO, N. et al. Prophylaxis and management of acute radiation-induced skin reactions: a systematic review of the literature. **Curr Oncol**. v.17, n.4, p.94–112, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913836/> Acesso em: 12 ago. 2018.

SCHNUR, J. B. et al. A systematic review of patient-rated measures of radiodermatitis in breast cancer radiotherapy. **Am J Clin Oncol**. v.34, n.5, p. 529–36, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727239/> Acesso em: 09 set. 2018 DOI: 10.1097/COC.0b013e3181e84b36.

SEITÉ, S; BENSADOUN, R-J; MAZER, J-M. Prevention and treatment of acute and chronic radiodermatitis. **Breast Cancer (Dove Med Press)**, v.9, p.551-57, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5677297/> Acesso em: 10 set. 2018 DOI: 10.2147/BCTT.S149752.

SIMÕES, T.M.S., FERNANDES NETO, J., DE OLIVEIRA, T.K.B. et al. **Lasers Med Sci**.v. n. p: 1-11, mar. 2019. Photobiomodulation of red and green lights in the repair process of

third-degree skin burns. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10103-019-02776-7> Acesso em: 01 maio 2019.

SINGH, M et al. Radiodermatitis: a review of our current understanding. **Am J Clin Dermatol.** v.17, n.3, p. 277-92, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27021652> Acesso em: 04 set. 2018 DOI: 10.1007/s40257-016-0186-4.

SMOOT, B. et al. Effect of low-level laser therapy on pain and swelling in women with breast cancer-related lymphedema: a systematic review and meta-analysis. **J Cancer Surviv**, v. 9, n. 2, p.287–304, 2015 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25432632> Acesso em: 20 ago. 2018 DOI: 10.1007/s11764-014-0411-1.

SOARES, J.C. et al. Correlação entre postura da cabeça, intensidade da dor e índice de incapacidade cervical em mulheres com queixa de dor cervical. **Fisioter. Pesq.** São Paulo, v. 19, n.1, p. 68-72, Jan. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/fp/v19n1/13.pdf> Acesso em: 05 out. 2018. DOI:10.1590/S1809-29502012000100013.

STROUTHOS, I. et al. Photobiomodulation therapy for the management of radiation-induced dermatitis. **Strahlenther Onkol**, v. 193, n. 6, p. 491-98, 2017 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243723> Acesso em: 13 ago. 2018 DOI: 10.1007/s00066-017-1117-x.

YEH, N.G.; WU, CHIA-HAO; CHENG, T.C. Light-emitting diodes: Their potential in biomedical applications. **Renew Sust Energ Rev**, v. 14, n. 8, p. 2161-66, 2010. Disponível em: http://www.bycure.it/images/lav.scient.estetica/2_Light_emitting_Diodes.pdf Acesso em: 14 ago. 2018 DOI: 10.1016/j.rser.2010.02.015.

WALTHO, D.; ROCKWELL, G. Post-breast surgery pain syndrome: establishing a consensus for the definition of post-mastectomy pain syndrome to provide a standardized clinical and research approach — a review of the literature and discussion. **Can J Surg.** v. 59, n. 5, p. 342-50, 2016 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5042722/> Acesso em: 01 set. 2018 DOI: 10.1503 / cjs.000716.

WANG, L. et al. Predictors of persistent pain after breast cancer surgery: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **CMAJ.**, v. 188, n. 14, p. E352-E361, 2016. Disponível em: <http://www.cmaj.ca/content/188/14/E352> Acesso em: 30 ago. 2018.

WEISS, R.A. et al. Clinical experience with light-emitting diode (LED) photomodulation. **Dermatol Surg.**, v. 31, (9 Pt 2), p.1199–205, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176771> Acesso em: 23 ago. 2018.

WONG, R.K. et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of acute and late radiation reactions from the MASCC Skin Toxicity Study Group. **Support Care Cancer**, v. 21, n. 10, p. 2933–48, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942595> Acesso em: 12 ago. 2018 DOI: 10.1007/s00520-013-1896-2.

ZECHA JA, RABER-DURLACHER JE, NAIR RG, et al. Low-level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 2: proposed applications and treatment protocols. **Support Care Cancer** v.24, p:2793–2805, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984249> Acesso em: 01 maio 2019.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO LOCAL DE PESQUISA



Universidade Franciscana
Pró-Reitora de Pós-Graduação e Pesquisa
Santa Maria – RS, Brasil
Rua dos Andradas, nº 1614, prédio 07
Contato: +55 55 3220 1200

Santa Maria, 16 de agosto de 2019.

Destinado a quem interessar

De: Prof. Dr. Marcos Alexandre Alves, Universidade Franciscana

Re: Projeto de Pesquisa da Mestranda Fabiana dos Santos Ferreira

Eu, Marcos Alexandre Alves, Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Franciscana, venho por meio deste declarar às partes interessadas que é de conhecimento da referida Pró-Reitoria do desenvolvimento de estudos *in vitro* referentes ao projeto de pesquisa intitulado "Efeitos da fotobiomodulação em células de pele humana envolvidas no processo de reparo tecidual", referente ao mestrado da aluna Fabiana dos Santos Ferreira, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Funcional e orientada pela Professora Hedioneia Maria Foletto Pivetta da Universidade Federal de Santa Maria.

A realização dos experimentos na Universidade Franciscana caracteriza um trabalho em parceria para fins de produção acadêmica, não havendo qualquer benefício financeiro pelas partes envolvidas. As atividades serão realizadas no Laboratório 011, prédio 04, conjunto I, junto a Professora Francine Carla Cadoná. Além disso, os materiais de custeio/consumo serão obtidos pela aluna e professora orientadora.

A Comissão de Gestão de Laboratórios da Universidade Franciscana possui ciência do exposto.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marcos Alexandre Alves
Pró-Reitor de Pós-Graduação e
Pesquisa

(Representante da Comissão de Gestão
de Laboratórios)

Universidade Franciscana
Rua dos Andradas, nº 1614
Santa Maria – RS, Brasil
97010-032

ANEXO B – REGISTRO DO PROJETO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA - UFSM		Data/Hora: 02/09/2019 11:54
PROJETO NA ÍNTEGRA		Autenticação: 10C3.FF2D.2500.2688.4819.5CD5.50A5.1664
		Consulte em http://www.ufsm.br/autenticacao
Título: EFEITOS DA FOTOBIMODULAÇÃO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ-LED EM CÉLULAS TUMORAIS DA MAMA E EM CÉLULAS DE PELE HUMANA ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE REPARO TECIDUAL		
Número: 052569	Classificação: Pesquisa	Registrado em: 02/09/2019
Situação: Em trâmite para registro	Início: 30/09/2019	Término: 30/09/2021
Avaliação: Avaliado		Última avaliação:
Fundação: Não necessita contratar fundação		Número na fundação: Não se aplica
Supervisor financeiro: Não se aplica		
Proteção do conhecimento: Projeto não gera conhecimento passível de proteção		
Tipo de evento: Não se aplica	Carga Horária: Não se aplica	Alunos matriculados: Não se aplica
		Alunos concluintes: Não se aplica
Palavras-chave: Neoplasia da mama, Fotobiomodulação, Radiodermatite		
Resumo: Introdução: O tratamento com a fotobiomodulação por LED é um recurso amplamente utilizado no reparo tecidual com resultados promissores, no entanto, na fisioterapia oncológica, mais precisamente na prevenção de radiodermite, o uso desse recurso ainda é recente e os resultados obtidos precisam ser melhor elucidados. Diante disso, faz-se necessário avaliar e compreender os efeitos que a fotobiomodulação por LED exerce sobre as células tumorais da mama e sobre as células da pele envolvidas no processo de reparo tecidual, no tempo de exposição ao longo do tratamento radioterapêutico. Objetivo: Verificar os efeitos da fotobiomodulação por diodos emissores de luz em células tumorais da mama e em células da pele humana envolvidas no processo de reparo tecidual. Metodologia: Este projeto de pesquisa caracteriza-se como um estudo integrado de caráter experimental in vitro em que células tumorais da mama (MCF7) e normais, queratinócitos da linhagem HaCat e fibroblastos da linhagem HFF-1, serão expostas a diferentes comprimentos de onda: LED vermelho, comprimento de onda 658 nm e LED azul 470nm. As linhagens serão acompanhadas microscopicamente quanto a formação de monocamada em frasco de cultivo celular, sendo que ao atingir confluência entre 90-98% tais células serão replicadas, de modo que metade da suspensão celular seja disposta em novo frasco de cultivo e a outra metade seja destinada às avaliações experimentais. Os ensaios a serem realizados incluem métodos colorimétricos, fluorimétricos e microscópicos de verificação dos parâmetros relacionados a viabilidade e proliferação celular e ao metabolismo oxidativo.		
Objetivos: Verificar os efeitos da fotobiomodulação por diodos emissores de luz em células tumorais da mama e em células da pele humana envolvidas no processo de reparo tecidual. Investigar os efeitos do LED vermelho e azul na viabilidade e proliferação celular de fibroblastos e queratinócitos expostos a cada comprimento de onda. Investigar a ação do LED vermelho e azul nas taxas de apoptose celular de fibroblastos e queratinócitos expostos a cada comprimento de onda. Verificar a ação do LED vermelho e azul no metabolismo oxidativo em fibroblastos e queratinócitos expostos a cada comprimento de onda. Comparar os efeitos agudos e cumulativos da fotobiomodulação por LED vermelho e azul em fibroblastos e queratinócitos. Investigar a ação do LED azul e vermelho na viabilidade de células tumorais de mama; Investigar os efeitos do LED azul e vermelho na proliferação celular de células tumorais de mama; Determinar a ação do LED azul e vermelho quanto ao metabolismo oxidativo de células tumorais de mama; Avaliar o efeito do LED vermelho e azul na modulação do ciclo celular		

ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

Lasers in Medical Science

Photobiomodulation - blue and red LED: protection or cellular toxicity? In vitro study with human fibroblasts.
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	LIMS-D-20-00796
Full Title:	Photobiomodulation - blue and red LED: protection or cellular toxicity? In vitro study with human fibroblasts.
Article Type:	Original Article
Keywords:	Light-Emitting Diodes, Physiotherapy, Inflammation, Fibroblasts.
Corresponding Author:	FABIANA DOS SANTOS FERREIRA Santa Maria, BRAZIL
Order of Authors:	Fabiana dos Santos Ferreira Francine Carla Cadoná Alessandra Rafael Aunélio Thais Nogueira de Oliveira Martins Hedionéia Maria Foletto Pivetta
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Fabiana dos Santos Ferreira
First Author Secondary Information:	
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	Photobiomodulation is widely used in clinical practice, and there is increasing interest in using this tool to treat numerous dysfunctions in living organisms. Therefore, this study aimed to verify the action of blue and red LED light in cells. Human fibroblasts (HFF-1) were irradiated by blue (470 nm) or red (658 nm) light at doses of 4 and 18 J/cm ² , respectively. Laboratory analyses were carried out to check for viability, proliferation, cell death, and the formation of reactive oxygen and nitric oxide species. The blue light demonstrated cell protection potential by reducing free radical formation and protecting the cell membrane by decreasing double-stranded DNA strands. On the other hand, the red light showed less potential for cell protection due to the risk of associating more significant nitric oxide formation with increased reactive oxygen species formation, in addition to having a greater amount of extracellular DNA. Cell damage prevention is a potential beneficial effect of blue light at 18 J/cm ² . Despite the consolidated effects of red light in treating wounds, there was a potential toxic effect of this wavelength in the doses studied. Given the above, new studies relating these parameters with pathological cells or aggressors that simulate damage may offer results that can better support clinical practice.