

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

FABIO LOPES

LASER POLARIZADO VERSUS CAMPO ELÉTRICO
UNIFORME EM CULTURA CELULAR: EFEITOS BIOLÓGICO
E BIOFÍSICO

**Tese apresentada à Universidade Nove de Julho como
requisito para obtenção do título de doutor em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.**

**Orientadora: Dra. Daniela de Fátima Teixeira da
Silva**

Co-orientadora no exterior: Dra. Rosanna Nano

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE

FABIO LOPES

LASER POLARIZADO VERSUS CAMPO ELÉTRICO
UNIFORME EM CULTURA CELULAR: EFEITOS BIOLÓGICO
E BIOFÍSICO

**Tese apresentada à Universidade Nove de Julho como
requisito para obtenção do título de doutor em
Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.**

**Orientadora: Dra. Daniela de Fátima Teixeira da
Silva**

Co-orientadora no exterior: Dra. Rosanna Nano

Lopes, Fabio.

Laser polarizado versus campo elétrico uniforme em cultura celular: efeitos biológico e biofísico. / Fabio Lopes. 2018.

61 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Dr^a. Prof^a. Daniela de Fátima Teixeira da Silva.

1. Campo elétrico. 2. Laser polarizado. 3. Fotobiomodulação. 4. Ensaio de ferida. 5. Fibroblastos humanos.

S4o Paulo, 28 de fevereiro da 2018

TERMO DE APROVACGO

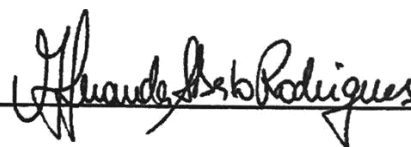
Aluno (a)t Fab@ Lopes

Tftulo da Tess: "Q F polarizad0 0/sUs campo elétfnico uniforme em cultura celular Efaitos biolbgico e
bbflslco•

Presldazte. PROF•. DR•. OANIELA DE FATIMA TEIXERA DA GILVA



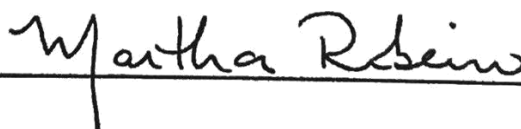
Mwnbro: PROF*. OR°. MARIA FERNANDA SETUBAL DETRO RODR



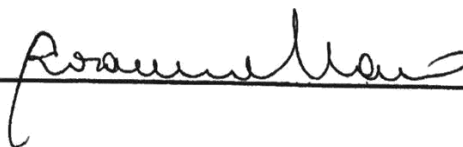
Membro: PROF*. DR.^ CHRISTIANE PAVANI



Membro: PROF*. DR.^ MARTHA SIMOES RE



Memtro: PROF^ . OR* . ROSANNA NANO



AGRADECIMENTOS

Aos Deuses, que me acompanham desde sempre e que me ensinaram que crer em mim mesmo é tão importante quanto crer neles.

Aos meus avós (*in memoriam*) por terem ensinado a importância da família nas nossas vidas.

À minha família, por ter me apoiado incondicionalmente em todos os meus projetos. Amo todos vocês!

Aos meus pais, por terem me ensinado os valores que tenho. Saibam que valeu a pena todos os esforços que fizeram até aqui!

À minha mãe que, mesmo preocupada comigo, entendeu o quanto era importante eu ir pra Itália.

Ao meu pai, por ter formado meu caráter. Talvez nem ele saiba o quanto me ensinou!

Aos meus amigos de sempre: Lenilson, Márcia e Katia. Pelo apoio mesmo a distância. Nunca esqueço de vocês!

Ao Alexandre, difícil colocar no papel sua importância na minha vida. Saiba que serei sempre grato a você por tudo que vivemos juntos. Muito obrigado!

Ao Fabio Bocatto, pelas conversas e por me fazer sorrir mesmo nas horas difíceis.

À Martina, pela amizade e bons momentos que vivemos no laboratório e fora dele. Sei realmente brava!

A Francesca Pasi, por ter respondido ao meu primeiro contato e por ter me ensinado a trabalhar no laboratório de cultura celular. Grazie mille!

Ao Guelton, pelas ideias, conselhos e risos. Se você tivesse desistido teria sido muito mais difícil pra mim. Muito obrigado Guelton!

Ao Lucas Andreo, pela ajuda com o cultivo celular nos meus estudos pilotos.

Ao Lucas, que em tão pouco tempo descobriu o quanto é difícil estar ao meu lado em certas horas, e mesmo assim não desistiu! Amo você!

À Universidade Nove de Julho pela bolsa concedida.

À Diretoria de Exatas da Universidade Nove de Julho, por ter colaborado com a implementação da bolsa sanduiche.

A CAPES, pelo suporte financeiro na forma de bolsa de doutorado sanduiche.

A todos os professores do Programa de Mestrado e Doutorado em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde.

A todos os professores e técnicos do laboratório “Lazzaro Spalanzani” do departamento de biologia e biotecnologia da Universidade de Pavia, Itália.

À Prof^a Dr^a. Daniela, minha orientadora, pelos ensinamentos e principalmente pela generosidade em dividir este projeto comigo. Muito obrigado!

A Prof^a Dr^a. Rosanna Nano pelos ensinamentos e por ter acreditado desde o começo neste projeto.

A Prof^a Dr^a Alessandra Tomaselli, pelos ensinamentos e pela ajuda com os equipamentos eletrônicos.

RESUMO

Atualmente, a fotobiomodulação é uma das terapias não invasivas mais utilizadas, e seus benefícios na cicatrização de feridas são bem descritos na literatura. No entanto, os parâmetros dosimétricos da fotobiomodulação como a direção de polarização, coerência e regime de funcionamento raramente são considerados. Embora a radiação emitida por um laser seja do tipo eletromagnética e, por sua vez, haja um campo elétrico a ela associado, a intensidade do campo elétrico e a sua direção de propagação não são apropriadamente discutidas. Os objetivos desta pesquisa foram desenvolver um dispositivo capaz de criar um campo elétrico de mesma intensidade daquele criado por um laser vermelho polarizado; comparar a migração e o alinhamento celular de fibroblastos humanos produzidos pela fotobiomodulação linearmente polarizada àqueles desencadeados por campo elétrico de mesma intensidade utilizando o dispositivo criado. As células foram semeadas em lamínulas e submetidas ao ensaio de ferida, em seguida foram divididas em cinco grupos experimentais de acordo com os tratamentos recebidos: Controle (C), campo elétrico paralelo (E//) e perpendicular (Epp) à ferida, laser polarizado paralelamente (L//) e perpendicularmente (Lpp) à ferida. Todos os grupos, exceto o grupo controle, foram submetidos ao campo elétrico de intensidade 2V/cm durante 100s por meio do laser polarizado ($\lambda = 660$ nm) ou por fonte não eletromagnética. A migração foi avaliada após 12h dos tratamentos e o alinhamento após 6 e 12h. Todos os tratamentos foram eficazes quanto à migração celular, com o grupo L// apresentando a melhor taxa. Quanto ao alinhamento, após 6h da aplicação do campo elétrico o grupo controle foi o menos alinhado e o L// foi o único alinhado paralelamente em relação ao campo incidente, além do mais alinhado em relação aos demais ($p < 0,05$). Após 12h da aplicação do campo elétrico não houve grupo alinhado paralelamente em relação ao campo incidente e o grupo controle somente não foi diferente do E//. O grupo mais alinhado, Epp, embora perpendicularmente em relação ao campo elétrico incidente, somente não foi diferente do grupo Lpp. a direção de vibração do campo elétrico do laser quando paralela ao longo eixo da ferida provocada em cultura de fibroblastos, mostra-se promissora quanto à migração após 12h, mas nesse mesmo período o melhor alinhamento celular foi verificado com a direção perpendicular do campo elétrico do dispositivo não-laser.

Palavras-chave: Campo elétrico, Laser polarizado, Fotobiomodulação, Ensaio de ferida, Fibroblastos humanos.

ABSTRACT

Currently, photobiomodulation is one of the most commonly used non-invasive therapies, and its benefits in wound healing are well described by literature. However, the dosimetric parameters of photobiomodulation, such as direction of polarization, coherence and regime of operation, are rarely considered. Although the radiation emitted by a laser is electromagnetic and, in turn, there is an associated electric field, the intensity of the electric field and its direction of propagation are not properly discussed. The objectives of this research were: developing a device capable of creating an electric field of the same intensity as that created by a polarized red laser; comparing cell migration and alignment of human fibroblasts produced by linearly polarized photobiomodulation to migration and alignment triggered by an electric field of the same intensity using the created device. The cells were sown in cover slots and submitted to the wound test, then divided into five experimental groups according to the received treatment: Control (C), parallel electric field (E //) and perpendicular electric field (Epp) in relation to the wound, laser polarized parallel to the wound (L //) and perpendicularly (Lpp) to the wound. All groups, except for the control group, were submitted to the electric field of 2V / cm intensity for 100 seconds by means of the polarized laser ($\lambda = 660$ nm) or a non-electromagnetic source. Migration was evaluated after 12 hours of treatment and alignment after 6 and 12 hours. All the treatments were effective in cell migration, with the L // group presenting the best rate. As for the alignment, 6 hours after the application of the electric field the control group was the least aligned and the L // was the only one aligned parallel to the incident field, in addition to being more aligned in relation to the others ($p < 0.05$). 12 hours after the application of the electric field there was no group aligned parallel to the incident field and the control group was not different from E //. The most aligned group, Epp, although perpendicular to the incident electric field, was no different from the Lpp group. The direction of vibration of the electric field of the laser, when parallel to the long axis of the wound provoked in a culture of fibroblasts, looks promising for migration after 12 hours, but in that same period the best cellular alignment was verified with the perpendicular direction of the electric field of the non-laser device.

Keywords: Electrical field, Polarized laser, Photobiomodulation, Wound assay, Human fibroblasts.

RIASSUNTO

Attualmente, la fotobiomodulazione è una delle terapie non invasive più comunemente utilizzate e i suoi benefici nella guarigione delle ferite sono ben descritti in letteratura. Tuttavia, i parametri dosimetrici della fotobiomodulazione come direzione della polarizzazione, della coerenza e del regime di funzionamento sono raramente considerati. Sebbene la radiazione emessa da un laser sia di tipo elettromagnetico e, a sua volta, vi sia un campo elettrico associato, l'intensità del campo elettrico e la sua direzione di propagazione non sono adeguatamente discusse. Gli obiettivi della ricerca sono sviluppare un dispositivo in grado di creare un campo elettrico della stessa intensità di quello creato da un laser rosso polarizzato e comparare la migrazione e l'allineamento cellulare dei fibroblasti umani prodotti dalla fotobiomodulazione linearmente polarizzata con migrazione e allineamento attivati dal campo elettrico della stessa intensità utilizzando il dispositivo creato. Le cellule sono state piastrate su vetrini e sottoposte al test di ferita; successivamente, sono state divise in cinque gruppi sperimentali secondo il trattamento ricevuto: controllo (C), campo elettrico parallelo (E //) e perpendicolare (PPE) alla ferita, laser polarizzato parallelamente (L //) e perpendicolarmente (L_{pp}) alla ferita. Tutti i gruppi, ad eccezione del gruppo di controllo, sono stati sottoposti al campo elettrico di intensità 2 V / cm per 100 secondi mediante il laser polarizzato ($\lambda = 660$ nm) o una sorgente non elettromagnetica. La migrazione è stata valutata dopo 12 ore di trattamenti e l'allineamento dopo 6 e 12 ore. Tutti i trattamenti sono risultati efficaci nella migrazione cellulare, e il gruppo L // ha presentato la migliore velocità. Per quanto riguarda l'allineamento, 6h dopo l'applicazione del campo elettrico il gruppo di controllo è risultato essere il meno allineato e L // l'unico allineato parallelamente in relazione al campo incidente, per di più allineato in relazione agli altri gruppi ($p < 0.05$). Dopo 12 ore dall'applicazione del campo elettrico non c'è stato nessun gruppo allineato parallelamente al campo incidente e il gruppo di controllo non era diverso da E //. Il gruppo più allineato, E_{pp}, sebbene perpendicolare al campo elettrico incidente, non era diverso dal gruppo L_{pp}. La direzione di vibrazione del campo elettrico del laser parallela all'asse della ferita inferta nei fibroblasti in coltura appare promettente come la migrazione dopo 12h, ma in questo stesso periodo l'allineamento cellulare migliore è stato verificato con la direzione perpendicolare del campo elettrico del dispositivo non laser.

Parole chiave : Campo elettrico, laser polarizzato, fotobiomodulazione, test di ferita, fibroblasti umani

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
RIASSUNTO	10
SUMÁRIO	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
LISTA DE UNIDADES	15
LISTA DE TABELAS.....	16
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	14
1.1. Laser: conceitos físicos	15
1.1.1. Campo elétrico	18
1.2. Efeitos do campo elétrico em cultura celular sem uso de radiação eletromagnética	21
1.3. Efeitos do campo elétrico em cultura celular com uso de radiação eletromagnética	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MÉTODOS	28
3.1. Cultivo celular	28
3.2. Ensaio de ferida	28
3.3. Divisão dos grupos experimentais	28
3.4. Campo elétrico sem uso de radiação eletromagnética.....	29
3.4.1. Exposição ao campo elétrico	29
3.5. Campo elétrico com uso de radiação eletromagnética.....	30
3.6. Migração celular	32
3.7. Alinhamento celular	33
3.8. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Migração celular	38
4.2. Alinhamento	42
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS	51

APÊNDICE A: Desenvolvimento do dispositivo para geração de campo elétrico	57
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica de uma onda eletromagnética com seus campos elétrico e magnético.	16
Figura 2	Esquema de polarização da luz.	16
Figura 3	Campo elétrico gerado por uma carga elétrica puntiforme.	18
Figura 4	Linhas de campo elétrico criadas por cargas positivas e negativas.	19
Figura 5	Linhas de campo elétrico uniforme.	20
Figura 6	Desenho esquemático da execução dos experimentos.	29
Figura 7	Exemplo de irradiação de uma lamínula.	31
Figura 8	Contorno das áreas livres inicial e final para medição das mesmas e contagem de células que migraram.	33
Figura 9	Sobreposição das imagens de contorno das áreas livres inicial e final.	33
Figura 10	Imagem dos citoesqueletos utilizada para medir os ângulos	35
Figura 11	Determinação dos ângulos	36
Figura 12	Áreas iniciais e finais grupo controle	38
Figura 13	Áreas iniciais e finais grupo E//	39
Figura 14	Áreas iniciais e finais grupo Epp	39
Figura 15	Áreas iniciais e finais grupo L//	40
Figura 16	Áreas iniciais e finais grupo Lpp	40
Figura 17	Taxa de fechamento em relação a cada tratamento	41
Figura 18	Número de células que migraram para área livre	42
Figura 19	Ângulos medianos de cada tratamento após 6h	43
Figura 20	Ângulos medianos de cada tratamento após 12h	44
Figura 21	Ilustração do método adotado para mapeamento do campo elétrico	57
Figura 22	Protótipo: dispositivo elétrico confeccionado para a criação de campo elétrico uniforme dentro de uma placa de Petri.	60
Figura 23	Dispositivo utilizado em todos os experimentos.	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CEU	Campo elétrico Uniforme
Ddp	Diferença de potencial elétrico
DMEM	Meio de cultura essencial mínimo
FBS	Soro fetal bovino
PBS	Solução salina tamponada com sais de fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico

LISTA DE UNIDADES

Hz	Hertz
V/m	Volt por metro
H/m	Henry por metro
N/C	Newton por Coulomb
W/m ²	Watt por metro quadrado
C/m ²	Coulomb por metro quadrado
F/m	Faraday por metro
mV	Milivolt
mV/mm	Milivolt por milímetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
V/cm	Volt por centímetro
MΩ	Mega ohm
Mm	milímetro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos do laser.	30
Tabela 2: Taxa de fechamento da área livre	38
Tabela 3: Número de células que migraram para área livre após 12h	41
Tabela 4: Valores dos ângulos medidos entre o longo eixo do citoesqueleto e a direção do campo elétrico aplicado com as respectivas significâncias estatísticas após 6h	42
Tabela 5: Valores dos ângulos medidos entre o longo eixo do citoesqueleto e a direção do campo elétrico aplicado com as respectivas significâncias estatísticas após 12h	43
Tabela 6: Comparação entre os valores dos ângulos após 6 e 12h.	45
Tabela 7: Tensões medidas utilizando DMEM como dielétrico	58
Tabela 8: Tensões medidas utilizando água Milli-Q como dielétrico	59

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Atualmente, a fotobiomodulação é uma das terapias não invasivas mais utilizadas, e seus benefícios na cicatrização de feridas são bem descritos na literatura ¹. Tanto *in vivo* quanto *in vitro* estudos têm mostrado que o tratamento a laser acelera as reações bioquímicas, a atividade dos fibroblastos, a produção de colágeno, neovascularização e a produção de ATP². Contudo, a literatura ainda é conflitante em relação aos mecanismos responsáveis pela atividade mitocondrial e os parâmetros ótimos para estimular a cicatrização³.

Os parâmetros dosimétricos da fotobiomodulação comumente relatado na literatura são: comprimento de onda, exposição radiante e densidade de potência. Enquanto que a direção de polarização, coerência e regime de funcionamento raramente são considerados⁴.

A polarização da luz está relacionada com a direção de oscilação de seu campo elétrico. Um laser que não faz uso de fibra ótica para entrega do feixe, emite luz polarizada. Ou seja, existe uma única direção de oscilação do campo elétrico. Embora sejam poucos, há relatos de efeitos benéficos da luz polarizada principalmente em relação à cicatrização ^{5; 6; 7; 8}.

Num estudo em tecido, foi proposto que o laser polarizado alinhado paralelamente ao longo eixo do tendão torna o tecido ainda mais organizado⁹. Resultado similar foi encontrado num estudo *in vivo* sobre efeitos da fotobiomodulação com laser polarizado em feridas de rato, verificou-se o aumento significativo da espessura da camada epitelial, aumento da quantidade de vasos sanguíneos e a maior organização de fibrilas de colágeno na lesão tratada com campo elétrico paralelo à espinha dorsal do animal. Os dados sugerem que a orientação da polarização do laser pode otimizar o processo de cicatrização de feridas⁵.

No trabalho de De Moura *et al*⁸, foi constatado aumento estatisticamente significativo na proliferação e na viabilidade de cultura de fibroblastos (L929). Resultados similares foram encontrados por Chao, que pesquisou os efeitos do campo elétrico gerado por outra fonte que não do laser ¹⁰.

Embora a radiação emitida por um laser seja do tipo eletromagnética e, por sua vez, haja um campo elétrico a ela associado, a intensidade do campo elétrico e a sua direção de propagação não são apropriadamente discutidas ou sequer mencionadas quando os efeitos – ou a ausência de efeitos – da fotobiomodulação são verificados. Em

outras palavras, é bastante raro encontrar em publicações científicas discussões sobre possíveis efeitos biofísicos do laser. Além do que, os poucos trabalhos que consideram a polarização do laser, não discutem a implicação física desta característica do laser. Ou seja, o campo elétrico não é considerado, mesmo quando são encontrados efeitos biológicos.

Considerando que muitos equipamentos comerciais utilizados para fotobiomodulação são polarizados, mais investigação é necessária a respeito da intensidade e direção do campo elétrico em diversos alvos biológicos, por exemplo, em cultura celular, para melhor elucidar os mecanismos fundamentais da interação. Ressalta-se que há trabalhos na literatura apontando os efeitos do campo elétrico em células, mas os mesmos não discutem a direção de propagação, se linear, circular, elíptico, enfim. Outro ponto que merece destaque é a questão da caracterização da intensidade do campo, pois muitas vezes ela é referida como frequência (Hz) e não como V/m ou N/C, que são unidades de fato do campo elétrico, e não da corrente elétrica geradora do campo elétrico^{11; 12; 13}.

Como a sinalização elétrica é importante para regular processos biológicos e químicos em organismos vivos¹⁴, é lícito pressupor que a intensidade e direção do campo elétrico durante a fotobiomodulação pode afetar a resposta do tecido biológico. Deste modo, comparar os efeitos do laser polarizado com os efeitos do campo elétrico gerado por uma fonte não eletromagnética é importante para a melhor compreensão dos fenômenos biofísicos envolvidos na fotobiomodulação.

1.1. Laser: conceitos físicos

A luz é uma onda eletromagnética, ou seja, é uma onda formada por um campo magnético e um campo elétrico perpendiculares entre si. Esses campos podem se sustentar mutuamente: quando um campo magnético sofre variação em relação ao tempo, ele é capaz de gerar campo elétrico. Da mesma forma, se um campo elétrico varia, ele cria campo magnético. Assim a luz é a propagação no espaço dos dois campos simultâneos^{15; 16}.

O laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) é um tipo particular de radiação eletromagnética, que apresenta propriedades bem específicas (monocromaticidade, coerência e colimação), diferenciando-se da luz emitida por fontes convencionais⁵. Os princípios teóricos envolvidos na geração desse tipo de luz

iniciaram-se com Albert Einstein em 1917, mas foi em 1960 que Theodore Maiman construiu o primeiro equipamento laser (Laser de Rubi) nos Estados Unidos.

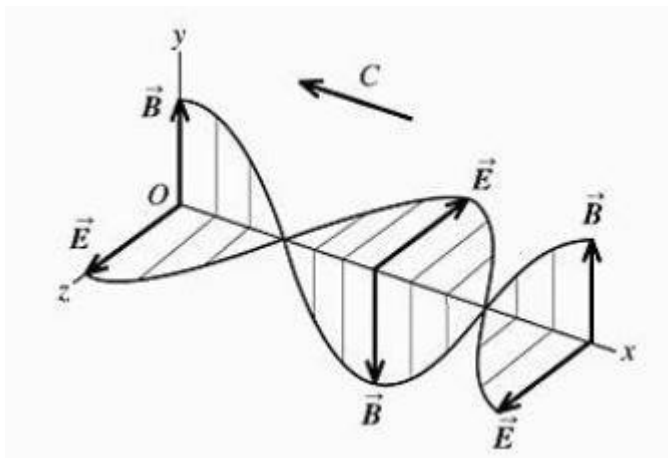


Figura 1: campos elétrico (E) e magnético (B) formando uma onda eletromagnética com velocidade da luz (c). Fonte: Sears e Zemansky. Física 3.

A propagação da luz não monocromática não tem direção preferencial de oscilação dos seus campos elétrico e magnético. Dizemos, nestes casos, luz não polarizada. Há, no entanto, a possibilidade de definir uma direção preferencial desses campos, tornando a onda eletromagnética polarizada (**figura 2**). Embora existam vários tipos de polarização, geralmente o termo polarizado é usado para designar o laser polarizado a partir do campo elétrico, por exemplo, linearmente polarizado, de modo que o campo elétrico se propague em uma única direção.

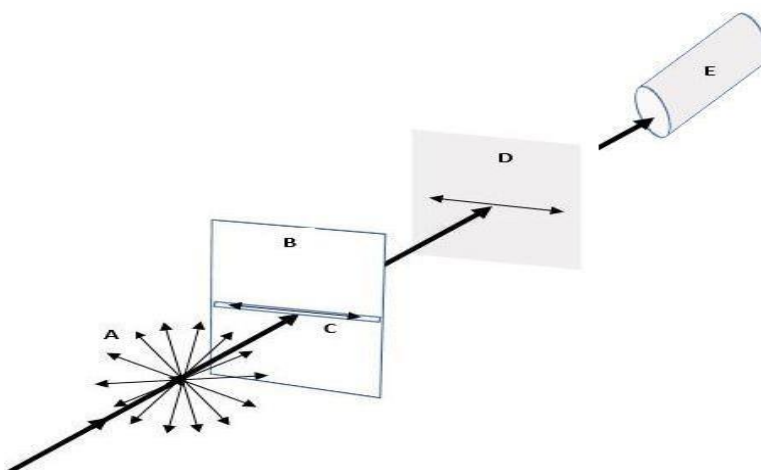


Figura 2: Ilustração de polarização linear: (A) luz não polarizada; (B) polarizador com direção de polarização (C); luz polarizada horizontalmente (D) e detector (E).

Os campos elétrico e magnético de qualquer onda eletromagnética são simultaneamente dependentes, cuja constante de proporcionalidade é a velocidade da luz c ^{15; 16}.

Equação 1: $E = B \cdot c$

Onde E corresponde ao campo elétrico e B o campo magnético.

É possível determinar a intensidade do campo elétrico de um laser por meio da equação:

Equação 2: $E = \sqrt{\frac{I Z_0}{2n}}$

Onde n é o índice de refração do meio e I é a intensidade da radiação (W/m²), dada por:

Equação 3: $I = \frac{P}{A}$

Em que P é a potência (W) do laser e A corresponde à área irradiada (m²). A impedância Z_0 (Ω) é determinada pela expressão:

Equação 4: $Z_0 = \sqrt{\frac{\mu}{\epsilon}}$

onde μ é permeabilidade magnética do meio e ϵ é a permissividade elétrica do meio. Por se tratar de meio de cultura celular, a permissividade elétrica foi calculada a partir da velocidade de fase v da luz na água (velocidade da luz ao penetrar num meio). A velocidade de fase da luz é dada pela equação:

Equação 5: $v = \sqrt{\frac{1}{\epsilon\mu}}$

A velocidade de fase da luz na água é de $2,26 \times 10^8$ m/s e sua permeabilidade magnética da água é $1,26 \times 10^{-6}$ H/m¹⁶. Assim, a permissividade elétrica é $\approx 1,55 \times 10^{-11}$ F/m.

Nessas condições, utilizando a **equação 4** temos:

$$Z_0 = \sqrt{\frac{1,26 \times 10^{-6}}{1,55 \times 10^{-11}}} = 285 \Omega$$

A título de exemplificar o cálculo que foi realizado neste trabalho, tomemos como exemplo um laser vermelho ($\lambda = 660 \text{ nm}$) e potência radiante efetiva de 20 mW que foi utilizado para irradiar uma cultura celular cuja área irradiada é de 1 cm². Então, utilizando a **equação 3**, temos:

$$: I = \frac{20 \text{ mW}}{0,0001 \text{ m}^2} = 200 \text{ W/m}^2$$

Considerando ainda que a cultura celular foi mantida em água durante a irradiação, a luz atravessa do meio ar para o meio água e, portanto, $Z_0 = 285 \Omega$. Assim, utilizando a **equação 1**, temos:

$$E = \sqrt{\frac{200 \times 285}{2 \times 1,33}} = \sqrt{\frac{57000}{2,66}} = 146,4 \text{ V/m} = 1,46 \text{ V/cm}$$

1.1.1. Campo elétrico

É possível obter campo elétrico sem a presença de radiação eletromagnética, pois corpos eletricamente carregados (ânions ou cátions) são capazes de perturbar o meio a sua volta em todas as direções, de tal forma que a intensidade dessa perturbação pode ser medida num ponto específico do espaço¹⁶. A intensidade dessa perturbação é definida como campo elétrico. Quanto mais próximo de um corpo carregado, mais intenso é o campo elétrico, de modo que sua intensidade não é constante, mas varia com a distância em relação ao corpo eletricamente carregado (**figura 3**).

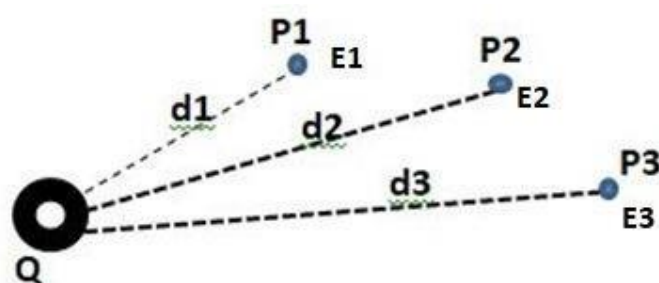


Figura 3: Corpo carregado com carga Q e pontos $P1$, $P2$ e $P3$, distantes $d1$, $d2$ e $d3$, respectivamente da carga Q . Os campos $E1 > E2 > E3$.

Embora o campo elétrico não seja visível, é possível verificar a presença das linhas de campo. Convencionalmente, as linhas de campo são de afastamento em cargas positivas e de aproximação em cargas negativas (**figura 4**). Sendo assim o campo elétrico \vec{E} é uma grandeza vetorial, ou seja, possui módulo, direção e sentido, portanto será escrito sempre como tal (\vec{E}).

O espaçamento entre as linhas do campo indica sua intensidade, quanto maior a densidade das linhas maior a intensidade do \vec{E} ¹⁷. Se a distância entre as linhas do campo é constante, tem-se um campo elétrico uniforme, isto é, sua intensidade é a mesma em qualquer ponto dessa região.

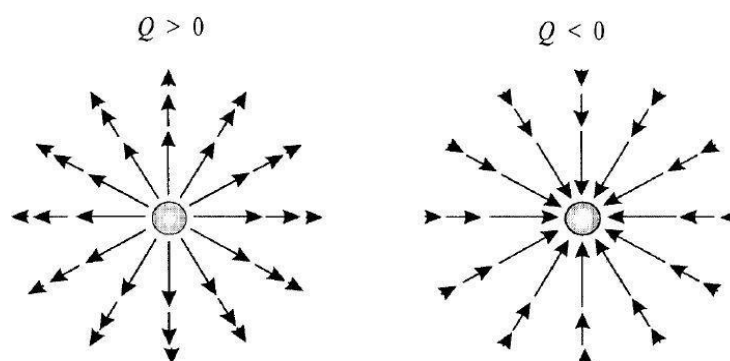


Figura 4: linhas de campo elétrico de uma carga $Q > 0$ e por uma carga $Q < 0$. Essas linhas representam o sentido e a direção de atuação de uma força F quando uma carga q é colocada nesse campo elétrico.

Um campo elétrico uniforme (CEU) pode ser criado a partir de duas placas metálicas paralelas e carregadas, um dispositivo assim é conhecido como capacitor de placas paralelas. A diferença de potencial entre as placas dá origem ao \vec{E} , cujas linhas são perpendiculares às placas metálicas, mas paralelas entre si. Nessa situação o módulo da intensidade é determinado pela equação:

$$\text{Equação 6: } |E| = \frac{U}{d}$$

Onde U é a diferença de potencial entre as placas, unidade em volt (V), e d a distância, em metro (m), entre elas. Nesse caso, a unidade de medida do \vec{E} é V/m.

Quando uma partícula carregada é colocada num CEU, ela fica sujeita a ação de uma força \vec{F} que atua sempre na mesma direção das linhas do campo. O sentido da força depende do sinal da carga que está no campo¹⁷. A força pode provocar o deslocamento da partícula (figura 5). Nessas condições, o campo \vec{E} é diretamente proporcional à força recebida pela carga e inversamente proporcional à carga. Matematicamente, temos:

$$\text{Equação 7: } \vec{E} = \frac{\vec{F}}{q}$$

Onde \vec{F} é a força recebida pela carga, unidade em Newton (N), a carga q , unidade em Coulomb (C). Neste caso, a unidade de medida do campo elétrico passa ser N/C.

A relação entre a força e a carga elétrica é válida quando não há meio material entre as placas, ou seja, quando estão imersas no vácuo. Do contrário, se há entre as placas um meio material e eletricamente isolante, esse meio é considerado um dielétrico tornando \vec{E} dependente da permissividade elétrica ϵ do material¹⁸.

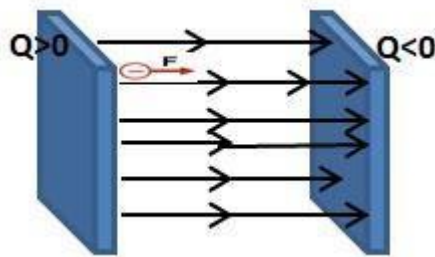


Figura 5: representação de uma carga negativa num campo elétrico uniforme criado com placas paralelas eletricamente carregadas. Em qualquer ponto da região entre as placas, a força recebida por uma carga qualquer é constante.

O campo elétrico \vec{E} entre placas paralelas também pode ser determinado pela relação entre a densidade superficial de carga σ (C/m²) e a permissividade elétrica ϵ do material entre as placas medidas em Faraday por metro (F/m):

$$\text{Equação 6: } E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

A densidade superficial de carga por sua vez é dada pela relação entre a carga total Q medida em Coulomb (C) na placa e a área A (m²) dessa placa.

$$\text{Equação 7: } \sigma = \frac{Q}{A}$$

Substituindo a equação 2 em 1 temos:

Equação 8:
$$\vec{E} = \frac{Q}{\epsilon A}$$

Uma vez que a carga na placa e sua área são constantes, o campo elétrico depende da permissividade elétrica do material entre as placas.

1.2. Efeitos do campo elétrico em cultura celular sem uso de radiação eletromagnética

Desde o relato de Luigi Galvani em 1760 sobre contrações musculares em rãs mortas colocadas em pratos metálicos, provocadas por choques elétricos, começou-se a investigar a relação entre fenômenos elétricos e biológicos. Galvani observou que era possível produzir a contração dos músculos das patas posteriores quando estes eram colocados em contato com o nervo lombar e este último era estimulado por um par bimetálico¹⁹.

Após as observações de Galvani, não tardou muito para a descoberta de que os batimentos cardíacos ocorriam concomitantemente com o aparecimento de correntes elétricas e que estas podiam ser detectadas na superfície do corpo²⁰. Contudo, somente em 1951, constatou-se que células do coração possuem diferença de potencial (ddp) de 60 mV nas células nodais e 90 mV nas células de Purkinje.¹⁴

A diferença de potencial quando aplicada no plasmalema (camada que envolve a célula muscular) cuja espessura é de 70 Å, cria um campo elétrico da ordem de 10⁹ V/m, que é extremamente intenso. Essa intensidade se deve ao fato de que a rigidez dielétrica de uma membrana é da ordem de 20.000.000V/m¹⁴. Para a maioria das células, verifica-se uma ddp de, aproximadamente, 60 a 70 mV em média. Como a única interface que separa os meios é a membrana, conclui-se que esta ddp é devido à membrana, que por ser fixo para cada tipo de célula é denominado potencial de repouso da membrana celular. Conseqüentemente, a membrana celular está imersa num campo elétrico. Na maioria das células este valor permanece inalterado, desde que não sofra influências externas.

Por outro lado, quando a membrana celular por algum motivo se rompe, ou o tecido é lesionado, é possível constatar a presença de uma corrente de lesão. A lesão (ruptura do plasmalema) expõe o citoplasma, que tem potencial elétrico menor que do

meio extracelular. Essa ddp por sua vez cria a corrente elétrica de lesão¹⁴. Em relação a esta última, células lesionadas contidas numa ferida, bem como células em estado proliferativo apresentam diferença de potencial de membrana em torno de -30 mV, enquanto células saudáveis e não proliferativas apresentam potencial de repouso em torno de -70 mV²¹. Igualmente, a própria pele funciona como uma bateria (conhecida como barreira de Rein), onde a diferença de potencial média entre o extrato córneo e a derme é de 23 mV. Quando uma lesão ocorre, pode ocorrer um curto circuito na bateria da pele, provocando o surgimento de uma microcorrente elétrica na região da lesão²².

Os processos fundamentais como divisão, migração e diferenciação celular, ocorrem dentro de um meio extracelular onde estão presentes gradientes de tensão iônica, e conseqüentemente uma corrente elétrica (ou seja, movimentação de cargas elétricas ou íons), esses gradientes de tensão representam um atividade sinalizadora para as funções fisiológicas²³. De fato, todo processo de reparo de todos os organismos vivos é iniciado por uma corrente elétrica²⁴ e esta, por sua vez, só é possível na presença de um campo elétrico¹⁸.

A migração celular direcionada por campo elétrico exógeno, conhecida como galvanotaxia ou eletrotaxia, foi descrita em muitos tipos de células, incluindo fibroblastos, e estudos com animais têm mostrado que a galvanotaxia promove a cicatrização de feridas cutâneas²⁵.

Como campos elétricos de baixa frequência não são susceptíveis de penetrar na membrana celular devido à sua alta impedância, acredita-se que a galvanotaxia é resultante de canais de membrana ativados e da reorganização de moléculas de superfície carregadas por meio de forças eletroforéticas e eletrosmóticas^{25; 26}.

A produção de adenosina trifosfato²⁷ (ATP) pode ser aumentada a partir de uma estimulação elétrica capaz de fornecer à membrana externa mais íons positivos e íons negativos para membrana interna, aumentando a diferença de potencial entre as membranas que por sua vez gera maior força próton motriz aumentando, assim, a produção de ATP²⁸.

No final dos anos sessenta, a verificação do aumento da condutância de membranas e a permeação de moléculas, chamaram a atenção para potenciais aplicações em medicina e biotecnologia^{29; 30}. Descobriu-se que a aplicação de campos elétricos na forma de pulsos de frações de segundos e alta intensidade aumentam bruscamente a condutância de membranas biológicas e a permeação de moléculas, porém, quando o pulso termina, as condições normais das membranas podem se restabelecer. Além

desses fatores, outras alterações macroscópicas foram observadas, dentre elas, a rotação e o alinhamento de células ou vesículas, com a direção do campo elétrico³¹.

A aplicação de campos elétricos de corrente contínua em cultura celulares tem uma história longa, no entanto, a interpretação da resposta das células a esses campos foi prejudicada pela falta de técnica adequada, contaminação de culturas pelo material dos eletrodos, incerteza sobre a magnitude dos campos e, às vezes, pela complexidade do sistema biológico em estudo³². A partir da década de setenta, após uma revisão da literatura³³, várias pesquisas aplicaram campos elétricos em células isoladas em cultura e registraram as respostas em filme ou fita de vídeo para que as respostas pudessem ser cuidadosamente caracterizadas e as intensidades de campo limiar estabelecidas. Descobriu-se então que vários tipos de células migram e respondem direcionalmente a campos muito pequenos (a partir de 0,1 mV/diâmetro celular) e, ainda, alguns tipos de células são capazes de produzir correntes endógenas quando estimulados por campos elétricos exógenos³². Esta última descoberta possibilitou a investigação da relação entre campos elétricos endógenos durante certas respostas às lesões³⁴.

Em cultura celular de macrófagos humanos, a exposição ao campo elétrico de baixa intensidade aumentou a regulação de atividades ligadas ao reparo¹¹, também foi demonstrado que culturas de células endoteliais migram para a região do catodo de um campo elétrico exógeno aplicado na cultura. O limite de ação do efeito do campo para que ocorra migração celular é de 1 a 2 V/cm, semelhante à intensidade do campo elétrico endógeno medidas *in vivo*³⁵.

A literatura aponta que os campos elétricos endógenos atuam diretamente na migração celular em resposta a um sinal intracelular. Esse sinal determina novas conexões no arranjo da actina no citoplasma, orientados em direção ao catodo³⁶.

De fato, nos sistemas biológicos o campo elétrico é formado principalmente por sinais elétricos, com origem nas variações de concentração dos íons na região extracelular. Essas variações espaciais decorrentes da presença de íons podem se formar pelo funcionamento de bombas iônicas, pelas perdas de íons de células individuais ou mesmo pelo escape de íons através das camadas de membranas celulares. Esse fluxo variável de íons estabelece os gradientes de tensão que são encontrados no meio extracelular e representam uma atividade sinalizadora para as funções fisiológicas acima citadas^{35;37}.

Os campos elétricos bem como as correntes elétricas de feridas aparecem imediatamente e espontaneamente em lesões, aumentam rapidamente, persistem por

muitas horas e dias durante o processo de reparo e desaparecem próximas do tempo de cura completa³⁸. Foi demonstrado que este sinal elétrico de ferida endógena natural é um estímulo potente à migração celular durante o reparo tecidual³⁹.

Durante a cicatrização de feridas ocorrem campos elétricos fisiológicos superiores a 1 V/cm, no processo de morfogênese e crescimento de tumores, e esses mesmos campos foram simulados para induzir o sentido de migração de uma variedade de células^{35; 37}.

Campos elétricos constantes de 150 a 600 mV/mm durante alguns minutos de aplicação em culturas de fibroblastos, células diretamente ligadas ao processo de reparo tecidual, resultou em orientação dos longos eixos perpendicularmente às linhas de campo e migração das células para o cátodo (polo negativo). Esta resposta migratória é rapidamente reversível quando o campo é invertido. Com intensidades de campo superiores a 400 mV/mm, as células também se alongam, embora esta resposta não seja observada até cerca de 1 h após a aplicação do campo⁴⁰. Em 1980, Radice observou que um campo elétrico de 8 mV/mm provocou a migração de uma célula envolvida na cicatrização de feridas⁴¹.

Embora seja abundante na literatura o estudo dos efeitos da bioeletricidade, poucos são os trabalhos que investigam de fato somente a ação do campo elétrico, uma vez que a corrente elétrica não é medida ou mencionada. Assim é difícil conhecer o papel do campo elétrico nos efeitos da bioeletricidade.

13. Efeitos do campo elétrico em cultura celular com uso de radiação eletromagnética

Os efeitos da fotobiomodulação a nível celular e molecular têm sido demonstrados em muitos estudos, mas devido ao grande número de parâmetros envolvidos, é muito difícil comparar os resultados obtidos nas diferentes pesquisas, razão pela qual os mecanismos de interação da fotobiomodulação em células não foram ainda completamente descritos^{42, 43}.

Os fibroblastos participam ativamente na formação de tecido de granulação e na formação da matrix extracelular, desempenhando importante papel no reparo tecidual. A proliferação e o aumento do metabolismo celular determinam o sucesso da reparação,

uma vez que o colágeno produzido pelo fibroblasto é responsável pela resistência e integridade do novo tecido formado ⁴³.

Os mecanismos da fotobiomodulação podem ser descritos por meio dos célebres trabalhos de Karu e Smith. De acordo com Karu⁴⁴, se a exposição for realizada com comprimento de onda visível, os fotoceptores primários serão os componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias através de eventos fotoquímicos. No entanto, Smith propôs que a radiação infravermelha inicia a cascata de eventos metabólicos por efeitos fotofísicos nas membranas⁴⁵.

Tais mecanismos ocorrem independentemente da radiação ser polarizada. No entanto, quando polarizada, a fotobiomodulação também é capaz de provocar efeitos físicos similares àqueles provocados por um campo elétrico como, por exemplo, o reordenamento das cabeças polares da bicamada lipídica na membrana celular. Esta mudança na qualidade da membrana celular influencia todos os processos conectados a ela e tal modelo foi sugerido como uma das explicações para os efeitos fotobiomoduladores do laser ⁴⁶.

A luz polarizada vibra em uma única direção, perpendicular ao seu eixo de propagação. Esta característica permite que ela aja na camada lipídica da célula, alterando os processos celulares pela membrana celular, como a produção de energia, transporte de íons⁴⁷.

São poucos os trabalhos publicados com a finalidade de investigar os efeitos da luz polarizada, seja *in vitro* ou *in vivo*. Mas na prática, muitos autores usam a radiação polarizada sem saberem que a estão usando, por desconhecerem todas as características do equipamento. A rigor, todo laser de diodo é linearmente polarizado quando nenhum sistema de entrega está acoplado, por exemplo. Dessa forma, a busca pelos efeitos da radiação polarizada, na literatura, torna-se difícil.

No trabalho de Mignon et al, por exemplo, foi constatado que o laser de diversos comprimentos de onda pode estimular a proliferação e a síntese de colágeno em fibroblastos humanos ⁴⁸. Porém, os autores não fazem referência aos possíveis efeitos da luz polarizada.

De acordo com trabalho de De Moura, a luz polarizada não teve efeito na viabilidade celular de fibroblastos e células tumorais. Não foram avaliados direção e intensidade do campo elétrico⁸. Da mesma forma, os fibroblastos humanos irradiados com luz de 632,8 nm tiveram sua proliferação estimulada e aumentou sua viabilidade

celular, demonstrando a efeito estimulador da fotobiomodulação e a utilidade desta terapia no processo de reparo⁴⁹.

Também mostrou-se que, quando irradiadas, as células mantidas sob déficit nutricional tiveram aumento do crescimento celular, tendo as taxas de crescimento similares ou superiores àquelas das células-controle mantidas sob condições ideais ⁸.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Comparar os efeitos biológicos e biofísicos produzidos pela fotobiomodulação polarizada àqueles desencadeados por campo elétrico sem uso de radiação eletromagnética.

2.2. Objetivos específicos

- Elaborar um dispositivo capaz de produzir campo elétrico uniforme de mesma ordem de grandeza daquele gerado por um laser em baixa intensidade.
- Comparar a fotobiomodulação linearmente polarizada ao campo elétrico uniforme provocado sem o uso de radiação eletromagnética quanto à migração e alinhamento de fibroblastos humanos.
- Comparar as direções de polarização, paralela ou perpendicular, em relação à ferida criada nos fibroblastos em cultura, entre os diferentes métodos de criação do campo elétrico.

3. MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

As células foram cultivadas no laboratório “Lazzaro Spal anzani” do Departamento de Biologia e Biotecnologia da Universidade de Pavia, Itália. Fibroblastos dérmicos humanos primários isolados a partir de pele infantil foram cultivados em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Euroclone SpA, MI, Itália) enriquecido com 10% de soro bovino fetal, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, glutamina 2 µg/ml (Euroclone SpA) a 37°C numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar. As células foram monitoradas utilizando-se um microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA) e sempre cultivadas em estado de subconfluência.

A Universidade de Pavia possui parceria com o hospital San Matteo, de modo que é possível a utilização de tecidos biológicos que seriam encaminhados para descarte, conforme publicação recente do grupo⁵⁰.

3.2. Ensaio de ferida

Os fibroblastos (25 X 10³) foram semeadas em lamínulas (18 x 18 mm) após a terceira passagem e estas mantidas individualmente dentro de uma placa de Petri (35 x 10 mm) na presença de meio DMEM com 10% de FBS, até alcançarem a confluência de monocamada. Com auxílio de uma ponteira de pipeta (P 20) foram realizadas duas linhas de descontinuidade desta monocamada criando duas áreas livres de células. Este método é referido como ensaio de ferida^{51; 52}. Este procedimento foi realizado para todos os experimentos realizados.

3.3. Divisão dos grupos experimentais

As células foram divididas em cinco grupos de acordo com o tratamento a que foram submetidas: controle (C), não submetido a nenhum tratamento, campo elétrico paralelo (E//), campo elétrico perpendicular (Epp), laser polarizado paralelo (L//) e laser polarizado perpendicular (Lpp).

34. Campo elétrico sem uso de radiação eletromagnética

As células utilizadas foram submetidas a um campo elétrico uniforme e constante de intensidade 2 V/cm, utilizando o dispositivo descrito no **apêndice A**.

3.4.1. Exposição ao campo elétrico

Três linhas de referência foram marcadas previamente no fundo da placa do lado externo (**Figura 6**), para facilitar a localização dos pontos correspondentes às áreas livres de células e a aquisição de imagens de uma mesma área em diferentes intervalos de tempo.

Para a exposição ao campo elétrico, a lamínula com os fibroblastos aderidos foi retirada da placa de Petri contendo o meio de cultura e cuidadosamente colocada na placa de Petri que já continha 30 ml de água milli-Q (quantidade suficiente para estabelecimento do campo) e o próprio dispositivo para a criação do campo. O tempo de exposição foi de 100 segundos (**apêndice A**). Após esse período, a lamínula foi devolvida à placa de Petri original, o meio de cultura foi trocado e as áreas livres delimitadas pelas linhas no fundo da placa foram fotografadas em seguida.

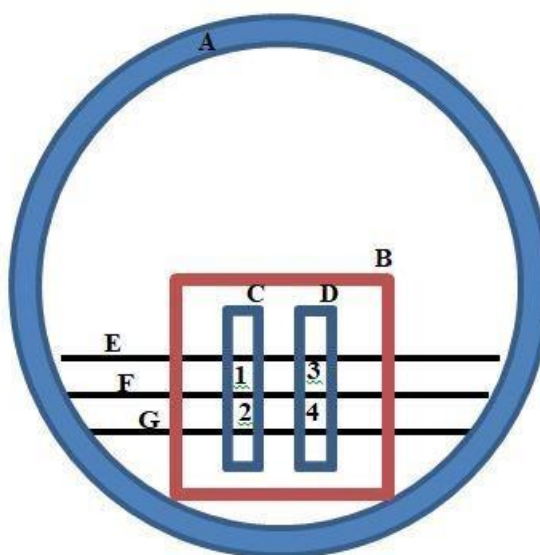


Figura 6: (A) Placa de Petri, (B) posição demarcada para a lamínula com fibroblastos aderidos, (C e D) áreas livres, (E, F e G) linhas de referência criadas no exterior da Placa de Petri e (1,2,3 e 4) região a ser fotografada.

A direção do **E** foi determinada tomando como referência as próprias feridas criadas na lamínula. Deste modo, cada lamínula foi posicionada com as feridas paralela (**E//**) ou perpendicularmente (**E \perp**) aos eletrodos do dispositivo.

Após serem fotografadas, as células foram novamente incubadas e após 12 horas as lamínulas foram novamente fotografadas. Este experimento foi repetido uma vez de maneira idêntica. Vale ressaltar que as lamínulas do grupo controle apesar de não terem sido submetidas a nenhum tratamento, também foram submetidas à água milli-Q por igual período.

3.5. Campo elétrico com uso de radiação eletromagnética

As células foram irradiadas utilizando o equipamento Quantum (EccoFibras, Campinas, SP, Brasil) na presença do meio de cultura (**Tabela 1**). Devido à absorção de 8% do meio de cultura no comprimento de onda de 660 nm, também foram calculadas as respectivas grandezas efetivas⁵³.

Tabela 1: Parâmetros dosimétricos do laser.

Parâmetros	Laser vermelho
Comprimento de onda central [nm]	660
Largura espectral [nm]	10
Modo de operação	contínuo
Potência radiante [mW]	27,6
Potência radiante efetiva [mW]	25,4
Diâmetro de abertura [cm]	1,2
Área do feixe no alvo [cm ²]	1,13
Irradiância [mW/cm ²]	24,4
Irradiância efetiva [mW/cm ²]	22,5
Duração da exposição [s]	100
Exposição radiante [J/cm ²]	2,48
Exposição radiante efetiva [J/cm ²]	2,25
Energia radiante [J]	2,80
Energia radiante efetiva [J]	2,54
Técnica de aplicação	Pontual
Número e frequência das sessões de tratamento	Uma única vez

A irradiação foi realizada ajustando a altura da ponteira do laser em relação à lamínula, de modo a formar um círculo de diâmetro 1,2 cm. Para facilitar e padronizar o

ajuste desta área, foi desenhado um círculo em papel milimetrado e este colocado sob a placa que continha a lamínula a ser irradiada (**figura 7**).

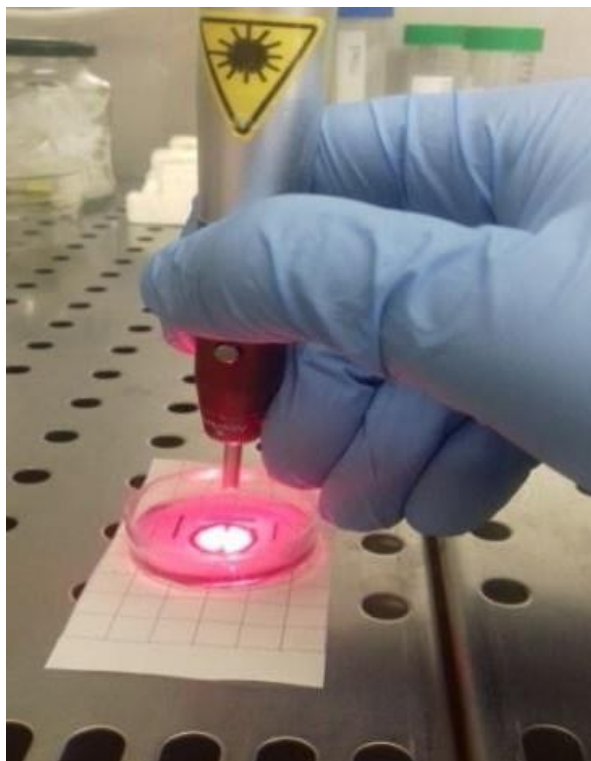


Figura 7: Irradiação de uma lamínula, sempre com a área irradiada de 1,2 cm de diâmetro.

Tanto a exposição ao \vec{E} descrita no item 3.4.2 quanto via laser foram conduzidas dentro do fluxo laminar para minimizar interferências externas. A intensidade do campo elétrico do laser nessas condições de irradiação foi de 1,55 V/cm, determinada por meio da **equação 2**, utilizando os parâmetros do laser descritos na tabela 1:

$$E = \sqrt{\frac{\frac{25,4 \times 10^{-3}}{1,13 \times 10^{-4}} \times 285}{2 \times 1,33}} = 1,55 \text{ V/cm}$$

Devido a precisão do equipamento disponível para utilização no laboratório de cultura celular, foi necessária uma aproximação do valor teórico (ajustado para 2 V/cm).

A direção do campo elétrico foi identificada pela própria posição da ponteira do laser durante a irradiação. Essa direção foi verificada previamente utilizando um potenciômetro e um polarizador. A ponteira do laser foi ajustada a fim de encontrar o ângulo exato em que o potenciômetro não fizesse nenhuma leitura, indicando que o plano do polarizador estava alinhado perpendicularmente ao plano do campo elétrico

emitido pelo laser. Equipamentos laser cujo meio ativo é um diodo, desde que a ponteira não esteja acoplada a uma fibra óptica, emitem luz linearmente polarizada. Dessa maneira, não foi necessário o uso de um polarizador externo para manter a direção de vibração do campo elétrico constante.

Imediatamente após a irradiação, o meio de cultura foi trocado e as lamínulas foram fotografadas e, em seguida foram incubadas para serem fotografadas novamente após 12 horas.

3.6. Migração celular

A migração celular foi verificada por meio das imagens obtidas logo após os tratamentos (t_0) comparadas com as imagens obtidas após 12h (t_{12}). Para tanto foram utilizados microscópio (Olympus BX41, Milão, Itália) com aumento de 40X e máquina fotográfica (Olympus C4040-ZOOM, Milão, Itália).

As áreas livres de células foram medidas utilizando-se o software de domínio público ImageJ 1.43a (National Institutes of Health, Bethesda, USA), desenvolvido por Wayne Rasband.

Após a determinação da escala para medição em milímetros, foi feito um recorte com a função *crop* de 1,47 x 1,47 (mm) a fim de garantir que todas as imagens tivessem a mesma área total. Finalmente, neste recorte foi feito o contorno da ferida (*freehand*). As áreas iniciais e finais foram medidas em mm^2 (**figura 8**). Este processo foi repetido para todas as imagens, totalizando 40 imagens, sendo 4 para cada grupo experimental em cada experimento.

Para analisar a taxa de fechamento da ferida, em porcentagem, foi usada a seguinte relação entre as áreas:

$$\frac{A_{12h} - A_{0h}}{A_{0h}} \cdot 100$$

onde A_{12h} corresponde à área final e A_{0h} corresponde à área inicial.

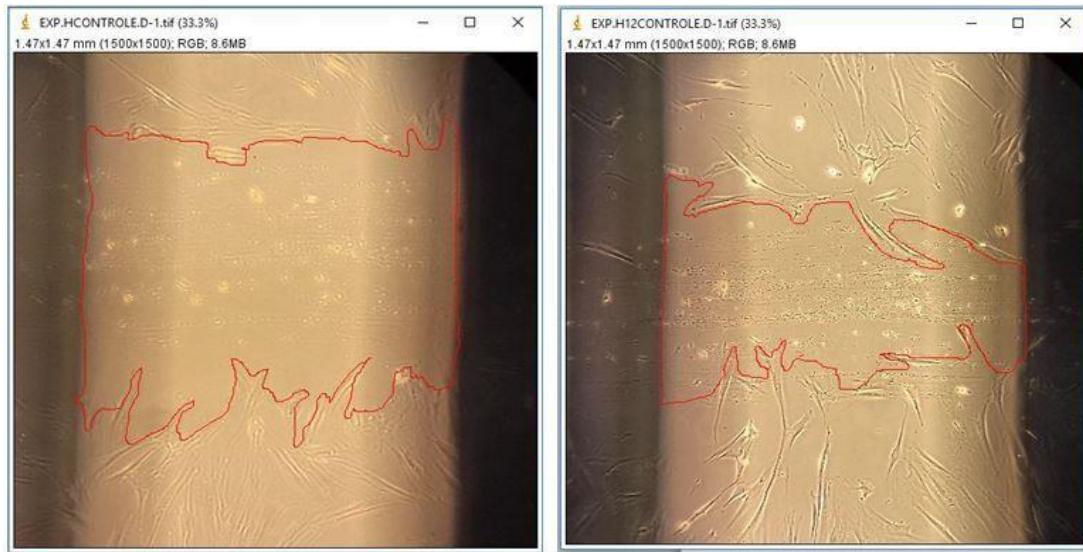


Figura 8: Exemplo do contorno das áreas inicial e final com auxílio do software ImageJ.

Depois, as imagens das áreas foram sobrepostas (*overlay*) de maneira a possibilitar visualmente a contagem das células que migraram para a área livre inicial (**figura 9**).

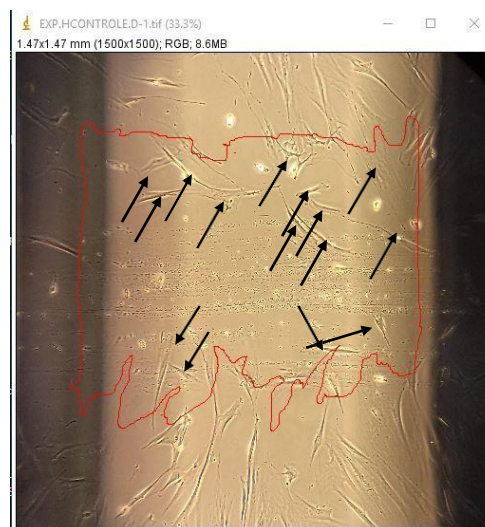


Figura 9: Exemplo da sobreposição das imagens final e inicial. O contorno em vermelho corresponde à área inicial, de modo que é possível notar as células (indicadas com setas) que migraram para esta área.

3.7. Alinhamento celular

O alinhamento foi verificado por imagem através de microscopia de fluorescência, com a finalidade de marcar o citoesqueleto e o núcleo. Após 6 e 12 horas

dos tratamentos, os fibroblastos cultivados em lamínulas foram fixados com formol a 4% durante 20 min e pós-fixados com 70% de etanol a -20°C.

As amostras foram reidratadas durante 10 minutos em PBS e depois imunomarcadas com os anticorpos. As células foram incubadas com anticorpos primários anti- α -tubulina de rato monoclonais diluídos 1:100 (Invitrogen) durante 60 minutos à temperatura ambiente numa câmara úmida escura. Depois de algumas lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas com anticorpos secundários Alexa-Fluor 488 cabra anti-mouse (Molecular Probes, Invitrogen) durante 45 min. Depois disso, as secções foram contra-coloridas para DNA com 0,1 μ g/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Milão, Itália), lavadas com PBS e montadas numa gota de Mowiol (Calbiochem, Inalco, Itália), para análise de microscopia de fluorescência.

Foram realizados dois experimentos independentes. Um microscópio Olympus BX51 equipado com uma lâmpada de mercúrio de 100 W foi usado nas seguintes condições: filtro de excitação de 330-385 nm, espelho dicróico de 400 nm e filtro de barreira (bf) de 420 nm para Hoechst 33258; filtro de excitação de 450-480 nm, espelho de 500 nm e 515 nm (bf) para a fluorescência de Alexa 488; filtro de excitação 540 nm, espelho de 580 nm e 620 nm (bf) para Alexa 594. As imagens foram gravadas com um sistema de câmara Olympus MagniFire e processadas com o software Olympus Cell F. Os fibroblastos foram fotografados com aumento de 100x. Cada grupo experimental foi fotografado em 3 pontos distintos da ferida.

A partir da imagen obtida por microscopia de fluorescência (**figura 10**), o software ImageJ, versão 1.43a foi utilizado para verificar o alinhamento dos citoesqueletos em relação ao campo elétrico aplicado. O ângulo entre o longo eixo de cada citoesqueleto e a direção do campo elétrico foi medido utilizando a ferramenta *angle tool* do software (**figura 11**). Para o grupo controle, os ângulos foram medidos em relação à direção da área livre.

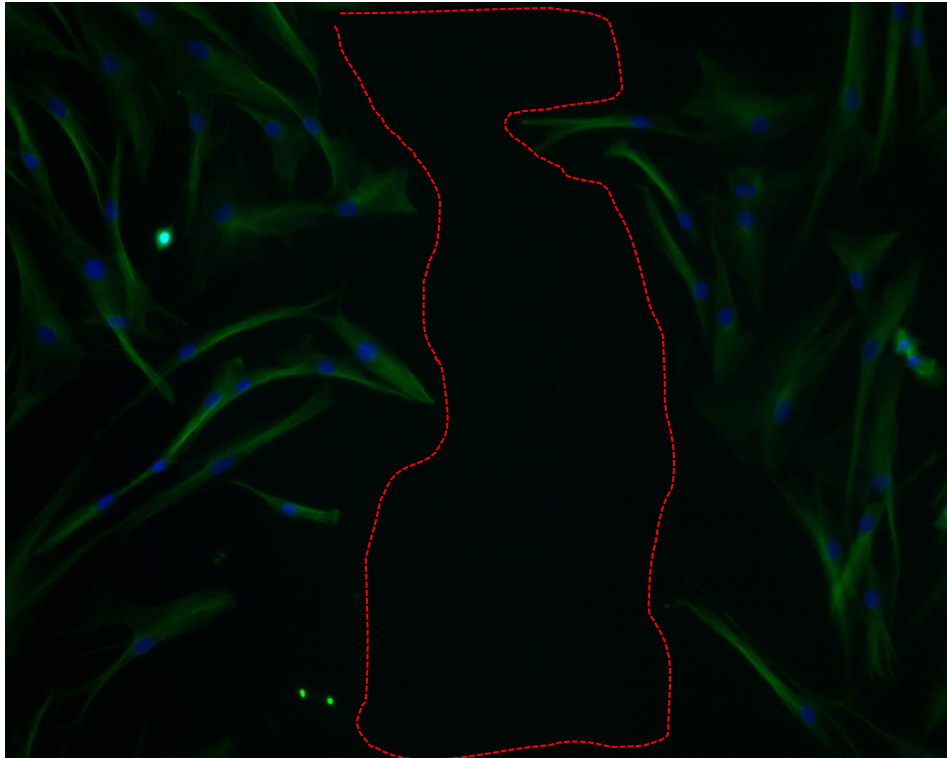


Figura 10: Imagem obtida por microscopia de fluorescência. Nota-se a área livre criada (contornada com tracejado vermelho), os núcleos (em azul) e os citoesqueletos (em verde).

Desta forma, quanto mais próximo de 0° mais alinhado paralelamente ao campo elétrico estará o longo eixo do citoesqueleto (foram considerados os valores dos ângulos entre 0° e 45° para representar o alinhamento em paralelo, isto é, $0^\circ \leq \text{ângulo} < 45^\circ$). De maneira análoga, quanto mais próximo de 90° , mais alinhado perpendicularmente ao campo elétrico (foram considerados os valores dos ângulos entre 45° e 90° para representar o alinhamento em perpendicular, isto é, $45^\circ \leq \text{ângulo} < 90^\circ$).



Figura 11: Imagem obtida com o software Image J. Foram desenhados (em vermelho) e numerados (em branco) os ângulos entre o longo eixo de cada célula e a direção do campo E , que neste caso é perpendicular à direção da ferida.

3.8. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Anderson-Darling. A taxa de fechamento da ferida foi considerada paramétrica, de tal forma que o teste One-Way ANOVA foi utilizado com post hoc Fisher.

Os resultados sobre o número de células que migraram para a área da ferida e também sobre o alinhamento do citoesqueleto foram considerados não paramétricos. Sendo assim, foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis com post hoc Mann-Whitney.

A significância adotada em todos os testes foi $\alpha=0,05$. Foi utilizado o software estatístico Minitab 16 (Minitab Inc, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Migração celular

Todos os grupos apresentaram áreas da ferida menores após 12h ($p < 0,05$). A tabela 2 apresenta os valores médios das taxas de fechamento das áreas livre e seus respectivos desvios padrão após 12h da realização da ferida.

Tabela 2: Taxa de fechamento da área livre do ensaio de ferida.

Grupos	N	Taxa de fechamento
C	8	$(-42,84 \pm 6,92)$
E//	8	$(-70,12 \pm 13,94)$
Epp	8	$(-75,48 \pm 6,76)$
L//	8	$(-78,82 \pm 13,63)$
Lpp	8	$(-76,92 \pm 16,34)$

Os valores negativos indicam diminuição da área livre.

Nas figuras 12 a 16 é possível verificar as imagens imediatamente após os tratamentos e 12h depois, de uma mesma região, para cada um dos grupos de estudo.

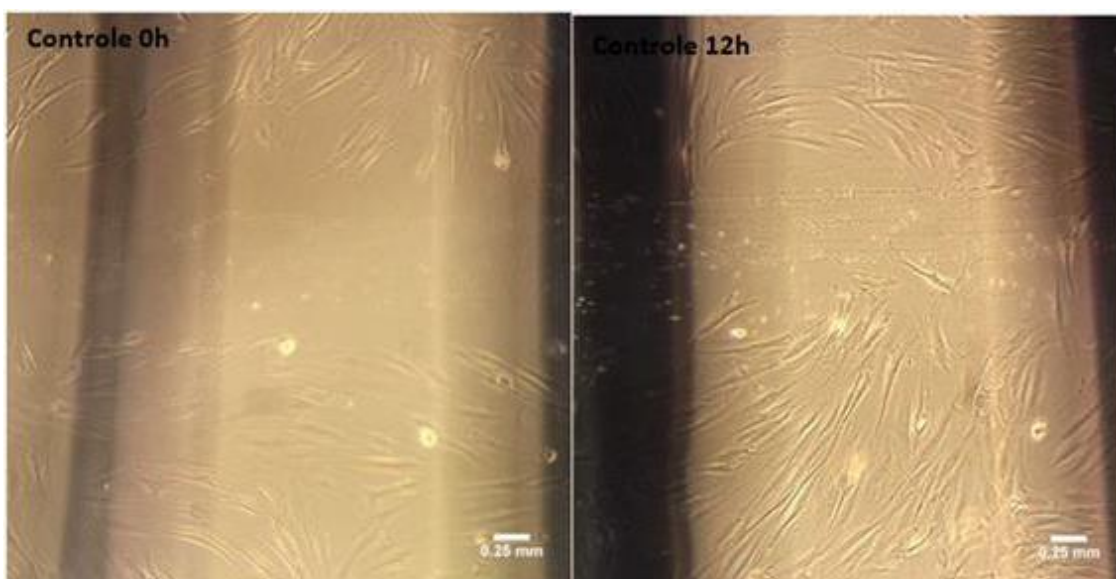


Figura 12: Grupo controle, antes e após 12h da realização da ferida.

O grupo controle apresenta visível diferença na área livre de células após 12h quando comparado com os demais grupos no mesmo período.

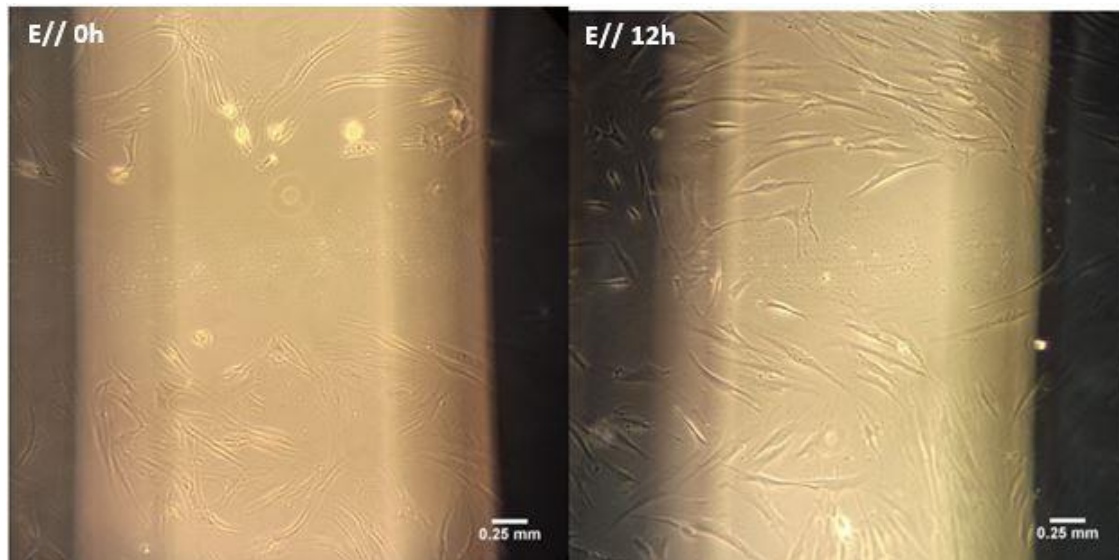


Figura 13: Grupo E//, imediatamente e após 12h da submissão ao campo elétrico em paralelo ao longo eixo da ferida usando o dispositivo elétrico.

Também é possível notar que os grupos Epp (figura 14) e L// (figura 15) apresentam a menor área livre após 12h quando comparados com os outros grupos.

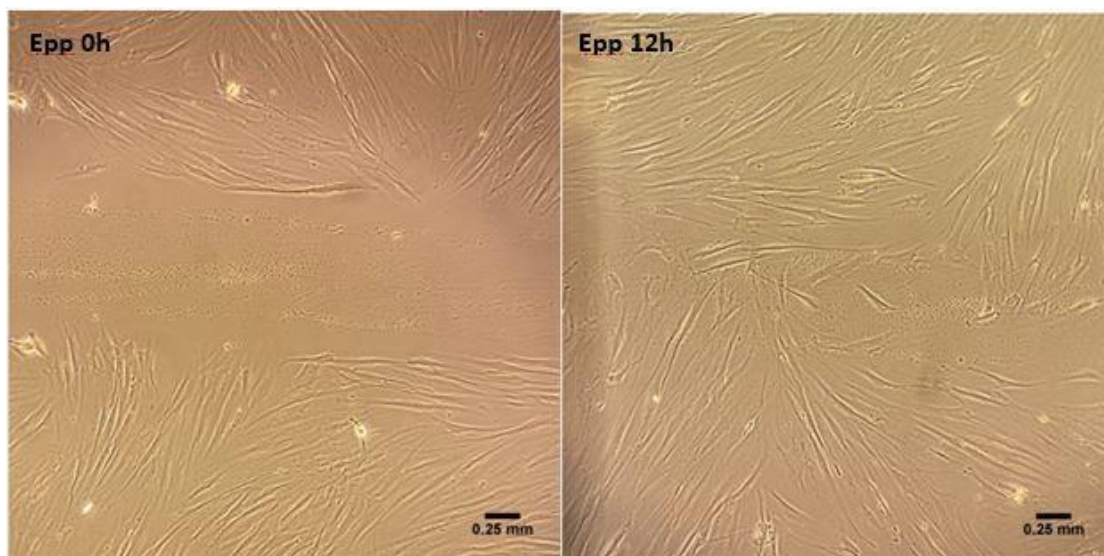


Figura 14: Grupo Epp, imediatamente e após 12h da submissão ao campo elétrico em perpendicular ao longo eixo da ferida usando o dispositivo elétrico.

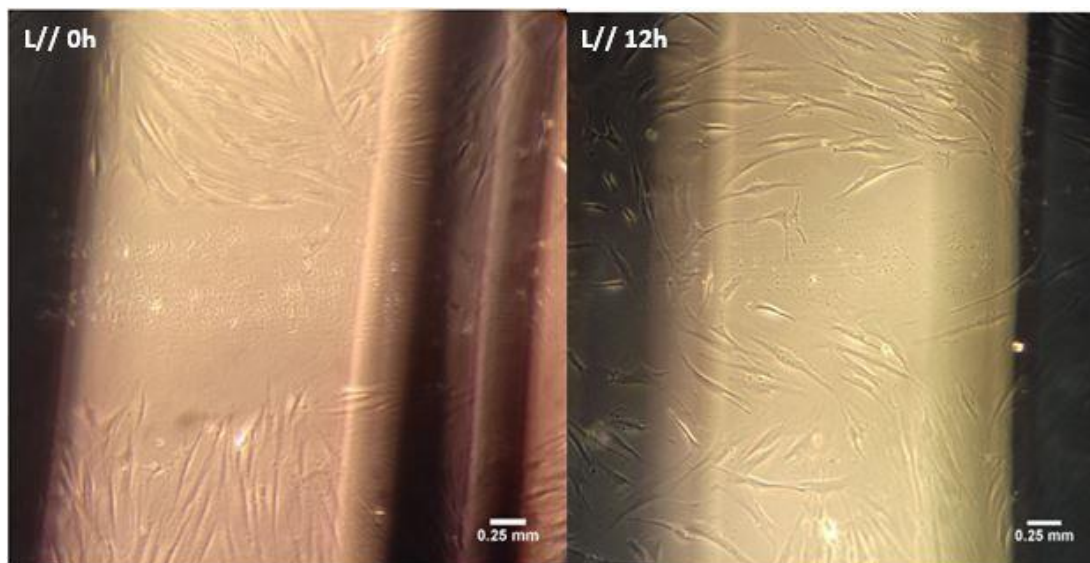


Figura 15: Grupo L//, imediatamente e após 12h da submissão ao campo elétrico em paralelo ao longo eixo da ferida usando o laser.

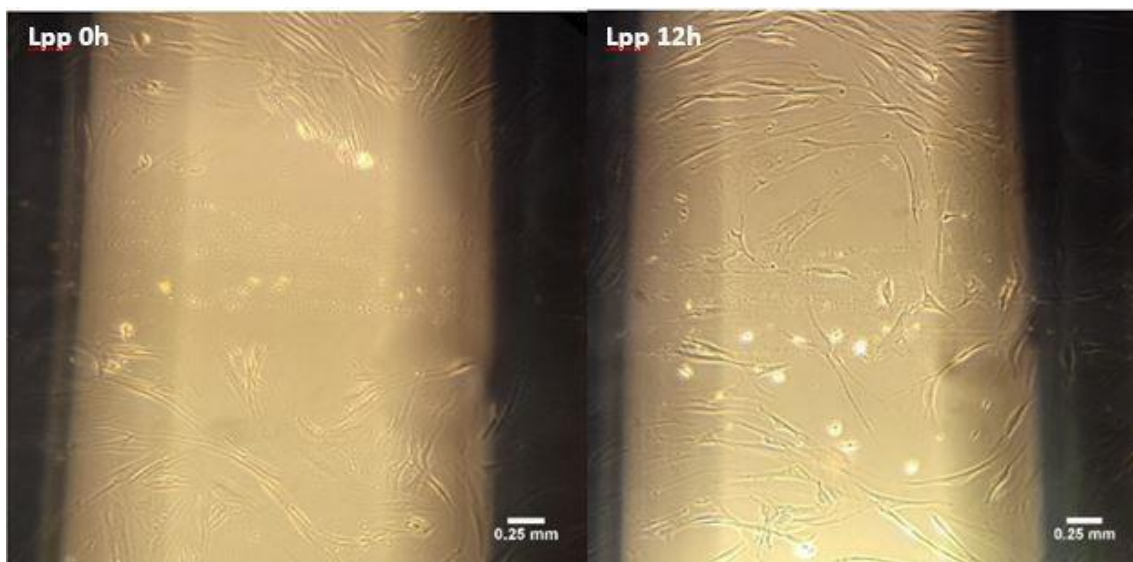


Figura 16: Grupo Lpp, imediatamente e após 12h da submissão ao campo elétrico em perpendicular ao longo eixo da ferida usando o laser.

Na **figura 17** é possível verificar a taxa de fechamento da ferida de cada tratamento. O grupo controle apresentou a menor taxa de fechamento entre todos os grupos ($p=0,0001$). Entre os grupos tratados, não houve diferença significativa.

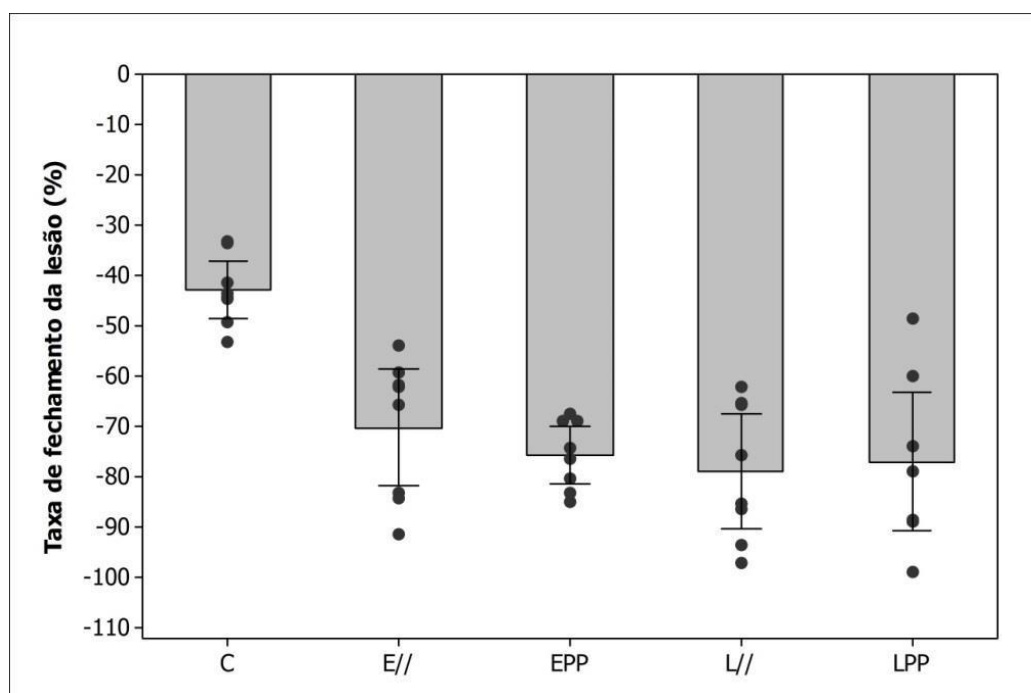


Figura 17: Taxa de fechamento da lesão em relação a cada tratamento.

Em relação ao número de células, após 12h somente houve diferença significativa entre os grupos controle e E// ($p= 0,0037$) (**tabela 3**), embora todos os grupos tenham apresentado valor mediano de células migratórias maior que aquele do grupo controle (**figura 18**).

Tabela 3: Número de células que migraram para área livre após 12h.

GRUPOS	MÍNIMO	NÚMERO DE CÉLULAS	MÁXIMO
C	13,00	(17,00 ± 6,50)	22,00
E//	17,00	(24,00 ± 4,75)	46,00
Epp	15,00	(24,00 ± 26,00)	49,00
L//	5,00	(22,50 ± 11,75)	30,00
Lpp	9,00	(21,50 ± 17,00)	45,00

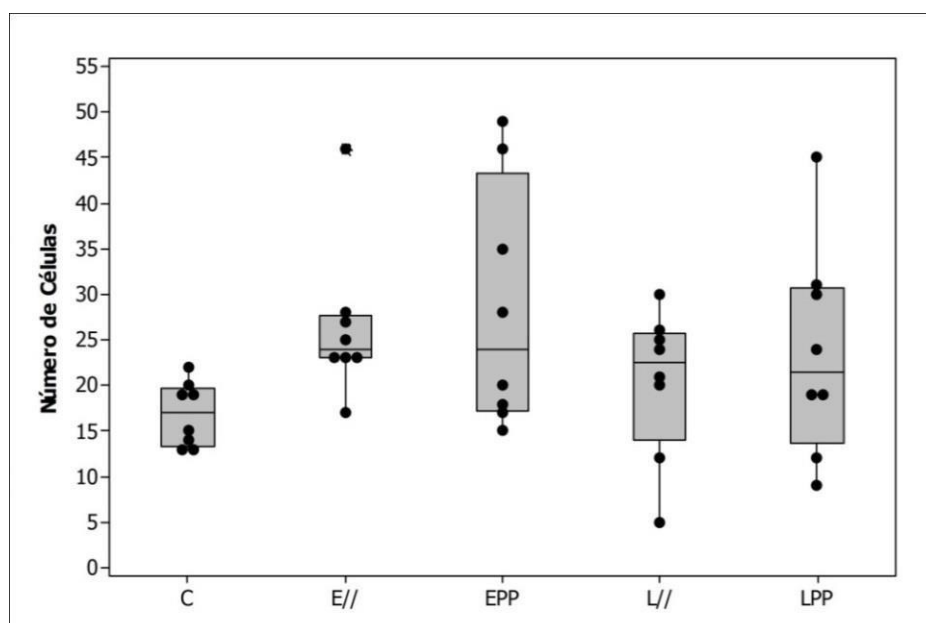


Figura 18: Número de células que migraram para a área livre da ferida após 12 h.

4.2. Alinhamento

Após 6h da aplicação do campo elétrico e numa ordem crescente de alinhamento, o grupo controle foi o menos alinhado, seguido pelo Epp, E//, Lpp e L//, sendo o L// o único alinhado paralelamente em relação ao campo incidente. O grupo L// foi significativamente diferente de todos os demais (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores dos ângulos medidos entre o longo eixo do citoesqueleto e a direção do campo elétrico aplicado com as respectivas significâncias estatísticas após 6h.

Grupos	Mediana ± IQ (°)	Significância estatística				
		Controle	E//	Epp	L//	Lpp
Controle	102,000 ± 66,48		0,7600	0,7236	0,0001	0,0050
E//	91,30 ± 85,67			0,6172	0,0001	0,0626
Epp	99,94 ± 82,15				0,0001	0,0063
L//	35,88 ± 41,01					0,0001
Lpp	71,23 ± 82,01					

O gráfico da **figura 19** ilustra as diferenças entre os ângulos medianos de cada grupo após 6h do tratamento.

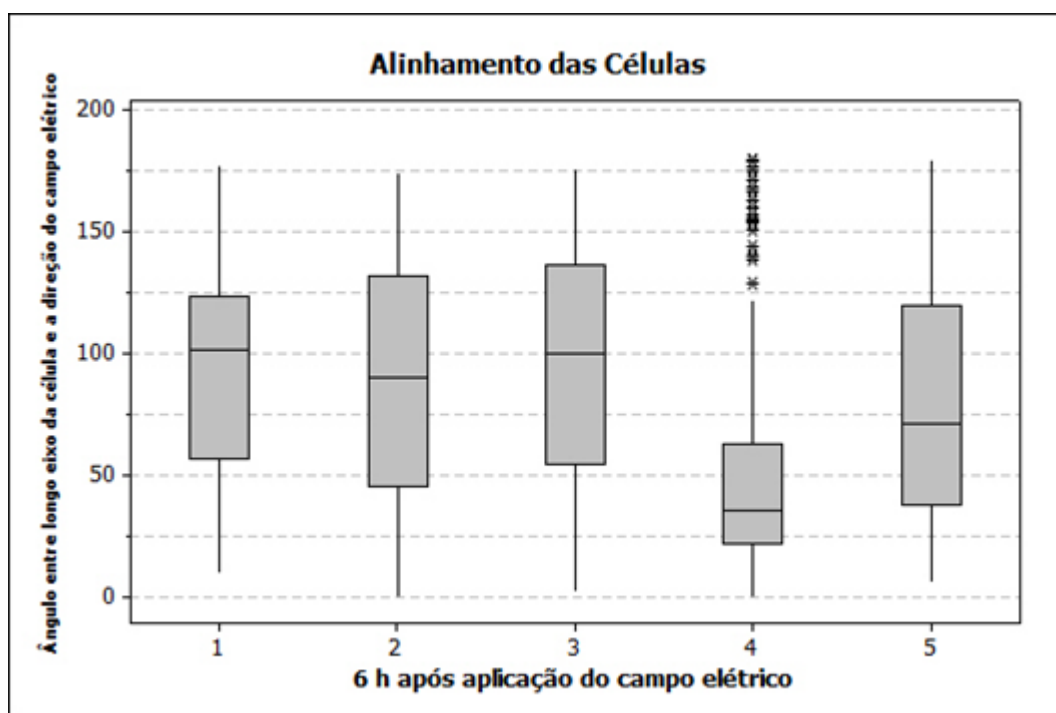


Figura 19: Ângulos medidos entre o longo eixo dos citoesqueletos e a direção de vibração do campo elétrico. Para o grupo controle, o ângulo foi medido em relação a direção da área livre. O grupo 4 (L//) apresentou diferença significativa em relação a todos grupos.

Após 12h da aplicação do campo elétrico e numa ordem crescente de alinhamento, o grupo controle foi o menos alinhado, seguido pelo E//, L//, Lpp e Epp, não havendo nenhum grupo alinhado paralelamente em relação ao campo incidente (Tabela 5). O grupo controle não foi diferente apenas do E//. O grupo mais alinhado, Epp, embora perpendicularmente em relação ao campo elétrico incidente, somente não foi diferente do grupo Lpp.

Tabela 5: Valores dos ângulos medidos entre o longo eixo do citoesqueleto e a direção do campo elétrico aplicado com as respectivas significâncias estatísticas após 12h

	Mediana ± IQ	Significância estatística				
		Controle	E//	Epp	L//	Lpp
	(°)					
Controle	91,33 ± 85,10		0,4061	0,0023	0,0241	0,0172
E//	85,28 ± 77,50			0,0004	0,1015	0,0184
Epp	46,22 ± 90,29				0,0061	0,0924
L//	67,80 ± 68,08					0,3270
Lpp	58,15 ± 74,17					

O gráfico da **figura 20** ilustra as diferenças dos valores medianos dos ângulos de cada grupo após 12h do tratamento.

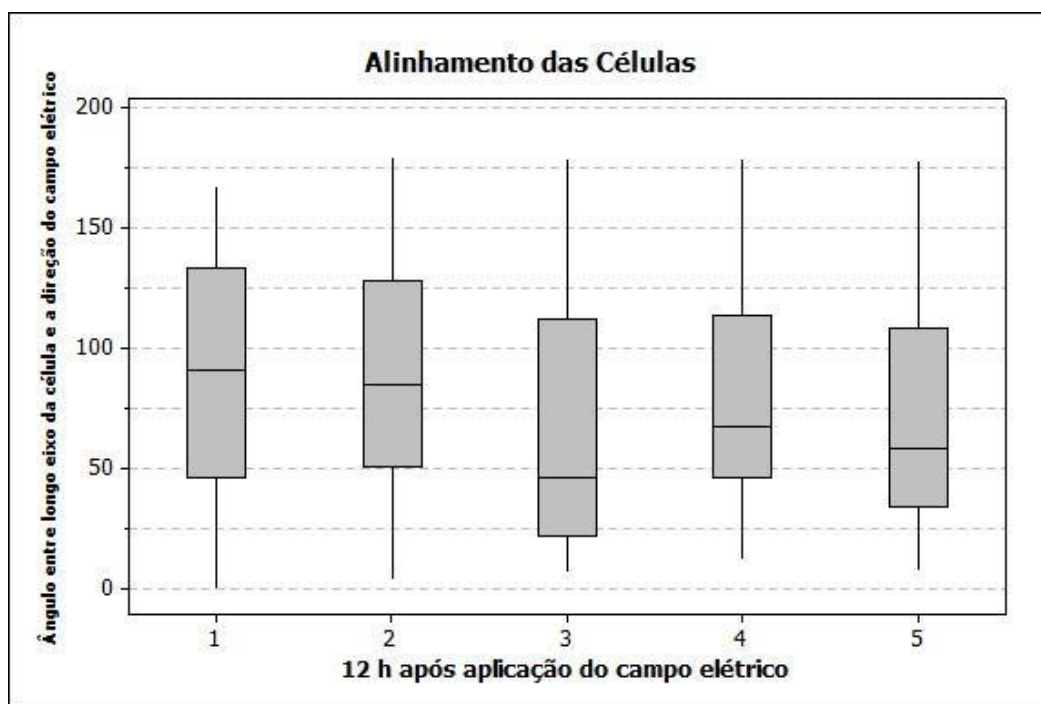


Figura 20: Ângulos medidos entre o longo eixo dos citoesqueletos e a direção de vibração do campo elétrico. Para o grupo controle, o ângulo foi medido em relação a direção da área livre. O grupo 1 (Controle) apresentou diferença significativa em relação aos grupos 3 (Epp) e 4 (L//).

Na comparação entre os períodos de 6h e 12h, somente os grupos Epp e L// apresentaram diferenças significantes (**Tabela 6**). Após 6h o grupo L// foi o único que apresentou alinhamento paralelo à direção do campo. No entanto, após 12h do tratamento, todos os grupos apresentaram alinhamento perpendicular à direção do campo elétrico aplicado.

Tabela 6: *Comparação entre os valores dos ângulos após 6 e 12h.*

GRUPOS	ÂNGULOS APÓS 6h DO TRATAMENTO Mediana ± IQ (°)	ÂNGULOS APÓS 12h DO TRATAMENTO Mediana ± IQ (°)	COMPARAÇÃO ENTRE 6 E 12h
Controle	102,000 ± 66,48	91,33 ± 85,10	0,9830
E//	91,30 ± 85,67	85,28 ± 77,50	0,6496
Epp	99,94 ± 82,15	46,22 ± 90,29	0,0001
L//	35,88 ± 41,01	67,80 ± 68,08	0,0001
Lpp	71,23 ± 82,01	58,15 ± 74,17	0,5646

5. DISCUSSÃO

O presente estudo comparou os efeitos biológico (migração celular) e biofísico (alinhamento celular) produzidos tanto por um campo elétrico sem uso de radiação eletromagnética, quanto pela fotobiomodulação usando laser. Em ambos os dispositivos o campo elétrico produzido foi uniforme e de intensidade 2 V/cm, tendo-se também comparado os efeitos da direção de vibração do campo elétrico: paralela ou perpendicular em relação ao longo eixo da ferida produzida nos fibroblastos cultivados.

As taxas de fechamento da ferida, em porcentagem, e numa ordem crescente foram $-42,84 \pm 6,92$ no grupo controle, $-70,12 \pm 13,94$ no E//, $-75,48 \pm 6,76$ no Epp, $-76,92 \pm 16,34$ no Lpp e $-78,82 \pm 13,63$ no L//. Houve significância estatística entre o grupo controle e os demais ($p < 0,05$).

Os resultados corroboram com a literatura quanto ao grupo sem tratamento (controle) possuir a menor taxa de fechamento da ferida. Em 2013, Rouabhia et. al investigaram os efeitos do campo elétrico em fibroblastos humanos quando expostos a intensidades de 0,5 ou 2 V/cm por 2, 4 ou 6h⁵⁴. A análise da área do ensaio de ferida quando comparada ao grupo não exposto (controle) mostrou redução significativa quando observada 12h e 6h para as células tratadas com 0,5 e 2 V/cm, respectivamente. Além disso, a mais alta taxa de migração foi observada nas células tratadas com 2 V/cm. Os grupos expostos ao campo elétrico fecharam totalmente a ferida em 24h, enquanto o grupo controle ainda permanecia com 30 a 40% da ferida aberta⁵⁴. A intensidade do campo elétrico usada em nosso trabalho também foi de 2 V/cm, embora com tempo de exposição muito menor, 100 s, e ainda assim as células controle comportaram-se de maneira distinta das demais.

O modelo de migração celular usado, o ensaio de ferida, é um método bem estabelecido onde imagens fotográficas são obtidas em períodos pré-determinados pelos pesquisadores e a taxa de fechamento da lesão, tal qual calculada na presente tese, continua sendo usada⁵⁵. Essa metodologia evidenciou que todos os tratamentos foram eficazes quanto à migração celular, com o grupo L// apresentando a melhor taxa. Em 2015, Kim et. al verificaram que a exposição ao LED de $\lambda = 660\text{nm}$ resultou em proliferação e migração celular aumentadas em relação ao controle (não irradiado). A taxa de migração celular dos fibroblastos HGF-1 aumentou significativamente depois de 5, 10 e 20 minutos de irradiação após 12h da realização da ferida, sendo a taxa de 5

minutos similar àquela de 20 min. Entre 12h e 24h após a ferida, a exposição de 10 min foi aquela que mais estimulou a migração, corroborando com os achados do ensaio MTT ⁵⁶. Embora o LED usado pelos autores não tenha sido polarizado, os efeitos de sua exposição foram capazes de diferenciar-se em relação ao grupo controle. Similarmente, nossos grupos expostos à radiação eletromagnética vermelha, Lpp e L//, foram aqueles que apresentaram as maiores taxas de migração celular.

Infelizmente não foram encontrados trabalhos que tenham usado fotobiomodulação polarizada em cultura celular, seja com laser ou LED, para compararmos nossos achados em função da direção de vibração do campo elétrico. No entanto, se expandirmos a busca bibliográfica para modelo animal, encontraremos os estudos do grupo de Ribeiro *et. al*, os quais apontam que o campo elétrico do laser quando polarizado paralelamente em relação a uma direção referencial no tecido promovem melhor cicatrização, com fibroblastos ativos no 17º dia após a realização da ferida, assim como colágeno mais organizado ^{5, 57}.

Em relação ao número de células, após 12h somente houve diferença significativa ($p= 0,0037$) entre os grupos controle ($17,0 \pm 6,5$) e E// ($24,0 \pm 4,75$), embora todos os grupos tenham apresentado valor mediano de células migratórias maior que aquele do grupo controle. Esse resultado é surpreendente porque a melhor taxa de fechamento da ferida foi verificada no grupo L//, então esperávamos maior número de células também no grupo L//. Esse resultado precisa ser melhor explorado, principalmente quanto às características do citoesqueleto, o qual é sabido possuir mobilidade, elasticidade e viscosidade que podem contribuir para o fechamento da lesão, sem necessariamente a célula estar inteiramente presente no leito da ferida ⁵⁸.

Quanto ao alinhamento, após 6h da aplicação do campo elétrico o grupo controle foi o menos alinhado e o L// foi o único alinhado paralelamente em relação ao campo incidente, além do mais alinhado em relação aos demais ($p < 0,05$). Após 12h da aplicação do campo elétrico não houve grupo alinhado paralelamente em relação ao campo incidente e o grupo controle somente não foi diferente do E//. O grupo mais alinhado, Epp, embora perpendicularmente em relação ao campo elétrico incidente, somente não foi diferente do grupo Lpp.

De acordo com os resultados, o grupo L// após 6h ainda estava alinhado ao campo elétrico incidente, mas após 12h já se comportava como os demais grupos, isto é, com alinhamento perpendicular ao campo elétrico incidente. Já com o grupo Epp ocorreu o oposto, pois após 6h era o grupo menos alinhado ao E incidente, enquanto

após 12h foi aquele mais alinhado, tanto quanto o Lpp. A literatura aponta que os fibroblastos costumam alinhar-se perpendicularmente em relação à direção do campo elétrico incidente. Erickson e Nuccitelli⁴⁰ estudaram o comportamento de fibroblastos em campos elétricos de intensidades variando de 0,01 a 6 V/cm durante 90 minutos de exposição, e demonstraram que as células migram no sentido do cátodo e se alinham perpendicularmente à direção do campo elétrico, sendo este efeito mais acentuado com campo elétrico de 6 V/cm. Também de acordo com Sun⁴⁸, este efeito foi verificado com fibroblastos expostos a campos elétricos de 7 V/cm durante 60 minutos. Resultado semelhante foi obtido com o trabalho de Chao¹⁰, aplicando 6V/cm durante 60 minutos em fibroblastos. Então, era apenas uma questão de tempo até que o grupo L// se comportasse como os demais grupos. Mas é interessante ressaltar que o grupo E// não teve comportamento semelhante ao grupo L//, fazendo crer que o campo elétrico produzido por um laser provoca efeitos diferentes daquele produzido por um dispositivo que não faz uso de radiação eletromagnética, ainda que a intensidade e direção sejam as mesmas. Tal comparação entre o campo elétrico de um laser e um campo elétrico de uma fonte não eletromagnética não foi encontrada na literatura, tornando a discussão uma tarefa árdua.

Em relação à análise intragrupo, apenas os grupos Epp e L// apresentaram diferenças entre 6h e 12h. Tal resultado corrobora com o fato de que as direções dos campos elétricos desses dois grupos parecem ser aquelas que mais evidenciam os resultados do alinhamento, seja para melhor alinhar as células, L// após 6h ou Epp após 12h, ou para desalinhá-las, Epp após 6h ou E// e L// após 12h.

Embora a discussão sobre as diferentes direções de vibração do campo elétrico seja escassa quanto à aplicação em alvos biológicos (células, fluidos ou tecidos), há indicação de que a vibração em paralelo do campo elétrico do laser é mais benéfica⁹. Por outro lado, a vibração perpendicular do campo elétrico sem radiação eletromagnética é mais eficaz quanto à migração de fibroblastos. Por exemplo, no estudo de Chao et al, os fibroblastos alinharam-se perpendicularmente ao campo elétrico, sendo a velocidade de migração das células maior na primeira hora após a exposição, e com campo elétrico de intensidade de 2 V/cm. Segundo os autores, a explicação para a migração celular está na força exercida pelo campo elétrico, que pode facilitar o deslocamento das células. Vale ressaltar que o meio dielétrico utilizado permitia a criação de corrente elétrica, no caso de 0,03 A. Embora os autores não

discutam a direção do campo, a mesma era perpendicular à ferida. Esse fato corrobora com nosso resultado no grupo Epp após 12h¹⁰.

Sendo o fibroblasto uma importante célula conectada ao processo de regeneração tecidual e sabendo-se que o campo elétrico desempenha papel fundamental em sua migração e sinalização⁵⁹, esperamos que esse trabalho traga maior discussão sobre as diferentes direções de vibração do campo elétrico, seja ele produzido por laser ou LED (ao usar a fotobiomodulação) ou por eletrodos (dispositivo não eletromagnético).

6. CONCLUSÕES

Os efeitos biológicos e biofísicos produzidos pela fotobiomodulação polarizada se diferem daqueles desencadeados por campo elétrico sem uso de radiação eletromagnética, pois os grupos E// e L// apresentaram resultados distintos, assim como Epp e Lpp quando a migração celular e o alinhamento foram analisados.

Todos os tratamentos foram eficazes quanto à migração celular em relação ao grupo controle, com o grupo L// apresentando a melhor taxa de fechamento da ferida. Em relação ao número de células, após 12h o grupo controle apresentava a menor quantidade de células na área da ferida, enquanto o grupo E// a maior quantidade.

As vibrações do campo elétrico Epp e L// foram aquelas que mais evidenciaram os resultados do alinhamento, seja para melhorar o alinhamento das células, L// após 6h ou Epp após 12h, ou para desalinhá-las, Epp após 6h ou E// e L// após 12h.

Sendo assim, a direção de vibração do campo elétrico do laser quando paralela ao longo eixo da ferida provocada em cultura de fibroblastos, mostra-se promissora quanto à migração após 12h, mas nesse mesmo período o melhor alinhamento celular foi verificado com a direção perpendicular do campo elétrico do dispositivo não-laser.

REFERÊNCIAS

- ¹ REGAN, M. A. et al. A Systematic Review of Therapeutic Interventions for Pressure Ulcers After Spinal Cord Injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 90, n. 2, p. 213-231, Feb 2009. ISSN 0003-9993. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263577000005 >.
- ² ROCHA JUNIOR, A. M. et al. Low-Level Laser Therapy Increases Transforming Growth Factor-beta(2) Expression and Induces Apoptosis of Epithelial Cells During the Tissue Repair Process. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 2, p. 303-307, Apr 2009. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265363800013 >.
- ³ DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 17, May-Jun 2016. ISSN 1077-260X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000378533700001 >.
- ⁴ MIGNON, C. et al. Photobiomodulation devices for hair regrowth and wound healing: a therapy full of promise but a literature full of confusion. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 10, p. 745-749, Oct 2016. ISSN 0906-6705. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000385353500001 >.
- ⁵ RIBEIRO, M. S. et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: A light microscopy study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, n. 1, p. 59-66, Feb 2004. ISSN 1044-5471. Disponível em: < <Go to ISI>://000220876400011 >.
- ⁶ RAMALHO, L. M. P. et al. **Assessment of laser photobiomodulation and polarized light on the healing of cutaneous wounds on euthyroid and hypothyroid induced rats**. Conference on Mechanisms for Low-Light Therapy V. San Francisco, CA. Jan 23-25, 2010. p.
- ⁷ PINHEIRO, A. L. B. et al. Polarized light (400-2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): A description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 5, p. 485-492, Oct 2005. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233178900008 >.
- ⁸ DE MOURA, K. V. M. et al. Effects of a Polarized Light Source (400-2000 nm) on Hep.2 and L929 Cell Lines: A Spectroscopic in Vitro Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 3, p. 441-446, Jun 2009. ISSN 1549-5418. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267613100010 >.
- ⁹ TEIXEIRA SILVA, D. F. et al. Birefringence and Second Harmonic Generation on Tendon Collagen Following Red Linearly Polarized Laser Irradiation. **Annals of Biomedical**

- Engineering**, v. 41, n. 4, p. 752-762, Apr 2013. ISSN 0090-6964. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316566400008 >.
- ¹⁰ CHAO, P. H. G. et al. Effects of applied DC electric field on ligament fibroblast migration and wound healing. **Connective Tissue Research**, v. 48, n. 4, p. 188-197, 2007. ISSN 0300-8207. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000248048000003 >.
- ¹¹ HOARE, J. I. et al. Electric fields are novel determinants of human macrophage functions. **J Leukoc Biol**, v. 99, n. 6, p. 1141-51, Jun 2016. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26718542> >.
- ¹² DOGANAY, O.; XU, Y. Electric-field induced strain in biological tissues. **J Acoust Soc Am**, v. 128, n. 5, p. EL261-7, Nov 2010. ISSN 1520-8524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110536> >.
- ¹³ PARK, H. H. et al. An indirect electric field-induced control in directional migration of rat mesenchymal stem cells. **Applied Physics Letters**, v. 105, n. 24, p. 4, Dec 2014. ISSN 0003-6951. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000346643600094 >.
- ¹⁴ C., G. E. A. **Biofísica**. São Paulo: Sarvier, 2002.
- ¹⁵ TIPLER, P. A.; MOSCA, G. **Física para cientistas e engenheiros**. 6. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- ¹⁶ HALLIDAY, D., RESNICK, R. & WALKER, J. **Fundamentos de Física 3: Eletromagnetismo**. 7. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- ¹⁷ KELLER, F. J. **Física**. 1. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1999.
- ¹⁸ MACHADO, K. D. **Teoria do Eletromagnetismo**. Paraná: 2006.
- ¹⁹ SARTORI, P. H. S., LORETO, E. L. S. **Difusão e campo elétrico na membrana celular: construção de modelos didáticos funcionais**. Revista Brasileira de bioquímica e biologia molecular. 1: 1-15 p. 2010.
- ²⁰ GALVANI, L. **Galvani, Memorie ed esperimenti inediti**. Bologna, Italia: Unibo, 1937.
- ²¹ LEVIN, M. Molecular bioelectricity: how endogenous voltage potentials control cell behavior and instruct pattern regulation in vivo. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 24, p. 3835-50, Dec 2014. ISSN 1939-4586. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25425556> >.

- 22 BARKER, A. T.; JAFFE, L. F.; VANABLE, J. W. THE GLABROUS EPIDERMIS OF CAVIES CONTAINS A POWERFUL BATTERY. **American Journal of Physiology**, v. 242, n. 3, p. R358-R366, 1982. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1982NF40900095 >.
- 23 LAVIN, M. F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer (vol 9, pg 759, 2008). **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 927-927, Dec 2008. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000261126800012 >.
- 24 KIRSCH, D. L.; SMITH, R. B. The use of cranial electrotherapy stimulation in the management of chronic pain: A review. **Neurorehabilitation**, v. 14, n. 2, p. 85-94, 2000. ISSN 1053-8135. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000088395900004 >.
- 25 FINKELSTEIN, E. I. et al. Electric field-induced polarization of charged cell surface proteins does not determine the direction of galvanotaxis. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 11, p. 833-46, Nov 2007. ISSN 0886-1544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685443> >.
- 26 POO, M. et al. Electrophoresis and diffusion in the plane of the cell membrane. **Biophys J**, v. 26, n. 1, p. 1-21, Apr 1979. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/262406> >.
- 27 TATA, D. B.; WAYNANT, R. W. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical applications. **Laser & Photonics Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1-12, Jan 2011. ISSN 1863-8880. Disponível em: < <Go to ISI>://000286682200003 >.
- 28 CHENG, N. et al. THE EFFECTS OF ELECTRIC CURRENTS ON ATP GENERATION, PROTEIN-SYNTHESIS, AND MEMBRANE-TRANSPORT IN RAT SKIN. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 171, p. 264-272, 1982. ISSN 0009-921X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1982PV35700044 >.
- 29 BENZ, R.; BECKERS, F.; ZIMMERMANN, U. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. **J Membr Biol**, v. 48, n. 2, p. 181-204, Jul 1979. ISSN 0022-2631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/480336> >.
- 30 FREY, A. H. Electromagnetic field interactions with biological systems. **FASEB J**, v. 7, n. 2, p. 272-81, Feb 1993. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440406> >.
- 31 KLOTH, L. C.; ZHAO, M. EFFECTS OF ENDOGENOUS ELECTRICAL FIELDS AT WOUNDS AND THE USE OF EXOGENOUS ELECTRIC CURRENTS TO ENHANCE HEALING. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 2, p. A31-A31, Mar-Apr 2011. ISSN 1067-1927. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000287878100095 >.

- 32 ROBINSON, K. R. THE RESPONSES OF CELLS TO ELECTRICAL FIELDS - A REVIEW. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 6, p. 2023-2027, 1985. ISSN 0021-9525. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AVN9400001 >.
- 33 JAFFE, L. F.; NUCCITELLI, R. ELECTRICAL CONTROLS OF DEVELOPMENT. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 6, p. 445-476, 1977 1977. ISSN 0084-6589. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1977DF50200017 >.
- 34 HINKLE, L.; MCCAIG, C. D.; ROBINSON, K. R. THE DIRECTION OF GROWTH OF DIFFERENTIATING NEURONS AND MYOBLASTS FROM FROG EMBRYOS IN AN APPLIED ELECTRIC-FIELD. **Journal of Physiology-London**, v. 314, n. MAY, p. 121-&, 1981 1981. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1981LR72500011 >.
- 35 MCCAIG, C. D.; SONG, B.; RAJNICEK, A. M. Electrical dimensions in cell science. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 23, p. 4267-76, Dec 2009. ISSN 1477-9137. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923270> >.
- 36 LI, X.; KOLEGA, J. Effects of direct current electric fields on cell migration and actin filament distribution in bovine vascular endothelial cells. **J Vasc Res**, v. 39, n. 5, p. 391-404, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 1018-1172. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297702> >.
- 37 MCCAIG, C. D. et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. **Physiol Rev**, v. 85, n. 3, p. 943-78, Jul 2005. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987799> >.
- 38 NUCCITELLI, R. et al. The electric field near human skin wounds declines with age and provides a noninvasive indicator of wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 5, p. 645-655, Sep-Oct 2011. ISSN 1067-1927. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000295091700014 >.
- 39 ZHAO, M. et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 457-460, Jul 27 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000239278900044 >.
- 40 NUCCITELLI, R.; ERICKSON, C. A. EMBRYONIC-CELL MOTILITY CAN BE GUIDED BY PHYSIOLOGICAL ELECTRIC-FIELDS. **Experimental Cell Research**, v. 147, n. 1, p. 195-201, 1983 1983. ISSN 0014-4827. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983RJ36800020 >.
- 41 RADICE, G. P. THE SPREADING OF EPITHELIAL-CELLS DURING WOUND CLOSURE IN XENOPUS LARVAE. **Developmental Biology**, v. 76, n. 1, p. 26-46, 1980 1980. ISSN 0012-1606. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1980JL63000003 >.

- 42 KHADRA, M. et al. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 73A, n. 1, p. 55-62, Apr 2005. ISSN 1549-3296. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000227684500007 >.
- 43 BASSO, F. G. et al. Biostimulatory effects of low-level laser therapy on epithelial cells and gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. **Laser Physics**, v. 23, n. 5, May 2013. ISSN 1054-660X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000318007600025 >.
- 44 KARU, T. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Photobiomodulation (Low-Power Laser Therapy). **Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 20, n. 2, Mar-Apr 2014. ISSN 1077-260X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329997200017 >.
- 45 KENDRIC, C. S. **The photobiological basis of low level laser radiation therapy**. Laser Therapy. Japan: International Phototherapy Association. 3: 19 - 24 p. 1991.
- 46 PELOW, P. V.; CHUNG, T. Y.; BAXTER, G. D. Laser Photobiomodulation of Proliferation of Cells in Culture: A Review of Human and Animal Studies. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. S3-S40, Aug 2010. ISSN 1549-5418. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280667300001 >.
- 47 CAMPANHA, B. P. et al. Polarised light (λ 400-2000nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. In: RECHMANN, P.; FRIED, D., *et al* (Ed.). **Lasers in Dentistry IX**, v.4950, 2003. p.144-149. (Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (Spie)). ISBN 0-8194-4750-1.
- 48 MIGNON, C. et al. **Photobiomodulation of distinct lineages of human dermal fibroblasts: a rational approach towards the selection of effective light parameters for skin rejuvenation and wound healing**. Conference on Mechanisms of Photobiomodulation Therapy XI. San Francisco, CA. Feb 13-14, 2016. p.
- 49 ESMAEELINEJAD, M. et al. The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 121-129, Jan 2014. ISSN 0268-8921. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329834200016 >.
- 50 PASI, F. et al. Effects of extremely low-frequency magnetotherapy on proliferation of human dermal fibroblasts. **Electromagn Biol Med**, v. 35, n. 4, p. 343-52, 2016. ISSN 1536-8386. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27254779>>.
- 51 ROSA, M. R. P. D. **Estudo in vitro da modulação das metaloproteinases da matriz pelo fator de crescimento EGF em células derivadas de ameloblastoma**. 2013. 85 (Mestrado). INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

ODONTOLOGIA SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ São Paulo.

- 52 NOMIZU, M. et al. Cell adhesive sequences in mouse laminin beta1 chain. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 311-20, Jun 2000. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860548> >.
- 53 TEIXEIRA SILVA, D. F. et al. Effective Transmission of Light for Media Culture, Plates and Tubes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 5, p. 1211-1216, Sep-Oct 2012. ISSN 0031-8655. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000308396000020 >.
- 54 ROUABHIA, M. et al. Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation. **Plos One**, v. 8, n. 8, Aug 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000323425700081 >.
- 55 YAHAYA, E. S. et al. Attenuation of oxidative stress and artificial wound closure in C2C12 myoblasts induced by sequential extracts of Boerhavia diffusa. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 111-123, Jan 2018. ISSN 0022-3573. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000418462800011 >.
- 56 KIM, M. S. et al. Effect of 660 nm Light-Emitting Diode on the Wound Healing in Fibroblast-Like Cell Lines. **International Journal of Photoenergy**, p. 9, 2015. ISSN 1110-662X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000363168000001 >.
- 57 SILVA, D. F. T. et al. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 11, n. 2, p. 024002.1 - 024002.6, Mar-Apr 2006. ISSN 1083-3668. Disponível em: < <Go to ISI>://000237623100021 >.
- 58 KOLE, T. P. et al. Intracellular mechanics of migrating fibroblasts. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 1, p. 328-338, Jan 2005. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225954400033 >.
- 59 IWASA, S. N.; BABONA-PILIPOS, R.; MORSHEAD, C. M. Environmental Factors That Influence Stem Cell Migration: An "Electric Field". **Stem Cells International**, 2017. ISSN 1687-966X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000401359300001 >.

APÊNDICE A: Desenvolvimento do dispositivo para geração de campo elétrico.

A ideia inicial do modelo experimental foi criar um dispositivo do tipo capacitor de placas paralelas. Para tanto, utilizou-se a **equação 3**. Porém, a medição da ddp só é possível se entre as placas houver um meio dielétrico que permita detectar o campo elétrico. Não é possível, por exemplo, utilizar o ar como meio dielétrico, pois sua resistência elétrica é significativamente alta para que a ddp aplicada nas placas seja capaz de criar o campo.

O campo foi mapeado com a ajuda de um voltímetro, tocando uma das placas metálicas com um dos terminais do voltímetro (placa de referência). O outro terminal foi posicionado distante 1cm da placa de referência no eixo perpendicular à mesma (coluna A da figura 21). Em seguida, esse terminal foi deslocado 1 cm à direita de A (coluna B da figura 21) e assim sucessivamente até que todas as tensões elétricas da linha 1 fossem coletadas. Posteriormente, o terminal do multímetro foi deslocado 1 cm abaixo da linha 1 e o procedimento anterior foi repetido para a linha 2, e assim por diante até que as tensões em todos os pontos fossem determinadas. Durante todo o processo, a temperatura do meio era monitorada com auxílio de um termopar. Essa metodologia foi adotada para os testes.

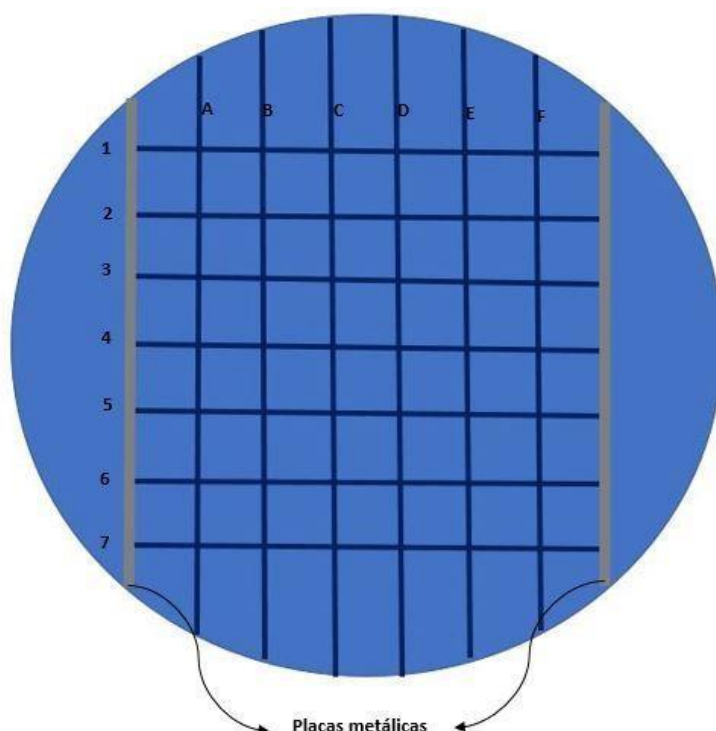


Figura 21: ilustração do método adotado para mapeamento do campo elétrico a partir do potencial elétrico entre placas metálicas paralelas.

A possibilidade de utilização do meio de cultura como meio dielétrico, assim como outros líquidos comumente utilizados em cultura celular, foi descartada pois mesmos têm comportamento de condutor elétrico, ou seja, permite o movimento de elétrons livres (ou íons), e devido ao aumento de temperatura causado. Isso se deve, basicamente, a sua composição salina. A **tabela 7** mostra os dados coletados quando da utilização de DMEM como meio dielétrico.

Tabela 7: *Tensões medidas utilizando DMEM como dielétrico.*

ddp (V)	A	B	C	D	E	F
1	22,22	20,06	17,73	14,84	12,21	9,71
2	22,34	20,17	17,75	15,20	12,23	9,55
3	22,30	20,25	17,60	15,40	12,22	9,53
4	22,40	20,11	17,80	15,06	12,32	9,40
5	22,30	20,00	17,81	14,75	11,97	
6	22,34	20,11	17,61	14,79	11,85	
7	22,37	20,16	17,50	14,50	11,82	

Os pontos F5, F6 e F7 não foram coletados devido ao aumento de temperatura após 2 minutos do início da coleta de dados. Nota-se que entre as colunas D e C a ddp já é superior a 2 V.

O dispositivo foi testado também com água Milli-Q (**Tabela 8**) que tem resistência elétrica elevada (em torno de 180 M Ω). Neste teste, o campo elétrico foi medido a cada centímetro entre as placas. Até uma exposição ao campo elétrico de 300 segundos, a temperatura medida foi de $(24,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Para que houvesse uma adequada margem de segurança, optou-se pelo tempo de exposição de 100 s.

A partir da escolha da água Milli-Q como dielétrico mais apropriado, elaboramos um protótipo em acrílico e com dimensões que permitiam introduzi-lo dentro de uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro. Foi então realizado um outro teste com este dispositivo e o meio dielétrico já mencionado (**figura 22**).

Tabela 8: *Tensões medidas utilizando água Milli-Q como meio dielétrico.*

Tensões (V)	A	B	C	D	E	F
1	21,61	19,36	17,03	14,83	12,56	10,30
2	21,68	19,78	17,10	14,91	12,51	10,37
3	21,80	19,34	17,17	14,84	12,57	10,32
4	21,79	19,45	17,13	14,81	12,51	10,32
5	21,75	19,42	17,10	14,97	12,58	10,41
6	21,83	19,39	17,03	14,95	12,54	10,43
7	21,77	19,29	16,97	14,75	12,60	10,47

Diferentemente da tabela A, as diferenças de tensões não se alteram significativamente, mesmo nas colunas mais afastadas da placa de referência.

O campo foi mapeado com a ajuda de um voltímetro, tocando uma das placas metálicas com um dos terminais do voltímetro (placa de referência). O outro terminal foi posicionado distante 1cm da placa de referência no eixo perpendicular à mesma (ponto A, **figura 22**). Em seguida, esse terminal foi deslocado 1 cm à direita de A e posteriormente 1 cm à esquerda de A, obtendo-se os valores dos campos nos pontos A1 e A2 (**figura 22**). Esse processo foi repetido para determinar os valores de tensão nos pontos B, B1 e B2 e assim por diante até que as tensões em todos os pontos fossem determinadas.

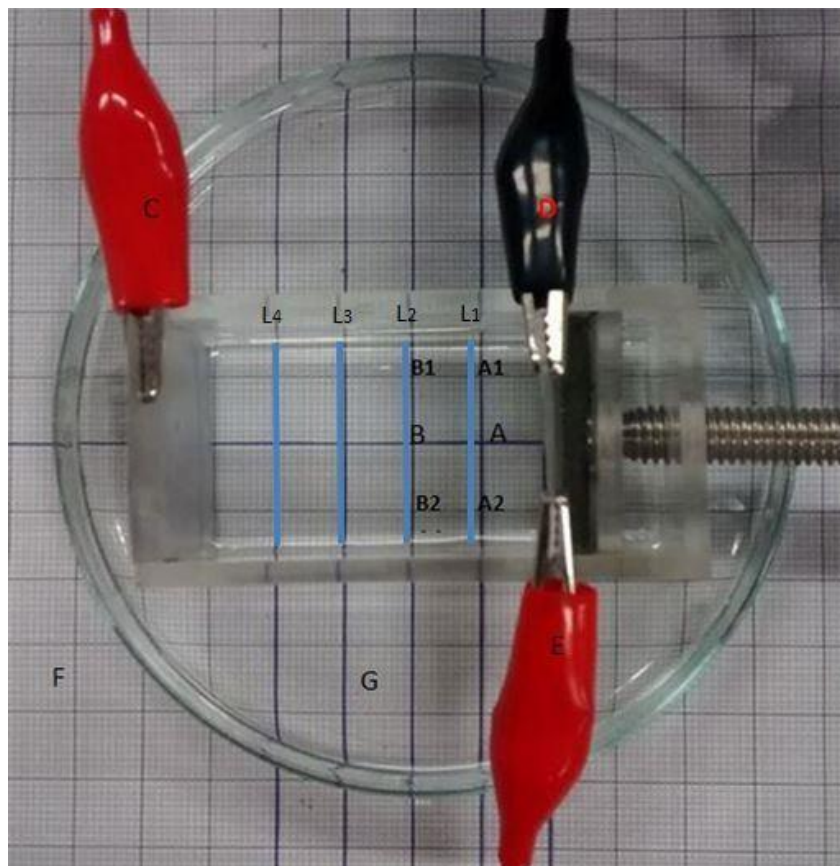


Figura 22: Dispositivo para criar campo elétrico: eletrodos conectados à fonte de tensão ajustável e às placas metálicas C e D. As medições de tensão foram realizadas utilizando papel milimetrado (F) sob a placa de Petri com água Milli-Q (G). Um dos terminais do voltímetro foi fixado numa das placas (E) e com o outro foram medidas as tensões nos pontos das linhas equipotenciais L1, L2, L3 e L4 no interior do dispositivo.

Sendo determinadas as tensões ponto a ponto, o campo foi calculado com a **equação 3**, de modo que a cada linha paralela às placas metálicas os valores de potencial elétrico eram iguais. Essas linhas são conhecidas como linhas equipotenciais e o campo elétrico é sempre perpendicular a elas.

Embora tenha atendido às necessidades iniciais, o dispositivo foi modificado devido a dois problemas referentes à sua utilização: era necessária sua fixação dentro da placa de Petri durante a utilização, e suas dimensões limitavam a área que efetivamente iria ser submetida ao campo elétrico. Assim, foi criado e testado um novo dispositivo que superasse esses problemas (**figura 23**).

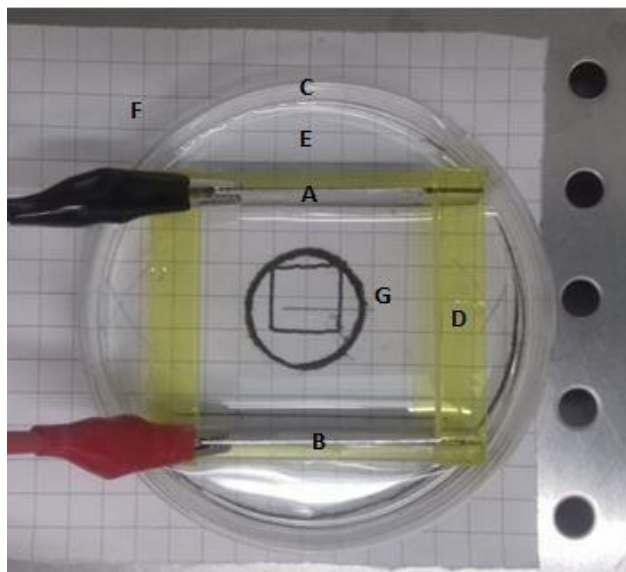


Figura 23: Dispositivo final utilizado em todos os experimentos: Placas metálicas (A e B); placa de Petri (C); Estrutura em acrílico (D); Água milli-Q(E); papel quadriculado(F); desenho para centralização da lamínula (G).

A nova versão do dispositivo foi construída com acrílico e com dimensões precisas (7,0 x 7,0 cm), obtidas por meio de uma cortadora a laser. Foi possível estabelecer um campo elétrico estável e uniforme na maior área possível dentro da placa de Petri. Com ele, as lamínulas com as células aderidas eram depositadas no centro da placa de Petri de maneira tal que era possível, quando necessário, girar o dispositivo de modo que se adequasse à direção de polarização pretendida.

O acrílico permitiu que, antes de todos os experimentos, o dispositivo fosse higienizado com álcool 70% e descontaminado com luz ultravioleta por 15 minutos, juntamente com os demais materiais utilizados.