

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

MATHEUS HENRIQUE RONDINE

Influência biomodulatória da terapia laser de baixa intensidade e do soro rico em fatores de crescimento em cultura de células fibroblásticas.

Araraquara-SP
2018

MATHEUS HENRIQUE RONDINE

**INFLUÊNCIA BIOMODULATÓRIA DA TERAPIA LASER DE BAIXA
INTENSIDADE E O PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM CULTURA DE
CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Prof. Dr. André Capaldo Amaral
Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

Araraquara-SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

R681i Rondine, Matheus Henrique

Influência biomodulatória da terapia laser de baixa intensidade e do soro rico em fatores de crescimento em cultura de células fibroblásticas/
Matheus Henrique Rondine. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018.

64f.

Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal –
UNIARA

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Coorientador: Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto

1. Tendão. 2. Fibroblasto. 3. Plasma rico em plaquetas. 4. Terapia Laser de baixa intensidade. I. Título.

CDU 610



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



MATHEUS HENRIQUE RONDINE

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Universidade de Araraquara - UNIARA


Drª JANAÍNA DE ANDREA DERNOWSEK
Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer - CTI

RESUMO

A terapia laser de baixa intensidade (TLBI) e o soro rico em fatores de crescimento (SRFC), derivado da técnica do plasma rico em plaquetas humano (PRP), são utilizados clinicamente como agentes bioestimulantes no reparo tecidual. A utilização se justifica pela capacidade de estimular a proliferação e diferenciação celular, a síntese de componentes da matriz extracelular e neoangiogênese local. Em contrapartida, as efetividades dessas técnicas, assim como parâmetros de administração, não se encontram devidamente estabelecidos. Assim sendo, o presente estudo almejou caracterizar, em uma condição *in vitro*, a influência biomodulatória de ambas as técnicas sobre células fibroblásticas. Amostras de sangue de um voluntário do sexo masculino foram centrifugadas para o fracionamento do plasma rico em plaquetas e submetidas a ativação com trombina humana e cloreto de cálcio para obtenção do SRFC. Fibroblastos humanos (linhagem GM07492) foram semeados em placas de 24 poços (3×10^4 células) em meio de cultivo DMEM suplementado com 2.5% de SRFC, soro fetal bovino (SFB) ou ambos. Previamente foi determinada a DE_{MAX} (dose efetiva máxima) para cada λ . As análises de viabilidade celular foram determinadas através do método colorimétrico MTT-Formazan 24 horas após realizadas as irradiações e expressas percentualmente em relação à viabilidade do grupo controle. Os resultados foram estabelecidos por procedimentos estatísticos descritivos e o teste de análise de variância (ANOVA), complementado pelo pós-teste de Fisher. A comparação de viabilidade celular entre os grupos controle, SRFC e SFB + SRFC evidenciou valores de viabilidade celular significativamente diferentes entre ambos os grupos ($p \leq 0,05$), com maior média para o grupo para o grupo SFB + SRFC e menor para o controle. Assim como observado nos grupos suplementados com SFB, os grupos contendo o SRFC tiveram o seu potencial biológico incrementado pela influência da radiação LASER em ambos os λ . Os grupos SFB + SRFC + LASER 685nm e SFB + SRFC + LASER 830nm apresentaram taxas de viabilidade celulares inferiores ao grupo SFB + SRFC ($p \leq 0,05$), que não recebeu quaisquer tipos de irradiações e superiores ao grupo controle. Tais resultados demonstram que a somatória das diferentes formas de obtenção dos fatores de crescimento, em associação com a radiação LASER, desfavoreceu o potencial biológico das células, em ambos os λ , caracterizando uma resposta bioinibitória, com médias de viabilidade celulares inferiores ao meio de cultivo padrão (SFB) em associação ao SRFC.

Palavras-chave: Tendão; Fibroblasto; Plasma rico em plaquetas; Terapia LASER de baixa intensidade.

Abstract

Low-intensity laser therapy (LILT) and serum platelet-rich growth factor (PRGF) derived from the human platelet-rich plasma technique (PRP), are used clinically as biostimulants agents in tissue repair. The use is justified by the ability to stimulate cell proliferation and differentiation, the synthesis of extracellular matrix components and local neoangiogenesis. In contrast, the effectiveness of these techniques, as well as administration parameters, are not properly established. Thus, the present study aimed to characterize, in an *in-vitro* condition, the biomodulatory influence of both techniques on fibroblast cells. Samples of blood from a male volunteer were centrifuged for fractionation of platelet-rich plasma and subjected to activation with human thrombin and calcium chloride to obtain PRGF. Human fibroblasts (line GM07492) were seeded in 24-well plates (3×10^4 cells) in DMEM culture medium supplemented with 2.5% PRGF, fetal bovine serum (FBS) or both. The MaxED (maximum effective dose) was previously determined for each λ . The cell viability analyzes were determined by the MTT-Formazan colorimetric method 24 hours after irradiation and expressed percentage in relation to the viability of the control group. The results were established by descriptive statistical procedures and the analysis of variance (ANOVA), complemented by Fisher's post-test. The Cell viability comparison between control groups, PRGF and FBS + PRGF, showed significantly different values of cell viability between the two groups ($p \leq 0.05$), with a higher mean for the group for the FBS + PRGF group and lower for the control group. As observed in the groups supplemented with SFB, the groups containing SRFC had their biological potential increased by the influence of LASER radiation on both λ . These results demonstrate that the sum of the different forms of growth factors, in association with LASER radiation, disfavored the biological potential of the cells, in both λ , characterizing a bioinhibitory-biological response, with cell viability means lower than the standard culture medium (FBS) in association with PRGF.

Keywords: Tendon; Tendinopathy; Platelet-rich plasma; Low-intensity laser therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Estrutura e composição do tecido tendineo e sua organização hierárquica, conferindo-lhe alta resistência mecânica a forças de trações geradas pelos músculos. 15
- Figura 2:** Representação de uma plaqueta e sua estrutura discóide complexa. 18
- Figura 3:** Principais diferenças e alterações estruturais presentes entre uma plaqueta ativada de forma endógena fisiologicamente e ativada de forma exógena com trombina humana..... 20
- Figura 4:** Caracterização do espectro eletromagnético e suas frequências das radiações eletromagnéticas, se estendendo desde as ondas de baixas frequências até as de maior frequência. Quanto maior a frequência de uma onda eletromagnética, maior será a intensidade da energia emitida e menor o comprimento da onda. 22
- Figura 5:** Descrição esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela TLBI, caracterizada pela liberação de ROS, NO e produção de ATP. 25
- Figura 6:** Representação esquemática da fotodissociação do óxido nítrico, que quando ligado aos centros heme da CCO pode inibir a respiração celular e após ser fotodissociado permite o retorno do oxigênio e conseqüente incremento da respiração celular. 25
- Figura 7:** Representação esquemática do procedimento de punção venosa e da separação dos derivados sanguíneos após a primeira etapa de centrifugação. Os derivados são separados em três fases, o plasma pobre em plaquetas, o “*buffy coat*” no centro representado pelas plaquetas e leucócitos e as células vermelhas do sangue na base do tubo. 29
- Figura 8:** Formação do Péllet plaquetário após a segunda centrifugação, caracterizado pela pequena névoa acima das hemácias na base do tubo..... 29
- Figura 9:** SRFC e pequeno coágulo formado durante o processo de 4 horas de ativação do L-PRP em estufa, antes de passar pelo agitador vortex 30

Figura 10: Equipamento contendo os diodos responsáveis pela emissão das radiações LASER nos λ de 685 e 830nm.	32
Figura 11: Demonstração do suporte e linhas de grade para orientação da placa de irradiação(A) e posicionamento da garra que permite a fixação da probe óptica, viabilizando a realização dos procedimentos de irradiação. Plataforma e superfície de sustentação e guia para posicionamento da placa de cultivo celular (B).....	33
Figura 12: Demonstração do procedimento de irradiação com o λ 685nm dentro do fluxo laminar durante a realização dos experimentos.....	34
Figura 13: Representação gráfica de um ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492) com irradiação com LASER no λ de 685nm, caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental.....	39
Figura 14: Representação gráfica através do teste ANOVA e pós-teste de Fisher com intervalo de confiança de 95%, comparando os grupos entre si e considerando as médias estatisticamente diferentes se o intervalo não contiver o zero.	40
Figura 15: Representação gráfica de um ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492) com irradiação LASER no λ de 830nm, caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental.....	41
Figura 16: Representação gráfica através do teste ANOVA e pós-teste de Fisher com intervalo de confiança de 95%, comparando os grupos entre si e considerando as médias estatisticamente diferentes se o intervalo não contiver o zero.	41
Figura 17: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492), caracterizando as médias e desvios-padrão, grupo controle utilizando SFB, SRFC humano e a ação sinérgica de ambos.	43

Figura 18: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (**GM07492**), caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm. 44

Figura 19: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (**GM07492**), caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo SRFC e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm. 44

Figura 20: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (**GM07492**), caracterizando as médias e desvios-padrão, grupo SFB + SRFC e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação quanto aos principais fatores de crescimento derivados de plaquetas e suas principais funções relacionadas a afecções tendíneas: 18

Tabela 2 : Parâmetros utilizados para a determinação da ($DE_{MÁX}$) para ambos os λ , correspondente a cada doses de aplicações utilizadas (J/cm^2), tempo de irradiação e a energia total depositada (J) 35

Tabela 3: Descrição dos nove grupos experimentais designados para o estudo. 35

Tabela 4: Descrição dos valores do sangue total valores de referência e PRP em relação a glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas..... 38

LISTA DE ABREVIACOES, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

ADP	Adenosina difosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Buffy coat
CCO	Citocromo c oxidase
DE_{MAX}	Dose efetiva máxima
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO	Densidade tica
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EV	Eltrnvolt
SFB	Soro fetal bovino
FC	Fatores de crescimento
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
Hz	Hertz
IGF-I	Fator de crescimento semelhante  insulina
J	Joule
J/cm²	Joule/cm ²
LASER	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
MEC	Matriz extracelular
ml	Mililitro
MTT	3{[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]},
nm	Nanomtros

NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SRFC	Soro rico em fatores de crescimento
RBC	Célula vermelha ou glóbulo vermelho
TLBI	Terapia laser de baixa intensidade
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WBC	Célula branca ou glóbulo branco
UI	Unidades Internacionais
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
λ	Comprimento de onda
%	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	O TECIDO TENDÍNEO.....	15
2.1.1	Tendinopatia.....	16
2.1.2	Aspectos clínicos e tratamentos a partir de recursos biológicos e eletrofísicos.....	16
2.2	PLAQUETAS	17
2.2.1	Soro rico em fatores de crescimento (SRFC).....	19
2.2.2	Processo de obtenção e ativação do SRFC	19
2.2.3	Efeitos biológicos do SRFC.....	20
2.3	TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (TLBI).....	21
2.3.1	Histórico.....	21
2.3.2	Propriedades físicas da radiação	22
2.3.3	Interação da radiação laser com os tecidos biológicos.....	23
2.3.4	Mecanismo celular e molecular	24
2.3.5	Aspectos clínicos e biológicos da TLBI	26
3	OBJETIVO.....	27
3.1	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Soro rico em fatores de crescimento (SRFC)	28
4.1.1	Sujeito	28
4.1.2	Protocolo de obtenção do SRFC	28
4.2	ANÁLISE da viabilidade celular <i>IN VITRO</i>	31
4.3	ação biomodulatória da Radiação laser	31
4.3.1	Dispositivo emissor de radiação LASER.....	31
4.3.2	Plataforma para irradiação	32
4.3.3	Procedimento de irradiação.....	33

4.3.4	Determinação da dose efetiva máxima ($DE_{MÁX}$)	34
4.3.5	Efeito biomodulatório do LASER e do SRFC	35
4.4	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	36
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Quantificação dos subprodutos sanguíneos	38
5.2	CURVA DOSE RESPOSTA E $DE_{MÁX}$	38
5.2.1	Efeito biomodulatório do LASER e do SRFC	42
6	DISCUSSÃO.....	47
7	Conclusões	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

A tendinopatia é uma desordem estrutural do tendão muito comum, com prevalência em indivíduos do sexo masculino e/ou atletas, podendo acometer a população do mundo todo, com diagnóstico clínico de dor e disfunção, comprometendo o bem-estar físico, psicossocial, carreira esportiva, e qualidade de vida (PETERS et al., 2015). Estas desordens podem ser de origem aguda ou crônica, causadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos, apresentando-se de forma inflamatória ou degenerativa, classificadas como tendinite e tendinose respectivamente (DOCHEVA et al., 2014). Em uma inflamação aguda os fatores extrínsecos predominam, principalmente em atletas, por conta de micro traumas e esforços repetitivos constantes, à falta de preparo físico e técnicas adequadas. Nas desordens crônico-degenerativas, tais fatores se somam aos fatores intrínsecos do tendão e pelo seu envelhecimento biológico natural (SHARMA e MAFFULLI, 2005). Biologicamente o tendão apresenta capacidade de realizar o seu auto reparo, contudo, devido sua microestrutura possuir uma pobre celularização e vascularização, sua capacidade natural é extremamente baixa e ineficiente. Por conta disso, sua regeneração é lenta, ocasionando uma reabilitação prolongada e restrições físicas ao paciente (REINKING 2011; DOCHEVA et al., 2014).

Tendo em vista essa limitação biológica, diferentes opções terapêuticas são utilizadas com o objetivo de potencializar a resposta celular e, por conseguinte, o reparo tecidual, através de meios eletrofísicos ou biológicos. Entre os meios eletrofísicos pode-se citar a terapia laser de baixa intensidade (TLBI) e o ultrassom terapêutico (FARCIC et al., 2012), que são comumente utilizados na prática clínica (TUMILTY et al., 2012). Em relação aos meios biológicos, estudos relatam principalmente a utilização de células troncos mesenquimais (YIN et al., 2010; AHMAD et al. 2012, WANG e NIRMALA, 2015) e o soro rico em fatores de crescimento (SRFC) (NOURISSAT et.al., 2015; WANG e NIRMALA, 2016), sendo o último exemplo, uma técnica promissora que vem crescendo e ganhando espaço nos últimos anos.

O SRFC é um subproduto sanguíneo que contém uma elevada concentração plaquetas, capaz de disponibilizar citocinas e fatores de crescimento (KNEZEVIC et al., 2016). Diversas pesquisas demonstraram o seu potencial de estimular o reparo de diferentes tipos de tecidos biológicos, principalmente: ósseo (POCATERRA et al., 2016), condral (ORNET et al., 2014), muscular (SÁNCHEZ et.al., 2014), tendíneo (NOURISSAT et.al., 2015) e cutâneo (VENTER et al., 2015). Foram descritos a potencialização das taxas de proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia, extra-síntese de componentes da matriz extracelular e neoangiogênese, que determinam em um menor tempo e melhor qualidade de processo de reparo (NOURISSAT

et al., 2015; CARVALHO et al., 2016). Tais resultados subsidiaram a utilização na prática clínica com resultados satisfatórios (MAUTNER e KNEER, 2014).

A terapia com laser de baixa intensidade (TLBI) consiste em uma modalidade fototerápica que vem crescendo mundialmente na prática clínica, principalmente nas áreas de fisioterapia e medicina esportiva, evidenciando resultados em diferentes afecções musculoesqueléticas (HASHIMI et al., 2010; MARCOS et al., 2013; ALVES et al., 2014; SOUSA e SILVA 2016). Sua aplicação tem demonstrado eficácia terapêutica em diferentes tipos de tecidos biológicos, influenciando-os positivamente, através de efeitos fisiológicos tais como, neoangiogênese e melhora da oxigenação tecidual, estimulação de síntese e liberação de fatores de crescimento, proliferação e diferenciação celular, incremento da síntese de constituintes da matriz extracelular, modulação da resposta inflamatória e analgesia (NEVES et al., 2011; TUMILTY et al., 2012; NAGATA et al., 2013).

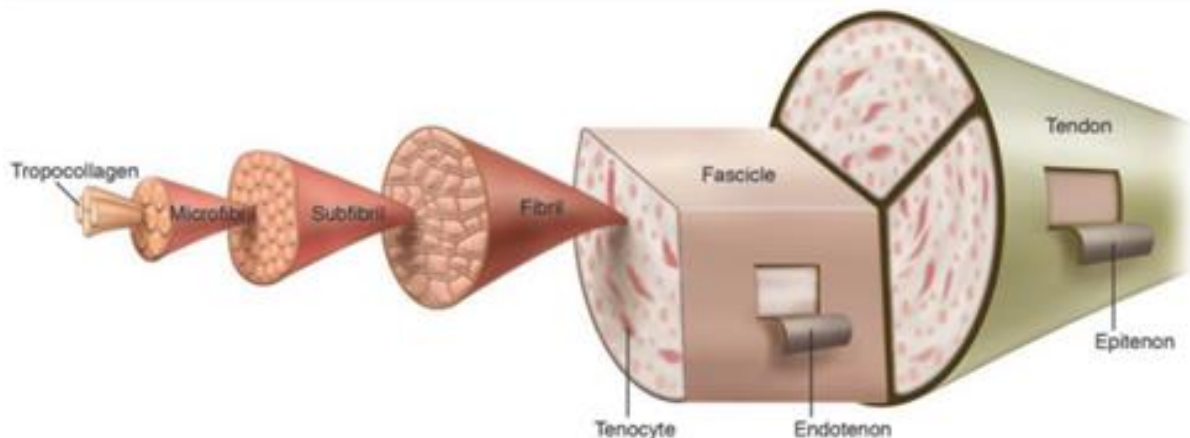
Embora a TLBI e o SRFC sejam utilizados regularmente na prática clínica para o tratamento de tendinopatias, as pesquisas científicas que caracterizam as consequências dessas ações associadas são escassas, em especial aos eventos biológicos que constituem o processo de reparo tecidual e as células que os conduzem.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TECIDO TENDÍNEO

O tendão é um componente anatômico ligado aos músculos estriados esqueléticos, constituído de tecido conjuntivo denso, firmemente empacotado, organizado de forma hierárquica, através fascículos, fibras, fibrilas e moléculas de colágeno (Figura 1). Sua principal função é fixar os músculos ao esqueleto com o propósito de transmitir as forças geradas pelas contrações musculares até unidade óssea de inserção, muito importante para a biomecânica na geração de movimentos e estabilização das articulações, mediando-os (ASLAN et al., 2008; ABATE et al., 2009; REINKING, 2011; FANG e LAKE, 2016; D'ADDONA et al., 2017).

Figura 1: Estrutura e composição do tecido tendineo e sua organização hierárquica, conferindo-lhe alta resistência mecânica a forças de trações geradas pelos músculos.



Fonte: ASLAN et al., 2008, adaptado

Sua matriz extracelular (MEC) possui uma microanatomia composta basicamente de água e colágeno, sendo o colágeno tipo I o mais abundante (65-80%), o que fundamenta o tendão ser tão resistente a forças de trações. Porém, o colágeno tipo I não é o único presente em sua composição, pode-se encontrar os tipos III, IV, V, VI e outros glicosaminoglicanos (BARBOSA, 2012; FANG e LAKE, 2016; D'ADDONA et al., 2017).

As suas principais células são os tenócitos e os tenoblastos, precursoras dos fibroblastos, situadas entre as fibras de colágeno ao longo eixo do tendão em pequenas quantidades, capazes de se adaptarem às diferentes situações em que os tendões são submetidos. São responsáveis pela: produção, manutenção e secreção de proteínas de matriz, organização e orientação das fibras de colágeno (SHARMA e MAFFULLI et al., 2005).

2.1.1 Tendinopatia

O termo “*tendino*” refere-se ao próprio tendão, “*patia*” refere-se a doença, ou doença do tendão, uma desordem estrutural com um diagnóstico clínico de dor e disfunção, que representa um desafio clínico importante, com maior prevalência em indivíduos do sexo masculino e/ou atletas, podendo, porém, acometer a qualquer indivíduo quando a capacidade natural de reparo do tecido é ultrapassada pela sua degradação. O prognóstico é frequentemente incerto, com alta incidência de cronicidade e recorrência (PETERS et al., 2015).

Termos gerais são utilizados para a caracterização deste tipo de alteração, divididos em: "tendinite" e "tendinose". A tendinite é o termo originalmente designado para quadros com a presença de reações inflamatórias, com grande presença de dor local, disfunção, alterações morfológicas e térmicas. A tendinose é o termo denominado quando ocorrem alterações predominantemente crônico-degenerativas, devido a persistência da tendinite por longos períodos ou a idade biológica do tendão ser avançada; notam-se alterações morfológicas como a irregularidade na orientação das fibras, arredondamento dos fibroblastos, aumento da quantidade de água no tecido, sucedendo a manifestações clínicas, como inchaço, dor ao realizar movimentos ou palpções e consequente performance prejudicada (MAGNUSSON, LANGBERG e KJAER, 2010; DOCHEVA et al., 2014; HOPKINS et al., 2016).

Estas desordens podem ser causadas por fatores intrínsecos ou extrínsecos (DOCHEVA et al., 2014). Em uma inflamação aguda os fatores extrínsecos predominam, principalmente em atletas, por conta de micro traumas, esforços repetitivos constantes, à falta de preparo físico e técnicas inadequadas. Nas desordens crônico-degenerativas, tais fatores se somam ao fator intrínseco representado pelo envelhecimento biológico natural do tendão (SHARMA e MAFFULLI, 2005).

Biologicamente esse tecido apresenta a capacidade de realizar auto reparo, contudo, sua microestrutura possui uma pobre celularização e vascularização, comprometendo a capacidade natural de reparo, tornando-a extremamente baixa e ineficiente, quando comparado a outros tecidos, ocasionando reabilitações prolongadas e repleta de restrições físicas ao paciente (REINKING, 2011; DOCHEVA et al., 2014), isso acaba gerando uma grande influência, principalmente na carreira de atletas, comprometendo seu bem-estar físico, psicossocial, qualidade de vida e renda familiar (PETERS et al., 2015).

2.1.2 Aspectos clínicos e tratamentos a partir de recursos biológicos e eletrofísicos

Existe uma busca incessante por parte da medicina regenerativa, ortopedia e fisioterapia esportiva por recursos e tratamentos que promovam uma recuperação mais rápida e eficiente

para lesões musculoesqueléticas, principalmente tendíneas, por conta de toda sua fragilidade biológica celular e manifestações clínicas (SHARMA e MAFFULLI et al., 2005; JIANG et al., 2014).

Diferentes opções terapêuticas são constantemente testadas, buscando a potencialização das respostas celulares e, por conseguinte, o reparo tecidual, com melhores propriedades mecânicas e mais próximas do natural, restituindo as células originais e preservando as características morfológicas e funcionais do tecido, seja através de recursos biológicos ou eletrofísicos.

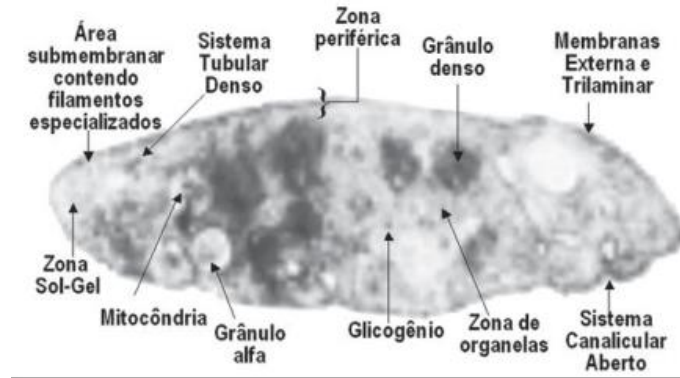
O tratamento através de meios biológicos passou a ser adotado nos últimos anos como um tratamento eficaz para os casos de tendinopatia, dentre eles podemos citar a utilização de células troncos mesenquimais (YIN et al., 2010; AHMAD et al., 2012, WANG e NIRMALA, 2015) e SRFC (NOURISSAT et.al., 2015), técnicas promissoras que estão progredindo, ganhando seu espaço e destaque nos últimos anos por sua influência no tecido e células alvo.

Entre os meios eletrofísicos, pode-se citar a TLBI (GUERRA et al., 2017), terapia por ondas de choque (ERROI et al., 2017) e o ultrassom terapêutico (FARCIC et al., 2012), utilizados a longa data para lesões musculoesqueléticas, com resultados positivos.

2.2 PLAQUETAS

As plaquetas, diferentemente do que muitos pensam, não são células. Na verdade, são fragmentos citoplasmáticos de formato discóide irregular, anucleados com diâmetro médio de 2,6µm (Figura 2), produzidos em decorrência da ruptura dos megacariócitos multinucleados encontrados na medula óssea. Do número total das plaquetas presentes no organismo humano, 70% dessa concentração está na circulação sanguínea, permanecendo em média de 7-8 dias, até serem removidas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado, os 30% restantes permanecem no baço (CASTRO, FERREIRA, NAGASHIMA et al., 2006). São as principais responsáveis pela manutenção e integridade vascular, respondendo rapidamente frente a qualquer alteração no endotélio, por meio das suas propriedades de adesão, liberação de substâncias e agregação (GRASSI e ARAUJO, 2012).

Figura 2: Representação de uma plaqueta e sua estrutura discóide complexa.



Fonte: GRASSI e ARAUJO, 2012, adaptado.

As plaquetas possuem grânulos alfa e densos, os grânulos alfas são os principais incumbidos pela produção dos fatores de crescimento derivados das plaquetas (Tabela 1). Os grânulos densos são constituídos principalmente de ADP, ATP, serotonina, cálcio e dopamina.

Tabela 1: Classificação quanto aos principais fatores de crescimento derivados de plaquetas e suas principais funções relacionadas a afecções tendíneas:

Fatores de crescimento	Funções
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Diferenciação celular, neovascularização, migração de fibroblastos e síntese de matriz extracelular
Fator de crescimento transformante-beta (TGF- β)	Estimulação da formação de colágeno e diferenciação das células tendíneas
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Neovascularização e prevenção da apoptose
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Proliferação de fibroblastos
Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)	Síntese de matriz extracelular e proliferação de fibroblastos
Fator de crescimento fibroblástico (FGF)	Neovascularização, estímulo a síntese de matriz extracelular e migração

Fonte: NIXON et al., 2012; WU, DIAZ e BORG-STEIN, 2016, adaptado.

2.2.1 Soro rico em fatores de crescimento (SRFC)

O SRFC é um subproduto sanguíneo que contém uma elevada concentração de plaquetas, derivado da técnica do plasma rico em plaquetas (PRP), capaz de disponibilizar citocinas e fatores de crescimento. Os seus primeiros relatos de uso indicam que foi por volta da década de 1950, nas áreas da dermatologia e cirurgia oral maxilofacial (NOURISSAT et al., 2015; KNEZEVIC et al., 2016). Trata-se de um método biológico autólogo, que até o momento não apresenta padrões e protocolos que regulem sua composição e os métodos exatos para preparação, administração e ativação dos fatores de crescimento plaquetários (DELONG et al., 2012; WU, DIAZ e BORG-STEIN, 2016).

Classicamente, o SRFC é definido como um soro contendo uma concentração plaquetária que é de 3 a 5 vezes maior do que a concentração basal encontrada em uma pessoa saudável, variando entre 150.000 a 400.000 plaquetas por microlitro (μL) (EHRENFEST et al., 2009; DELONG et al., 2012).

O SRFC vem conquistando maior visibilidade nos últimos anos, devido a sua capacidade de influenciar no complexo molecular e celular e promover um microambiente favorável a recuperação de distúrbios teciduais. Durante as fases iniciais de processo de reparação de uma lesão tecidual, as plaquetas ativadas atraem e promovem a migração celular, agregam-se e formam uma matriz de fibrina que funciona como um andaime de tecido para libertação sustentada dos fatores de crescimento e citocinas, que estimulam e promovem o recrutamento, diferenciação, proliferação e comunicação entre as células (WU, DIAZ E BORG-STEIN, 2016).

2.2.2 Processo de obtenção e ativação do SRFC

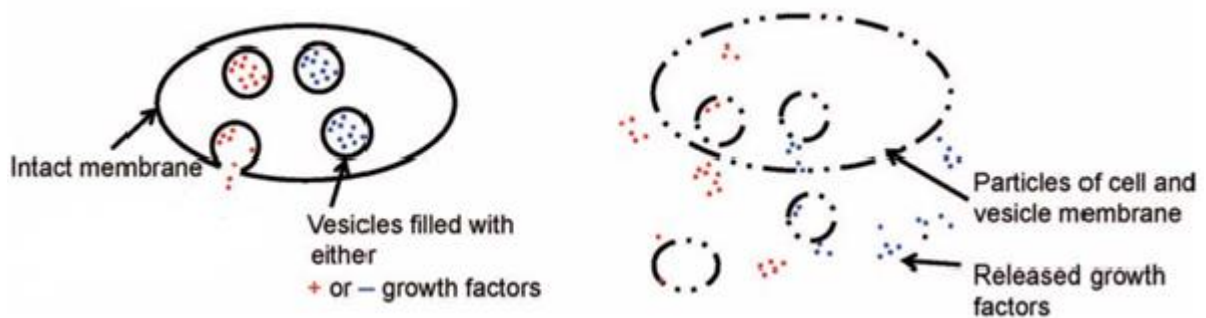
O processo típico de sua obtenção pode ser em uma clínica, laboratório hematológico ou em uma sala cirúrgica, realizado através da coleta sanguínea por punção venosa, com a presença de um anticoagulante de citrato de sódio no frasco de armazenamento, de modo que a conversão da pró-trombina em trombina é bloqueada, inibindo o processo de coagulação sanguínea e assim seus subprodutos sejam separados através da centrifugação (EHRENFEST et al., 2009; ARNO CZKY, DELOS e RODEO 2011; DELONG et al., 2012).

Os fatores de crescimento permanecem de forma latente dentro dos grânulos plaquetários até o momento de sua ativação, que pode ser efetuada de duas formas: exógena ou endógena. A forma exógena consiste na ativação plaquetária e início da liberação dos seus fatores de crescimento antes da aplicação no tecido, realizada com o uso de trombina bovina ou humana, cloreto de cálcio e o colágeno humano tipo I (SCHERER et al., 2012).

O método de ativação endógeno ocorre após a aplicação, através da interação das plaquetas o microambiente tecidual, por meio do contato com material fibrilar do colágeno e as membranas basais das células. Sendo assim, a plena necessidade de que a ativação seja realizada da forma exógena não está totalmente clara (SCHERER et al., 2012).

Uma vez ativadas de forma exógena, as plaquetas começam a secretar de imediato seus fatores de crescimento, sendo que aproximadamente 70% são secretados nos primeiros 15 minutos após a ativação, e dentro de algumas horas quase 100% deles já foram liberados, o que pode levar ao encurtamento da exposição de células alvo a eles, devido a esta liberação abrupta e rapidamente finalizada. A ativação em condição endógena, propicia a liberação lenta e gradual dos fatores de crescimentos, concedendo maior tempo de exposição as células (Figura 3) (HAN et al., 2009; ARNOCZKY, DELOS e RODEO 2011; SCHERER et al., 2012).

Figura 3: Principais diferenças e alterações estruturais presentes entre uma plaqueta ativada de forma endógena fisiologicamente e ativada de forma exógena com trombina humana.



Fonte: SCHERER et al., 2012, adaptado

2.2.3 Efeitos biológicos do SRFC

Entre os efeitos biológicos responsáveis pelo estímulo ao processo de cicatrização, foram descritos a potencialização das taxas de diferenciação e proliferação celular, quimiotaxia, extra-síntese de componentes da matriz extracelular e neoangiogênese, determinando um menor tempo e melhor qualidade de processo de reparo tecidual (NOURISSAT et al., 2015). Tais resultados subsidiam a sua utilização na prática clínica com resultados satisfatórios, com grande aplicabilidade em tendinopatias, principalmente epicondiliares (KARADUMAN et al., 2016), patelares (ZAYNI et al 2015), calcaneanas (TAKAMURA et al 2016) e relacionadas aos músculos do manguito rotador (ZUMSTEIN et al., 2016; MAUTNER e KNEER, 2014).

Assim, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas demonstrando seu potencial de estimulação e modulação biológica de diversos tipos de tecidos, principalmente: ósseo (POCATERRA et al., 2016), condral (ORNET et al., 2014), muscular (SÁNCHEZ et.al., 2014),

tendíneo (NOURISSAT et.al., 2015) e cutâneo (VENTER et al., 2015), apresentando constantemente resultados significativos.

2.3 TERAPIA LASER DE BAIXA INTENSIDADE (TLBI)

2.3.1 Histórico

A palavra LASER, trata-se de uma abreviação de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, traduzido para o português como amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Constitui-se de uma radiação eletromagnética específica, tendo como principais características a monocromaticidade, unidirecionalidade, coerência espacial e temporal (BAXTER, 1997a).

O renomado e bastante conhecido físico Albert Einstein foi quem originalmente esboçou os princípios básicos da geração desse tipo de luz, no início de seu século, por volta de 1917, porém foi somente em 1960 que Theodore Maiman produziu o primeiro disparo de luz LASER de rubi no *Hughes Laboratories* nos EUA (BAXTER, 1997a). Nas décadas subsequentes, vários dispositivos *laser* baseados no protótipo original de Maiman foram desenvolvidos, desde apontadores a laser, leitores de código de barras e até mesmo equipamentos para utilização militar (MISERENDINO; PICK, 1995).

Foi só na metade da década de 60, que o potencial biológico da radiação LASER de baixa intensidade para a indução de fenômenos foto-bioquímicos celulares começou a ser notado, sendo relatado pelo pesquisador Húngaro Endre Mester, através da realização de um experimento para identificar se a radiação poderia causar algum tipo de neoplasia em camundongos. Mester e colaboradores (1968) raspam o pelo das costas dos animais, dividiu-os em dois grupos e irradiou um grupo com laser de rubi de baixa potência, com comprimento de onda 694 nm. O grupo de tratamento não obteve câncer e para sua surpresa, os pelos cresceram mais rapidamente do que o grupo não tratado. Ele chamou isso de "Bioestimulação Laser"

Desde então, foi observado um grande interesse pelo esclarecimento e compreensão de seus mecanismos de ação, tendo em vista resultados clínicos favoráveis, principalmente no que diz respeito à melhora no processo de cicatrização de diferentes tecidos biológicos. Embora ainda permaneçam obscuros alguns de seus mecanismos de ação, evidências demonstram que a radiação LASER tem a capacidade de alterar a atividade celular, fenômeno, denominado de biomodulação (HAMBLIN et al., 2015).

2.3.2 Propriedades físicas da radiação

Por meio da teoria dos quanta de luz, proposta por Max Planck em 1900, afirma que a emissão e absorção de energia eletromagnética dos corpos se dá através de "pacotes" contínuos de energia. O LASER é um dispositivo que funciona baseado num fenômeno: inversão de população, ou seja, absorção de energia para que a maior parte dos átomos se excitem e elétrons "saltem" de órbitas de baixa energia para órbitas de energia mais alta e quando retornam ao seu estado fundamental e realizam a liberação de fótons idênticos.

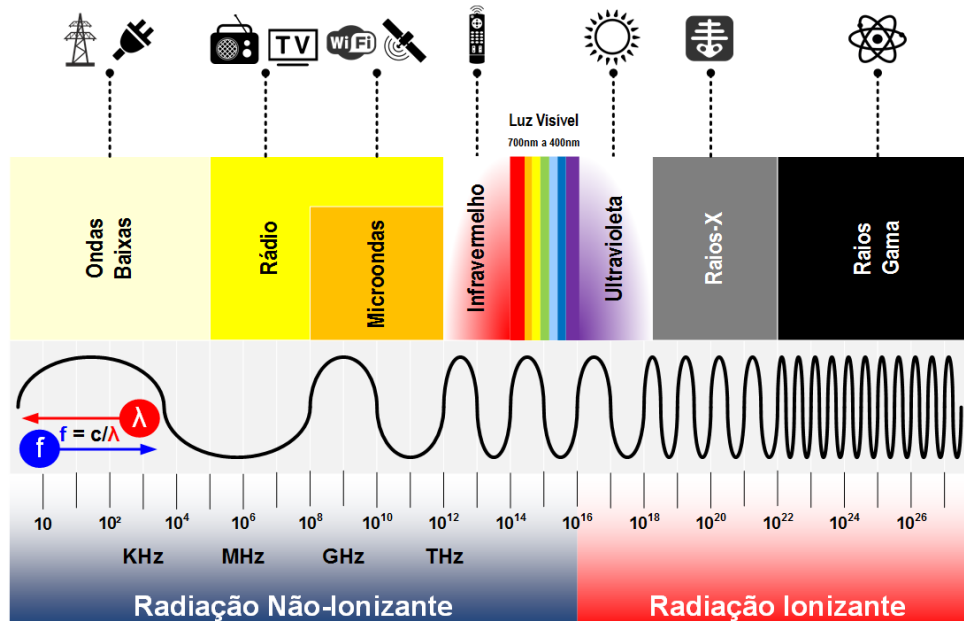
Cada pacote de energia (quantum) possui uma quantidade de energia bem definida, transportada pelas ondas eletromagnéticas por meio de pacotes, denominados *quantums* ou fótons, que percorrem o espaço realizando movimentos oscilatórios (HALLIDAY e RESNICK, 1988).

O movimento oscilatório dos fótons no espaço permite a determinação dos seguintes parâmetros:

- Ciclo: menor porção não repetitiva da onda;
- Período: tempo para realizar um ciclo, medido em segundos (s);
- Comprimento de onda (λ): distância percorrida pelo ciclo;
- Frequência: número de ciclos por segundos, medido em hertz (Hz);
- Velocidade de propagação: constante e igual a 300.000 Km/s.

Os parâmetros de λ e F estão diretamente relacionados à energia aportada pelo fóton. Assim, qualquer um desses 2 parâmetros possibilitam a caracterização de uma radiação eletromagnética (Figura 4) (HALLIDAY e RESNICK 1988).

Figura 4: Caracterização do espectro eletromagnético e suas frequências das radiações eletromagnéticas, se estendendo desde as ondas de baixas frequências até as de maior frequência. Quanto maior a frequência de uma onda eletromagnética, maior será a intensidade da energia emitida e menor o comprimento da onda.



Fonte: <http://labcisico.blogspot.com.br/2013/03/o-espectro-eletromagnetico-na-natureza.html>

2.3.3 Interação da radiação laser com os tecidos biológicos

Quando o laser é aplicado, a luz entregue à superfície precisa chegar ao tecido desejado. Isto pode parecer simples, mas os princípios da óptica são ignorados neste campo. Assim que uma onda eletromagnética incide sobre um tecido biológico ela sofre, inevitavelmente, um fenômeno denominado de espalhamento, caracterizado pelos sucessivos processos de reflexão e/ou refração dos fótons durante sua propagação (HAMBLIN e DEMIDOVA 2006; HAMBLIN 2015).

Segundo HAMBLIN e DEMIDOVA 2006, tanto a absorção e a dispersão da luz no tecido são dependentes do λ , relatam que essa dispersão é muito mais alta em λ na faixa azul (440-485nm), sendo a radiação absorvida antes mesmo de atingir o tecido alvo e que a água começa a absorver significativamente em λ superiores a 1150nm

Por razões como essa, existe uma "janela óptica", que cobre os λ vermelho e infravermelho próximos, onde a penetração efetiva de luz no tecido é maximizada (Figura 5). Embora a luz azul, verde e amarela, de diferentes comprimentos de onda possam ter efeitos significativos sobre as células que crescem em meio de cultura opticamente transparente, o uso da TLBI em animais e pacientes envolve quase exclusivamente luz vermelha e infravermelha próxima, com λ variando de 600-950nm (HAMBLIN e DEMIDOVA 2006; HUANG et al., 2009;). Os tecidos biológicos apresentam, além de um baixíssimo grau de homogeneidade, uma alta quantidade de moléculas absorventes, o que explica a alta magnitude dos fenômenos de espalhamento e absorção em relação à radiação laser (HAMBLIN et al., 2015).

2.3.4 Mecanismo celular e molecular

A TLBI, usa luz laser de baixa potência na faixa de 1-1000 mW, com comprimentos de onda que variam de 632-1064nm, buscando potencializar ou estimular uma resposta biológica. Não emite calor, som ou quaisquer vibrações no tecido, age através de uma indução fotoquímica na célula, processo referido como fotobiomodulação (RASHIDI et al., 2015; HASHIMI et al., 2010).

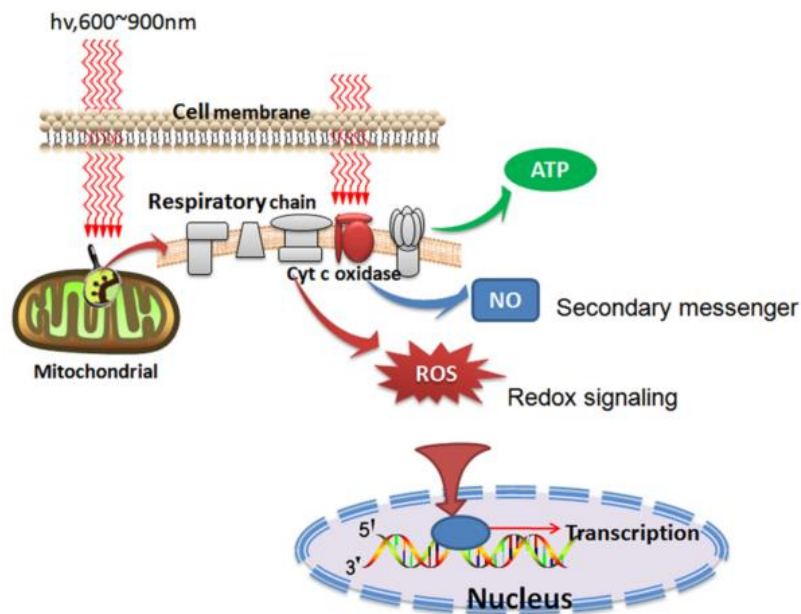
A terapia de fotobiomodulação é uma forma de terapia que não utiliza formas ionizantes como fontes de luz, incluindo LASERS e LED (*Light Emitting Diode*), no espectro visível e infravermelho. É um processo não-térmico envolvendo cromóforos endógenos que promovem através da absorção de energia eventos fotofísicos e fotoquímicos, em várias escalas biológicas, com resultados terapêuticos benéficos, como analgesias, imunomodulação, e potencialização de reparos teciduais (TSAI e HAMBLIN, 2017).

Uma das hipóteses mais aceitas e estudadas para a ação do LASER de baixa intensidade é que as mitocôndrias sejam os principais alvos intracelulares, responsáveis por desempenhar um papel importante no metabolismo e geração de energia celular, através do processo de fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons (HAMBLIN et al., 2015).

As mitocôndrias são uma importante fonte de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células, essas ROS podem atuar como um sinal redox modulável, afetando reversivelmente a atividade de uma gama de funções celulares, influenciando a atividade de moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos. Acredita-se que as células possuam sensores que detectam os níveis de ROS potencialmente nocivos e induzem a resposta através da produção de antioxidantes como superóxido dismutase e catalase. ROS estão presentes em grande parte das células eucarióticas devido ao metabolismo energético dependente do uso de oxigênio, que recebe quatro elétrons e quatro prótons resultando na formação de duas moléculas de H₂O e aumento do potencial protônico da membrana (HASHIMI et al., 2010; HUANG et al., 2011).

Quatro complexos ligados à membrana mitocondrial interna foram identificados, constituindo uma estrutura transmembranar extremamente complexa e embutida na membrana interna, o Complexo IV, também conhecido como CCO (Citocromo C-oxidase), é um componente da cadeia transportadora de elétrons, responsável pela conversão a luz em sinais que podem estimular processos biológicos (Figura 5) (HASHIMI et al., 2010).

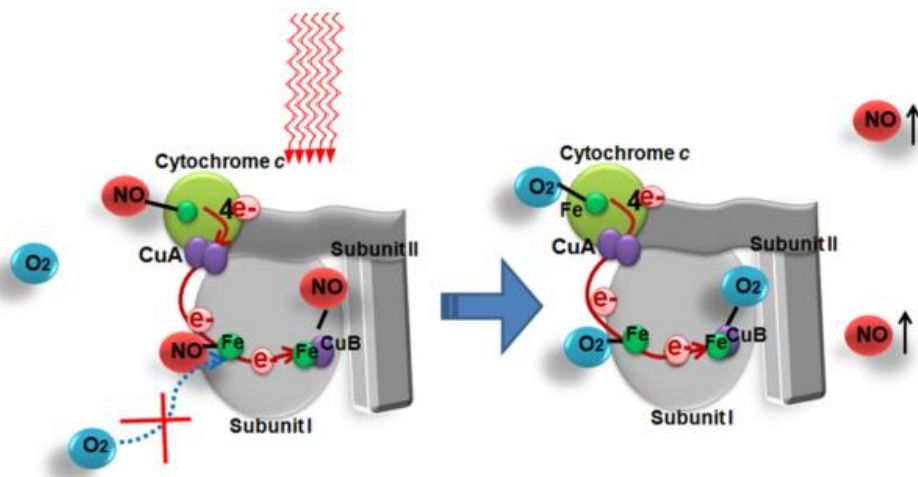
Figura 5: Descrição esquemática das vias de sinalização celular desencadeadas pela TLBI, caracterizada pela liberação de ROS, NO e produção de ATP.



Fonte: Huang et., al 2011

A CCO possui 2 hemes-centros de cobre, capazes de absorver a luz em uma ampla gama espectral, incluindo o vermelho e infravermelho. No nível celular, a principal resposta a TLBI é a geração de uma fotodissociação do óxido nítrico (NO), permitindo que o oxigênio retorne aos seus sítios de ligação com a CCO e aumente a respiração celular (Figura 6) (HAMBLIN et al 2015; TSAI e HAMBLIN 2017).

Figura 6: Representação esquemática da fotodissociação do óxido nítrico, que quando ligado aos centros heme da CCO pode inibir a respiração celular e após ser fotodissociado permite o retorno do oxigênio e consequente incremento da respiração celular.



Fonte: Huang et., al 2011

A ação da luz nas membranas plasmáticas ou mitocôndrias podem modular vias de sinalização, produção ROS, ATP e NO. Os efeitos secundários são sempre precedidos de efeitos primários, como influência nos processos metabólicos, como produção de fatores de crescimento, atividade anti-apoptose e pró-sobrevivência, organização do citoesqueleto, homeostase, proliferação e diferenciação celular (TSAI e HAMBLIN 2017).

2.3.5 Aspectos clínicos e biológicos da TLBI

Atualmente o uso da TLBI tem tido um amplo e difundido uso em diferentes processos cicatriciais, com um desígnio de obtenção mais rápida e eficiente da reestruturação de vários tipos de tecidos biológicos, seja ele, tendíneo (GUERRA et al 2017), cutâneo (RASHIDI et al 2015), ósseo (MEDALHA et al 2016), condral (TRAWITZKI et al., 2017), nervoso (HASHMI et al., 2010) ou muscular (GARCIA et al., 2016), controlando e modulando tanto processos agudos como crônicos. Seu êxito deve-se aos mecanismos de respostas que este recurso induz, como redução de edema local, melhora da oxigenação tecidual, estimulação de síntese e liberação de fatores de crescimento por parte das células, incremento da ativação, proliferação e diferenciação celular, estímulo à síntese de constituintes da matriz extracelular, modulação da resposta inflamatória e analgesia (TUMILTY et al, 2012; NAGATA et al 2013).

Devido a capacidade de influenciar e bioestimular diferentes tecidos biológicos, a TLBI rotineiramente é utilizada em diferentes áreas da medicina, proporcionando resultados satisfatórios. A associação desta terapia ao SRFC atualmente é desconhecida, com poucos ou inexistentes resultados publicados na comunidade acadêmica que demonstrem a eficiência de ambas as terapias em conjunto, seus métodos e parâmetros de aplicações.

Sendo assim, a principal hipótese referente ao estudo e análise de ambas as técnicas foi que a ação sinérgica da radiação LASER e do SRFC, simulando uma condição *in vivo*, causariam uma ação bioestimulante sobre a cultura de células fibroblásticas humana *in vitro*.

3 OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo analisar o potencial biomodulatório do soro rico em fatores de crescimento, derivado da técnica do plasma rico em plaquetas, e/ou da terapia LASER de baixa intensidade na viabilidade de células fibroblásticas humanas *in vitro*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a influência do SRFC humano, oriundo da ativação do PRP, na viabilidade de células fibroblásticas humanas e correlacionar com a ação do SFB habitualmente utilizado em experimentação *in vitro*;
- ✓ Analisar o potencial biomodulatório da radiação LASER na viabilidade de células fibroblásticas sob suplementação de SFB, SRFC e ambos associados;
- ✓ Determinar os parâmetros dosimétricos da radiação LASER, nos dois λ propostos no estudo, responsáveis pela geração da ação biomodulatória, caso essa seja evidenciada;
- ✓ Estabelecer a influência exercida pela associação da ação do SRFC e da radiação LASER sobre a viabilidade das referidas células.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SORO RICO EM FATORES DE CRESCIMENTO (SRFC)

Os procedimentos para obtenção do SRFC determinados neste estudo foram realizados no Laboratório de Hematologia e Imunologia da Universidade de Araraquara – UNIARA. Os materiais empregados na coleta foram descartáveis. O descarte do sangue e seus derivados, assim como dos materiais utilizados para coleta, foram feitos em caixas coletoras apropriadas para material infectante e posteriormente encaminhado para incineração.

4.1.1 Sujeito

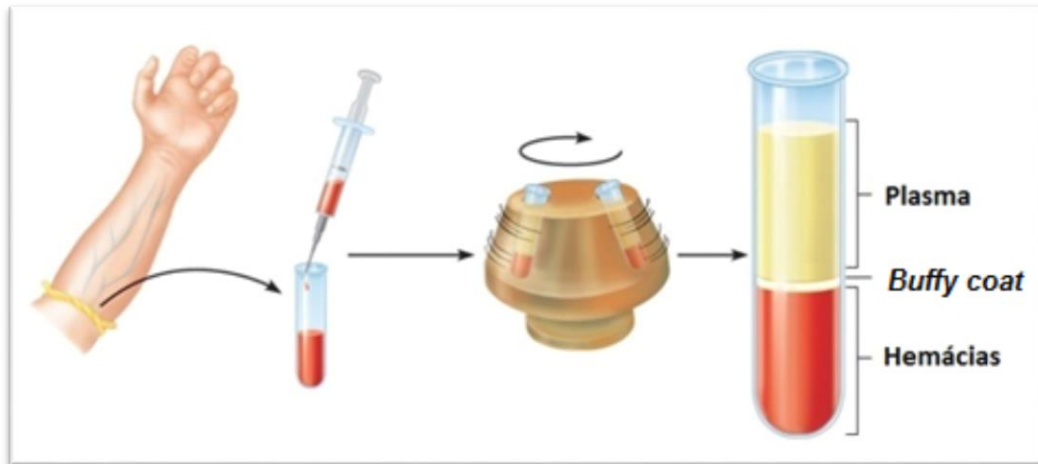
Foi selecionado 1 (um) voluntário saudável, com idade de 42 anos, do sexo masculino, não tabagista, clinicamente saudável, e que não tenha feito uso regular de qualquer tipo de medicamento nos 6 meses que antecederam a coleta do material biológico. Para ser considerado voluntário, foi necessária a prévia autorização por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido, de acordo com as normas previstas pela resolução **CNS 466/12** do Ministério da Saúde. O estudo foi submetido e aprovado pela análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara – UNIARA sob o **Número do Parecer: 1.768.274**

4.1.2 Protocolo de obtenção do SRFC

O voluntário encontrava-se em jejum de 12 horas no momento da coleta do sangue. As amostras foram colhidas por meio de punção venosa, realizada por profissional Biomédico devidamente habilitado e seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial.

Foram colhidos 20mL de sangue e separados em seis tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante (*Vacutainer*) e um tubo contendo EDTA. O tubo contendo EDTA foi utilizado para a determinação dos valores sanguíneos basais de plaquetas, leucócitos e hemácias, analisados no Laboratório de análises São Lucas, através de quantificação automatizada (*Sysnex XT – 1800i*). Os demais foram inicialmente centrifugados a 400g (1500 rotações por minuto) durante 10 minutos. Após centrifugação, houve a separação dos derivados sanguíneos em três fases, o plasma pobre em plaquetas, o “*buffy coat*” no centro e as células vermelhas do sangue na base do tubo (Figura 7).

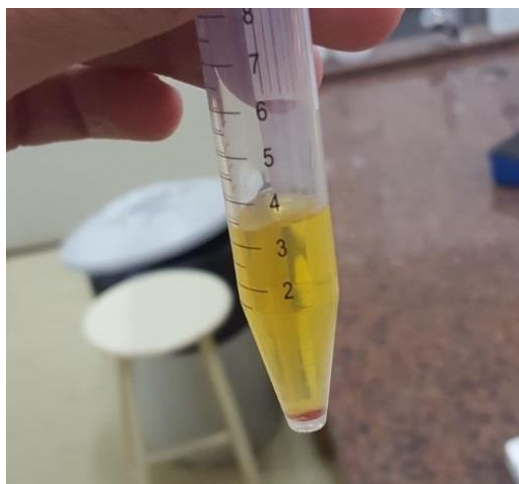
Figura 7: Representação esquemática do procedimento de punção venosa e da separação dos derivados sanguíneos após a primeira etapa de centrifugação. Os derivados são separados em três fases, o plasma pobre em plaquetas, o “*buffy coat*” no centro representado pelas plaquetas e leucócitos e as células vermelhas do sangue na base do tubo.



Fonte: <http://www.mausmarrow.com/wp-content/uploads/2013/12/image5.jpg>, adaptado.

O volume total de plasma dos tubos, incluindo a parte do “*buffy coat*”, foi removido, acondicionado em um tubo estéril e submetido a uma nova centrifugação de 700g (2000 rotações por minuto) durante 17 minutos, resultando na formação do *pellet* de plaquetas e leucócitos (Figura 8).

Figura 8: Formação do *Pellet* plaquetário após a segunda centrifugação, caracterizado pela pequena névoa acima das hemácias na base do tubo.



Fonte: Arquivo próprio

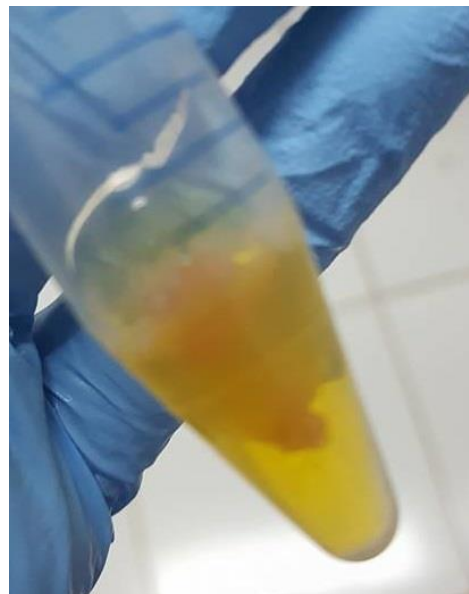
Primeiramente 1 ml do plasma pobre em plaquetas foi separado e o restante descartado, restando apenas o *pellet* plaquetário. Este plasma pobre em plaquetas armazenado até então, foi utilizado para ressuspender o *pellet* plaquetário, leucócitos e hemácias presentes no tubo,

constituindo a partir de então, o L-PRP. Uma alíquota de 50 μ L do L-PRP foi adicionado a um *eppendorf* e encaminhada para quantificação de hemácias, leucócitos e plaquetas, assim como realizado com o tubo contendo o sangue total do voluntário.

Para a obtenção do SRFC, foi induzida a ativação plaquetária por meio de uma solução de trombina humana, 10.000 UI (Unidades Internacionais) acrescida com 1000 μ L de cloreto de cálcio 10% (*Beriplast®P*). Foram utilizados 78 μ L desta solução com trombina, responsável pela indução do fenômeno de degranulação das plaquetas e liberação das biomoléculas contidas nos grânulos α e grânulos densos. Vale ressaltar a presença das citocinas e fatores de crescimento produzidos e liberados pelos leucócitos, uma vez que o protocolo de dupla centrifugação utilizado para a obtenção do PRP não exclui esse tipo celular.

O L-PRP permaneceu em estufa de cultivo celular (Panasonic – Co² incubator MOC - 19 AIC-UV) à temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico por um período de 4 horas, a fim de permitir a ativação, degranulação plaquetária e formação do coágulo. Após essas 4 horas, o SRFC juntamente com o coágulo que se formou (figura 9) passaram por agitador vortex com velocidade de 2500rpm (*gehaka*) por 5 minutos, utilizado para a homogeneização e retirada do soro presente dentro do coágulo, que logo após foi removido e descartado em local apropriado.

Figura 9: SRFC e pequeno coágulo formado durante o processo de 4 horas de ativação do L-PRP em estufa, antes de passar pelo agitador vortex



Fonte: Arquivo próprio

A fim de uma maior purificação do SRFC e menor quantidade de detritos presentes, foi realizado uma ultracentrifugação a 16000 rotações por minuto, durante 60 segundos.

4.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO*.

Os experimentos *in vitro* determinados neste estudo foram realizadas no Laboratório de Ensaaios Celulares e Engenharia de Regenerativa (LECER) do Grupo de Pesquisa em Química Medicinal e Medicina Regenerativa - QUIMMERA da Universidade de Araraquara – UNIARA.

Para as análises *in vitro*, foi utilizada a linhagem de fibroblastos humanos (GM07492). As células foram cultivadas em garrafas com meio de cultura de Eagle's modificado por Dulbecco (DMEM - Vitrocell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell), Penicilina (100 µg/mL - Vitrocell) e Estreptomicina (100µg/mL - Vitrocell), e mantidas em estufa de cultivo celular (Panasonic – Co² incubator MOC -19 AIC-UV) à temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

4.3 AÇÃO BIOMODULATÓRIA DA RADIAÇÃO LASER

4.3.1 Dispositivo emissor de radiação LASER

Foram utilizadas nos experimentos radiações LASER em dois comprimentos de onda distintos, sendo um dentro da faixa de radiação visível e outro na faixa de radiação infravermelho ($\lambda = 685$ e 830nm) do espectro eletromagnético com potência de 35mW e regime de emissão contínuo.

Esses comprimentos de onda representam as radiações LASER cujas fontes de emissão são comercialmente disponíveis e rotineiramente utilizadas na prática clínica, inclusive com objetivo de estimular o processo de reparo tecidual durante o tratamento fisioterapêutico das lesões musculoesqueléticas.

O equipamento utilizado nos experimentos foi o Thera Lase[®], fornecido pela empresa DMC equipamentos, composto por diodos semi-condutores e emissor das radiações propostas (Figura 10). Caracteriza-se pela emissão da radiação por meio de uma fibra ótica circular e o feixe colimado, divergindo a partir da extremidade da fibra e determinando uma relação diretamente proporcional entre a distância de um alvo e a área de projeção do feixe. O equipamento permite a seleção de comandos do λ , modo de emissão (contínuo ou pulsado) e dose de radiação e potência.

Figura 10: Equipamento contendo os diodos responsáveis pela emissão das radiações LASER nos λ de 685 e 830nm.



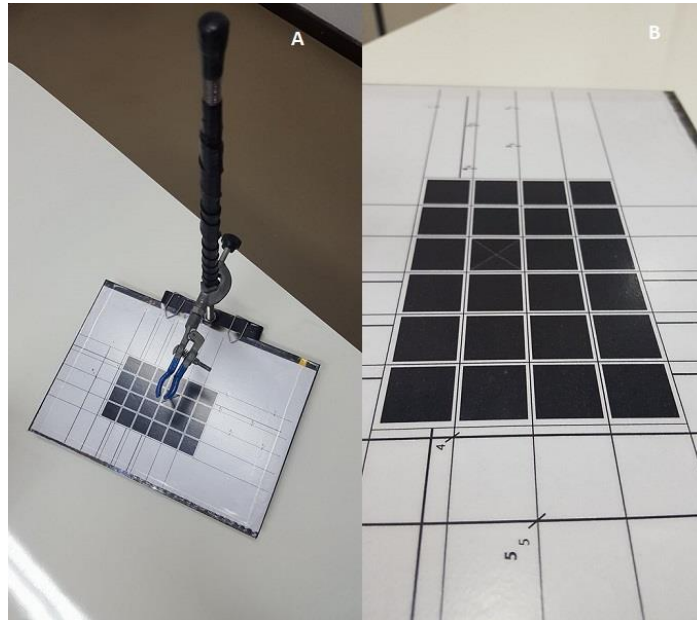
Fonte: Arquivo próprio

4.3.2 Plataforma para irradiação

A primeira etapa para a realização dos experimentos *in vitro* foi o desenvolvimento de um dispositivo para viabilizar a irradiação das células, contidas nos poços das placas de cultura (24 poços), dentro do fluxo laminar, em virtude da necessidade de ambiente estéril para as irradiações. Tal dispositivo foi posicionado para proporcionar o adequado posicionamento da placa de cultura e da probe emissora da radiação, para que a probe se mantivesse perpendicular e imóvel em relação à superfície de irradiação durante todo o procedimento (Figura 11 A). A probe emissora de radiação é uma fibra óptica que possui uma leve angulação, o que se fez necessário encontrarmos a garra para sua fixação correta, afim de proporcionar o adequado posicionamento do feixe, na posição perpendicular.

A superfície da base apresenta uma marcação em forma de grade quadriculada que orienta o posicionamento da placa para que o feixe da radiação coincida com a área do poço alvo, ela apresenta cor negra para diminuir ao máximo os níveis de reflexão da radiação e reincidência sobre o contingente celular (Figura 11 B).

Figura 11: Demonstração do suporte e linhas de grade para orientação da placa de irradiação(A) e posicionamento da garra que permite a fixação da probe óptica, viabilizando a realização dos procedimentos de irradiação. Plataforma e superfície de sustentação e guia para posicionamento da placa de cultivo celular (B)



Fonte: Arquivo próprio

O suporte para fixação da probe de emissão apresenta uma haste disposta verticalmente fixa a sua base e uma garra presa a esta haste, possibilitando a regulagem da altura da probe em relação a base e ajustes do feixe da radiação. O distanciamento ou aproximação da fonte de emissão proporciona a adequação entre as áreas de incidência do feixe do LASER e do poço da placa de cultura.

4.3.3 Procedimento de irradiação

Nos dias estabelecidos para a realização das irradiações, assim como para os demais em que a rotina da cultura foi necessária, as técnicas básicas de esterilização do fluxo laminar vertical e manuseio asséptico foram mantidas, acrescida pelo fato da plataforma de irradiação e as probes de emissão terem sido introduzidas no fluxo laminar previamente à sua irradiação com luz ultravioleta (30 minutos).

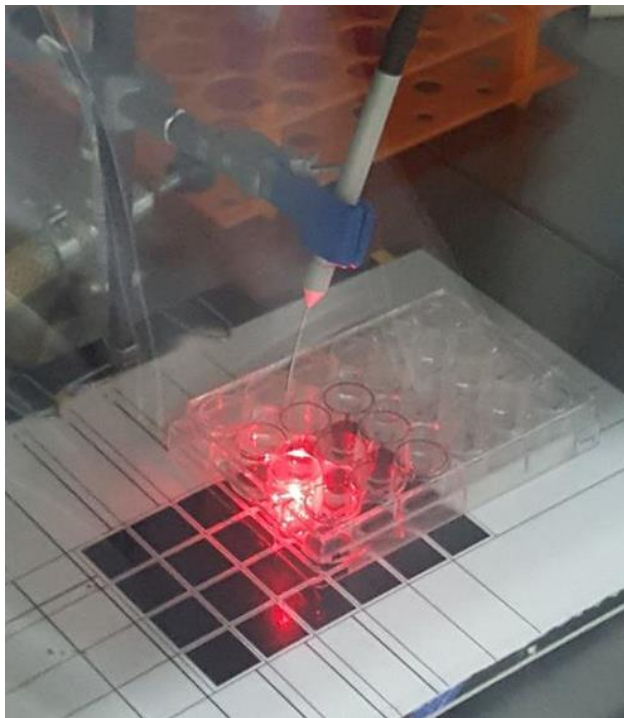
A visualização do feixe de radiação infravermelha foi viabilizada pelo uso de uma câmera de celular Galaxy s6 (*Samsung*) dotada de um sistema de captação deste tipo de radiação.

Tendo em vista que a área de projeção do feixe da radiação coincidiu com a área de superfície dos poços (1.91 cm^2), foi possível estabelecer a média da irradiância utilizada nestes experimentos (aproximadamente 18 mW/cm^2).

Antes do acionamento da emissão da radiação, a placa era posicionada na base da plataforma, tendo como guia a demarcação em grade disposta em sua superfície. Com o término da irradiação iniciava-se um novo ciclo compreendendo o posicionamento da placa, programação do parâmetro dosimétrico e a execução da irradiação.

Durante o procedimento de irradiação, a iluminação interna do fluxo laminar, caracterizada por uma lâmpada fluorescente, foi mantida desligada e as tampas das placas foram removidas (Figura 12).

Figura 12: Demonstração do procedimento de irradiação com o λ 685nm dentro do fluxo laminar durante a realização dos experimentos



Fonte: Arquivo próprio

4.3.4 Determinação da dose efetiva máxima ($DE_{MÁX.}$)

A determinação das $DE_{MÁX.}$ para cada um dos comprimentos de onda (λ), denominadas de doses ideais, estabelecidas através de experimentos prévios de viabilidade celular, realizados em condições de suplementação de meio DMEM 5% de SFB, uma concentração inferior as condições ideais de cultivo e rotineiramente utilizadas, que é DMEM 10% de SFB.

Para tal, foi utilizada uma placa de 24 poços. As células foram removidas das garrafas de cultivo, quantificadas e semeadas a uma concentração de 5×10^4 células por poço.

Em seguida foi realizado o processo de irradiação com as doses pré-estabelecidas (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5) para ambos os λ com os seguintes parâmetros (Tabela 2).

Tabela 2 : Parâmetros utilizados para a determinação da ($DE_{MÁX}$) para ambos os λ , correspondente a cada doses de aplicações utilizadas (J/cm^2), tempo de irradiação e a energia total depositada (J) .

Dose (J/cm^2)	Tempo de irradiação (segundos)	Energia depositada (J)
0,3	16	0,5
0,6	33	1,1
0,9	49	1,7
1,2	65	2,2
1,5	82	2,8

Terminado o processo de irradiação, as células foram homogeneizadas e transferidas para a placa de 96 poços em quadruplicatas 1×10^4 células por poço, permanecendo por um período de 24 horas de encubação, suficiente para que ocorressem os processos de adesão, espraiamento e proliferação celular.

4.3.5 Efeito biomodulatório do LASER e do SRFC

Para a determinação do efeito biomodulatório do LASER e do SRFC, assim como na etapa anterior foi utilizada uma placa de 24 poços, as células foram removidas das garrafas de cultivo, quantificadas e semeadas a uma concentração de 3×10^4 células por poço, em meio DMEM 2,5% SFB. Para realização das dos procedimentos e os seguintes grupos experimentais foram separados (Tabela 3):

Tabela 3: Descrição dos nove grupos experimentais designados para o estudo.

Grupos experimentais	Descrição
CONTROLE	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo (SFB).
LASER 685nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo (SFB) e irradiadas com a $DE_{MÁX}$. nesse λ .

LASER 830nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo (SFB) e irradiadas com a $DE_{MÁX}$ nesse λ .
SRFC	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo, sendo realizada a troca do SFB pelo SRFC.
SRFC + LASER 685nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo (SRFC) e irradiadas com a $DE_{MÁX}$ nesse λ .
SRFC + LASER 830nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo (SRFC) e irradiadas com a $DE_{MÁX}$ nesse λ .
SFB + SRFC	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo, suplementadas por ambas as fontes de obtenção dos fatores de crescimento, SFB e SRFC.
SFB + SRFC + LASER 685nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo, suplementadas por ambas as fontes de obtenção dos fatores de crescimento e irradiadas com a $DE_{MÁX}$ nesse λ .
SFB + SRFC + LASER 830nm	As células foram mantidas nas condições iniciais de cultivo, suplementadas por ambas as fontes de obtenção dos fatores de crescimento e irradiadas com a $DE_{MÁX}$ nesse λ .

Após a preparação dos respectivos insumos, os frascos que continham SRFC passaram por um processo de filtração, com o auxílio de uma seringa e um filtro (*Kasvi*) com poro de 0,22 micrômetros.

4.4 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade, *in vitro*, das células fibroblásticas foi avaliada após 24 horas de incubação, nas condições experimentais estabelecidas, com as células em adesão. As células primeiramente foram semeadas em placas de 24 poços nas condições de cultivo ideais (DMEM 10% SFB), onde permaneceram por 18 horas, para que ocorressem os processos de adesão e espraiamento. Após esse período, os poços foram lavados e o meio de cultivo trocado, sendo reduzido para (DMEM 2,5% SFB), mantido nessas condições por mais 18 horas até os procedimentos de irradiação e colocação dos respectivos meios de cultura específicos de cada grupo experimental, onde permaneceram por 24 horas em encubação na estufa de cultivo celular

até o momento da análise. Foram realizadas análises em triplicatas em cada grupo utilizando o método colorimétrico MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}, um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. Para iniciar a análise o meio de cultivo foi removido, os poços lavados com tampão fosfato (PBS) e alíquotas de 350 μ L de MTT adicionadas aos poços. Após 4 horas de incubação, foram adicionados 700 μ L de solução de isopropanol em cada poço para a solubilização completa dos cristais de formazan precipitados, com a realização de constantes homogenizações. A seguir, os valores de densidade ótica (DO) em absorbância em espectrofotômetro (Polaris-Celer) utilizando o λ de 570nm, foram estabelecidos e os resultados de viabilidade celular expressos em forma percentual em relação aos valores de DO obtidos no grupo controle.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados foram utilizados procedimentos de estatística qualitativa descritiva básica e o teste de análise de variância (ANOVA), complementado pelo pós-teste de Fisher, ambos com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS SUBPRODUTOS SANGUINEOS

Os resultados obtidos através da quantificação celular no sangue total e após fracionamento plasmático para a obtenção do PRP são expressos na Tabela 4.

Quando comparados com os valores de referência, também descritos na referida tabela, o voluntário encontrava-se dentro dos padrões de normalidade, classificado como saudável e elegível para o presente estudo.

Tabela 4: Descrição dos valores do sangue total valores de referência e PRP em relação a glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas.

	Sangue total	Valores de referência	PRP
	x 10 ³ /μL	x 10 ³ / μL	x 10 ³ /μL
Glóbulos Brancos	5.52	4 - 10	2.1
Glóbulos Vermelhos	4.78	4.2 - 5.9	0,0001
Plaquetas	205	150 – 400	1.720

Através do protocolo dupla centrifugação e separação dos subprodutos, a taxa de concentração plaquetária que antes era de 205x10³/μL, passou a ser de 1.720x10³/μL, ou seja, foi obtida uma concentração plaquetária de aproximadamente nove vezes a concentração inicial.

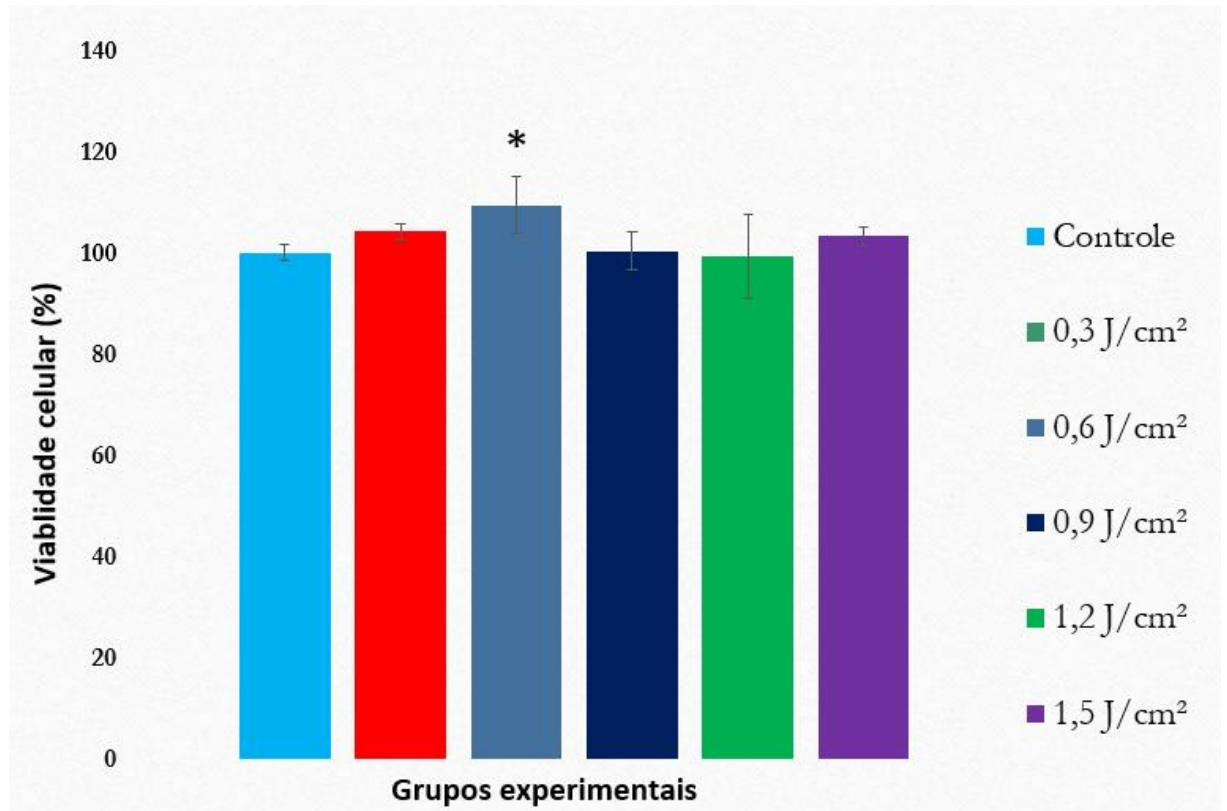
A concentração de hemácias, após procedimento de fracionamento dos subprodutos sanguíneo foi reduzida, apresentando quantidades extremamente baixas. Tal fato reflete acurácia no processo de pipetagem ao final da primeira etapa de centrifugação.

Em relação a concentração de leucocitária, ela foi reduzida em aproximadamente 50%. Isto acontece devido ao fato da necessidade de, no momento da pipetagem para a coleta do plasma ao final da primeira etapa da centrifugação, coletar o *buffy coat*, local onde encontram-se a maior concentração das plaquetas.

5.2 CURVA DOSE RESPOSTA E DE_{MÁX}.

Os resultados referentes ao λ de 685nm expressos por meio das médias e desvios-padrão das amostras e o grupo controle, no que diz respeito a viabilidade celular, encontram-se apresentado na figura 13.

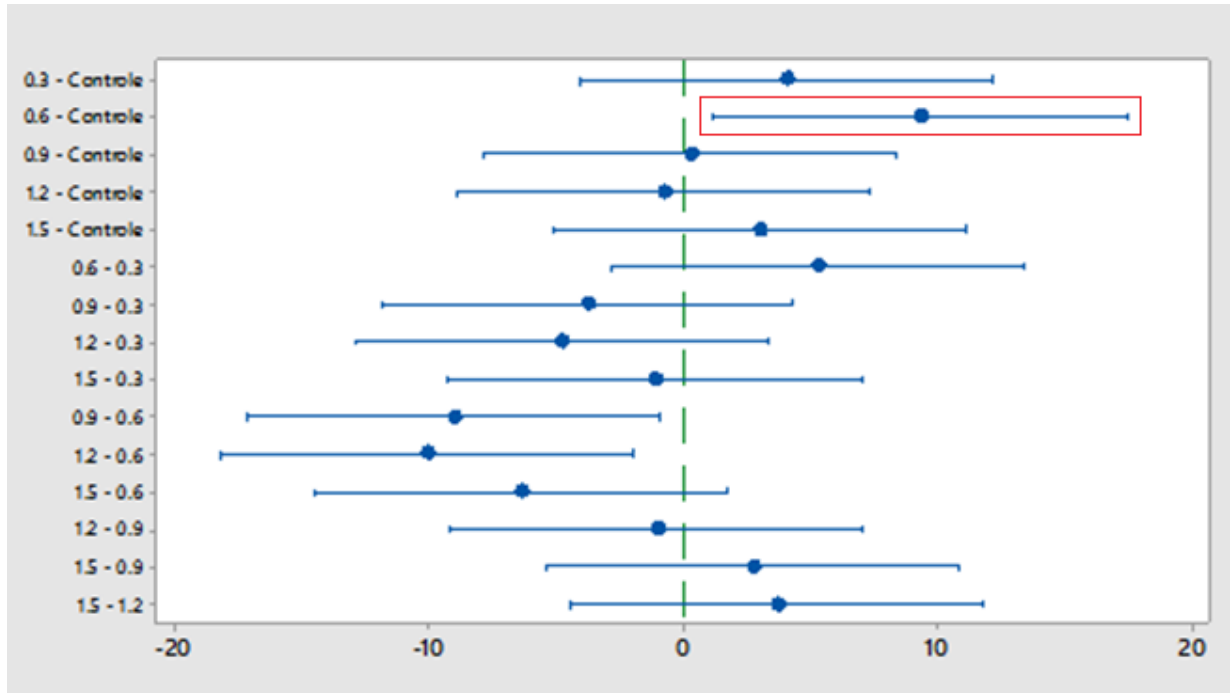
Figura 13: Representação gráfica de um ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492) com irradiação com LASER no λ de 685nm, caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental.



Como visualizado na figura 13, houve um aumento nos valores de média de viabilidade celular nos grupos 0,3 e 0,6 J/cm². As análises estatísticas demonstram a diferença presente apenas entre os grupos 0,6 J/cm² e Controle, com as células irradiadas alcançando uma média de viabilidade 9.5% superior ao Controle ($p \leq 0,05$).

Os resultados referentes à análise estática, comparando as diferenças intergrupos que receberam diferentes dosagens com o λ de 685nm, são apresentados na figura 14.

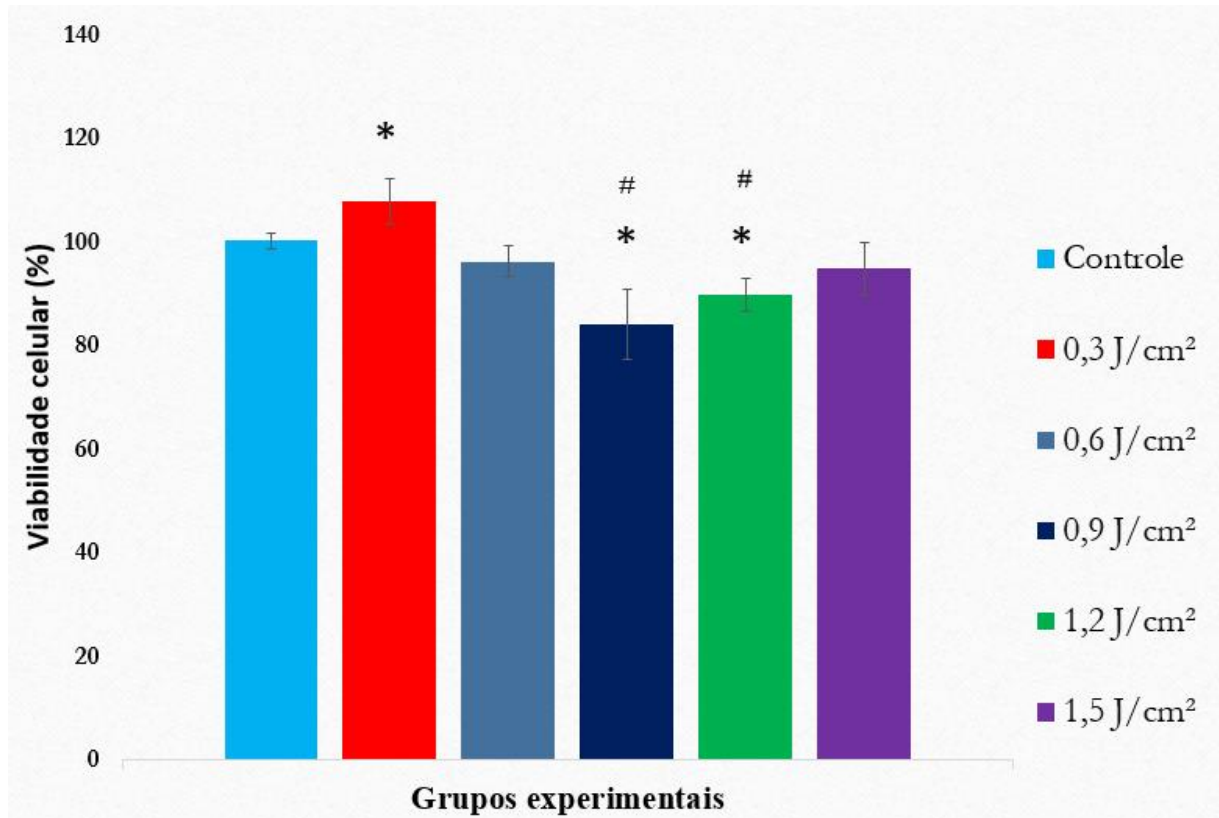
Figura 14: Representação gráfica através do teste ANOVA e pós-teste de Fisher com intervalo de confiança de 95%, comparando os grupos entre si e considerando as médias estatisticamente diferentes se o intervalo não contiver o zero.



Referente aos resultados expostos, a única dose que apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo Controle foi de $0,6 \text{ J/cm}^2$, que foi estabelecida como a $DE_{MÁX}$. a ser utilizada para esse λ .

No que diz respeito aos resultados obtidos no λ de 830nm , as médias e desvios-padrão das amostras, relativo a viabilidade celular do grupo controle e as diferentes dosagens de radiações, encontram-se apresentadas na figura 15.

Figura 15: Representação gráfica de um ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (**GM07492**) com irradiação LASER no λ de 830nm, caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental.

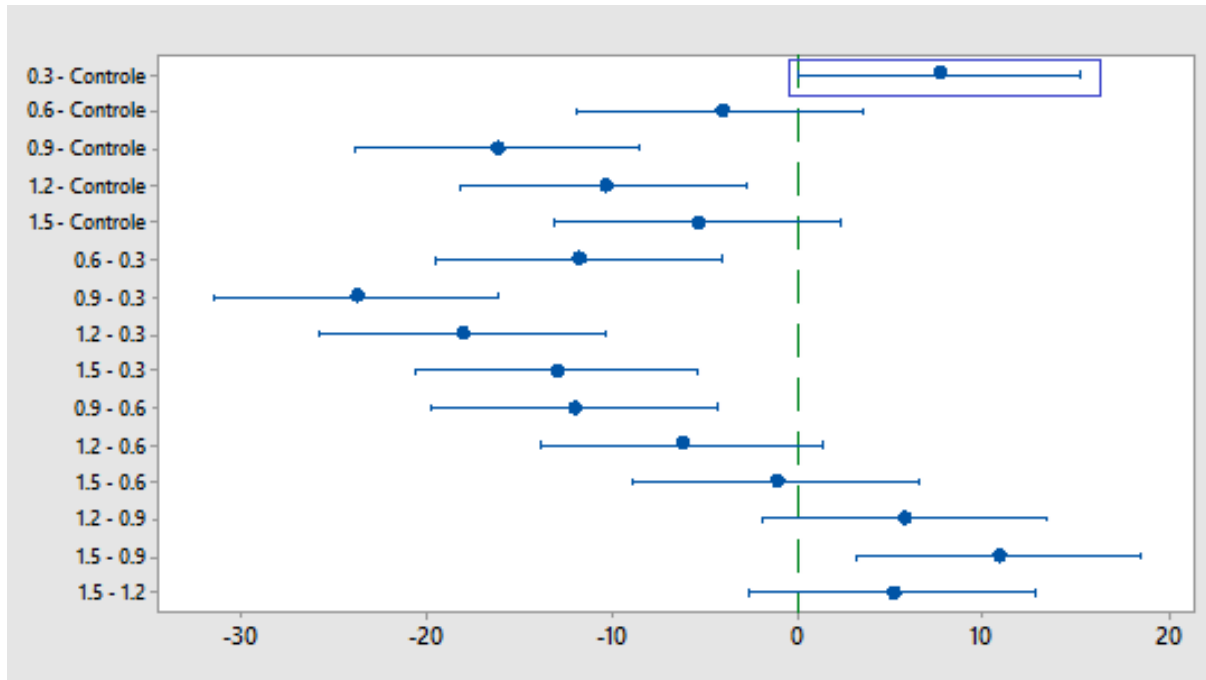


Como visualizado na figura 15, pode-se notar o aumento nos valores de média de viabilidade celular apenas no grupo que recebeu a dosagem de 0,3 J/cm², que corresponde a um aumento de 8% em relação ao Controle. Ressalta-se que esse foi o único grupo a apresentar diferença estatística significativas do grupo Controle ($p \leq 0,05$) no que corresponde a um efeito bioestimulante.

Diferentemente do λ 685nm, o λ de 830nm também apresentou dosagens que sugerem uma influência bioinibitória. As densidades energéticas de 0,9 e 1,2 J/cm² apresentaram médias de viabilidade inferiores estatisticamente do grupo Controle ($p \leq 0,05$), 16% e 10,5% respectivamente inferiores.

Os resultados evidenciados pela análise estática, comparando os grupos que receberam diferentes dosagens com o λ de 830nm com o Controle, são apresentados na figura abaixo (Figura 16).

Figura 16: Representação gráfica através do teste ANOVA e pós-teste de Fisher com intervalo de confiança de 95%, comparando os grupos entre si e considerando as médias estatisticamente diferentes se o intervalo não contiver o zero.



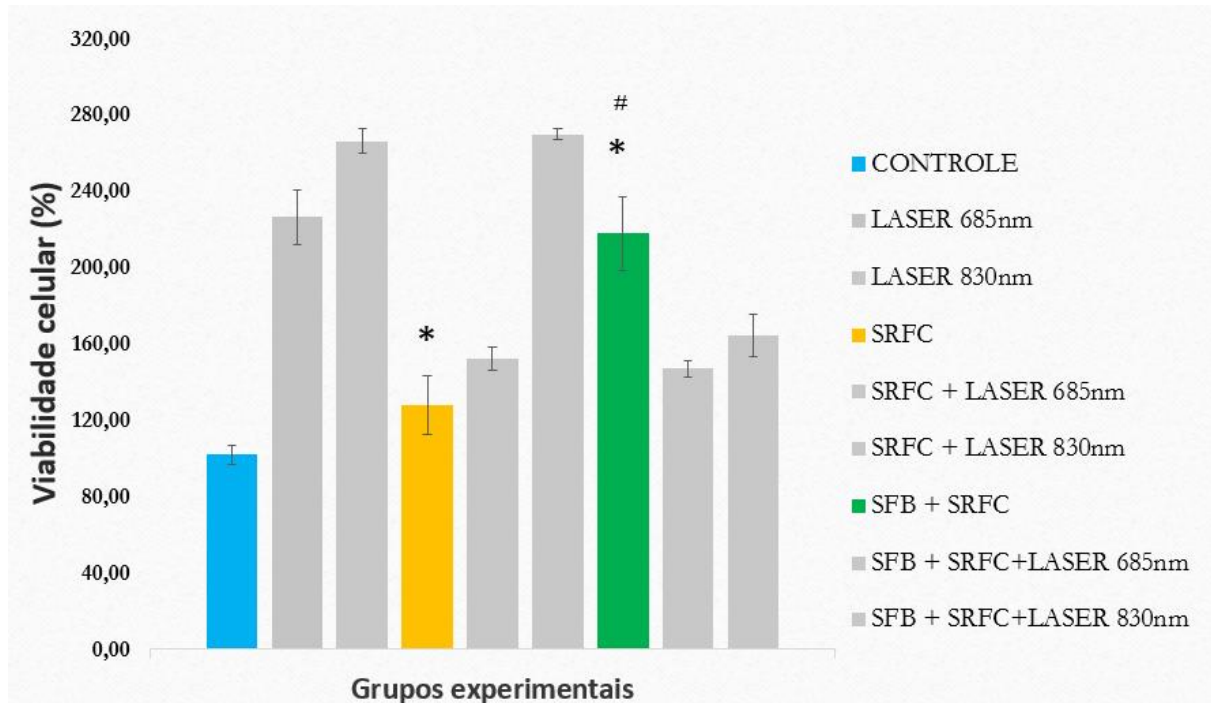
Referente aos resultados expostos a única dose que apresentou diferença estatística significativa com característica bioestimulatória foi a $0,3 \text{ J/cm}^2$, determinada como a $DE_{MÁX}$ para esse λ .

Com base nessas informações, os resultados remetem a existência de um comportamento λ -dependente e dose-dependente da radiação LASER, sendo $0,6 \text{ J/cm}^2$ para o λ de 685nm e de $0,3 \text{ J/cm}^2$ para o λ 830nm .

5.2.1 Efeito biomodulatório do LASER e do SRFC.

Determinadas as dosagens as doses bioestimulantes para cada um dos λ , as próximas etapas do estudo foram voltadas para determinar quais seriam os efeitos dessas radiações LASER considerando a presença, ou não, da influência biomodulatória do SRFC. Os resultados referentes à influência biomodulatória do LASER em cultura de células fibroblásticas suplementadas por SFB e/ou SRFC são apresentados na Figura 17.

Figura 17: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (**GM07492**), caracterizando as médias e desvios-padrão, grupo controle utilizando SFB, SRFC humano e a ação sinérgica de ambos.



A primeira análise foi destinada à comparação de viabilidade celular entre os grupos Controle, SRFC e SFB + SRFC, analisando a influência das diferentes fontes de disponibilização dos fatores de crescimento de forma isolada e em conjunto.

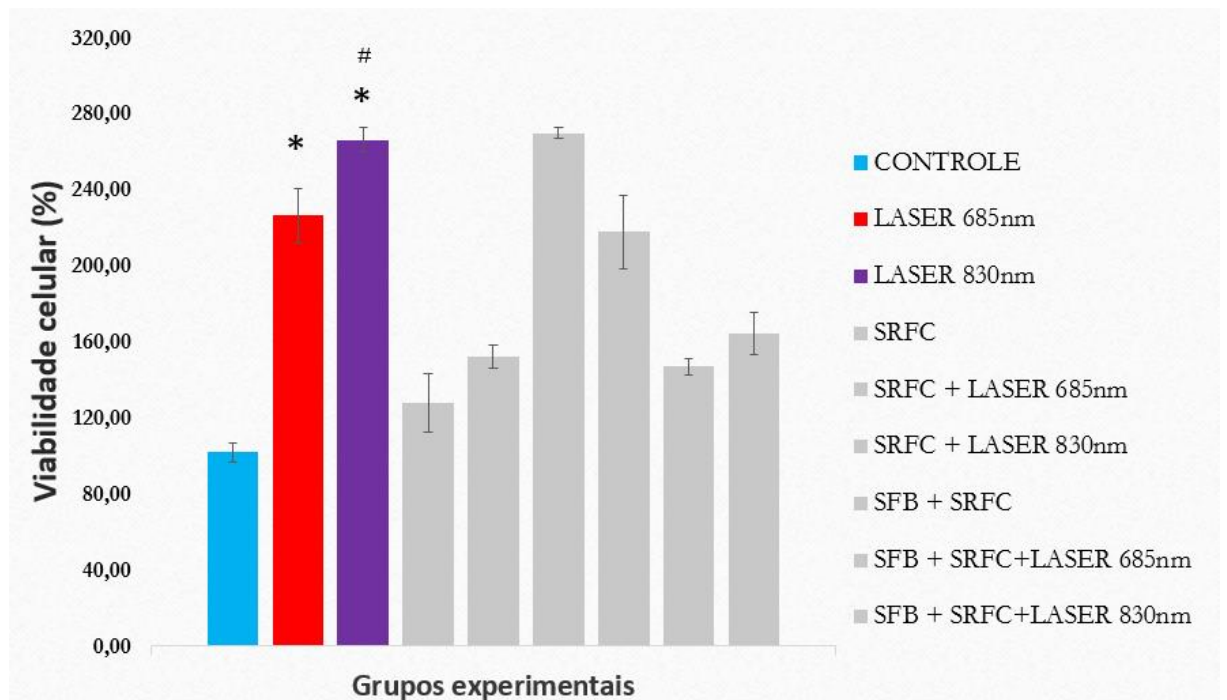
Foram evidenciados valores de viabilidade celular significativamente diferente entre ambos os grupos ($p \leq 0,05$). O SRFC obteve uma média em porcentagem de viabilidade celular 26% superior em relação ao grupo Controle, caracterizando um incremento na viabilidade celular por parte do SRFC. Ao associar ambas as fontes de FC, o SFB + SRFC, foi identificado um efeito somatório, caracterizado pela soma das médias de viabilidade celular do grupo Controle (101,8%) e SRFC (127,9), resultando em uma média de 217,9% para o grupo SFB + SRFC.

Esses dados sugerem que o protocolo de obtenção do SRFC adotado foi capaz de proporcionar média de viabilidade celular superior à proporcionada pelos fatores de crescimento disponíveis no SFB, responsável pela taxa de viabilidade do grupo Controle.

Após análise da influência da fonte de disponibilização de fatores de crescimento na viabilidade das células deu-se início às análises da influência da radiação LASER, estabelecendo um padrão de análise segmentado para cada uma das fontes de suplementação do meio de cultivo seja SFB, SRFC ou a ação sinérgica de ambos.

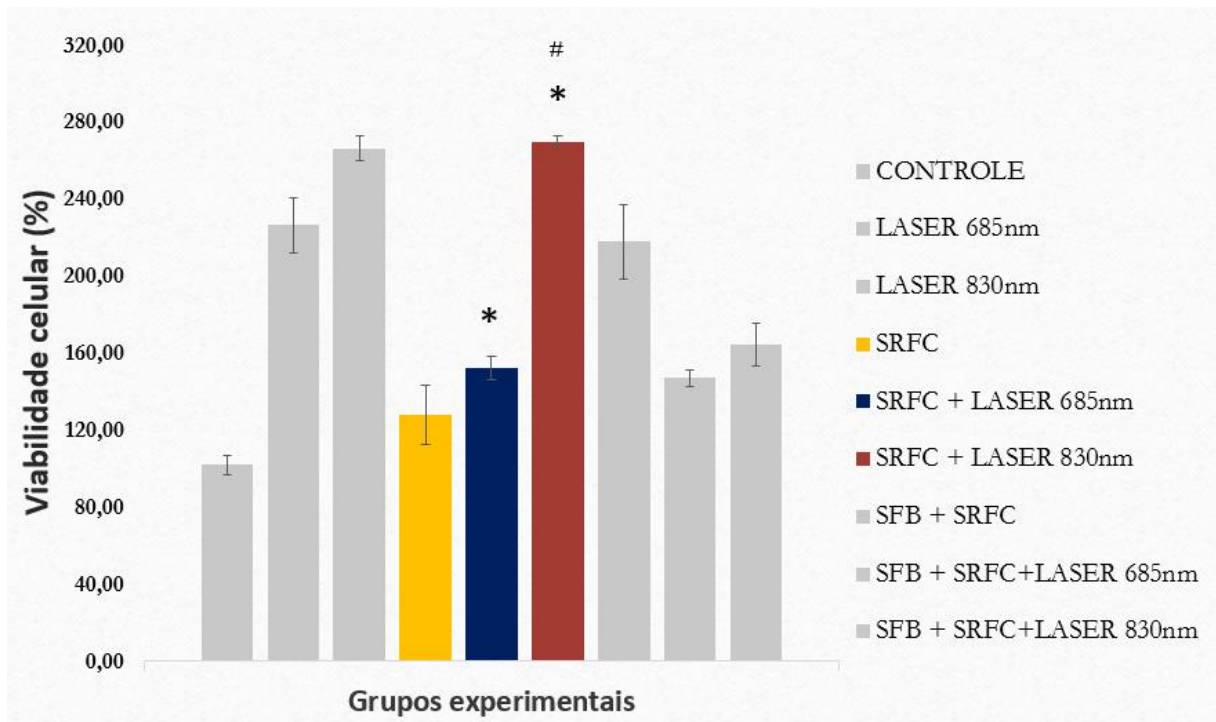
Nos grupos onde as células foram cultivadas com SFB, os grupos LASER 685nm e LASER 830nm alcançaram uma porcentagem média de viabilidade celular 124% e 164% superiores ao Controle, respectivamente ($p \leq 0,05$), são apresentados na figura 18.

Figura 18: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492), caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo controle e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm..



Assim como observado nos grupos suplementados com SFB, os grupos contendo o SRFC tiveram o seu potencial biológico incrementado pela influência da radiação LASER em ambos os λ , apresentado na figura 19.

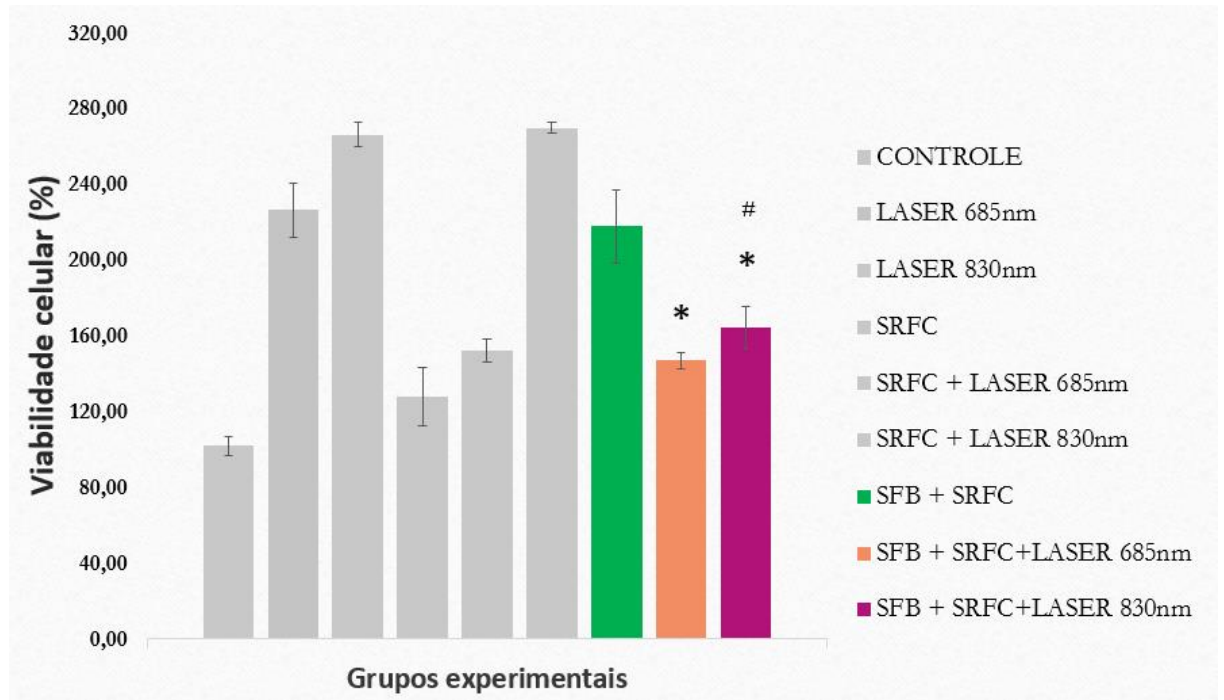
Figura 19: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492), caracterizando as médias e desvios-padrão, do grupo SRFC e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm.



O grupo SRFC + LASER 685nm obteve um aumento da atividade biológica das células, expressas por meio da média de viabilidade celular, de 24,2% em relação ao grupo SRFC (valor de $p \leq 0,05$). Já o grupo SRFC + LASER 830nm obteve uma média mais expressiva, com um aumento de 142% ($p \leq 0,05$).

Diferentemente dos resultados anteriores, onde a radiação LASER gerou respostas de ordem bioestimulatórias, os grupos SFB + SRFC + LASER 685nm e SFB + SRFC + LASER 830nm apresentaram taxas de viabilidade celular inferiores ao grupo SFB + SRFC, ($p \leq 0,05$), que não recebeu quaisquer tipos de irradiações, apresentado na figura 20.

Figura 20: Representação gráfica do ensaio de viabilidade celular através do MTT {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} de células fibroblásticas humanas (GM07492), caracterizando as médias e desvios-padrão, grupo SFB + SRFC e cada dose experimental, com irradiação LASER nos λ 685 e 830nm.



O grupo SFB + SRFC + LASER 685nm, apresentou uma média percentual de viabilidade celular 79% menor que o grupo SFB + SRFC. Em relação ao grupo SFB + SRFC - LASER 830nm os resultados não foram muito diferentes, apresentando, assim como o λ 685, uma média percentual de viabilidade celular com características bioinibitórias, sendo 53,4% menor em relação ao grupo SFB + SRFC.

Tais resultados demonstram que a somatória das diferentes formas de obtenção dos fatores de crescimento, em associação com a radiação LASER, desfavoreceu o potencial biológico das células, em ambos os λ , caracterizando uma resposta biológica bioinibitória. Ressalta-se que tais comparações foram realizadas, como anteriormente mencionado, de forma segmentada considerando a fonte de obtenção dos FC. Comparando os grupos SFB + SRFC + LASER 685nm e SFB + SRFC + LASER 830nm em relação ao grupo Controle, ambos foram superiores ($p \leq 0,05$), com um aumento de 47,8% e 67,8% na média de viabilidade celular, respectivamente.

6 DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos terapêuticos almejados em um programa de reabilitação direcionado às lesões tendíneas é estimular o processo de reparo tecidual, devido as suas limitações biológicas, buscando melhores perspectivas em relação ao seu completo restabelecimento estrutural e funcional. Com este objetivo traçado, frequentemente é proposto e utilizado uma ampla gama de recursos terapêuticos, seja ele um recurso eletrofísicos ou biológicos, devido à suposta potencialidade de interagir e estimular as células responsáveis pelo processo de reparo e regeneração, potencializando a funcionalidade celular e o processo regenerativo e contribuindo para uma recuperação acelerada e melhor qualidade funcional do novo tecido em formação.

Após a realizado o procedimento de fracionamento dos subprodutos sanguíneo, para preparação do SRFC a concentração de hemácias, foi reduzida, apresentando quantidades extremamente baixas, tal fato reflete a acurácia no processo de pipetagem ao final da primeira etapa de centrifugação. Em relação a concentração leucocitária, ela também foi reduzida, em aproximadamente 50% do valor basal. Esta concentração leucocitária foi atingida devido ao fato da necessidade de, no momento da pipetagem para a coleta do plasma ao final da primeira etapa da centrifugação, coletar o *buffy coat*, local onde se encontram a maior concentração das plaquetas. São inúmeros os protocolos de obtenção do PRP e dependendo de qual for adotado, diferentes taxas de concentrações plaquetárias e leucocitárias podem ser alcançadas e essa constituição do PRP tem forte relação com o grau de resposta biológica que se almeja. Melo e colaboradores (2018) abordaram e discutiram diferentes protocolos de centrifugação, dos quais identificou que a composição PRP pode ser modulada pelas condições de centrifugação, influenciadas por aceleração e tempo.

Em relação a taxa de concentração plaquetária obtida nesse estudo, através do protocolo de dupla centrifugação, valores considerados elevados foram atingidos. A concentração plaquetária foi de aproximadamente nove vezes a basal ($1.720 \times 10^3/\mu\text{L}$). DeLong e colaboradores (2012) e Alves e Ramon Grimalt (2018) classificam essa quantidade de plaquetas como alta e eficiente para manutenção da viabilidade das células. Concentrações plaquetárias acima de $1.800.00 \times 10^3/\mu\text{L}$ poderiam vir a gerar efeitos pró-apoptóticos e dessensibilizar dos receptores de FC nas células e, conseqüente, determinar efeito bioinibitório (Haynesworth et al 2002).

A concentração leucocitária, não menos importante que a plaquetária, também é discutida na literatura e, de acordo com Ehrenfest e colaboradores (2014), os leucócitos têm uma forte influência na liberação dos FC, particularmente TGF- β 1. Neutrófilos, que são

leucócitos granulocíticos, desempenham um papel crucial na defesa de um organismo contra a infecção, liberando numerosas citocinas inflamatórias e metaloproteínas, além da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que assim como os FC, são produzidas pelas células quando influenciadas pela radiação LASER (HUANG et al., 2011), que possui a capacidade de modular resposta celulares.

Parrish e colaboradores (2016) analisaram a eficiência biomodulatória de diferentes concentrações leucocitárias e plaquetárias presentes no SRFC. O SRFC rico em leucócitos (Plaquetas: $1772.7 \times 10^3/\mu\text{L}$; Leucócitos $19.3 \times 10^3/\mu\text{L}$) estimulou a proliferação de células tendínea *in vitro* melhor do que as preparações do SRFC pobres em leucócitos (Plaquetas: $485.9 \times 10^3/\mu\text{L}$; Leucócitos: $1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$). Ressalta-se que, neste caso, a taxa de concentração plaquetária foi reduzida simultaneamente. Isto evidencia a importância do protocolo de centrifugação para o fracionamento sanguíneo na obtenção dos concentrados plaquetários na influência da ação biomodulatória do SRFC dele resultante.

O processo de ativação plaquetária utilizada em nosso estudo, com trombina humana em solução de cloreto de cálcio, gerou um processo de ativação e formação de um coágulo instantaneamente. Diferentes métodos e formas de ativações plaquetárias são descritas e distintas são as respostas biológicas geradas pelos diferentes métodos de ativação, com trombina (humana ou bovina), cloreto de cálcio isolado, colágeno I ou não ativação, em aplicações *in-vivo*, que quando em contato com o organismo, acontece simultaneamente (SCHERER et al., 2012). Cavallo e colaboradores (2016) identificaram a ocorrência de uma liberação imediata de PDGF e TGF- β 1 e sua permanência estável ao longo do tempo, enquanto o VEGF mostra uma tendência crescente de 15 minutos até 24 horas através do método de ativação com trombina em uma solução de cloreto de cálcio, diferentes foram os tipos de respostas geradas por parte dos FC com as outras formas de ativação. Optamos pela utilização da trombina humana nesse estudo, devido a resultados na literatura que demonstram a maior eficiência através desse método de ativação. Em nossas análises realizadas após a colocação do meio de cultivo contendo as biomoléculas oriundas da técnica do PRP demonstraram resultados expressivos e positivos referentes a sua atuação biológica do SRFC.

Foi proposto nesse estudo, inicialmente, a determinação da curva dose resposta e $DE_{M\acute{A}X}$ para dois λ (685 e 830nm), a fim de avaliar o potencial dessas radiações em cultura de células fibroblásticas humanas.

Os resultados obtidos demonstram que para cada λ houve uma $DE_{M\acute{A}X}$ específica: λ 830nm = $0,3 \text{ J/cm}^2$ e λ 685nm = $0,6 \text{ J/cm}^2$, no que diz respeito ao estímulo à viabilidade celular. Esse comportamento λ -dependente e dose-dependente é descrito na literatura há anos, e está

relacionado, principalmente, aos diferentes sítios de absorção na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (KARU e AFANAS'eva 1995). Durante a análise do λ de 830nm, foram encontradas algumas dosagens (0,9 e 1.2 J/cm²) com médias sugestivas de inibição da viabilidade celular. Resultados já documentados também por Hawkins e Abrahamse (2006), evidenciando que a radiação LASER no λ 632.8nm, com a dose de 5 J/cm² e com irradiância de 3mW/cm², em cultura de células fibroblásticas da pele humana, estimulou a atividade mitocondrial, proliferação e migração celular e que as dosimetrias mais elevadas (10 e 16 J/cm²) resultaram na redução da viabilidade celular, da atividade mitocondrial e proporcionaram danos ao DNA celular. Entre os fatores que poderiam explicar as respostas biomodulatórias em dosagens superiores estão o λ distinto e a menor irradiância utilizada nessa pesquisa. Mbene e colaboradores (2009) demonstraram que a radiação LASER no λ 636nm, utilizando doses de 5,0 e 16,0 J/cm² e irradiância de 11mW/cm², apresentou resultados biomodulatórios similares. Neste caso, a maior taxa de proliferação das células expostas a dose de 5,0 J/cm² resultou no fechamento antecipado das escarificações geradas pelo método de *Wound Healing*. A dosimetria de 16 J/cm² comprometeu a viabilidade, reduzindo a taxa de proliferação celular e determinando danos à estrutura do DNA.

O SRFC utilizado como fonte de FC no presente estudo foi capaz de gerar efeitos modulatórios sobre as células fibroblásticas superior, em média 26%, à fonte de FC presente no meio de cultivo utilizado como padrão nessa pesquisa.

O SFB é um soro animal, oriundo do feto do boi, e representa a forma de suplementação do meio de cultivo mais utilizada rotineiramente em pesquisas envolvendo culturas de células, sendo meio de suplementação universal tanto em culturas celulares de origem humana e animal, devido a sua grande disponibilidade de hormônios e FC necessários para a proliferação, diferenciação e manutenção celular (KORNILOV et al., 2018). Isaac e colaboradores (2011) compararam a eficiência do SFB em relação ao Soro humano, utilizando apenas o plasma, obtido através de punção venosa seguido de centrifugação a 10.000 rpm durante 20 minutos. Os resultados evidenciam que diferentes tipos de respostas providas pelas distintas formas de suplementação podem ser geradas, influenciando na forma de adesão, estrutura morfológica e viabilidade das células fibroblásticas. Ressalta-se que neste estudo, a utilização do soro plasmático continha a disponibilidade apenas dos FC que já se encontravam no sangue.

Afim de proporcionar um efeito biomodulatório mais expressivo por parte da radiação LASER, o meio de suplementação que foi utilizado na etapa de determinação da DE_{MAX} . (5%) foi reduzido para 2,5%, expondo as células a uma condição ainda maior de desfavorecimento, ficando evidente a amplificação da resposta biológica nestas condições. Nouruzian e colaboradores (2012), em experimento *in vivo* analisando o efeito da radiação LASER em ratos diabéticos e não-diabéticos, que foram submetidos a tenotomias calcaneanas, a utilização da TLBI contribuiu em melhorias nas propriedades biomecânicas do tecido, aumentou sua resistência a cargas e tensões máximas, e demonstrou a tendência de uma resposta biológica mais ativa em condições desfavoráveis. Essa ideia também pode ser aplicada para cultura de células, partindo de promíscua, reduzimos a concentração de FC, afim de proporcionar condições metabólicas inferiores as de cultivo ideias para as células.

Os grupos submetidos a análise da influência biomodulatória do LASER com suplementação de 2,5% de FC oriundos dos SFB, alcançaram uma porcentagem média de viabilidade celular 124% e 164% superiores ao grupo controle, respectivamente, e muito mais expressivas quando comparadas aos dados obtidos com 5% SFB, durante a fase de determinação da DE_{MAX} , que atingiram médias de viabilidade celular de 9,5% no λ 685nm e 8% no λ 830nm, possivelmente devido a maior concentração de FC disponibilizados no meio de cultivo.

O SRFC, oriundo da técnica do L-PRP, apresentou considerável incremento do potencial biológico das células quando expostas aos diferentes λ , resultados similares à fonte de obtenção de FC oriundos do SFB, com menor expressão no λ de 685nm em relação ao λ 830nm, que obteve uma média de viabilidade celular 117,8% maior.

A associação ambas as fontes de FC (SFB e SRFC), demonstrou um aumento percentual significativo na viabilidade celular, compatível com um efeito somatório do potencial de manutenção de viabilidade de cada uma dessas fontes isoladamente. Tal fato ocorreu, possivelmente, pela maior concentração de FC e citocinas disponibilizadas. Em contrapartida, por apresentarem uma condição de maior oferta de FC, a radiação LASER não foi expressiva como nas outras análises.

Ressalta-se que, esse resultado se diferenciou dos demais, pois a influência do LASER não foi eficaz quanto os outros grupos, gerando uma resposta inferior por parte das células. Tais resultados demonstram que a somatória das diferentes formas de obtenção dos fatores de crescimento, em associação com a radiação LASER, desfavoreceu o potencial biológico das células, em ambos os λ , caracterizando uma resposta bioinibitória. Vale salientar também, o fato de que o λ 830nm sempre apresentar médias de viabilidade celular mais expressivas que o

λ 685nm, e que mesmo quando atingiu médias modulatórias caracterizadas por bioinibição, permaneceu superior em nosso estudo.

Uma das ideias centrais desse trabalho, foi avaliar quais seriam os benefícios da TLBI em pacientes que foram submetidos ao método de medicina regenerativa, denominado de plasma rico em plaquetas e evidenciar a questão de ser vantajoso ou não a utilização. Os resultados nos remetem que a utilização da técnica de L-PRP em uma condição *in vitro*, simulando uma condição *in-vivo*, onde já existe a biodisponibilidade dos FC, a utilização da radiação LASER causaria efeitos biomodulatórios que comprometeriam ação do SRFC e a atividade biológica das células. Que fique claro que isso é uma evidencia de um estudo *in vitro*, sugere-se que esse mesmo processo de ação conjugada das técnicas sejam inicialmente *in vivo*, e posteriormente em estudos clínicos.

7 CONCLUSÕES

- O SRFC, determinou uma resposta de viabilidade celular, em cultura de células fibroblásticas humana, superior ao SFB;
- A radiação LASER apresentou efeito biomodulatório com comportamento λ -dependente e dose-depende, com característica bioestimulante e bioinibitória (fotobiomodulação) sobre os fibroblastos humanos, suplementados com SRFC e/ou SFB;
- Dentro do leque das dosagens abordadas, o λ de 685nm apresentou como DE_{MAX} . 0,6 J/cm²;
- O λ de 830nm apresentou como DE_{MAX} . 0,3 J/cm² e dosagens bioinibitórias foram identificadas: 0,9 e 1,2 J/cm²;
- O efeito bioestimulante da radiação foi potencializado pela redução da concentração dos FC disponíveis no meio de cultivo celular;
- A ação sinérgica do SFB e o SRFC, que simula em uma condição *in vitro*, o que aconteceria após a aplicação da técnica de PRP, alcançou médias de viabilidade celular superiores aos grupos que receberam as radiações LASER nestas mesmas condições.
- A partir dos estudos realizados em experimentos *in vitro*, conclui-se que a utilização da Terapia Laser de Baixa Intensidade após a aplicação Plasma rico em plaquetas, poderia comprometer os benefícios terapêuticos almejados em um processo de reparo tecidual.
- Sugere-se que de novas pesquisas sejam desenvolvidas, abordando a influência sinérgica de ambas as técnicas e as respostas biológicas que as conduzem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, M. et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? **Arthritis research & therapy**, v. 11, n. 3, p. 235, 2009.

AHMAD, Z. et al. Exploring the application of stem cells in tendon repair and regeneration. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 28, n. 7, p. 1018–1029, 2012.

ALVES, A. N. et al. Effects of Low-Level Laser Therapy on Skeletal Muscle Repair: A Systematic Review. **American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists**, p. 1–13, 2014.

ALVES, R.; GRIMALT, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. **Skin Appendage Disorders**, p. 18–24, 2018.

ARNOCZKY, S. P.; DELOS, D.; RODEO, S. A. What Is Platelet-Rich Plasma? **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 19, n. 3, p. 142–148, 2011.

ASLAN, H. et al. Molecular targets for tendon neoformation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 439–444, 2008.

BARBOSA, D. et al. Low-level laser therapy combined with platelet-rich plasma on the healing calcaneal tendon: A histological study in a rat model. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 6, p. 1489–1494, 2012.

BAXTER, GD. Medical lasers and photomedicine. In: _____. Therapeutic lasers: Theory and practice. Edinburg: Churchill livingstone. 1997a.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321–332, 2006.

CAVALLO, C. et al. Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

D'ADDONA, A. et al. Inflammation in tendinopathy. **Surgeon**, p. 2–7, 2017.

DA RÉ GUERRA, F. et al. Low level laser therapy accelerates the extracellular matrix reorganization of inflamed tendon. **Tissue and Cell**, 2017.

DE CARVALHO, P. K. et al. Analysis of experimental tendinitis in rats treated with laser and platelet-rich plasma therapies by Raman spectroscopy and histometry. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 1, p. 19–26, 2016.

DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-rich plasma: The PAW classification system. **Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery**, v. 28, n. 7, p. 998–1009, 2012.

DOCHEVA, D. et al. Biologics for tendon repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 222–239, 2014.

DOHAN EHRENFEST, D. M. et al. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 3, p. 185–194, 2010.

EHRENFEST DAVID, M. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. **Muscle, Ligaments and Tendons Journal**, v. 4, n. 1, p. 3–9, 2014.

ERROI, D. et al. Conservative treatment for insertional achilles tendinopathy: Platelet-rich plasma and focused shock waves. A retrospective study. **Muscles, ligaments and tendons journal**, v. 7, n. 1, p. 98–106, 2017.

FANG, F.; LAKE, S. P. Experimental evaluation of multiscale tendon mechanics. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 35, n. 7, p. 1353–1365, 2016.

FARCIC, T. S. et al. Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema

musculoesquelético musculoskeletal system. **Arquivo Brasileiros de ciências da Saúde**, v. 37, n. 3, p. 149–153, 2012.

GARCIA, T. A. et al. Histological analysis of the association of low level laser therapy and platelet-rich plasma in regeneration of muscle injury in rats. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, 2016.

GUERRA, F. et al. Low level laser therapy accelerates the extracellular matrix reorganization of inflamed tendon. **Tissue and Cell**, 2017.

GRASSI e ARAUJO. Antiagregantes Plaquetários: Ampliando Conhecimento. **Disc. Scientia.**, v. 13, n. 1, p. 131–143, 2012.

HALLIDAY, D e RESNICK, R. Ondas eletromagnéticas. In: _____. **Física**: Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1988.

HAMBLIN, M. R. et al. Low level laser (light) therapy and photobiomodulation: the path forward. **Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE**, v. 9309, p. 930902, 2015.

HAMBLIN, M. R.; DEMIDOVA, T. N. Mechanisms of low level light therapy. **Proc SPIE**, v. 6140, n. August, p. 1–12, 2006.

HAN, B. et al. The effect of thrombin activation of platelet-rich plasma on demineralized bone matrix osteoinductivity. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 91, n. 6, p. 1459–70, 2009.

HASHMI, J. T. et al. Role of low-level laser therapy in neurorehabilitation. **PM and R**, v. 2, n. 12 SUPPL, p. S292–S305, 2010.

HAWKINS D. E ABRAHAMSE H 2006. Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg** 23(3): 251-259.

HAYNESWORTH, S E KADIYALA, S, LIANG, L , BRUDER, S. P. Mitogenic stimulation

of human mesenchymal stem cells by platelet releasate suggests A Poster No : 0462. **48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society**, n. 5, p. 4672, 2002.

HOPKINS, C. et al. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. **Asia-Pacific Journal of Sports Medicine, Arthroscopy, Rehabilitation and Technology**, v. 4, p. 9–20, 2016.

HUANG, Y.-Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy - an update. **Dose-response : a publication of International Hormesis Society**, v. 9, n. 4, p. 602–18, 2011.

HUANG, Y. Y. et al. Biphasic dose response in low level light therapy. **Dose-Response**, v. 7, n. 4, p. 358–383, 2009.

ISAAC, et al. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. v. 26, n. 3, p. 379–384, 2011.

JIANG, D. et al. Efficacy of tendon stem cells in fibroblast-derived matrix for tendon tissue engineering. **Cytotherapy**, v. 16, n. 5, p. 662–673, 2014.

KARADUMAN, M. et al. Platelet-rich plasma versus open surgical release in chronic tennis elbow: A retrospective comparative study. **Journal of Orthopaedics**, v. 13, n. 1, p. 10–14, 2016.

KARU TI and AFANAS' EVA NI. 1995. Cytochrome c oxidase as the primary photoacceptor upon laser exposure of cultured cells to visible and near IR-range light. *Dokl Akad Nauk* 342:693-5.

KNEZEVIC, N. N. et al. Is Platelet-Rich Plasma a Future Therapy in Pain Management? **Medical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 199–217, 2016.

KORNILOV, R. et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1422674, 2018.

MAGNUSSON P., D. S. et al. The pathogenesis of tendinopathy: balancing the response to

loading. **Nature Publishing Group**, v. 6, n. 10, p. 262–26843, 2010.0

MARCOS, R. L. et al. Biomechanical and biochemical protective effect of low-level laser therapy for achilles tendinitis. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 29, p. 272–285, 2013.

MAUTNER, K.; KNEER, L. Treatment of tendinopathies with platelet-rich plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 865–880, 2014.

MBENE, A. B.; HOURELD, N. N.; ABRAHAMSE, H. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16 J/cm². **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p. 131–137, 2009.

MEDALHA, C. C. et al. Low level laser therapy accelerates bone healing in spinal cord injured rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 159, p. 179–185, 2016.

MELO, B. A. G. et al. Distribution, recovery and concentration of platelets and leukocytes in L-PRP prepared by centrifugation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 161, p. 288–295, 2018.

MESTER, E., et al., "Studies on the inhibiting and activating effects of laser beams," *Langenbecks Arch Chir.* 322, 1022-1027 (1968).

MISERENDINO LJ, PICK R. *Lasers in dentistry*. Carol Stream; 1995.

NAGATA, M. J. H. et al. Bone marrow aspirate combined with low-level laser therapy: A new therapeutic approach to enhance bone healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 121, p. 6–14, 2013.

NEVES, M. A. I. et al. Different Power Settings of LLLT on the Repair of the Calcaneal Tendon. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. X, p. 663–668, 2011.

NOURISSAT, G. et al. Does platelet-rich plasma deserve a role in the treatment of tendinopathy? **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**, v. 82, n. 4, p. 230–4, 2015.

NOURUZIAN, M. et al. Effect of low-level laser therapy on healing of tenotomized Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **Lasers in Medical Science**, v. 28, n. 2, p. 399–405, 2012.

ORNETTI, P. et al. - Does platelet-rich plasma have a role in the treatment of osteoarthritis? **Joint Bone Spine**, v. 7, p. 104–109, 2014.

PARRISH, W. R. et al. Normal platelet function in platelet concentrates requires non-platelet cells: a comparative in vitro evaluation of leucocyte-rich (type 1a) and leucocyte-poor (type 3b) platelet concentrates. **BMJ Open Sport & Exercise Medicine**, v. 2, n. 1, p. e000071, 2016.

PETERS, J. A. et al. Preventive interventions for tendinopathy: A systematic review. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 19, n. 3, p. 205–211, 2015.

POCATERRA, A. et al. Effectiveness of platelet-rich plasma as an adjunctive material to bone graft: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 8, p. 1027–1034, 2016.

RASHIDI, S.; YADOLLAHPOUR, A.; MIRZAIYAN, M. Low Level Laser Therapy for the Treatment of Chronic Wound: Clinical Considerations. **Biomedical & Pharmacology Journal**, v. 8, n. 2, p. 1121–1127, 2015.

REINKING, M. Tendinopathy in athletes. **Physical Therapy in Sport**, v. 13, n. 1, p. 248, 2011.

SÁNCHEZ, M. et al. Muscle repair: Platelet-rich plasma derivatives as a bridge from spontaneity to intervention. **Injury**, v. 45, n. S4, p. S7–S14, 2014.

SCHERER, S. S. et al. Nonactivated versus thrombin-activated platelets on wound healing and fibroblast-to-myofibroblast differentiation in vivo and in vitro. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 1, p. 46e–54e, 2012.

SHARMA, P.; MAFFULLI, N. Basic biology of tendon injury and healing. **The Surgeon**, v. 3, n. 5, p. 309–316, 2005.

SOUZA, M. V. DE; SILVA, M. O. DA. Laserterapia Em Afecções Locomotoras: Revisão Sistemática De Estudos Experimentais. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, p. 76–82, 2016.

TAKAMURA, M. et al. The effect of platelet-rich plasma on Achilles tendon healing in a rabbit model. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 51, n. 1, p. 65–72, 2016.

TRAWITZKI et al. Low-intensity laser therapy efficacy evaluation in FVB mice subjected to acute and chronic arthritis. **Lasers in Medical Science**, v. 174, n. September 2016, p. 1–9, 2017.

TSAI, S.-R.; HAMBLIN, M. R. Biological effects and medical applications of infrared radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 170, n. December 2016, p. 197–207, 2017.

TUMILTY, S. et al. Clinical effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to eccentric exercise for the treatment of Achilles' tendinopathy: A randomized controlled trial. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 93, n. 5, p. 733–739, 2012 ;

VENTER, N. G. et al. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. **Burns**, p. 2–9, 2015.

WANG, J. H.-C.; NIRMALA, X. Application of Tscs and Prp to Treat Tendon Injuries. **Operative Techniques in Orthopaedics**, 2015.

WU, P. I. K.; DIAZ, R.; BORG-STEIN, J. Platelet-Rich Plasma. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 27, n. 4, p. 825–853, 2016.

YIN, Z. et al. Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration. **Expert opinion on biological therapy**, v. 10, n. 5, p. 689–700, 2010.

ZAYNI, R. et al. Platelet-rich plasma as a treatment for chronic patellar tendinopathy: comparison of a single versus two consecutive injections. **Muscles, ligaments and tendons**

journal, v. 5, n. 2, p. 92–8, 2015.

ZUMSTEIN, M. A. et al. The biology of rotator cuff healing. **Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research**, v. 103, n. 1, p. S1–S10, 2016.

ANEXO

ANEXO I: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência biomodulatória da terapia laser de baixa intensidade e do soro rico em fatores de crescimento plaquetários e leucocitários em cultura de células fibroblásticas.

Pesquisador: André Capaldo Amaral

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60111616.9.0000.5383

Instituição Proponente: Centro Universitário de Araraquara - SP

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO SAO BENTO DE ENSINO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.788.274

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa apresentado visa a avaliação de uma possível ação de somação ou potencialização no efeito biomodulatório do soro rico em fatores de crescimento, obtido pela técnica de Plasma Rico em Plaquetas e Leucócitos, e a Terapia Laser de Baixa Intensidade.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O presente Projeto de Pesquisa tem por objetivo analisar a influência biomodulatória do soro rico em fatores de crescimento plaquetários e leucocitários, derivados da técnica de L-PRP, e/ou da Terapia Laser de Baixa Intensidade em células fibroblásticas in vitro.

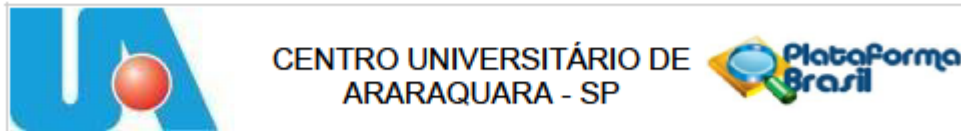
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram descritos e estão de acordo com a Resolução 466/12 CNS, sendo-os:

Riscos:

O voluntário poderá sofrer desconforto durante a punção venosa e/ou apresentar pequeno hematoma no sítio de punção. Tais riscos serão amenizados pela utilização de um profissional capacitado e com muita experiência neste tipo de coleta, seguindo as recomendações da

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
 Bairro: Centro CEP: 14.801-320
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-7263 Fax: (16)3301-7144 E-mail: comitedeetica@uniara.com.br



Página 01 de

Continuação do Parecer: 1.768.274

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Serão ainda realizadas orientações para o paciente de como proceder nas primeiras horas após coleta.

Benefícios:

O voluntário contribuirá com o desenvolvimento científico sobre a utilização de fatores de crescimento autólogos no tratamento de patologias musculoesqueléticas, em especial lesões tendíneas. Assim sendo, poderá se beneficiar desta metodologia caso sofra uma lesão musculoesquelética, tão comum na prática de atividade física ou mesmo de esportes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem valor técnico-científico para a sociedade e está adequada para sua execução além de proporcionar benefícios futuros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram devidamente encaminhados.

Recomendações:

Que os pesquisadores sigam exatamente o que está sendo proposto e que possíveis alterações sejam comunicadas a este CEP para nova avaliação.

Qualquer dúvida no decorrer do projeto este colegiado se coloca disposição e recomendamos que consulte a Resolução 466/12 CNS, (disponível no site do CEP) que seguimos para as análises éticas dos trabalhos endereçados a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto de Pesquisa em questão encontra-se APROVADO para ser desenvolvido.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Projeto encontra-se adequado e aprovado, de acordo com o relator o colegiado e com a Resolução 466/12 CNS. Qualquer alteração que venha ocorrer no projeto, pedimos a gentileza de informar ao CEP por meio de Emenda e/ou Notificação junto a Plataforma Brasil e, após a conclusão do Projeto de Pesquisa se faz necessário o envio Relatório Final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309		
Bairro: Centro		CEP: 14.801-320
UF: SP	Município: ARARAQUARA	
Telefone: (16)3301-7263	Fax: (16)3301-7144	E-mail: comitedeetica@uniarara.com.br



Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	16/09/2016		Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 1.768.274

Básicas do Projeto	ETO_789081.pdf	16:15:56		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_compromisso_pesquisador.pdf	16/09/2016 16:12:17	André Capaldo Amaral	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	16/09/2016 16:08:07	André Capaldo Amaral	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido.pdf	16/09/2016 16:07:42	André Capaldo Amaral	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DI_lab_2.pdf	16/09/2016 11:16:36	Matheus Henrique Rondine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DI_lab_1.pdf	16/09/2016 11:16:08	Matheus Henrique Rondine	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	16/09/2016 11:05:18	Matheus Henrique Rondine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 10 de Outubro de 2016

Assinado por:
Adilson César Abreu Bernardi
(Coordenador)

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
Bairro: Centro CEP: 14.801-320
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-7263 Fax: (16)3301-7144 E-mail: comfedeetica@uniara.com.br