



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**PROGRAMA DE MESTRADO E DOUTORADO EM MEDICINA**

**CARLOS ALBERTO OCON**

**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO  
EMPREGANDO O LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA  
MAGNETOTERAPIA, SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS  
HUMANAS (HUVECS)**

**São Paulo**

**2021**



**EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO  
EMPREGANDO O LASER DE BAIXA INTENSIDADE E DA  
MAGNETOTERAPIA, SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS  
HUMANAS (HUVECS)**

**CARLOS ALBERTO OCON**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina da  
Universidade Nove de Julho como requisito para  
Obtenção do Título de Doutor em Ciências da  
Saúde**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Stella Regina Zamuner**

**São Paulo**

**2021**

Ocon, Carlos Alberto.

Análise do efeito da terapia de fotobiomodulação empregando o laser de baixa intensidade (LBI) e da magnetoterapia, sobre células endoteliais humanas (HUVECS). / Carlos Alberto Ocon. 2021.

51 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2021.

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cristina Chavantes.

1. Células endoteliais humanas.
2. Magnetoterapia.
3. Laser.
4. Citocinas.
5. Viabilidade celular.

I. Chavantes, Maria Cristina      II. Título

CDU 616

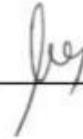
São Paulo 14 de dezembro de 2021

**TERMO DE APROVAÇÃO**

Aluno: **CARLOS ALBERTO OCON**

Título da tese: **ANÁLISE DO EFEITO DA TERAPIA DE FOTOBIMODULAÇÃO EMPREGANDO O LASER DE BAIXA INTENSIDADE DE ACORDO COMA RESPOSTA DA MAGNETOTERAPIA SOBRE AS CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS.**

Presidente: PROFA. DRA. MARIA CRISTIAN CHAVANTES



Membro: PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO SILVA JÚNIOR



Membro: PROFA. DRA. IVANY MACHADO DE CARVALHO BAPTISTA



Membro: PROFA. DRA. SILVIA NUNEZ



## **Agradecimentos**

Primeiramente agradecer a Deus, pois nas horas mais angustiantes da vida ele coloca anjos na sua vida, para podermos vencer etapas na nossa vida que muitas vezes achamos que será impossível.

Agradeço a minha família, com especial agradecimento a minha esposa Renata Miniaci, pelo seu apoio, paciência em todos estes anos de estudo.

Agradeço aos meus pais Joana e Francisco (in memória), a minha sogra Yvanize, minha irmã, cunhado e sobrinhos, pois sempre torceram muito pela minha vitória.

Um agradecimento especial também a uma pessoa que admiro muito a Dra. Aline da Silva, por todo o seu apoio, minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Chavantes por todos os ensinamentos a Prof<sup>a</sup> Dra. Stella Regina Zamuner, pela confiança e apoio, Dr. Luiz Fernando Zamuner, Dra. Leila, Dr. Sérgio, Tawane, Danniely e funcionários dos laboratórios, amigos docentes.

Sonhos são inicialmente utopias, com diferença, que estas utopias são alcançáveis, depende sempre das suas atitudes, portanto acredite no seu potencial.

Agradecer também Neo Spim, pelo empréstimo do equipamento de Magnetoterapia NVL-40 Sp-Brasil, para a realização deste estudo.

## **RESUMO.**

A Terapia de Fotobiomodulação, (LBI) e a Magnetoterapia (MAG) são tendências terapêuticas inovadoras, seguras e não invasivas, de baixo custo e apresentam resultados eficazes. Os efeitos do campo eletromagnético e as propriedades fotofísicoquímicas inerentes das terapias empregadas são capazes de gerar alterações benéficas no organismo, tais como redução de edemas, processo inflamatório, aceleração da cicatrização e analgesia. Este estudo tem o objetivo de analisar e comparar os efeitos do LBI no comprimento de onda de 660 nm e da Magnetoterapia (MAG.) na frequência de 9 Hz, na viabilidade por MTT, migração celular por lesão mecânica e dosagens de citocinas pró e antiinflamatória (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10), em células Huvecs Humanas. As células foram divididas em 4 grupos, sendo: grupo C(Controle), grupo L(LPS) , grupo T(LPS+LASER) e grupo M(LPS+ MAGNETO). Para a análise dos dados foram utilizados valores médios , desvio padrão e análise de variância (ANOVA) de uma via, com auxílio do software 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).Graph Pad In Stat versão 3.01. Foram realizados pós testes Tukey e considerada aceitável estatisticamente significantes, quando  $p < 0,05$ . Todas as amostras foram feitas em quadruplicadas.

O presente estudo demonstrou que a terapia por MAG, foi superior ao grupo T(LPS+Laser), grupo L(LPS) e grupo C(Controle) na viabilidade celular por MTT, bem como na migração celular após lesão mecânica os grupos M(LPS+ MAG) e o grupo T(LPS+Laser) tiveram efeito superior ao grupo C (Controle) e L(LPS), nas dosagens de citocinas. Todos os grupos não denotaram significância estatística referente às citocinas pró inflamatórias, na expressão da citocina IL-10 o tratamento T(LPS+Laser) evidenciou significância estatística.

**Palavras-Chave:** Células Endoteliais Humanas, Magnetoterapia, Laser, Citocinas, Viabilidade celular.

## **ABSTRACT.**

Photobiomodulation (LBI) and Magnetotherapy (MAG) are innovative and non-invasive therapeutic trends, with low cost and effective results. The effects of the electromagnetic field and the photophysical-chemical properties inherent to the therapy used are capable of generating beneficial changes in the body, such as reduction of edema, inflammation, acceleration of healing and analgesia. This study aims to analyze and compare the effects of LLLT at a wavelength of 660 nm and Magnetotherapy (MAG.) at a frequency of 9 Hz, on viability by MTT, cell migration by mechanical injury and dosages of pro and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-10) in Human Huvecs cells. The cells were divided into 4 groups, group C(Control), group L(LPS), group T(LPS+LASER) and group M(LPS+MAGNETO). For data analysis, means, standard values deviation and one-way analysis of variance (ANOVA) were used, with the aid of the 5.0 software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).Graph PadIn Stat version 3.01. Tukey tests were performed and considered acceptable when  $p < 0.05$ . All samples were taken in quadruplicate. The present study demonstrated that MAG therapy was superior to group T(LPS+Laser), group L(PS) and group C(Control) in cell viability by MTT, in cell migration after mechanical injury, in groups M(LPS+MAG) ) and the T(LPS+Laser) group had a greater effect than the C (Control) and L(LPS) group, in the cytokine dosages, all groups did not show statistical significance regarding the pro-inflammatory cytokines, in the expression of the IL-10 cytokine treatment T(LPS+Laser) showed statistical significance.

Key words: Human Endothelial Cells, Magnetotherapy, Low-Level Light Therapy, Cytokines, Cell viability.

## Sumário

1. Introdução.....	14
2. Revisão da literatura .....	16
2.1 Origem das Células Endoteliais .....	16
2.2 Funções das Células Endoteliais .....	16
2.3 Características Estruturais das Células Endoteliais .....	17
2.4 O Tecido Endotelial e as Citocinas .....	18
3. Terapia de Fotobiomodulação por LBI .....	22
3.1 Característica Fotobiomodulação.....	26
4. Magnetoterapia .....	27
5. Hipótese .....	30
5. Objetivos .....	31
5.1 Objetivo Primário.....	31
5.2 Objetivos Secundários .....	31
6. Material e Métodos.....	32
6.1 Células Endoteliais Huvecs.....	32
6.2 Cultivo Celular.....	32
6.3 Terapia de Fotobiomodulação.....	33
6.4 Magnetoterapia .....	34
6.5 Métodos Colorimétricos para Determinação de Viabilidade Celular .....	36
6.5.1 Viabilidade por MTT .....	36
6.5.2 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração Celular após Lesão Mecânica em Células Huvecs. ....	37
6.6 Ensaio de ELISA .....	38
7. Análise Estatística .....	39
8. Resultados .....	40

8.1 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Viabilidade de Células Huvecs .....	40
8.1.2 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração Celular após lesão Mecânica em Células Huvecs. ....	41
8.1.2 Ensaio de ELISA para Citocinas Pró e Antiinflamatórias .....	43
9. Discussão.....	46
Conclusões.....	47
Considerações Futuras .....	48
Referências Bibliográficas .....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura-1: .Ondas eletromagnéticas Visíveis.....	20
Figura-2: Característica do Laser.....	22
Figura-3: Efeito Fotofisicoquimico do LBI.....	23
Figura -4:Espectro Eletromagnético.....	26
Figura-5: Aparelho de Laser de Baixa Intensidade.....	29
Figura 6: Placas de 96 poços (tratamento LPS + LASER).....	30
Figura 7: Aplicação do LBI.....	30
Figura-8: Aparelho de Magnetoterapia.....	31
Figura 9:Placas de 96 poços (tratamento LPS + MAGNETO).....	31
Figura10: Aplicação Magnetoterapia.....	31
Figura11: Demonstrativo Ilustrativo MTT.....	33
Figura12: Resultado de Viabilidade Huvecs.....	36
Figura13: Migração celular após lesão mecânica.....	37
Figura14: Fotos células migração celular.....	37/38
Figura 15: Estatística IL-1 $\beta$ .....	40
Figura16: Estatística IL-6.....	40
Figura17: Estatística TNF- $\alpha$ .....	41
Figura18: Estatística IL-10.....	41

## LISTA DE TABELAS

Figura :1 Parâmetro de Dosimetria LBI.....	22
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
NO	Óxido Nítrico
E-Selectina	Epitelial Selectina
ICAM-1	Intercelular AdhesionMolecule1
VCAM-1	Molécula 1 de Adesão de Células Vasculares
LDL-ox	Lipídios de Baixa Densidade Oxidase
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 Alfa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF- $\beta$	Fator de Necrose Tumoral Beta
PCR	Proteína C Reativa
LASER	Light Amplification by Stimulated of Radiation
PDT	Terapia de Fotodinâmica
CEMP-BF	Campos eletromagnéticos pulsados de Baixa frequência
IV	Colágeno TipoIV
V	Colágeno Tipo V

VII	Colágeno Tipo VII
JA	Junção de Adesão
JV	Junção de Vedação
e-NOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ET-1	Endotelina1
RNA-m	Ácido Ribonucléico Mensageiro
LED	Light Emitting Diode
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
λ	Lambda
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LILT	Low Level Laser Therapy
CW	Contínuos Wave
W/cm <sup>2</sup>	Watt por Centímetro Quadrado
J/cm <sup>2</sup>	Joule por Centímetro Quadrado
NASA	National Aeronautics and Space Administration
ATP	Adenosina Trifosfática
TFBM	Terapia de Fotobiomodulação
ILIB	Laser Irradiation of Blood
G	Gauss
T	Tesla
Hz	Hertz
Na <sup>+</sup>	Sódio
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAM	calmadulina
MAG	Magnetoterapia
LPS	Lipopolissacarídeo
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
MAG	Magnetoterapia



## 1. Introdução.

O tecido endotelial é composto por monocamada celular, presente no revestimento de vasos sanguíneos (artérias e veias), câmaras cardíacas e túbulos renais, já o Endotélio contínuo é uma característica dos vasos do cérebro, retina e capilares musculares, enquanto endotélio fenestrado é encontrado na glândula endócrina e no rim<sup>1</sup>

O endotélio atua de forma determinante controlando a homeostase vascular, participa da regulação de sinais intracelulares (moléculas liberadas pelas células para provocar alterações fisiológicas como: proliferação, diferenciação, translocação de vesículas, produção de enzimas e apoptose (morte celular programada). na permeabilidade e tônus vascular, bem como na cascata de coagulação e na angiogenese<sup>1, 3,4</sup>.

O tecido endotelial forma uma barreira semipermeável entre o plasma e o líquido intersticial, portanto possui capacidade de mediar e monitorar as trocas bidirecionais de pequenas moléculas, restringindo o transporte de macromoléculas<sup>2</sup>.

Outra função endotelial é atuar como órgão endócrino, parácrino (produção de hormônio) e autócrino (Mensageiro químico), hormônios estes que influenciam a musculatura local, respostas inflamatórias e coagulação<sup>5</sup>.

O endotélio, quando agredido pode reduzir a biodisponibilidade de vasodilatadores tal como Óxido Nítrico (NO), que atua como protetor da parede vascular, fato que pode desencadear patologias cerebrais ou cardiovasculares, caracterizando uma disfunção endotelial<sup>6, 7,12</sup>.

O aumento na expressão de selectina endotelial (E-selectina), molécula de adesão celular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), ocorrem pela resposta de citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeos bacterianos ou lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDL-ox). Tais substâncias proporcionando a ligação célula-célula ou célula-matriz, no espaço

subendotelial, levando a elevação da espessura vascular, podendo até, devido a intensidade de o processo obstruir totalmente a luz do vaso<sup>8,9</sup>.

O aparecimento na corrente sanguínea das IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Proteína C Reativa (PCR) e (LDL-ox), são consideradas marcadores precoces de ativação endotelial e inflamação sistêmica<sup>10</sup>.

O processo inflamatório é um dos mecanismos que protegem o organismo em respostas a uma agressão, sendo que o endotélio vascular tem papel fundamental neste processo com liberação de agentes vasomotores e inflamatórios, que afetam a homeostase vascular<sup>11</sup>.

O tempo de duração e intensidade da inflamação é determinante para caracterizar transformações nos diferentes tecidos, podendo ser classificada como: aguda e crônica. O processo inflamatório inicia-se com uma constrição transitória das arteríolas locais, posteriormente ocorre uma vasodilatação dos vasos sanguíneos da área agredida<sup>22, 23</sup>

Este processo resulta em um maior fluxo sanguíneo, levando a uma quimiotaxia leucocitária, sendo que após aderirem a células endoteliais projetam seu pseudópodos, movendo-se no interior do fluido tecidual até o local lesionado<sup>23</sup>.

A circulação dos neutrófilos é livre na corrente sanguínea, porém, quando os tecidos são danificados estes liberam: trombina, histamina, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 (IL-1) <sup>67</sup>.

Tal fato ocorre de uma ligação com as células endoteliais, devido a sua maior mobilidade, os Neutrófilos são as primeiras células de defesa a atingir o local danificado, os eosinófilos e monócitos se projetam para a lesão, atraídos por moléculas quimiotáticas. Estes últimos se diferenciam em Macrófagos, os quais fagocitam bactérias e células estranhas que existem no local da lesão<sup>24</sup>.

O funcionamento, do endotélio desempenha vários processos complexo tais como: homeostasia, angiogenese, regulação da pressão arterial e atua na modulação do processo inflamatório<sup>13</sup>.

O presente estudo visa analisar a ocorrência de uma maior ou menor viabilidade por MTT, migração celular após lesão mecânica e expressão de citocinas pró-inflamatórias das células endoteliais (HUVECs), sob efeito de tratamento da Terapia de Biofotomodulação e Magnetoterapia,

## **2. Revisão da literatura**

### **2.1 Origem das Células Endoteliais**

As células endoteliais têm seu desenvolvimento a partir da mesoderme, onde ocorre a formação de agregados sanguíneos no interior do saco vitelino, constituído de uma camada interna contendo células estaminais hematopoiéticas e camada externa constituída de angioblastos, sendo que a camada interna dá origem as células sanguíneas e a externa á células endoteliais, a tese mais aceita é que ambas as linhagem de células derivam de um mesmo percussor Hemandioblastos<sup>39, 40</sup>

A partir de esta formação dar-se inicio a dois processos distintos, o primeiro a vasculogenese com diferenciação das células endoteliais a partir dos hemangioblastos, o segundo resulta na angiogenese com formação de novos a partir dos já existentes <sup>41, 42</sup>.

Inicialmente entendia-se que a diferenciação das células endoteliais era restrita a fase embrionária e a fase de angiogenese ocorria apenas no pós-nascimento, descobertas recentes derrubam esta hipótese, pois foi encontradas populações de células CD34+, na medula óssea e sangue periférico de indivíduos adultos, chamadas de células progenitoras endoteliais, tendo a capacidade de se diferenciar em células endoteliais específicas contribuindo para a revascularização in vivo<sup>43</sup>.

### **2.2 Funções das Células Endoteliais**

O endotélio desempenha inúmeras funções, fato este devido à localização estratégica das células endoteliais entre o tecido e o sangue, outra

ação primordial é exercida pelas junções de proteínas específicas: junções Gap, junções de vedação, junções de aderência<sup>44</sup>.

Estas junções exercem funções distintas como: comunicação entre células impedem a livre movimentação de moléculas entre as células, mediam o transito de água e moléculas e controlam o crescimento celular<sup>40</sup>.

As células endoteliais possuem receptores em sua membrana que contribui para: controle de moléculas de proteína, controle de partículas transportadoras de lipídios, metabólicos e hormonas, manutenção do tônus vascular, ativação e inativação de hormonas vasoativas, tráfego de células sanguínea, transporte de nutrientes e solutos, proteção de fluidez sanguínea e controle do equilíbrio homeostático<sup>48</sup>.

O sistema hemostático mantém um equilíbrio tênue entre a característica pró-coagulante e a anticoagulante, em condições normais, as células endoteliais permanecem ativas metabolicamente (Mesmo aparentando estar inerte) promovendo uma superfície ativa anticoagulada, proporcionando a passagem de hemácias, leucócitos e plaquetas um trajeto livre para todo o corpo<sup>55</sup>.

Qualquer alteração deste equilíbrio como processo inflamatório ou tensão de cisalhamento levando a uma lesão endotelial, induz as células endoteliais a alterar o microambiente pró-trombótico e antifibrinolítico<sup>2</sup>.

### **2.3 Características Estruturais das Células Endoteliais**

As células endoteliais de um modo geral são alongadas, poligonais e dotadas de ampla superfície. A parte luminal está continuamente exposta às células circulantes e aos componentes plasmáticos, na porção oposta, as

abluminas presentes estão em contato com a matriz extracelular e tecidos adjacentes, que por meio de integrinas, liga-se a lamina basal<sup>18,19</sup>.

Pesquisa com cultura de células endoteliais tem origem remota , com cultivo de células por Lewis (1921), mas somente com Jaffet al (1973) , tiveram êxito, pois obtiveram uma população homogênea<sup>14</sup>. Segundo thorin (1998), as células endoteliais mantêm o equilíbrio vascular entre indução e inibição de crescimento, vasodilatação e vasoconstrição, anticoagulação e coagulação, modulam o tônus vasomotor, controla fluxo sanguíneo e media a resposta inflamatória e imunológica <sup>15</sup>.

Quando as células endoteliais entram em contato com o tecido conjuntivo, recebe o nome de lâmina basal, composta por colágeno tipo IV, proteoglicanas, glicoproteínas laminar e entactina, atuam na proliferação e diferenciação celular entre outras funções<sup>16</sup>.

Estudos demonstram que as células endoteliais, não são homogêneas em suas funções, características fisiológicas e morfológicas e antigeneidade, possuindo capacidade para adaptar-se aos diferentes microambientes<sup>17</sup>.

## **2.4 O Tecido Endotelial e as Citocinas**

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular com funções diversificadas metabólicas e endócrinas que participam da inflamação e resposta do sistema imune<sup>70</sup>.

Elas são separadas em três famílias: as Interleucinas (IL); os Interferons (INF) e os Fatores de Necrose Tumoral (TNF). Inicialmente eram denominadas linfocinas ou monocinas para apontar a sua origem celular, mas

atualmente o termo citocina é o melhor a ser utilizado em função de praticamente todas as células nucleadas serem capazes de sintetizar estas moléculas<sup>71</sup>.

A síntese das citocinas é regulada por diversos estímulos indutores em nível de tradução e transcrição, têm papel fundamental na formação dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, sendo produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a estímulos antigênicos ou em resposta a outras citocinas, sendo responsáveis pela liberação dos mediadores do processo inflamatório<sup>72</sup>.

São liberadas principalmente por monócitos/ macrófagos e linfócitos, porém podem ser secretadas por células adiposas, células epiteliais, células endoteliais e células da glia. Os monócitos circulantes no sangue e os macrófagos presentes nos tecidos causam a ativação dos linfócitos T e a secreção de citocinas<sup>73</sup>.

O aumento da inflamação desencadeia um incremento na síntese celular, citocinas pro - inflamatória e antiinflamatória, neutrófilos, monócitos, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10<sup>60</sup>.

Dentre as citocinas que desempenham papel de destaque na inflamação aguda, damos destaque a Interleucina-1 $\beta$  (IL- 1 $\beta$ ), o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a Interleucina-6 (IL-6). Nesse conjunto citado, damos destaque a TNF- $\alpha$  e IL- 1 $\beta$  que são moléculas importantes na inflamação<sup>74</sup>.

O TNF- $\alpha$  também pode ser liberados por fibroblastos, mastócitos, linfócitos T e células NK<sup>75</sup>.

Após sua produção, liberado e processado, o TNF- $\alpha$  se liga aos receptores nas células alvo e possui a capacidade de mediar diferentes efeitos em diferentes órgãos e tecidos<sup>76</sup>.

Entre os principais efeitos pró-inflamatórios do TNF- $\alpha$  estão: Nas células endoteliais esta citocina leva a expressão de moléculas de adesão, de outras citocinas, de fatores de coagulação e da enzima iNOS (responsável pela síntese de óxido nítrico). Por entre a expressão dos fatores de coagulação

decorre uma supressão da atividade anticoagulante das células endoteliais, alcançando um bloqueio do suprimento sanguíneo e necrose do tecido adjacente. O TNF- $\alpha$  do mesmo modo ativa leucócitos inflamatórios (macrófagos, neutrófilos, monócitos e linfócitos), incrementando a atividade microbicida; e leva os fagócitos mononucleares e outros tipos de células a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e o próprio TNF). Estas ações contribuem para o acúmulo de leucócitos no sitio inflamatório<sup>76</sup>.

A principal atividade da IL-1 é ser reguladora do processo inflamatório. Essa citocina incita a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, estimula os linfócitos na resposta imune<sup>76,80,81</sup>.

A IL-1 $\beta$  é sintetizada como um precursor que necessita ser clivado por uma enzima conversora da IL-1(ICE) e levado para fora da célula. As principais fontes celulares da IL-1 $\beta$  são os fagócitos mononucleares, fibroblastos, queratinócitos e linfócitos T e B. podem causar febre por uma elevação na produção de Prostaglandina E2 pelo endotélio vascular do hipotálamo, Induz a liberação de histamina por mastócitos no foco inflamatório<sup>80</sup>.

A IL-6 é sintetizada por uma variável de células, abrangendo fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos. A IL-6 a IL-1 e TNF- $\alpha$  influem a síntese de proteínas na fase aguda pelo fígado. Estas proteínas ofertam um incremento na proteção contra microrganismos e alteram a resposta inflamatória por atuarem sobre o fluxo celular e a liberação de mediadores<sup>77, 78</sup>.

A IL-6, além disso, apresenta um impacto regulatório, envolvendo a interdição da produção de TNF- $\alpha$ , atuando como um feedback negativo que suprime a resposta inflamatória aguda<sup>79</sup>.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunorreguladora importante, pleiotrópica, do tipo II, a IL-10 atua apenas nas respostas inflamatórias exageradas. No início, a IL-10 foi caracterizada como causa inibitória da produção de citocinas, secretada por células T helper 2 (Th2), com a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF $\alpha$ , pelas células T helper 1 (Th1)<sup>82</sup>.

Estudos demonstraram que a IL-10 é vastamente expressa por diversas células do sistema imune inato e adaptativo. As células Th2 e as células T reguladoras (TReg) não são as únicas a produzirem essa citocina, também as células Th1, Th17, T CD8+, células B, células dendríticas (DCs), macrófagos, monócitos, mastócitos, células natural killer (NK), eosinófilos e neutrófilos são fontes importantes de citocina IL-10<sup>83</sup>.

A IL-10 possui diferentes funções biológicas que atuam direta e indiretamente no sistema imune<sup>65</sup>. Ela é hábil em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas inflamatórias, mediadores secretados por macrófagos e DCs, e a produção de metaloproteases da matriz pelos macrófagos, assim como também em dificultar a diferenciação de DCs de precursores de monócitos e a maturação de DCs.<sup>66,83</sup>

A IL-10 também atua inibindo a função das células apresentadoras de antígenos (APCs), e devido a este efeito nas APCs previne a produção de citocinas relacionadas às células Th1 e Th2. Ademais, ela pode incrementar a diferenciação de células TReg, e em alguns casos também pode ativar os mastócitos e aumentar as funções das células T CD8, células B e células NK.<sup>84</sup>

As doenças crônicas como diabetes Mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a obesidade, podem causar uma inflamação crônica de baixo grau<sup>20</sup>.

A elevação dos neutrófilos e macrófagos provocam uma intensificação da síntese de IL-6 que, por sua vez, aumenta exponencialmente a produção de PCR no fígado, a IL-6 atua diretamente nas tempestades de citocinas, atuando também na diminuição da atividade do eNOS, conseqüentemente reduzindo o NO na corrente sanguínea, causando a diminuição da vasodilatação e acelerando a concentração de ET-1, que atua como vasoconstritor vascular, provocando um estresse por fricção entre o tecido sanguíneo e a parede do vaso, causando danos ao tecido endotelial, proporcionando o início do processo de aterosclerótico<sup>60,61</sup>.

A IL-6 é sintetizada pelos monócitos, fibroblastos entre outros, em resposta a uma agressão de microorganismos, também sofrem estímulos de outras citocinas como: IL-1 e TNF- $\alpha$ <sup>61</sup>.

A IL-6 exerce um papel importante no processo de erosão de placas de aterosclerose, tendo seus níveis séricos elevados durante este processo, atuando fortemente na resposta imune inata e adaptativa<sup>61</sup>.

A IL-1 é uma citocina também produzida pelas células endoteliais, quando está detecta uma invasão de microorganismos. Quando estas células são expostas a endotoxinas com estímulos pró-inflamatórios de patógenos expressam RNAm para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , proporcionando a compreensão que células endoteliais, não respondem apenas a estímulos imunológicos do linfócitos, como também, estão envolvida no processo de aterosclerose<sup>62</sup>.

Diversas citocinas foram identificadas na parede vascular a partir do estudo, tais como: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e IL-6, e muitos fatores de recrutamento e ativação de monócitos<sup>63</sup>.

### **3. Terapia de Fotobiomodulação por LBI**

Emission of Radiation, a qual significa “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”, consiste em um aparelho que emite luz (radiação não ionizante)<sup>37, 38</sup>.

Theodore Maiman, (1960), fabricou o primeiro aparelho de laser, seu uso terapêutico data de 1961, já o Prof. Dr. Leon Goldman responsável pela Dermatologia da Universidade de Cincinnati, através do desenvolvimento e o aprimoramentos realizados em aparelhos de Laser de Rubi, demonstrou a destruição seletiva de estruturas pigmentadas na pele, e lesões vasculares, ampliando os horizontes desta especialidade através de inúmeras publicações científicas de forma incansável ao redor do mundo, tornando-se o primeiro a usar a terapia com laser em medicina<sup>64</sup>.

Para o entendimento sobre as características do Laser, primeiramente temos que compreender a formação da luz, que são partículas de energia eletromagnética que caminham no espaço/tempo, estas partículas denominam-se fótons<sup>25</sup>.

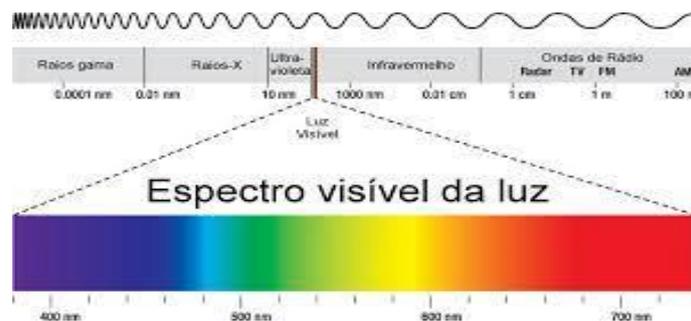
As ondas eletromagnéticas que tangem e constituem um Laser ou LED possuem vários comprimentos de onda, que variam de 440nm (violeta) a 700 nm(vermelho) até o infravermelho longo como CO<sup>2</sup> (10 nm)<sup>26</sup>. Contudo, apenas uma fração deste espectro de ondas é visível, conseqüentemente quanto o comprimento da onda ( $\lambda$ ) for mais longo temos uma onda em infravermelho, quando o ( $\lambda$ ) for mais curto teremos uma onda ultravioleta, os aparelhos na sua maioria oferecem para tratamento terapêutico de ondas no IV próximo, que estão entre 600 e 1000nm<sup>27</sup>.

Segundo Chavantes (2009) podemos dividir o laser, de acordo com sua potencia em: Laser de alta potencia ou cirúrgico, que possui >1 Watt, a partir de T<sup>o</sup>>45C<sup>o</sup>, e o Laser que empregam uma potência baixa ( PDT e LBI). <1 Watt, e T<sup>o</sup><1C<sup>o</sup> <sup>64</sup>.

O laser de baixa intensidade (LBI- Low –Level Laser Therapy) se caracteriza por oferecer uma terapia com emissão de luz de baixa intensidade, produzida pelos fótons, que quando absorvido pelo organismo, não são transformada em calor. LBI é uma energia constituída de ondas eletromagnéticas que não produz calor, sendo que a temperatura no tecido alvo, não pode ultrapassar 0,5°C, no organismo, a luz absorvida produz mudanças fotofisicoquímica nas mitocôndrias, promovendo alterações no metabolismo, promovendo os efeitos terapêuticos de morfodiferenciação e migração celular, tecidual, revascularização, diminuição de edema, remodelação celular, aumento da circulação capilar local e permeabilidade vascular levando a transferência de energia de um sistema partindo de zero até alcançar a crista interna do citocromo C, vindo a produzir ATP mitocondrial<sup>27</sup>.

As mitocôndrias quando estimuladas pela TFBM, (LBI), revelaram uma maior funcionabilidade, sendo mais específicas e intensas, levando ao aumento da capacidade de regeneração e cicatrização. Segundo Carnevalli et al , em seus estudos afirmou que a TFBM no espectro vermelho, atua na formação de mitocôndrias gigantes e na sua quantidade biodisponível <sup>39,40</sup>.

**Figura 1:** Ondas Eletromagnéticas Visíveis



Fonte: ilustração adaptada Peter Hermes Furian/ Shutterstock.com

Laser tem seu funcionamento diferenciado em dois parâmetros, a forma contínua (CW) sem variações e forma pulsada onde existe uma variação entre o valor máximo de potência do equipamento e o mínimo, neste caso será necessário calcular a potência média, pois é ela que tem significância terapêutica, a potência do laser é expressa em  $W/cm^2$ , a exposição radiante, densidade de energia, fluência ou dose são medidas em  $J/cm^2$ <sup>29</sup>.

Os aparelhos de laser contêm uma substância radioativa (cristal de Rubi ou gases, como: Hélio-neônio,  $CO_2$ ), esta substância é essencial e deve ser capaz de absorver energia de uma fonte externa<sup>30</sup>.

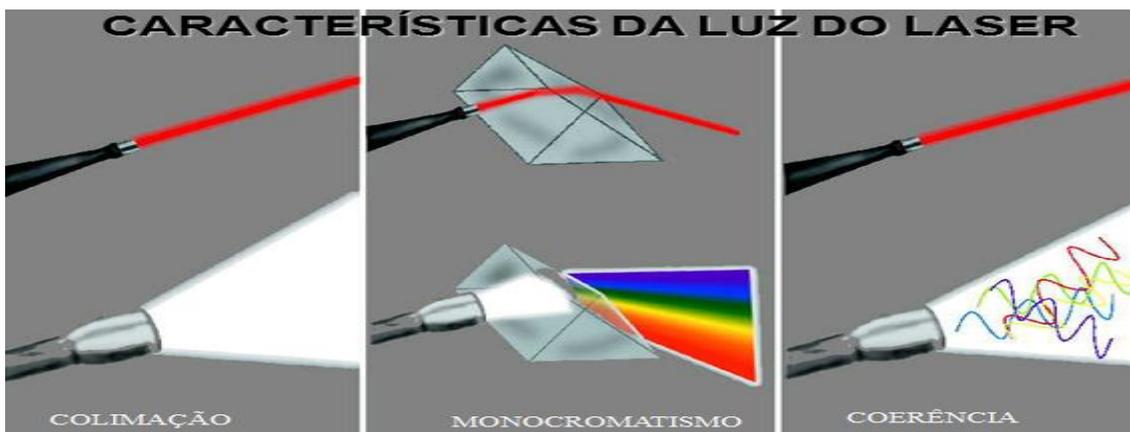
Os átomos são os menores componentes desta substância e sendo, nêutrons e prótons no seu núcleo, orbitam (elétrons) em níveis diferentes de energia da substância radioativa<sup>31</sup>.

Toda vez que um elétron muda de órbita ou se excita significa absorve quantidade de energia suficiente para mudar de posição, gerando um Quantum, com o dinamismo desta nova estrutura e pouca instabilidade, quando não mais são estimulados, retorna ao seu nível original. Entretanto, durante esse retorno o mesmo libera energia em forma de fótons, fenômeno este chamado de emissão espontânea, mas quando permanece continuamente estimulado, produz emissão estimulada, termo descrito por Einstein, quando recebeu o prêmio Nobel de Física no início do século passado<sup>32,33</sup>.

Os aparelhos de laser possuem no seu interior dois espelhos, um localizado na extremidade, que multiplicam a energia liberada pela colisão entre fótons onde registra mais fótons estimulados e segundo possui um orifício central onde é liberado a energia<sup>34</sup>.

As características do laser se diferem da luz devido ao processo de formação de luz, que consiste em que todos os fótons são remetidos no mesmo tempo e espaço e, conseqüentemente, sem perda de energia, garantindo que a energia emitida pelo aparelho é a mesma entregue ao tecido, pelo fato de ter um único comprimento de onda, apresenta uma única coloração<sup>35, 36</sup>.(conforme figura 2)

**Figura 2:** Característica do Laser



Fonte:Chavantes -2009

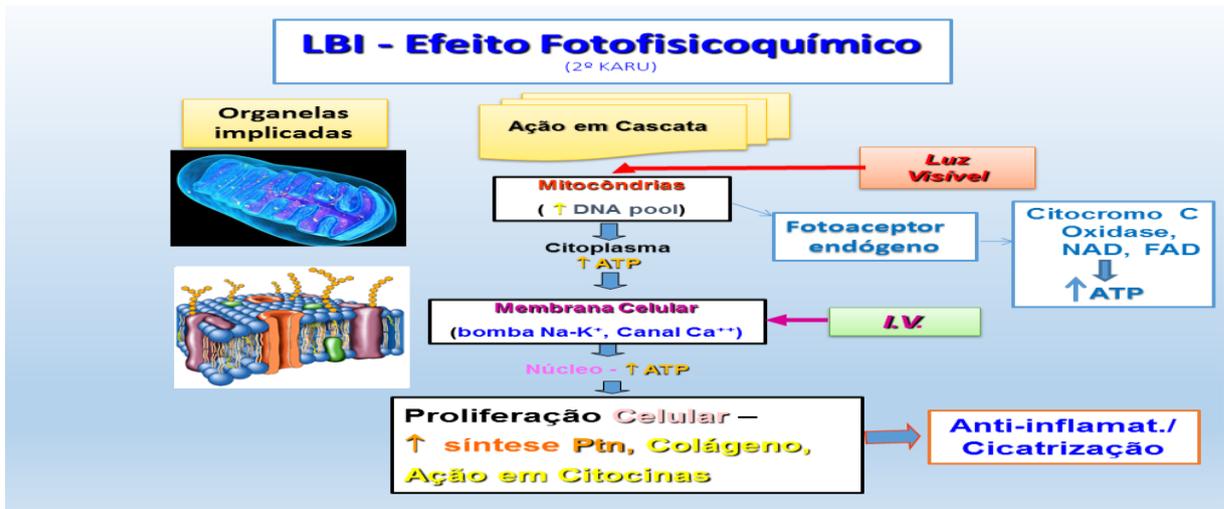
### 3.1 Característica Fotobiomodulação

O Laser atua na faixa do vermelho (622-660nm) ou infravermelho (780 nm- 1mm), por apresentar várias propriedades terapêuticas, é utilizado em larga escala, por vários profissionais da Saúde<sup>26</sup>.

Estudos recentes demonstram que a terapia por fotobiomodulação, é utilizada em várias patologias agudas tais como: Diabetes Melitus, doenças autoimune, doenças vasculares, endócrinas, respiratórias (Bronquite e Pneumonia)<sup>47</sup>. Segundo Kazemi (2013), a terapia por fotobiomodulação aumenta a diferença de oxigênio arteriovascular atuando para o encerramento da hipóxia tecidual e Hiperapneia<sup>48, 49</sup>.

A terapia por Fotobiomodulação por LBI promove uma modulação na sinalização redox do sistema respiratório, por meio da estimulação de componentes mitocondriais, sendo capaz de induzir efeitos positivos na expressão de imunoglobulinas, interferons e interleucinas<sup>50, 51</sup>.

Figura3: ILBI (Laser Irradiation of Blood)



Fonte: Chavantes -2009

#### 4. Magnetoterapia

A origem da magnetoterapia tem seu uso nas primeiras civilizações, existem relatos de que 2.500 anos chineses usavam pedra magnetizadas (magnetites) para tratamento de saúde, sendo que apenas no último século começaram a se aprimorar seus benefícios<sup>52</sup>

Foram apenas a partir das descobertas de seus benefícios que começaram a serem desenvolvidas diversas formas de magnetoterapia como: Radiofreqüência, terapia por magnéticos estáticos e a terapia por campos eletromagnéticos pulsados de baixa freqüência<sup>54</sup>.

No ano de 1.979 a Food and Drug Administration (FDA, EUA) aprovou, pela primeira vez, o uso de eletromagnético pulsado (MAG) para o tratamento de fraturas não unidas<sup>43</sup>.

A MAG consiste na aplicação de campos Eletromagnéticos pulsados e oscilantes de Baixa Potência (CEMPO-BF), que possui o potencial de normalizar o fluxo de íons e nutrientes das células, nervos e outras tecidos<sup>53</sup>.

A MAG consiste em um método de fácil manuseio, uma terapia não invasiva, utilizada principalmente nas desordens músculo-esquelético, manuseio da dor e regeneração de tecidos<sup>55</sup>. A força magnética é medida em GAUSS (G) ou TESLA (T)(1 T=10<sup>4</sup> G) e a frequência em Hertz (Hz)<sup>54</sup>.

Os princípios que governam os fenômenos eletromagnéticos possuem a capacidade de atuar, em sistemas biológicos e organismos vivos, onde os campos eletromagnéticos são presentes e, constantemente, criados por processos fisiológicos (movimentos celulares, fluxos iônicos, fluidos dos sistemas corpóreos, cadeia de transporte mitocondrial, portanto, efeitos biológicos podem resultar da interação desses campos com campos eletromagnéticos exógenos<sup>41</sup>.

Os impulsos eletromagnéticos têm a função de repolarizar à membrana celular restaurando o funcionamento fisiológico e o equilíbrio de energia. Assim, as células expostas a campos eletromagnéticos de baixa frequência (0 a 100 Hz), sofrem alterações específicas desde mudanças de fluxo iônico transmembranar até o aumento da síntese de DNA e da transcrição de RNA<sup>44</sup>.

As células sadias do organismo mantêm uma carga elétrica entre 70 – 100mv está carga elétrica ocorre devido às trocas iônicas em nível de membrana celular, sendo que qualquer alteração no potencial desta membrana o fluxo iônico altera a homeostase celular<sup>56, 57</sup>.

A CEMP-BF atua na membrana celular alterando o transporte de íons como Na<sup>+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> normalizando o potencial transmembranar, a transdução de sinais, promovendo o equilíbrio celular<sup>58</sup>

O campo magnético tem uma função principal de: desvio de partículas com carga elétrica em movimento e produção de correntes induzidas pelo efeito de produção de ondas ultrassônicas em tecido ósseo e colágeno. Em nível celular, o campo magnético é capaz de regularizar o potencial de membrana, aumentar a solubilidade de substâncias e dinamizar o metabolismo celular <sup>42</sup>.

A corrente eletromagnética induzirá a ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteína calmodulina (CaM), com esta junção a síntese de constituintes de óxido nítrico (NO) é estimulada, liberando fatores de crescimento endoteliais estimulando a angiogênese em horas e dias, fator de crescimento fibroblastos (estimula produção de colágeno) e TGF-B (aumenta a remodelação celular)<sup>59</sup>.

A magnetoterapia (MAG) é aplicada em praticamente todas as doenças caracterizadas por dor, inflamação e quando ocorre déficit funcional vascular. Existem três tipos de MAG de acordo com a fonte geradora do campo magnético usado:

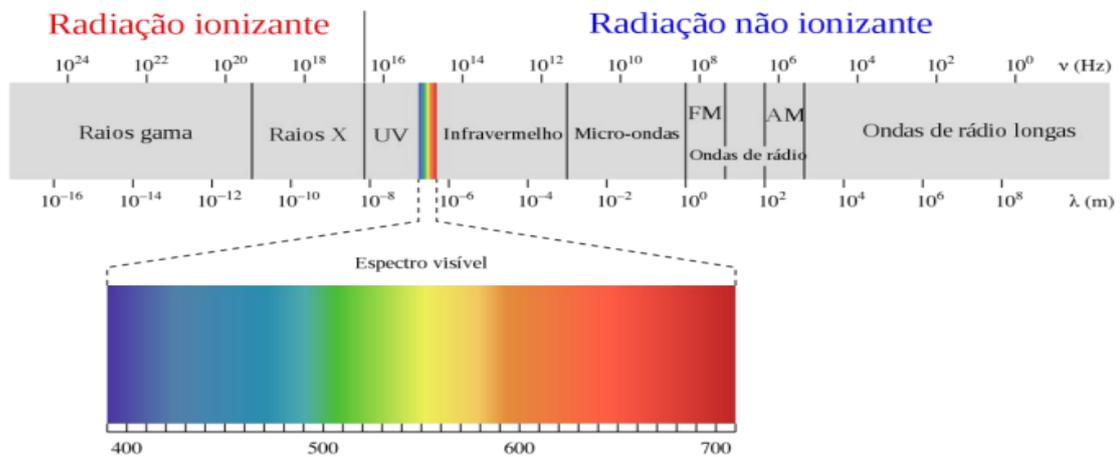
As ondas eletromagnéticas são classificadas em ionizantes e não ionizantes, de acordo com a frequência de emissão, potencial e intensidade. As não ionizantes e, assim, são invasivas, já as ionizantes são amplamente utilizadas na Medicina como meio de diagnósticos e tratamentos.

**Estática** - Consiste em se aplicar, sobre a pele do local a ser tratado, um ou mais, magnetos (ímã). Tem aplicação eficiente em casos de dores localizadas.

**Baixa frequência** - Gera campos magnéticos variáveis com frequências que oscilam entre 10 e 200 Hz e é adequada para favorecer a regeneração dos tecidos.

**Alta frequência** - o campo gerado atinge alguns milhões de hertz (18-900 MHz). Estas frequências elevadas são adequadas para tratar processos dolorosos e inflamações.

Figura:4. Espectro eletromagnético



Fonte: Yuri Tungsten -adaptada de Philip Ronan

## 5. Hipótese

Será que as terapias com Fotobiomodulação (LBI) e Magnetoterapia serão capazes de alterar a viabilidade de células Huvec por ensaio MTT?. As terapias seriam capazes de promover a migração e proliferação em celular (Huvecs), após lesão mecânica e ainda inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, ademais aumentar a produção de citocina antiinflamatória? .

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo Primário**

Analisar se as terapias de Fotobiomodulação por (LBI), e Magnetoterapia causam efeitos em células endoteliais ( HUVECS).

### **5.2 Objetivos Secundários**

Avaliar os efeitos das terapias com aparelhos baseados em energia (Laser de Baixa Intensidade e Magneto) na:

- Viabilidade células HUVECS, através da utilização de LBI e Magnetoterapia;
- Proliferação e migração de células endoteliais HUVECS, após lesão mecânica;
- Liberação ou inibição de citocinas pró e antiinflamatórias ( TNF- $\alpha$  ,IL-1, IL-6 , e IL10) e por ensaio imunoenzimático.

## **6. Material e Métodos**

Este estudo foi realizado no laboratório de biotecnologia e de cultivo celular, onde foram utilizados nos estudos células Huvecs, gentilmente cedidas pela Professora Dra. Stella Regina Zamuner da Universidade Nove de Julho.

### **6.1 Células Endoteliais Huvecs**

As células endoteliais Huvecs, oriunda de cordão umbilical foram cultivadas no meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab),

### **6.2 Cultivo Celular**

As Células Endoteliais Huvecs foram mantidas em estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, utilizando microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA).

O subcultivo foi realizado quando a monocamada celular se tornar subconflente para a perpetuação da linhagem celular, sempre em fluxo laminar (Linha 400, Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). Para tanto, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com tampão PBS 1X (NaCl 140mM; KCl 2,5mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM; KH<sub>2</sub>PO 1,4mM; pH 7,4) e desaderidas com solução de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C. Após a incubação, foi realizada nova lavagem com meio, centrifugação a 1200 RPM a 10°C por 5 minutos (Centrifuga Excelsa 4-280R, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente a ressuspensão em 4 ml de meio DMEM.

A viabilidade das células foi avaliada por contagem com corante vital azul de Trypan (0,4%) e assim utilizada nos ensaios às culturas com viabilidade maior que 95%. A seguir, foram realizadas as sementeiras das células, em placas de cultura de 96 poços.

### 6.3 Terapia de Fotobiomodulação

Após a adição de LPS nas células Huvec, foi aplicada a terapia de Fotobiomodulação, utilizando dispositivo marca DMC<sup>R</sup> modelo Laser Therapy XT, sendo aplicado 4J/cm<sup>2</sup> por 40 segundos diretamente no poço pela parte inferior da placa.

A aplicação da Fotobiomodulação ocorreu em ambiente parcialmente obscuro para que não houvesse interferência da iluminação.

Tabela 1 Parâmetro Dosimetria do LBI

Comprimento de onda 660nm
Densidade de energia 4 J/cm <sup>2</sup>
Potência de saída 100 mW
Densidade de potência 0.33 W/cm <sup>2</sup>
Modo de aplicação Pontual
Tempo 40 segundos

Figura:5 Aparelho de Laser



Fonte(Foto arquivo Próprio)

Figura: 6 Placa de 96 Poços



Fonte: (Foto arquivo próprio)

Figura: 7 Aplicação LBI



Fonte(Foto arquivo próprio)

## 6.4 Magnetoterapia

Foi aplicado campo magnético oscilante, diretamente sob a placa de 96 poços. O equipamento utilizado (NVL, Linfospin, Brasil), induzindo um campo magnético oscilante com frequência que varia de (0 a 24 Hz). Foi optado pela frequência de 9 Hz de estudos pilotos prévios os que demonstraram ser a melhor energia para as células de acordo com trabalho de Yoshimura, Zamuner, Aguiar (2020) e tempo de aplicação de 40 segundos. Os ciclos de variações provenientes do aparelho induzem a uma inversão polar.

Através do medidor Gass (TMAG-1T, Globalmag, Brasil precisão de 1mT) o campo magnético na superfície do aparelho era de 3.000G (300 mT).

Figura :8 Aparelho Magneto



Fonte: N° ANVISA 809390-3 (Foto: arquivo próprio)

Figura 9: Poços 96 poços



Fonte: Foto Arquivo Próprio

Figura: 10 Aplicações Magnetoterapia



Fonte: (Foto: arquivo próprio)

## 6.5 Métodos Colorimétricos para Determinação de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi obtida pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo, que se resume em uma análise colorimétrica que de forma indireta mede a citotoxicidade.

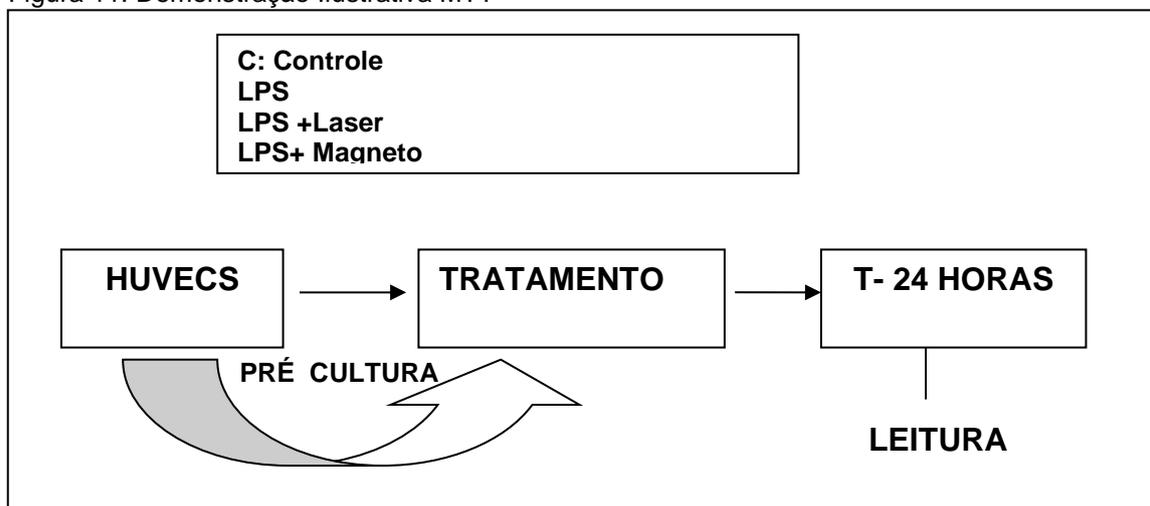
### 6.5.1 Viabilidade por MTT

No ensaio de MTT, a citotoxicidade celular é avaliada através da atividade das enzimas desidrogenase mitocondriais. Estas enzimas têm a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado. Após a solubilização com isopropanol, obtém-se uma solução cuja absorvância pode ser medida, sendo que a intensidade da cor mensurada será diretamente proporcional a quantidade de células viáveis.

Após os procedimentos de cultivo celular,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 96 poços para estudo dos grupos C (controle), L (LPS), T (LPS + LASER) e M (LPS+MAG) e armazenada em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas, decorrido este tempo necessário para aderência celular, foi adicionado o LPS, 100ug/μl, onde foi realizada a seguinte solução: (1 μl de LPS + 1000 μl de DEMEM + SFB 10%), desta solução 1μL foi acrescentado a cada dos grupo L(LPS), grupo T(LPS+ LASER) e grupo M (LPS+Magneto), realizou-se imediatamente o tratamento com Laser sob os poços individualmente por 40 segundos a 4 Joule por cm<sup>2</sup> a 660 nm no grupo T e aplicação do magneto sob os poços a freqüência de 9 Hz por 40 segundos. Depois de decorrido o tempo de tratamento, as placas foram novamente incubadas em estufa a 37°C e 5%CO<sub>2</sub> por 24 horas, decorrido este tempo de incubação os poços foram lavados com 100 μL de PBS e em seguida adicionou-se MTT (Thiazolyl Blue TETRAZOLIUMBROMIDE - SIGMA M5655) em uma concentração de 50 μL (0,5mg/mL), por poço, procedendo-se então a incubação das placas na estufa (HEPA class 3110, Thermo Electron Corporation, Marietta, OH, EUA) a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por um período de

aproximadamente 4 h. após este período todo o líquido presente nas placas foi retirado, e adicionou-se então 100µL de isopropanol, permitindo a quebra dos cristais que se formaram. Foi realizada então a leitura de absorbância, utilizando-se uma leitora ELISA (620nm).

Figura 11: Demonstração Ilustrativa MTT



Linha de Tempo Fonte: Elaborado pelo Autor, adaptado Trabalho mestrado UFRN-2019

### 6.5.2 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração Celular após Lesão Mecânica em Células Huvecs.

As células Huvecs, na proporção de  $1 \times 10^4$  por poço, de passagem 2, foram semeadas em lamínulas colocadas em placas de 24 poços, Após a Aderência das células nas lamínulas, foi adicionado 100µl de LPS nos grupos L, (LPS), T(LPS+ Laser) e M (LPS+ Magneto), deixada por 24 horas em estufa 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>, depois de decorrido este período, retirou-se as placas da estufa, levou ao fluxo laminar e realizou-se a lesão mecânica utilizando uma ponteira de pipeta branca.

As fotos de todos os grupos foram capturadas em microscópio invertido de fase (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), marcando como 0 hora, em seguida levada a estufa por mais 24 horas, no dia seguinte novas imagens foram capturadas novamente os poços marcados como 24 horas e realizou-se a comparação entre os grupos .

## 6.6 Ensaio de ELISA

Para o ensaio de expressão dessas citocinas, as células foram plaqueadas com 2.000.000 de células Huvec em cada poço. Após esse período, as células receberam estímulo de LPS de 100µL por poço, incubadas por 24 horas.

O sobrenadante foi removido dos poços. O ensaio imunoenzimático (Elisa). As dosagens foram feitas com Kit R&D Systems (menneapolis, MN, USA). As placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina para humano, diluído em PBS por 12hs. Em seguida as placas foram lavadas com solução de PBS 0,05% de Tween 20.

Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1h. As placas foram lavadas para a remoção da solução de bloqueio.

Em seguida, as amostras (100µl) e as curvas foram colocadas nos respectivos poços e incubadas por 2hs. Ao final do período de incubação as placas foram lavadas.

O anticorpo de detecção foi adicionado conjugado a peroxidase e incubado por 2hs. As placas foram novamente lavadas e assim adicionadas o substrato da peroxidase (tetrametilbenzidina) deixando reagir de 15 a 20 minutos. Ao final da incubação, foi adicionado solução de parada (H<sub>2</sub>so<sub>4</sub>-2N). e incubadas em ambiente escuro por 30 minutos. As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## **7. Análise Estatística**

Para a análise dos dados foram utilizados valores médios, desvio padrão e análise de variância (ANOVA) de uma via, com auxílio do software 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). Graph Pad In Stat versão 3.01. Foram realizados pós testes Tukey e considerada aceitável estatisticamente significativa, quando  $p < 0,05$ . Todas as amostras foram feitas em quadruplicadas.

## 8. Resultados

### 8.1 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Viabilidade de Células Huvecs .

A análise da viabilidade celular foi realizada utilizando o ensaio do MTT nas células Huvecs com estímulo de LPS por 24 h. Após esse período, as células do grupo LPS+LASER receberam a aplicação pontual por 40 seg. a 660 nm e as células do grupo LPS+MAGNETO receberam aplicação por 40 seg. a 9 Hz.

A leitura de cada poço foi realizada no espectrofotômetro na regulação de 620 nm.

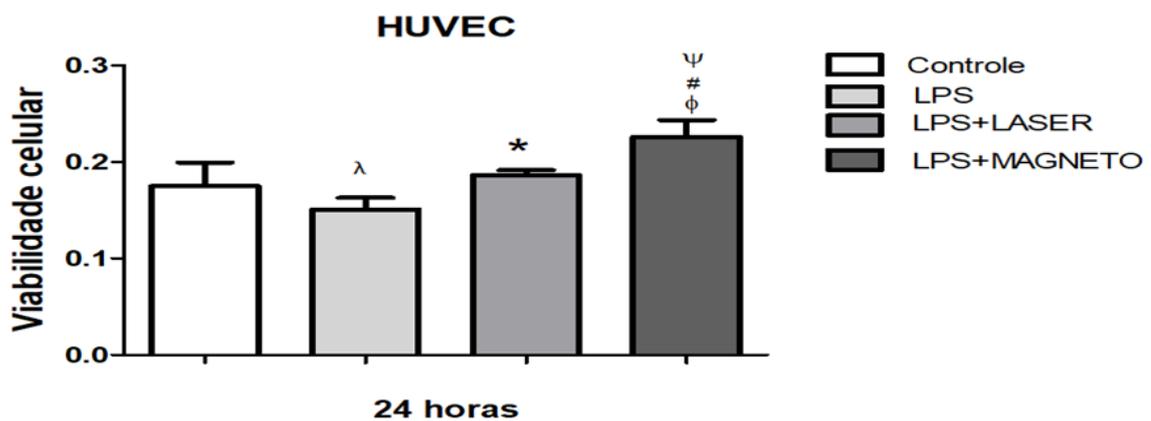


Figura 12. Efeito do LBI e MAG na viabilidade celular de células Huvecs, foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, as células receberam estímulo de LPS por 24 h. Após 24h do LPS aplicado, as células do grupo LPS+LASER receberam a aplicação pontual do laser por 40 segundos e as células do grupo LPS+MAGNETO receberam aplicação com o aparelho magneto por 40 segundos. Cada valor representa a média ± SEM de três experimentos independentes. \*p<0,05 vs LPS; #p<0,01 vs C; φp<0,001 vs LPS; Ψ p < 0,05 vs LPS + LASER ;λ p<0,05 vs C.(ANOVA).

### 8.1.2 Efeito da Terapia com LBI e Magnetoterapia na Migração Celular após lesão Mecânica em Células Huvecs.

A realização de todo o processo descrito no material e método item 6.5.2, efetuou-se comparação entre as imagens captadas no microscópio invertido (Eclipse TE 2000U, Nikon, Melville, NY, EUA), células integras (controle), grupo L(LPS), grupo T(LPS+LASER) e grupo M(LPS+MAGNETO), em 0 hora e 24 horas, observou-se que ambos os tratamentos (LASER e MAGNETO), apresentaram um resultado superior aos grupos LPS e Controle, podendo ser observados no grupos LASER e MAGNETO a formação de pequenos vasos, corroborando a eficácia do experimento.

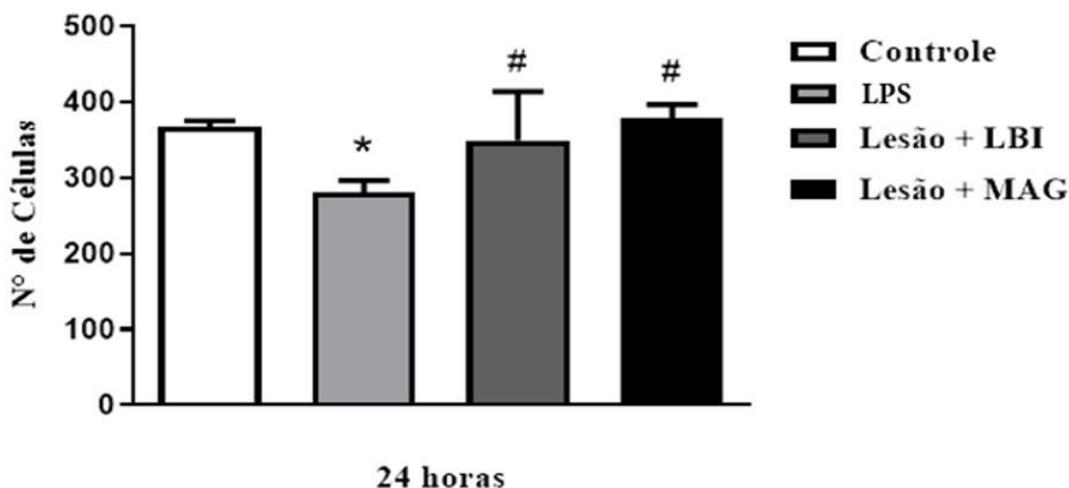
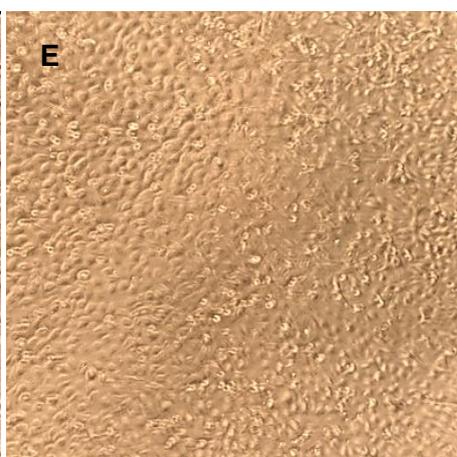
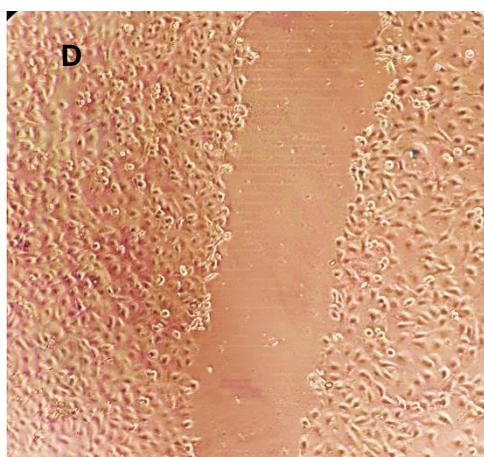
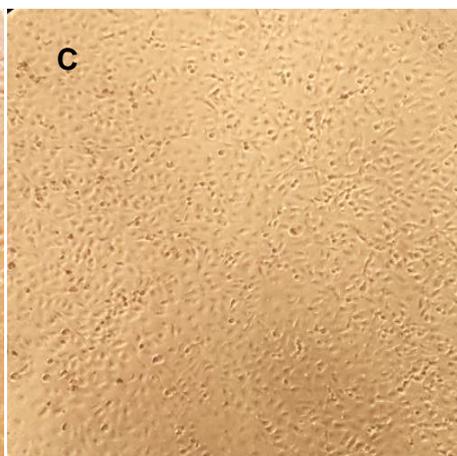
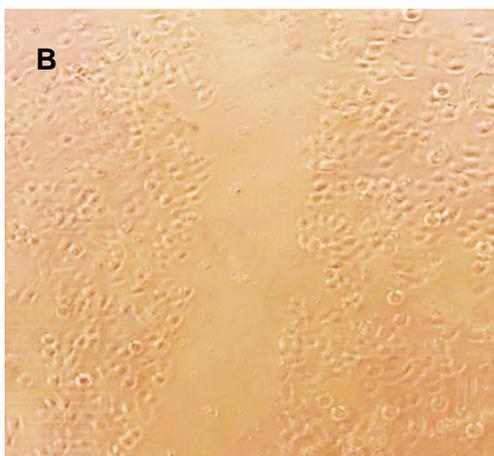
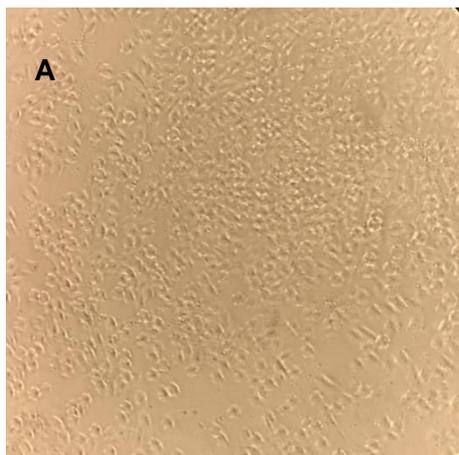
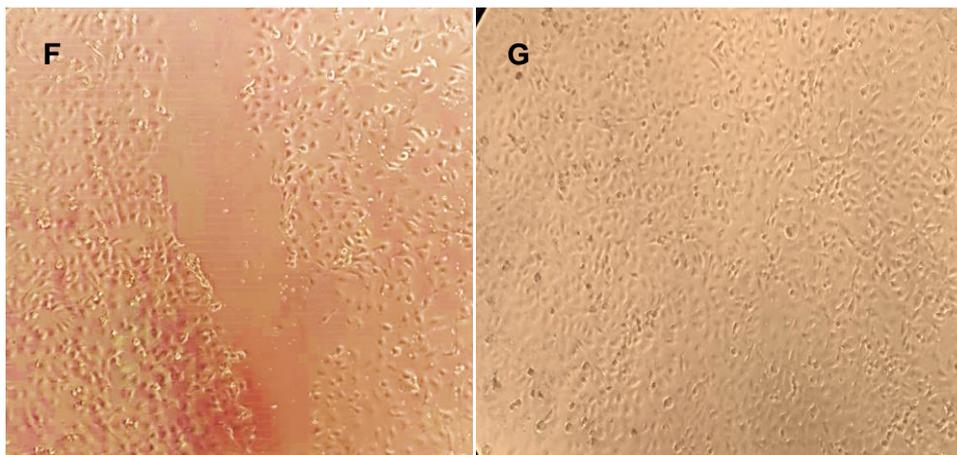


Figura 13. Efeito do LBI e MAG na migração de células Huvec. (A) Células integras, (B, D e F) ruptura causada por fricção, (C) migração natural 24h. Migração após 24h com uso do LBI 660nm (E) e migração após 24h com utilização da MAG (G) a 9 Hz. A contagem de células foi realizada utilizando o programa imageJ, onde foi calculada a média de quatro imagens. Barra de escala  $200\ \mu\text{m}$  e objetiva de 10x. Em (H), gráfico que mostra contagem de células de quatro imagens, \*  $p < 0,05$  vs C; #  $p < 0,05$  vs Lesão MN. (segundo L.F Zamumer).





Efeito do LBI e MAG na migração de células HUVECs(A) Células integras, (B, D e F) ruptura causada por fricção, (C)migração após LPS 24h.(E) Migração após 24h com uso do LBI ;(G) migração após 24h com utilização da MAG.

### 8.1.2 Ensaio de ELISA para Citocinas Pró e Antiinflamatórias

Para o ensaio de expressão dessas citocina, o sobrenadante foi removido das células no tempo de 24 horas por meio do ensaio imunoenzimático (Elisa). As dosagens foram feitas com Kit R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). As placas de 96 poços foram adsorvidas com anticorpo de captura monoclonal anti-citocina para humano, diluído em PBS por 12hs. Em seguida as placas foram lavadas com solução de PBS 0,05% de Tween 20; os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 1% de BSA (soro albumina bovina – Sigma) por 1h. As placas foram lavadas para a remoção da solução de bloqueio. Em seguida, as amostras (100µl) e as curvas foram colocadas nos respectivos poços e incubadas por 2h. No fim do período de incubação as placas foram lavadas; o anticorpo de detecção foi adicionado conjugado a peroxidase e incubado por 2h. As placas foram novamente lavadas e adicionadas o substrato de peroxidase (tetrametilbenzidina) deixando reagir de 15 a 20 minutos. Ao término da incubação, adicionou-se uma solução de parada (H<sub>2</sub>so<sub>4</sub>-2N). As citocinas foram quantificadas pela leitura da absorbância (450nm) usando leitor de placas Spectramax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA

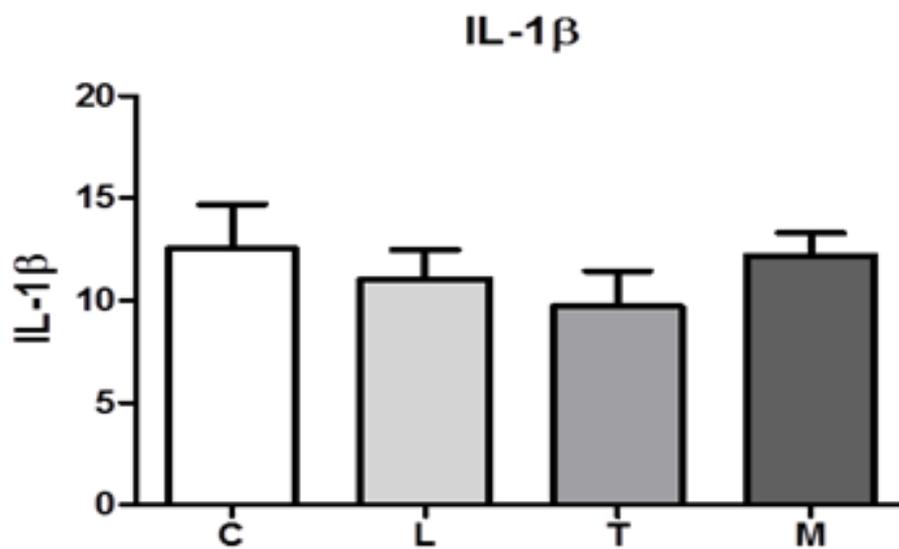


Figura 15: O efeito do tratamento dos grupos T (LPS+ Laser) e M (LPS+Magneto), não apresentaram significância estatística comparados ao grupo L (LPS) e C (Controle)

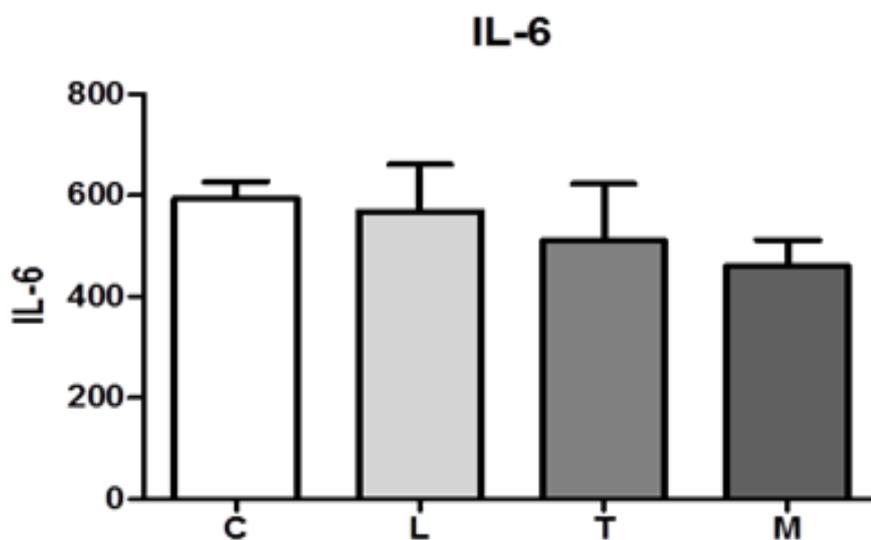


Figura 16: Os grupos T (LPS+ Laser) e M (LPS+ Magneto), não apresentaram significância estatística em coração aos grupos L (LPS) e C (Controle)

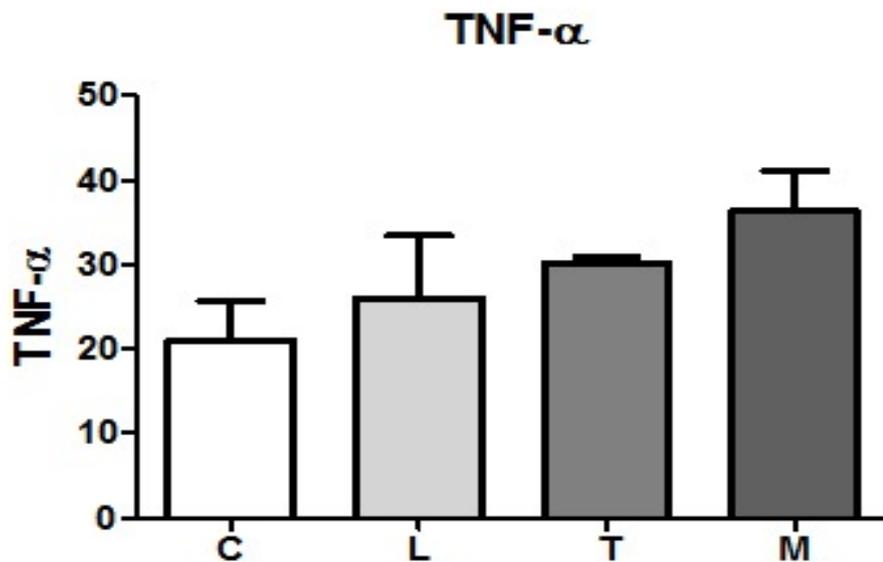


Figura 17: Os grupos T (LPS+Laser) e M (LPS+Magneto), não apresentaram significância estatística comparados aos grupos L (LPS) e C (Controle).

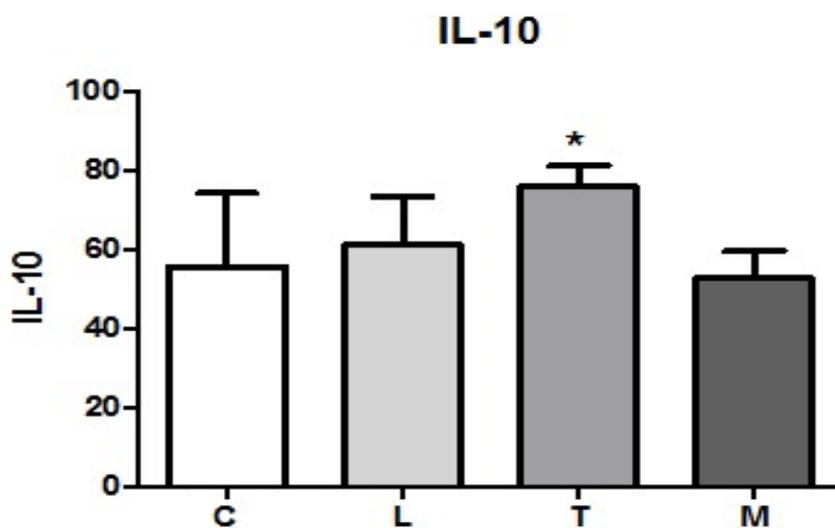


Figura 18: O grupo T (LPS+Laser), apresentou significância estatística sobre os grupos C (Controle), L (LPS) e M (LPS+Magneto).

## 9. Discussão

A cultura de células proporciona ao pesquisador ambiente propício para desenvolvimento de experimentos, pois tem a possibilidade de controle rigoroso de diversas variáveis<sup>69</sup>. Portanto, os estudos *in vitro* utilizando a terapia por LBI e MAG, podem se tornar importantes alternativas de tratamento *in vivo*, oferecendo uma maior segurança e eficácia na utilização destes recursos<sup>68</sup>.

Em nossos experimentos o LPS, altamente citotóxico, extraído na membrana de células gram-negativas, foi utilizado em células Huvecs.

Em relação à viabilidade celular através do teste de MTT, o estudo demonstrou que a Fotobiomodulação por LBI 4 J/cm<sup>2</sup>, comprimento de onda de 660nm por 40 segundos, proporcionou um aumento na viabilidade das células Huvecs, comparadas ao grupo L (LPS), resultado que corrobora com estudos anteriores, com utilização de comprimento de onda 660nm e 4 a 8 J/cm<sup>2</sup><sup>68</sup>.

Destacamos que o tratamento do grupo M (LPS+Magneto) a 9 Hz por 40 segundos, mostrou ser superior a todos os outros grupos estudados. A escassez de trabalhos com magneto em tratamento de células Huvecs, se fez mister devido ao presente estudo se tornar norteador de experimentos futuros na área.

O presente estudo também avaliou a migração e proliferação celular após lesão mecânica com ponteira de pipeta branca, onde foi utilizada solução de LPS nos grupos L(LPS), T(LPS+LASER) e M(LPS+MAGNETO) foi captada imagem no microscópio invertido em 0 hora e 24 horas e comparadas entre os grupos. A contagem de células foi realizada utilizando o programa image J, onde foi calculada a média de quatro imagens. Barra de escala | 200 µm | e objetiva de 10x. (One-way ANOVA). Onde os grupos T (LPS+LASER) e M(LPS+MAGNETO) demonstraram uma eficácia migratória e proliferativa superior ao grupo (LPS) e grupo C(Controle), Observa-se nas lamina formação de pequenos vasos em ambos os tratamentos.

Nas dosagens de citocinas por ensaio imunoenzimático, não foram observadas significância estatística entre os grupos C (controle), L (LPS), T (LPS+Laser) e M (LPS+magneto), na expressão de citocinas pró inflamatória, na citocina IL-10 antiinflamatória o tratamento com Laser grupo T(LPS+Laser), mostrou uma significância estatística, frente aos outros grupos, o tratamento resultou em uma maior expressão desta citocina.

Os presentes resultados corroboram com a maioria dos trabalhos publicados sobre células Huvecs e o efeito do laser (LBI). Já quanto ao tratamento com magneto, em células Huvec, observa-se uma ausência total de publicações, ou seja, este estudo demonstrou ser um marco inicial para tratamentos menos invasivos futuros.

## **Conclusões**

Após todos os resultados serem compilados a conclusão foi que o tratamento de Fotobiomodulação (LBI) e Magnetoterapia demonstraram serem eficientes nos experimentos.

A viabilidade das células Huvec demonstrou uma melhor resposta tanto no grupo T (LPS+Laser) quanto no grupo M (LPS Magneto).

Após a realização da lesão mecânica, na células Huvec, evidenciaram ter maior proliferação e migração quando comparados com os demais grupos.

Os resultados do experimentos com a utilização do (LPS+ Laser), denotou ser decisivo na expressão de citocina IL-10(antiinflamatória),contudo não apresentou resposta significativa referente as expressão das citocinas pró-inflamatórias.

A realização dos experimentos, e seus resultados, capacitam as terapias de Fotobiomodulação e Magnetoterapia a integrarem alternativa terapêutica *in vivo*, porem, sendo necessário mais estudos em animais e clínicos

para determinação de dosimetrias seguras e eficazes para distintas enfermidades em pacientes.

A terapia utilizada segue uma tendência Brasileira (SUS) e Mundial para que os tratamentos venham ser cada vez menos invasivos e eficientes.

## Considerações Futuras

Com a escassez de publicações sobre a atuação da Magnetoterapia no tratamento de células Huvecs, este trabalho tem o intuito de servir como marco inicial para estudos futuros.

As terapias empregadas mostram ser eficazes, portanto uma melhor abordagem e aprofundamento, com mais estudos seria de grande valia para uma possível inclusão do tratamento *in vivo* no Sistema Único de Saúde, devido ao baixo custo e segurança ao Paciente.

## Referências Bibliográficas

1. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1631-74.
2. Silverthorn, D.U. (2017). *Fisiologia humana: uma abordagem integrada 7ª ed* ed. Porto Alegre: Artmed

3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
4. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 1992;359(6398):843-5.
5. Junqueira, L.C.; carneiro, J.; abrahamsohn, p. (2017). *Histologia básica: texto e atlas* 13<sup>a</sup> ed. Ed. Rio de janeiro: guanabarakoogan
6. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *Biomed Res Int*. 2014;2014:801896.
7. Pennathur S, Heinecke JW. Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease. *CurrDiab Rep*. 2007;7(4):257-64.
8. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171(3):223-9.
9. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Defective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996;94(6):1298-303
10. Badimon L, Romero JC, Cubedo J, Borrell-Pagès M. Circulating biomarkers. *Thromb Res*. 2012;130(Suppl 1):S12-5.
11. Tizard, I. R. Imunidade inata: inflamação. In: *imunologia veterinária - uma introdução*. 6.ed. São paulo: rocca, 2002. Cap. 5, p. 39-45.
12. SNYDER S.H., BREDET D.S. Biological role of nitric oxide. *Scientific American*. New York, v. 266, p. 68-77, 1992.
13. Bahia, I. Endotélio e aterosclerose. *Revista da sociedade de cardiologia do estado do rio de janeiro*. Rio de janeiro, v. 17, n. 1, p. 26-32, jan-mar. 2004.
14. Murray, M. R.; kopech, G. A. *Bibliography of the research in tissue culture 1884 to 1950*, new york and london: academic press, vol. 5, 1953
15. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. V. 386, p. 671-4, 1997
16. Junqueira, I. C. U.; carneiro, j. *Histologia básica*. In: *órgãos dos sentidos*. 8.ed. Rio de janeiro: guanabarakoogan, 1995. P. 433
17. Rhodin, J. A. G. Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *Journal of Ultrastructure Research*. New Haven, v. 25, p. 452-485, 1968.

18. Alberts, B.; et al. (2017). *Biologia molecular da célula* 6ª ed. Ed. Porto alegre: artmed
19. gutstein, D. E.; liu, f. Y.; meyers, M. B.; choo, A.; fishman, G. I. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *Journal of cell science*. London, v. 116, n. 5, p. 875-885, 2003.
20. Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação celular: revisão de literatura. *Vercolbrascir.*;37, n. 4, 295-302, 2010.
21. Leinonen E, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Hultén LM, Hiukka A, Taskinen MR. Insulin resistance and adiposity correlate with acute-phase reaction and soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2003;166(2):387-94. Pmid:12535753. [Http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9150\(02\)00371-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9150(02)00371-4)
22. Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature*, n. 420, p. 853-859, 2002.
23. Fallavena, P. R.; borges, T. J.; paskulin, D. D.; paludo, F. J.; goetze, T. B.; oliveira, J. R.; nóbrega, O. T.; dias, F. S.; alho, C. S. The influences of CD14 - 260C>T polymorphism on survival in ICU critically ill
24. Tizard, I. R. Imunidade inata: inflamação. In: *imunologia veterinária - uma introdução*. 6.ed. São Paulo: ROCCA, 2002. Cap. 5, p. 39-45.
25. Gordon JP, Zeiger HJ, Townes CH. The maser—new type of microwave amplifier, frequency standard, and spectrometer. *Physical Review*. 1955;99(4):1264.
26. Chavantes MC, Tomimura S. *Princípios do Laser*. Capítulo 1-5. *Laser em Bio-Medicina: Princípios e Prática* Chavantes, MC (ed) Atheneu, São Paulo, Brasil 2009a. 2009:1-70.
27. Chavantes MC, Tomimura S. *Classificação dos laser*. *Laser em bio-medicina: princípios e prática* São Paulo: Atheneu. 2009:51-60.
28. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989; 56(5):691-704.
29. Chavantes MC. *Laser em Bio-Medicina: Princípios e Prática*. São Paulo: Atheneu. 2009:33-45.
30. Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci*. 1988;2(1):53-74.
31. Basford JR. Low-energy laser therapy: Controversies and new research findings. *Lasers in surgery and medicine*. 1989;9(1):1-5.

32. Palmeira PTSS, Santos MESM, de Vasconcelos Catão MHC. Capítulo 6 Influência do Laser Terapêutico na Osseointegração dos Implantes Dentários. Odontologia: os desafios do mundo contemporâneo 2.
- 33 Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Therapy*. 2005;23(2):161-6.
34. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *Journal of clinical laser medicine & surgery*. 2004;22(2):141-50.
35. Henriques ACG, Cazal C, Castro JFL. Ação da laserterapia no processo de proliferação celular: revisão de literatura. *Ver colbrascir*.;37, n. 4, 295-302, 2010.
36. Catão MHC. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Revbraspatol Oral*. 3:214-8, 2004.
37. Karu TI, Kalendo GS, Letokhov VS. Biostimulation of helecels by low intensity visible light. *NuovocimD*, v. 1, n. 6, p. 828, 1982.
38. Holanda VM, Chavantes MC, Wu X, Anders JJ. The Mechanistic Basis for Photobiomodulation Therapy of Neuropathic Pain by Near Infrared Laser Light. *Lasers in Surgery and Medicine*.49(5):516-524, 2017.
39. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23(4):355-61.
40. Carnevalli CMM, Soares CP, Zângaro RA, Pinheiro ALB, Silva NS. Laser light prevents apoptosis on Cho K-1 cell line. *J Clin Laser Med Surg*. 2003; 1(4):193-6
41. Yoshimura TM, Meneguzzo DT, Lopes-Martins RAB. A pilot study—acute exposure to a low-intensity, low-frequency oscillating magnetic field: effects on carrageenan-induced paw edema in mice. *Revista Brasileira de Física Médica*. 2011;5(1):53-6.
42. Meyer PF, Paiva A, Cavalcanti S, da Silva EM, da Silva RMV, de Souza Costa L, et al. Magnetoterapia: é possível este recurso fazer parte da rotina do fisioterapeuta brasileiro *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 2011;36(1).
43. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr Dental J*. 42:247-54, 1997.
44. Goodman R, Wei LX, Chu J, Xu A. Exposure of human cells to low-frequency electromagnetic fields results in quantitative changes in transcripts. *Biochim Biophys Acta*, 1009 (3):216-20, 1989.

45. Gutstein, D. E.; liu, F. Y.; meyers, M. B.; choo, A.; fishman, g. I. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *Journal of cell science*. London, v. 116, n. 5, p. 875-885, 2003.
- 46) Aird, W.; “phenotypic heterogeneity of the endothelium i. Structure, Function, And Mechanisms”; *Circulation Research*; 100:158-173 (2007a)
47. Pinto NC, Pereira HC, Stolf NAG, Chavantes MC. Laser de baixa intensidade em deiscência aguda safenectomia: proposta terapêutica. *Revbrascircardiovasc.* ;24(1), P. 88-91, 2009.
48. Chavantes MC. Laser em Problemas Cardiorrespiratória. In: Chavantes MC (ed). *Laser em Biomedicina*. Atheneu. São Paulo, 2009: P.149-181.
49. Chavantes MC, Holanda VM, Pinto NC, Belotto RA, Zamuner SR, Duarte IS. Aplicações de Terapias com Laser em Medicina. In: Fernandes, Ferrari, França (eds). *Biofotônica: Conceitos e Aplicações*. 2017. UNINOVE, São Paulo. Cap. 13. P- 222-242.
50. Ablon G. Fototerapia com diodos emissores de luz: tratamento de uma ampla gama de condições médicas e estéticas em dermatologia. *J clinaesthetDermatol*. 2018; 11 (2): 21–27.
51. Yan QC, Tomita N, Ikada Y. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. *Medical engineering & physics*. 1998;20(6):397-402.
52. Meyer, P. F., Paiva, A., Maria, E., Marcel, R., Costa, L. D. S., & Ronzio, O. A. (2010). Magnetotherapy : can this resource be part of Brazilian physiotherapist routine ? *Arquivos Brasileiros de Ciências Da Saúde*, 36(1),35–39.
53. Hug, K., & Roosli, M. (2012). Review Therapeutic Effects of Whole-Body Devices Applying Pulsed Electromagnetic Fields ( PEMF ): *Bioelectromagnetics*, 33, 95– 105
54. Markov, M. S. (2007a). Expanding Use of Pulsed Electromagnetic. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 26, 257–274
55. Wu, k.; thiagarajan, p.; “role of endothelium in thrombosis and hemostasis”; *annual reviews of medicine*; 47:315-331 (1996
56. Chapellier, P. Le, & Matta, B. (2010). Cellular Perception and Static Magnetic Fields Active Penetration Depth for Pain Magnetotherapy. *Piers*, 6(3), 287–292
57. Sekino, S. Y. A., Sekino, M. S., & Eno, S. U. (2011). Biological effects of.
58. Markov, M. S. (2007b). Pulsed electromagnetic field therapy history , state of the art and future. *Environmentalist*, 27, 465–475.

59. Gaynor, J. S. (2015). Energy Modalities. In J. S. Gaynor & W. W. Muir III (Eds.), *Handbook of Veterinary Pain Management* (Third Edit, pp. 359–361). Elsevier Mosby
60. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:607-615. Pmid:21818123.
61. Brevetti G, De Caterina M, Martone VD, et al. Exercise increases soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in patients with intermittent claudication. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001;24:193-199. Pmid:11455059.
62. Libby P.; ordovas J.M.; auger K.R.; et al. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am j pathol* , v. 124, p. 179-85, 1986.
63. Tuzcu E.M.; kapadia S.R.; tutar E.; et al. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* , v. 103, p. 2705-10, 200
64. Chavantes,MC et al, *Laser em BIO-MEDICINA, Princípios básicos: guia prático para iniciantes,pesquisadores e discentes na área da saúde e exatas* ,Ed. Atheneu2009.
65. Delogue G. Antonucci A, Signore M, et al Plasma Levels of IL 10 and nitric oxide under two different anesthesicregimens.*Eur J Anesth* 2005;22:462-6
66. Tsuei BJ, Bernanrd AC, Shane MD, et al Surgery induces human mononuclear cell arginase I. Expression .*J. Trauma* 2001; 51: 497-502
67. Leme, J.G.; de Mello, S.B.V.; Falcão, R.P. & Rocha, J.R.O.: Lymphocytes in non-immune inflammation: a specific subclass of lymphoid cells? *Br. J. exp. Path.* 62: 172-181.
68. Diego ,FA: Efeito da Fotobiomodulação na proliferação e viabilidade de células endoteliais da veia Umbilical Humana (HUVEC)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN-Centro de Biociência\_CB-Natal/RN-2019
69. Johns LD.Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: the frequency resonance hypothesis. *J AthlTrain.* 37(3):293-9, 2002.
70. Aldhahi W, hamdy O, Adepokines, inflammation, and the endethelium in diabetes. *Curent diabetes reports* v.3,n4, p.293
71. Dinarello, C. A. Proinflammatory cytokines. *CHEST Journal*, v. 118, n. 2, p. 503-).
72. Cotran, R. S, kumar, V., collins, T *Patologia Estrutural e Funcional.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.

73. Tizard, I.R. Citocinas e sistema imune. In: Tizard, I.R. *Imunologia Veterinária: uma introdução*. 6 ed. São Paulo: Roca, p.140-153, 2002; ABBAS, A.K; LICHTMAN, AH. *Imunologia básica: Funções e distúrbios do sistema imunológicos*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 314p).

74. Feghali, C.A.; wright, T.M. Cytokines in acuteandchronicinflammation. *Front. Biosc.*, v. 2, p. d12-26, 1997

75. Beutler,]B.; cerami, A. The common mediatorofshock, cachexiaand tumor necrosis. *Adv. Immunol.*, v. 42, p. 213-231, 1988.

76. Warren, J,S,.Interleukinsand tumor necrosisfactor in inflammation*Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, v. 28, p. 37-59, 1990.

77. Hirano, T. The biologyof interleukin-6. *Chem, Immunol.*, v. 51, p. 153-182, 1992.

78. Suffredini, A.F; fantuzzi, G.; badolato, R.; oppenheim, J.J.; O'grady, N.P. New insights intothebiologyoftheacute phase response. *J. Clin. Immunol.*, v. 19, p. 203-214, 1999.

79. Gadiant R.A.; patterson, P.H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*, v. 17, p. 127. 137. 1999.

80. Cerretti, D.P; kozlosky, C.J; mosley, B.; nelson, N.; van ness, K.; greenstreet, T.A. et al. Molecular cloning of the IL-1 $\beta$  processing enzyme. *Science*, v. 256, p. 97-100.

81. Thornberry, N.A.; bull, H.G.; calaycay, J.R; chapman, K.T.; howard, A.D.; kostura, M.J. et al. A novel heterodimeric cysteine protease 18 required interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, v. 356, p. 768-774, 1992.

82. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: a potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*...2015;74(1):27-34...doi:...10.1016/j. cyto.2014.10.031

83. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL 10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170-81. doi: 10.1038/nri2711.

84. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*...2008;226:205-18...doi:...10.1111/j.1600- 065X.2008.00706.x

