



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

ALINE TADEU FIGUEIREDO SALU CATOIA

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED 810nm
ASSOCIADA A FATORES DE CRESCIMENTO EM
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.

São Paulo, SP

2025



ALINE TADEU FIGUEIREDO SALU CATOIA

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO COM LED 810nm
ASSOCIADA A FATORES DE CRESCIMENTO EM
FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.**

**Dissertação apresentada à Universidade Nove de Julho,
para obtenção de título de Mestre em Medicina Biofotônica.**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro
Rodrigues.**

São Paulo, SP

2025



FICHA CATALOGRÁFICA

Catoia, Aline Tadeu Figueiredo Salu.

Efeito da fotobiomodulação com LED 810nm associada a fatores de crescimento em fibroblastos dérmicos humano. / Aline Tadeu Figueiredo Salu Catoia. 2025.

54 f.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2025.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues.

1. Fibroblastos. 2. Fotobiomodulação. 3. Infravermelho. 4. Fatores de crescimento. 5. Colágeno.

I. Rodrigues, Maria Fernanda Setúbal Destro. II. Título

CDU 615.831



São Paulo, 17 de dezembro de 2025.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Aline Tadeu Figueiredo Salu Catoia

Título da Dissertação: "Efeito da fotobiomodulação com Led 810nm associada a fatores de crescimento em fibroblastos dérmicos humanos".

Presidente: PROF^a. DR^a. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES

Membro: PROF. DR. RODRIGO LABAT MARCOS

Membro: PROF^a. DR^a. MARIA STELLA MOREIRA Maria Stella Moreira

DEDICATÓRIA

A Cristo Jesus, que me deu essa grande oportunidade de estudo para contribuir com a ciência e por me permitir ter essa formação. Por minhas forças e condições financeiras, não teria conseguido. Deus é tremendo em tudo que faz e esse presente foi muito além do que pensava ou imaginava. Obrigada por me capacitar, estar ao meu lado o tempo todo e por me sustentar nos momentos de fraqueza.

Ao meu esposo Thiago, que em todo momento me apoiou, acreditou e esteve ao meu lado. O seu amor e o seu abraço fizeram diferença todas as vezes que me sentia incapaz. A sua paz e suas palavras em dizer que “tudo vai ficar bem”, “você vai conseguir”, foi como um fôlego para prosseguir. Essa conquista também é sua.

A minha mãe Andrea, que desde pequena reforçava a importância do estudo “para ser alguém na vida”. Ainda que a dificuldade do ensino público no país seja inerente, e essa tenha sido minha realidade de escola da prefeitura e estadual, minha mãe nunca deixou os filhos pararem de estudar. Obrigada por ser a melhor mãe do mundo, te amo eternamente.

Aos meus irmãos, Robson, Rafael e Isabela, por todo apoio, incentivo e carinho. Vocês foram fundamentais. A “mestra” está chegando.

Obrigada a cada um, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A realização dessa pesquisa foi graças a Universidade Nove de Julho, pelo apoio, incentivo e excelente estrutura educacional.

À professora Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, que aceitou realizar esse projeto em uma linha de trabalho diferente da que estava habituada, mas que com toda sua expertise compartilhou seu conhecimento, com paciência e diligência.

Às minhas companheiras de pesquisa, Erika e Roberta, cada uma com sua habilidade e experiência, tornou esse trabalho muito enriquecedor e com trocas valiosas. Juntas, esse caminho foi incrível e eu aprendi muito com cada uma.

Ao professor e amigo Marcelo, por enxergar a aluna Aline lá na graduação de uma forma diferente e por me mostrar os “caminhos das pedras”. Nunca imaginei chegar até aqui. Você foi o primeiro contato nesse universo de pesquisa acadêmica e sem o seu suporte, provavelmente não estaria digitando essas palavras hoje.

Ao meu trabalho, Núcleo GA, que foram compreensíveis em momentos que precisei me ausentar para ir ao laboratório, ao biotério, para cursar as matérias obrigatórias e por me incentivar a continuar os estudos. Se não fosse a compreensão e flexibilidade da empresa, da minha gestora Aline Cintra e do médico dr. Gabriel Almeida, o caminhar seria mais árduo. Obrigada por acreditarem em mim e por toda força. Jamais irei esquecê-los. A minha gratidão será eterna.

À Universidade de São Paulo (USP), pela infraestrutura e suporte que permitiram o desenvolvimento desta pesquisa com excelência.

Aos setores administrativos do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, pelo suporte constante, organização e empenho em garantir o bom andamento do programa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, cujas disciplinas foram fundamentais para a construção dos conhecimentos teóricos e práticos que embasaram esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta pesquisa se tornasse realidade, o meu muito obrigada!

FINANCIAMENTOS

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE) - PROGRAMA DE BOLSAS PARA A FORMAÇÃO DO PESQUISADOR.

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM APOIO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) – PROCESSO: 88887.940981/2024-00.

RESUMO

A constante busca por tratamentos antienvhecimento vem sendo uma crescente em todo o mundo, onde a todo momento surgem novas tecnologias no ramo da estética, produtos dermocosméticos e injetáveis, além de protocolos e combinações para retardar esse processo. O envelhecimento é multifatorial, englobando fatores intrínsecos e extrínsecos, mudanças físicas como perda da elasticidade, aparecimento de rugas em todo o corpo e acúmulo de células senescentes. Neste estudo, avaliou-se o efeito isolado e combinado da fotobiomodulação infravermelha (FBMIV, 810 nm) e dos fatores de crescimento (FCs) (TGF- β 3, IDP2 e IGF) sobre fibroblastos dérmicos humanos. Assim, foram constituídos seis grupos experimentais: Controle, FC (1:1), FC (1:3), FBMIV, FC (1:1) + FBMIV e FC (1:3) + FBMIV. A irradiação foi feita utilizando-se o equipamento LEDbox (BioLambda, Brasil), com LED 810nm, 5,04 J/cm², 49 mW/cm², 102s de exposição e 8,16J. Após a irradiação, foi realizada análise da viabilidade celular e avaliação da expressão dos genes *COL1A1*, *COL3A1*, *TGF- β 1* e *Elastina*. Os resultados mostraram que a diluição 1:3 dos FCs manteve viabilidade celular semelhante ao controle em todos os períodos avaliados, sendo esta selecionada para avaliação da expressão gênica. A expressão dos genes *COL1A1*, *COL3A*, *Elastina* e *TGF- β 1* foi aumentada significativamente tanto nos tratamentos FBMIV quanto FC (1:3) isolados, enquanto a combinação FBMIV + FCs não apresentou efeito aditivo. Desta maneira, tanto a FBMIV quanto o tratamento com os fatores de crescimento (TGF- β 3, IDP2 e IGF) mostraram-se eficazes, de forma independente, na modulação positiva de genes da MEC em fibroblastos dérmicos humanos. Entretanto, a associação entre ambos os tratamentos não potencializou os efeitos isolados. Esses resultados reforçam o potencial da FBMIV como terapia bioestimuladora isolada e sugerem que ajustes de concentração, dose e tempo de aplicação poderão revelar novas possibilidades combinadas para estratégias de rejuvenescimento cutâneo.

Palavras-chave: Fibroblastos, fotobiomodulação, infravermelho, fatores de crescimento, colágeno.

ABSTRACT

The constant search for anti-aging treatments has been growing worldwide, with new technologies in the field of aesthetics, dermocosmetic products, and injectables emerging all the time, along with new protocols and combinations designed to delay this process. Aging is multifactorial, encompassing intrinsic and extrinsic factors, as well as physical changes such as loss of elasticity, the appearance of wrinkles throughout the body, and the accumulation of senescent cells. In this study, the isolated and combined effects of infrared photobiomodulation (FBMIV, 810 nm) and growth factors (GFs) (TGF- β 3, IDP2, and IGF) on human dermal fibroblasts were evaluated. Six experimental groups were established: Control, GF (1:1), GF (1:3), FBMIV, GF (1:1) + FBMIV, and GF (1:3) + FBMIV. Irradiation was performed using the LEDbox device (BioLambda, Brazil) with an 810 nm LED, 5.04 J/cm², 49 mW/cm², 102 seconds of exposure, and 8.16 J of energy. After irradiation, cell viability was analyzed, and the expression of the genes *COL1A1*, *COL3A1*, *TGF- β 1*, and *Elastin* was evaluated. The results showed that the 1:3 dilution of GFs maintained cell viability similar to the control group at all time points, and this dilution was selected for gene expression analysis. The expression of *COL1A1*, *COL3A1*, *Elastin*, and *TGF- β 1* genes was significantly increased in both isolated treatments—FBMIV and GF (1:3) while the combination of FBMIV + GFs did not present an additive effect. Therefore, both FBMIV and treatment with growth factors (TGF- β 3, IDP2, and IGF) proved to be effective, independently, in positively modulating ECM-related genes in human dermal fibroblasts. However, the combination of both treatments did not enhance the isolated effects. These findings reinforce the potential of FBMIV as a biostimulatory therapy and suggest that adjustments in concentration, dose, and application time may reveal new combined strategies for skin rejuvenation.

Keywords: Fibroblasts, photobiomodulation, infrared, growth factors, collagen

DESTAQUES

1. **Modelo *in vitro*:** utilização de fibroblastos dérmicos humanos (HFF-2), apresentando relevância para a pele humana.
2. **Combinação inédita de tratamentos:** avaliação do efeito isolado e do efeito combinado da FBMIV (810 nm) e fatores de crescimento (TGF- β 3, IDP2, IGF).
3. **Avaliação do efeito dependente do tempo do tratamento:** efeito da viabilidade celular após 24, 48 e 72h do tratamento.
4. **Avaliação modulação da expressão de genes associados com a matriz extracelular:** efeito positivo da modulação dos genes *COL1A1*, *COL3A1*, *Elastina* e *TGF β 1*, permitindo análise dos genes de forma precisa do tratamento.
5. **Importância estética, clínica e em protocolos:** otimização de protocolos estéticos *anti-aging*, assim como limitações durante combinações de terapias.

HIGHLIGHTS

1. *In vitro* model: use of human dermal fibroblasts (HFF-2), demonstrating relevance to human skin.

2. Novel combination of treatments: evaluation of the isolated and combined effects of PBM (810 nm) and growth factors (TGF- β 3, IDP2, IGF).

3. Assessment of viability and gene expression: identification of cell viability and modulation of the *COL1A1*, *COL3A1*, *Elastin* and *TGF β 1* genes, allowing precise gene analysis of the treatment.

4. Assessment of time-dependent effect: various time periods (24, 48, 72h) were used, demonstrating diverse dynamics and cellular responses.

5. Aesthetic, clinical, and protocol importance: optimization of anti-aging aesthetic protocols, as well as limitations during combination therapies.

RESUMO PARA LEIGOS

Com o passar dos anos, a pele perde firmeza, elasticidade e vitalidade devido à redução da atividade das células que produzem colágeno e elastina, sendo essas substâncias essenciais para a aparência jovem e saudável. Rugas, linhas de expressão e flacidez tornam-se mais aparentes, impulsionando a busca por métodos eficazes e seguros de rejuvenescimento. Nesse contexto, o presente estudo investigou como a fotobiomodulação (FBM) com luz infravermelha e fatores de crescimento específicos (TGF- β 3, IDP2 e IGF) podem atuar na regeneração da pele envelhecida. O objetivo principal foi verificar se a aplicação da luz infravermelha de 810 nm, isoladamente ou combinada com os fatores de crescimento, poderia reativar os fibroblastos, células responsáveis pela produção de colágeno e elastina. Nos experimentos laboratoriais, células da pele humana e fatores de crescimento foram expostos isolados ou em associação com a luz infravermelha. Após o tratamento, foi avaliado se houve modulação da viabilidade celular e da produção de colágeno, elastina e TGF β , indicadores de regeneração e rejuvenescimento celular. Os resultados demonstraram que tanto a luz infravermelha quanto os fatores de crescimento, quando aplicados separadamente, estimularam positivamente os fibroblastos, aumentando a produção de proteínas estruturais da pele. No entanto, a combinação das duas terapias não apresentou efeitos superiores aos observados com o uso individual de cada uma, sugerindo que ambas ativam mecanismos semelhantes dentro das células, sem efeito aditivo. Esses achados reforçam o potencial da fotobiomodulação como alternativa segura, não invasiva e acessível para tratamentos estéticos. Em síntese, o estudo conclui que a estimulação de fibroblastos por meio da luz e de proteínas bioativas pode aumentar a capacidade de regeneração da pele e retardar os sinais do envelhecimento.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 24h	36
Figura 2.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 48h.	37
Figura 3.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 72h.	37
Figura 4.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 24h	38
Figura 5.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 48h	39
Figura 6.	Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 72h.	40
Figura 7.	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de <i>COL1A1</i> nos grupos tratados com FC 1:3, FBM-IV e FBM-IV + FC 1:3.	41
Figura 8.	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de <i>COL3A</i> nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3.	42
Figura 9.	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de <i>Elastina</i> nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3, em comparação ao controle	42
Figura 10.	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de <i>TGFβ1</i> nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3, em comparação ao controle	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação das 32 células da linhagem celular humana HFF-2.
- Tabela 2.** Descrição dos genes avaliados por RT-qPCR, de acordo com a 35 sequência de *primers* e concentração utilizadas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1- proteína ativadora

ATP - Adenosina Trifosfato

CcO- citocromo c oxidase

CTGF- fator de crescimento do tecido conjuntivo

CV- Cristal violeta

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGF- fator de crescimento epidérmico

FC- Fatores de crescimento

FBM- Fotobiomodulação

FGF- fator de crescimento de fibroblastos

GAGs- Glicosaminoglicanos

GM-CSF- fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos

IGF- fator de crescimento semelhante à insulina

IL-6- Interleucina- 6

LEDs- diodos emissores de luz

MAPKs- proteínas quinases por mitógeno

MEC- Matriz extrcelular

MMP- Metaloproteinases da matriz

NF- κ B- Fator nuclear- κ B

PDGFs- fatores de crescimento derivado de plaquetas

PGs- Proteoglicanos

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SASP- Fenótipo secretor associado à senescência

TGF- Fator de crescimento transformador

TGF- β - Fator de crescimento transformador- β

TGF- β 1- Fator de crescimento transformador- β 1

TGF- β 2- Fator de crescimento transformador- β 2

SUMÁRIO

1.0 CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.1 Pele	18
1.2 Fibroblastos	19
1.3 Envelhecimento cutâneo	20
1.4 Terapia Estética no Envelhecimento	23
1.5 Efeitos da Fotobiomodulação na pele	25
2.0 JUSTIFICATIVA	28
3.0 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4.0 METODOLOGIA	31
4.1 Cultivo celular	31
4.2 Grupos experimentais	31
4.3 Fotobiomodulação (equipamento e parâmetros)	32
4.4 Análise da Viabilidade Celular (MTS e Cristal Violeta)	32
4.5 Análise de Expressão Gênica	33
4.5.1 Extração de RNA	34
4.5.2 Síntese de cDNA	34
4.5.3 qPCR (PCR quantitativo em tempo real)	34
4.6 Análise Estatística	35
5.0 RESULTADOS	36
5.1 Análise Viabilidade Celular	36
5.1.1 Ensaio MTS	36
5.1.2 Ensaio Cristal Violeta	38
5.2 Expressão Gênica	40
6.0 DISCUSSÃO	44
7.0 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS	47
8.0 CONCLUSÃO	48
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 PELE

A pele possui três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo (Kohl et al., 2011). No contexto de camadas de pele, a epiderme como camada mais externa, possui vasta quantidade de queratinócitos densos, melanócitos, células de Merkel, células de Langerhans, entre outros. São responsáveis por manter uma barreira de proteção, coloração, sensibilidade e interação nervosa e defensores imunológicos, nessa ordem (Yousef et al., 2025). A derme, camada intermediária, contém fibroblastos, colágeno tipo I e tipo III, mastócitos, vascularização e adipócitos. As fibras de colágeno que fornecem resistência à tração e elasticidade, fazem parte da matriz extracelular (MEC). Nesta camada, é realizada a síntese de colágeno e fibras elásticas (Brown, Krishnamurthy, 2025). Em nossa pele, o colágeno tipo I representa de 80% a 90% do colágeno total (presente em pele, tendões e ossos). Os proteoglicanos (PGs) e o glicosaminoglicanos (GAGs) como ácido hialurônico, são amorfos e integram elementos fibrosos e da matriz celular na derme. Possuem a capacidade de absorverem água em até 1.000 vezes o seu volume, atuando na regulação hídrica e na expansibilidade da derme. (Shin et al., 2019). Na hipoderme, encontramos tecido adiposo e conjuntivo frouxo, disponibilizando um isolamento térmico, assim como proteção contra impactos (Shin et al., 2019).

O declínio da função imunológica cutânea ocorre em decorrência das alterações estruturais e fisiológicas da pele, comprometendo processos fundamentais como nutrição tecidual, suporte estrutural, vascularização, reparo e regeneração. O reconhecimento e a resposta a patógenos tornam-se menos eficientes, reduzindo a capacidade de defesa da pele. Além disso, a sinalização celular é prejudicada, o que resulta em uma resposta inflamatória menos precisa frente a lesões, agentes químicos nocivos e microrganismos patogênicos. Consequentemente, observa-se maior predisposição a dermatites e irritações químicas, devido ao aumento da exposição a alérgenos decorrente da ruptura da barreira cutânea (Fore, 2006).

Do ponto de vista histopatológico, os queratinócitos senescentes tornam-se resistentes à apoptose, sobrevivendo tempo suficiente para acumular danos

ao DNA e às proteínas, o que pode favorecer o surgimento de alterações de caráter neoplásico. Paralelamente, há redução no número de melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel na epiderme, contribuindo para a disfunção imunológica e sensorial. O estresse oxidativo, provocado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultantes do metabolismo oxidativo, induz mutações no DNA, oxidação de proteínas, levando à perda funcional e a oxidação de lipídios de membrana, comprometendo a sinalização transmembrana e o transporte celular (Fore, 2006).

Compreender essas alterações imunológicas e estruturais é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e intervenção no envelhecimento cutâneo, assim como abordagens terapêuticas mais específicas, promovendo a manutenção da integridade da barreira cutânea, a modulação da resposta inflamatória e a preservação da função imunológica da pele.

1.2 Fibroblastos

Os fibroblastos são células multipotentes ou mesenquimais, de morfologia fusiforme ou estrelada com um núcleo oval e um retículo endoplasmático distinto e são encontradas por todo corpo (Boraldi et al., 2024). Eles coordenam as cascatas de comunicação na matriz extracelular com sinais biofísicos e bioquímicos e por meio da secreção de fatores de crescimento, citocinas e exossomos, produzem componentes extracelulares essenciais para a regeneração, remodelação e o rejuvenescimento de tecidos (Mehta et al., 2023). Além disso, os fibroblastos são conhecidos por reagir a forças e deformações provenientes da MEC. No período de desenvolvimento, envelhecimento ou doenças, mudanças que acontecem na composição do colágeno, elastina e proteínas como proteoglicanos, regulam a disposição e rigidez da MEC (Boraldi et al., 2024).

Há muito tempo se reconhece que diferentes populações de fibroblastos residem simultaneamente no mesmo órgão, porém apresentando heterogeneidade funcional e especializada, sendo essa organização

intertecidual importante para a homeostase e regeneração cutânea. Os fibroblastos papilares, próximos à epiderme, possuem a função de comunicação com queratinócitos e células imunes, liberando fatores de crescimento e estimulam a regeneração tecidual. Na derme profunda, os fibroblastos reticulares sintetizam colágeno tipo I e III, além da manutenção da resistência mecânica da pele (Lendahl et al., 2022).

Esses fibroblastos estão ligados no microambiente tecidual, modulando respostas inflamatórias, angiogênese e cicatrização por meio de citocina como Interleucina-6 (IL-6). Por fim, a vasta heterogeneidade e da comunicação intercelular de fibroblastos dérmicos permite o entendimento para que se desenvolva e compreenda novas terapêuticas assertivas no processo de envelhecimento e regeneração cutânea (Lendahl et al., 2022).

1.3 Envelhecimento cutâneo

A pele, é um órgão que passa por constantes mudanças visíveis ao longo dos anos. O processo de envelhecimento é progressivo e multifatorial, provocando alterações estéticas, funcionais, mudança de imagem de uma pessoa (Jane Fore, 2006), assim como alterações em nível molecular, celular e mecanismos biológicos também. Com o aumento da expectativa de vida e do envelhecimento da população, compreender cada mecanismo desse processo é fundamental para promover um envelhecimento saudável (Csekes, Racková, 2021).

O envelhecimento é influenciado por dois fatores principais: os intrínsecos, que incluem a composição genética do indivíduo, a capacidade funcional somática e a composição do organismo (Krutmann et al., 2021). No modo clínico, o envelhecimento intrínseco da pele se manifesta por sinais como linhas finas, xerose (pele seca) e flacidez (Csekes Rackvá, 2021). Já nos componentes extrínsecos, há influências ambientais, hábitos de vida, nutrição, exposição à poluição, radiação solar, variações de temperatura, entre outros (Krutmann et al., 2021).

A primeira citação utilizada sobre as alterações no contexto celular, foram mencionadas por Leonard Hayflick e Paul Moorhead, em que os fibroblastos primário humanos possuem uma capacidade limitada de divisão (Csekes Rackv, 2021). Foi conhecido como "limite de Hayflick" indicando a incapacidade dos telmeros de manter seu comprimento ao longo das replicações celulares. Portanto, as células perdem a capacidade proliferativa e entram em um estado irreversível de interrupo do ciclo celular, posteriormente denominado senescência celular ou replicativa (Hhn et al., 2017).

Uma das características presentes no envelhecimento,  a senescência celular, sendo composta por fibroblastos senescentes que liberam fatores de crescimento, enzimas degradadoras da matriz e citocinas pró inflamatórias, conhecidas como fenótipo secretor associado  senescência (SASP) (Li et al., 2025).

Na célula, ocorre o estado de parada irreversível do crescimento celular, provocado por estressores e que gera danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), encurtamento de telmeros, estresse oxidativo e ativao de vias oncognicas (López-Otn et al., 2023). No envelhecimento intrínseco, influenciado por fatores genéticos e celulares, juntamente com os fatores extrínsecos como radiao UV, poluio, hiperpigmentao, flacidez, rugas profundas e estresse oxidativo, leva a deteriorao estrutural e funcional da pele (Li et al., 2025).

A pele envelhecida  caracterizada por uma barreira epidérmica disfuncional, derme mais fina, fibroblastos senescentes acumulados, células imunes excessivas, componentes fragmentados da matriz extra clular, (Zhang et al., (2024), degradao de colágeno, perda de elasticidade, afinamento e formao de rugas (Shin et al., 2019)

Durante o envelhecimento, em cada camada de pele ocorrem alteraes moleculares como diminuio do colágeno, alteraes nos fibroblastos e fibras elásticas. Nesse processo, as ROS no envelhecimento, despertam as proteínas quinases por mitógeno (MAPKs) e induzem fatores de transcrio, englobando a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear- κ B (NF- κ B). Essa liberao eleva a expresso de metaloproteinase da matriz (MMP) e impede a sinalizao do

fator de crescimento transformador-B (TGF- β), corroborando à fragmentação do colágeno e a redução da biossíntese de colágeno (Shin et al., 2019).

Temos como consequência um obstáculo na interação mecânica entre os fibroblastos e a MEC, o que diminuiu o tamanho dos fibroblastos dérmicos. Os fibroblastos senescentes liberam uma maior quantidade de ROS, elevando ainda mais a expressão de MMPs e bloqueando a sinalização do TGF- β , tornando-se um feedback positivo e acelerando o envelhecimento dérmico. A MMP-12 liberada por fibroblastos e macrófagos atuam no crescimento da elastose solar e diminuição das fibras elásticas funcionais (Shin et al., 2019)

A redução na síntese de colágeno devido ao envelhecimento dos fibroblastos foi demonstrada por uma menor produção *in vitro* de procolágeno tipo I por fibroblastos dérmicos isolados da pele de indivíduos jovens (18 a 29 anos) em comparação com indivíduos idosos (80 anos ou mais). Neste estudo, foi concluído que a síntese reduzida de colágeno na pele envelhecida, está ligada diretamente com o envelhecimento dos fibroblastos e menor nível de estimulação mecânica em comparação a pela jovem (Varani et al., 2006).

Em amostras de pele de doadores humanos de diferentes faixas etárias, observou-se um aumento dependente da idade na expressão do marcador de senescência β -galactosidase em fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos, indicando que a pele envelhecida contém uma maior quantidade de células senescentes. Estudos indicam que a produção de pró-colágeno tipo I na pele humana envelhecida é reduzida, provavelmente devido à regulação negativa da sinalização do TGF- β e do seu fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), que é considerado um regulador importante da expressão do colágeno (Zhang, Duan, 2018).

Os fatores de crescimento decorrentes de fibroblastos vêm sendo usados com sucesso em cuidados dermatológicos desde 2001. Diversos estudos clínicos demonstram melhorias significativas na qualidade da pele, sem relatos de eventos adversos graves (Mehta et al., 2023).

1.4 TERAPIA ESTÉTICA NO ENVELHECIMENTO

Os FCs são proteínas reguladoras ativas, que equilibram o ciclo celular (Costa Amaral et al., 2020). ajudam a reconstruir a MEC e agem como mediadores biológicos naturais (Dieamant et al., 2012). Junto com as citocinas, tornam-se eles responsáveis por controlar o crescimento, a proliferação, a regeneração e a diferenciação celular por meio de uma rede de vias de sinalização intercelulares e intracelulares, portando, indispensáveis no retardo do envelhecimento visível da pele (Kadoya et al., 2017); (Fabi, Sundaram, 2014). Dentre as singularidades dos FCs, está a sua capacidade de iniciar a mitose de células em período de inatividade (estado quiescente), mesmo que ainda nutrientes e elementos essenciais sejam necessários para processos metabólicos, apenas os fatores de crescimento podem iniciar a divisão celular (Fitzpatrick, Rostan, 2003).

O TGF β desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase da pele. O TGF β é uma família de citocinas que possui três isoformas: TGF- β 1, 2 e 3. Essas isoformas localizam-se em diferentes camadas epidérmicas. O TGF- β 1 localiza-se no estrato granuloso e córneo, enquanto o TGF- β 2 e, em menor extensão, o TGF- β 3, estão presentes nas camadas suprabasais, indicando assim suas diferentes funções (Ramirez et al., 2014). Vale ressaltar que o TGF- β 1 e - β 2 estão entre os mais importantes estimuladores da síntese de colágeno e proteoglicanos, além disso, possui também papel importante na prevenção da degradação (Gauglitz et al., 2010).

Muitos estudos têm demonstrado efeito benéfico de muitos destes fatores de crescimento, por exemplo, fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs) fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator estimulador de colônia para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de crescimento transformador (TGF), tanto em modelos de culturas de células (*in vitro*) e modelos animais (*in vivo*), como também em pacientes que precisam de estímulos maiores na regeneração tecidual (Dieamant et al., 2012).

A aplicação tópica de fatores de crescimento, está relacionada ao estímulo de queratinócitos, fibroblastos e entre outras células que têm sua capacidade

proliferativa reduzida com o envelhecimento. Por meio de um estudo clínico e histopatológico com acompanhamento de voluntários durante seis meses, notaram a proliferação de proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, com respostas de neocolagênese e aumento da densidade de fibroblastos, principalmente em derme papilar, confirmando as observações *in vitro* da participação de fatores de crescimento e citocinas na atividade mitótica de fibroblastos dérmicos (Dieamant et al., 2012).

Um estudo utilizou cinco famílias de fatores de crescimento em formulação de gel tópico para avaliar a regressão fotodano e atenuação de rugas, sendo eles: EGF, TGF β , fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), PDGF e FGF. Como resultado, mais da metade dos participantes relataram visualizar melhora na qualidade de textura de pele, rugas e firmeza. A análise foi feita por biopsia na região da bochecha antes do tratamento e após o tratamento que durou de 60 dias (Fitzpatrick, Rostan, 2003).

A família TGF- β , que engloba TGF- β 1, - β 2 e - β 3 estão entre os mais importantes estimuladores da síntese de colágeno e proteoglicanos, e afetam a MEC não apenas estimulando a síntese de colágeno, mas também prevenindo sua degradação (Shin et al., 2019)

No estudo de Dieamant et al. (2012), foi utilizado um produto cosmético por via tópica contendo alguns fatores de crescimento como FGFb, EGF e IGF-1. Esses fatores são conhecidos por estimular a proliferação e atividade dos fibroblastos, promovendo a síntese de colágeno e elastina. Foi comprovado o aumento de fibroblastos de maneira significativa, não alterando a morfologia das células *in vitro*, sendo um tratamento eficaz na reparação tecidual e mantendo também a sua segurança.

Neste estudo Quan et al. (2010) observou que a expressão de TGF- β 1 e o CTGF estão reduzidas em fibroblastos da pele humana envelhecida, quando comparados aos que são encontrados na pele jovem, *in vivo*. Nos fibroblastos primários da pele humana, o TGF- β e o CTGF atuam em conjunto, por meio de mecanismos interdependentes, porém por mecanismos distintos, para regular a produção de procolágeno tipo I, sendo esse a primeira forma de colágeno, produzida dentro do fibroblasto. Esses dados corroboram para a hipótese de que

o eixo TGF- β /Smad/CTGF desempenha importante papel na regulação da produção de colágeno em fibroblastos dérmicos, e que a atenuação desse eixo sinalizador contribui para a diminuição do conteúdo de colágeno observado na pele humana envelhecida (Quan et al., 2010).

1.5 Efeitos da Fotobiomodulação na pele

A fotobiomodulação (FBM) de baixa intensidade demonstrou eficiência no tratamento e prevenção de doenças de pele. A luz, estimula cromóforos que são moléculas que absorvem os fótons e convertem a luz em respostas biológicas. A FBM pode ativar processos de sinalização celular. Havendo um aumento no transporte de elétrons, no consumo de oxigênio, no potencial da membrana mitocondrial e na síntese de adenosina trifosfato (ATP), células estressadas podem ter uma regulação positiva das vias de reparo e sobrevivência celular (Barolet, 2008).

O princípio do tratamento é baseado em reações de FBM, que incluem alterar a atividade celular intrínseca, promover a regeneração de vários tecidos e nervos, alterar a atividade celular intrínseca, melhorar o reparo do tecido, prevenir danos ao tecido e reduzir lesões inflamatórias. Isso pode ser profundamente explicado pelo fato de que os fótons emitidos pelos diodos emissores de luz (LEDs) são absorvidos pelos cromóforos da pele (por exemplo, mitocôndrias, citocromo C, melanina e protoporfirinas endógenas), causando alterações posteriores em sua biofisiologia, levando a mudanças na proliferação celular, migração, diferenciação, inflamação e produção de colágeno (Ngoc et al., 2023).

Os LEDs são combináveis com terapias sistêmicas e tópicas e podem ser clinicamente vantajosos devido à eficácia, segurança, diversos comprimentos de onda não ionizantes, baixo custo, facilidade de uso doméstico por pacientes e portabilidade. Os LEDs são dispositivos semicondutores que produzem luzes não coerentes, não colimadas e de espectro estreito (aproximadamente 255–1300 nm) quando uma voltagem direta é aplicada. Dispositivos LED, incluindo

luzes LED azuis (420–440 nm), vermelhas (630–680 nm) e amarelas (590–595 nm), bem como infravermelho próximo (LED-NIR; 750–1200 nm), são utilizados em aplicações biológicas e estéticas. Na verdade, a aplicação de LEDs na área estética tem atraído atenção graças às suas propriedades ideais como estimulação da atividade mitocondrial, aumento da síntese de ATP, regeneração tecidual e neocolagênese, redução da inflamação e recuperação cutânea pós procedimentos ablativos colágeno (Ngoc et al., 2023).

Na FBM, os seguintes parâmetros são comumente usados: (i) o comprimento de onda ou a cor da luz; (ii) a fluência ou a quantidade de energia recebida por unidade de área de superfície da pele (unidade: J/cm^2); (iii) a densidade de potência ou energia fornecida por área de superfície da pele (W/cm^2); (iv) período de tratamento (segundos); e (v) ciclo de trabalho ou fração do comprimento do tratamento no qual a luz é fornecida (expresso como uma porcentagem do período de tratamento). Cada comprimento de onda tem propriedades biofisiológicas únicas devido às diferenças nos alvos cromóforos e quão profundamente cada comprimento de onda penetra na pele (Jagdeo et al., 2018).

Estudos pré-clínicos *in vitro* e estudos clínicos iniciais demonstraram que os LEDs tiveram efeitos benéficos na cicatrização de feridas. O estudo clínico piloto controlado foi realizado para determinar se a fototerapia por LED vermelho de 633 nm pode melhorar a cicatrização de feridas após procedimentos cirúrgicos estéticos de blefaroblástia e o *resurfacing* ablativo. Os indivíduos foram avaliados 24 e 48 horas após a cirurgia, em 07 e 10 dias, e em duas, três e seis semanas. A redução do eritema, edema, hematomas e dias para a cura foi avaliada usando fotografia digital e foi revisada por um cirurgião plástico independente. O lado tratado com LED cicatrizou após uma média de 13,5 dias versus 26,8 dias para o lado não tratado (Trelles, Allones, 2006).

Outro estudo controlado, foi demonstrado a eficácia da combinação de um LED de 633 nm e outro LED de 830 nm para tratar rugas periorbitais. Os indivíduos foram irradiados com o LED de 830 nm por 20 minutos nos dias 1, 3, 5, 15, 22 e 29 e com o LED de 633 nm por 20 minutos nos dias 8, 10 e 12. A maioria dos indivíduos obteve suavização das rugas periorbitais, melhora nas

pontuações de fotoenvelhecimento e melhoras na maciez, suavidade e firmeza da pele. Eritema leve foi relatado por oito indivíduos (Russell et al., 2005).

A FBM é uma ferramenta valiosa no arsenal da dermatologia e estética. Ela pode ser usada sozinha ou em combinação com outras terapias para tratar uma ampla variedade de condições. Além disso, a tecnologia tem inúmeras aplicações estéticas, tanto como um tratamento independente quanto como um complemento a outros procedimentos estéticos, incluindo procedimentos comumente realizados como injeções, *resurfacing* a laser, peelings, luz intensa pulsada e microagulhamento (Ablon, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A constante busca por tratamentos antienvelhecimento vem sendo uma crescente em todo o mundo, onde a todo momento surgem novas tecnologias no ramo da estética, produtos dermocosméticos e injetáveis, além de protocolos e combinações para retardar esse processo. O envelhecimento é multifatorial, englobando fatores intrínsecos e extrínsecos, mudanças físicas como perda da elasticidade, aparecimento de rugas em todo o corpo e acúmulo de células senescentes.

Para nos aprofundar no assunto, este estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito da fotobiomodulação com LED 810nm associada a fatores de crescimento *TGF- β 3*, *IDP2* e *IGF* em fibroblastos dérmicos humanos. A luz de 810nm é bastante utilizada na literatura em geral e estética, nos ensinando que existe a maior penetrância no tecido, atingindo a derme onde ocorre a síntese ativa de colágeno tipo I e tipo III pelos fibroblastos.

Os FCs como *TGF- β 1*, *- β 2* e *- β 3* vem sendo utilizados na estética principalmente como *drug delivery* pós procedimentos estéticos e apresentam-se como importantes estimuladores da síntese de colágeno e também possuem a função de prevenir a sua degradação.

Alguns estudos abordam a utilização de FC em combinação com a luz infravermelha em torno de 810nm, resultando em melhora significativa de espessura e firmeza de pele. A FBM ao absorver os fótons, ocorre o aumento de atividades enzimáticas, ascensão da produção de ATP (energia celular) e liberação controlada de ROS, atuando como mensageiros intracelulares

Todavia, ainda que existam estudos mostrando os benefícios da combinação de FCs e FBM infravermelha, além de resultados promissores de forma isolada com *TGF- β 3*, *IDP2* e *IGF* e FBM infravermelha em fibroblastos dérmicos humanos, os efeitos é amplamente desconhecido. A discussão sobre o assunto é relevante e pode resultar em descobertas para um efeito potencializador ao fazer a junção das terapias, ampliando os efeitos de rejuvenescimento cutâneo e reparador.

Desta maneira, o aprofundamento nos estudos é importante para entender como a associação das terapias pode influenciar no comportamento dos fibroblastos, na síntese de colágeno e elastina, bem como nos processos moleculares que participam da regeneração da pele.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da FBM com comprimento de onda de 810nm associada aos fatores de crescimento TGF- β 3, IDP2 e IGF em fibroblastos dérmicos humanos.

3.2 Específicos

- Avaliar a viabilidade de fibroblastos dérmicos humanos após 24h, 48h e 72h de tratamento com a FBM associada aos fatores de crescimento TGF- β 3, IDP2 e IGF.
- Avaliar a expressão dos genes colágeno tipo 1, colágeno tipo 3 e elastina após 48h de tratamento com a FBM associada aos fatores de crescimento TGF- β 3, IDP2 e IGF.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo celular

Células da linhagem celular humana HFF-2 (ATCC), derivadas de fibroblastos dérmicos humanos, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dubelco's modified eagle médium- Gibco-Thermo Fisher, EUA) contendo solução antimicótica e antibiótica 1% e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Invitrogen, EUA), 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sódio e 1% de aminoácidos não-essenciais. As células foram mantidas em frascos ou placas de cultura a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade até atingirem confluência de 60-70% e utilizadas para os experimentos.

4.2 Grupos experimentais

As células da linhagem HFF-2 foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- **Controle:** células submetidas a nenhum tratamento.
- **Fator de crescimento FC (1:1):** células submetidas ao tratamento com fator de crescimento TGF-β3, IDP2 e IGF (PHD do Brasil), diluído 1:1 em meio de cultura completo com 10% de FBS.
- **Fator de crescimento FC (1:3):** células submetidas ao tratamento com fator de crescimento TGF-β3, IDP2 e IGF (PHD do Brasil), diluído 1:3 em meio de cultura completo com 10% de FBS.
- **FBMIV:** células submetidas ao tratamento com FBM em comprimento de onda infravermelha (LEDbox BioLambda, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 810nm), de acordo com os parâmetros dosimétricos descritos na Tabela 1.
- **Fator de crescimento FC (1:1) + FBMIV:** células submetidas ao tratamento com fator de crescimento TGF-β3, IDP2 e IGF (PHD do Brasil) e FBM em comprimento de onda infravermelho de acordo com os parâmetros dosimétricos descritos na Tabela 1.
- **Fator de crescimento FC (1:3) + FBMIV:** células submetidas ao tratamento com fator de crescimento TGF-β3, IDP2 e IGF (PHD do Brasil)

e FBM em comprimento de onda infravermelho de acordo com os parâmetros dosimétricos descritos na Tabela 1.

4.3 Fotobiomodulação

O equipamento utilizado para a terapia de fotobiomodulação foi o **LEDBOX®** (Biolambda, Brasil), projetado para aplicações clínicas e experimentais em fototerapia de baixa intensidade. O sistema opera por meio de emissores de LEDs de alta potência, disponibilizando diferentes comprimentos de onda na faixa do infravermelho visível (810nm – 850nm). O dispositivo permite o ajuste preciso de parâmetros de irradiação, incluindo potência de saída (mW), densidade de energia (J/cm²), tempo de exposição (s ou min) e área do feixe (cm²), garantindo padronização dos protocolos e reprodutibilidade experimental. A distribuição da luz é projetada para manter a homogeneidade da irradiação sobre a superfície exposta, reduzindo variações nos resultados biológicos.

Tabela 1. Parâmetros dosimétricos utilizados para a irradiação das células da linhagem celular humana HFF-2.

Parâmetros	Tipo fonte (laser/LED)
Comprimento de onda [nm]	810
Largura espectral [nm]	±20
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média [mW]	0,098
Potência pico [mW]	0,080
Irradiância no alvo [W/cm ²]	0,0494
Duração da exposição [s]	102
Exposição radiante [J/cm ²]	5,04
Energia radiante [J]	8,16
Técnica de aplicação	Em contato
Número e frequência das sessões de tratamento	1

4.4 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico com o reagente MTS e cristal violeta. A metodologia do MTS baseia-se na redução do sal tetrazólio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil) -2-(4-

sulfofenil) -2H-tetrazólio) por enzimas mitocondriais ativas em células metabolicamente funcionais, resultando na formação de um produto solúvel em meio aquoso, cuja concentração é proporcional ao número de células viáveis. Para isto, foram semeadas 4×10^4 células, ou seja, 40.000 células da linhagem HFF-2 por poço em placas de 96 poços e mantidas em incubadora a 37°C por 24 horas. Após este período, as células foram tratadas de acordo com os grupos experimentais descritos acima e incubadas por 24h, 48h e 72h. Após cada período de incubação, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados com PBS e 10uL de MTS foi adicionado em 90uL de DMEM sem FBS por poço. As células foram incubadas no escuro por 2h a 37°C. Após este período, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro Synergy H1 (BioTek) em comprimento de onda de 490nm. Os valores obtidos foram utilizados para comparar a viabilidade celular entre os grupos experimentais, sendo expressos como percentual em relação ao grupo controle no período de 24h.

Após a análise da absorbância do ensaio de MTS, a viabilidade celular foi confirmada por meio do ensaio de cristal violeta, técnica baseada na coloração de proteínas e DNA das células por este reagente, sendo proporcional à densidade de células aderidas. Para isto, cada poço da placa de 96 poços foi lavado por 2 vezes com 150uL de PBS e, posteriormente, foi adicionado 150uL de paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com 150uL de PBS e foi adicionado 50uL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos. A placa foi então lavada em água corrente 4 vezes e mantidas por 24h em temperatura ambiente para secagem. Após este período, foi adicionado 100uL de álcool metílico por poço e a placa foi mantida em agitação por 20 minutos em temperatura ambiente no equipamento Red Rocker (Hoefer). A análise da viabilidade celular com cristal violeta foi avaliada por meio de absorbância em comprimento de onda de 570nm, utilizando-se o equipamento Synergy H1 (BioTek). Os valores obtidos foram utilizados para comparar a viabilidade celular entre os grupos experimentais, sendo expressos como percentual em relação ao grupo controle no período de 24h.

4.5 Análise De Expressão Gênica

4.5.1 Extração de RNA

O RNA total foi purificado utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade e a pureza do RNA obtido foram avaliadas por meio do Nanodrop (ThermoFisher, Massachusetts, E.U.A.), utilizando-se como padrão os valores de referência especificados na literatura (concentração de RNA, relação 260/280 e relação 260/230).

4.5.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Um total de 1ug de RNA foi utilizado para a síntese do cDNA. As amostras de RNA total foram tratadas com 1U de DNase I Amplification Grade (Invitrogen) por 15 min à temperatura ambiente para eliminação do DNA genômico contaminante. Posteriormente, foi adicionado 1 uL de EDTA e as amostras foram incubadas a 65°C no termociclado DNase 15 minutos temperatura ambiente, depois EDTA para inativação da DNase por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, a síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o kit Revert Aid, de acordo com as recomendações do fabricante, seguido de incubação no termociclador QuantStudio 1 por 5 min a 25 °C e 60 min a 42 °C. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento de sua utilização.

4.5.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas no termociclador QuantStudio 1 utilizando-se o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) e *primers* específicos para os genes *COL3A1*, *COL1A1*, *ELASTINA*, *TGF-β* e o gene constitutivo *RPL41*. Para a amplificação específica dos transcritos a partir do cDNA de cada amostra, as reações foram realizadas em volume final de 10uL, sendo 1 µl de cDNA (10ng), 5µl de Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), primers específicos para cada alvo, de acordo com a concentração descrita na Tabela 2 e água. Em seguida, as amostras foram incubadas no equipamento QuantStudio por 2min a 50°C, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15s, 62°C por 30s e 72°C por 40s. A quantificação da expressão gênica foi realizada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Zhu, L, 2019).

Tabela 2: Descrição dos genes avaliados por RT-qPCR, de acordo com a sequência de *primers* e concentração utilizadas.

<i>Gene</i>	Primers 5' 3'	Concentração	T_m (°C)
<i>COL3A1</i>	F: AATCAGGTAGACCCGGACGA R: TTCGTCCATCGAAGCCTCTG	75	62
<i>COL1A1</i>	F: GGCCCTCAAGGTTTCCAAGG R: CACCCTGTGGTCCAACAATC	200	62
<i>ELASTINA</i>	F: AGGTATCCCATCAAGGCCCC R: TTTCCCTGTGGTGTAGGGCA	100	62
<i>TGF-β</i>	F: CAGAAATACAGCAACAATTCCTGG R: TTGCAGTGTGTATCCGTGCTGTC	400	62

4.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e um mínimo de três experimentos independentes foram conduzidos. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do software GraphPad Prism, versão 7.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). A verificação da distribuição dos dados foi realizada utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns. Nos casos em que os dados apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Para a análise da expressão gênica e comparação dos tratamentos com o grupo Controle, utilizou-se o teste One Sample t Test. Adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Análise viabilidade celular

5.1.1 Ensaio MTS

Após 24 horas (Figura 1), foi observado que a viabilidade celular dos diferentes grupos experimentais foi semelhante ao grupo controle, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos.

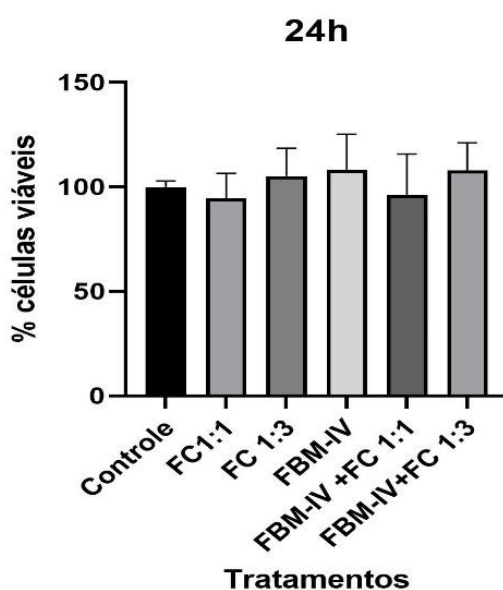


Figura 1. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 24h do tratamento com FC nas proporções 1:1 e 1:3; associados ou não á FBM-IV com LED 810nm.

Com 48 horas de exposição (Figura 2), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, obtendo-se níveis semelhantes ao controle em 24 horas e, apesar do aumento após 48hs, os níveis permaneceram semelhantes.

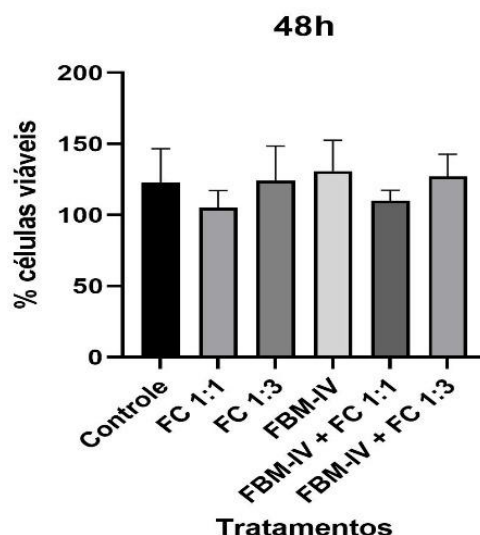


Figura 2. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 48h do tratamento com FC nas proporções 1:1 e 1:3; associados ou não à FBM-IV com LED 810nm em relação ao grupo controle.

Após 72 horas (Figura 3), foram encontradas redução da viabilidade celular entre controle e FC 1:1 ($p < 0,001$), controle e FBM-IV+FC1:1 ($p < 0,0001$), FBM-IV e FBM-IV+FC1:1 ($p < 0,0001$). Houve aumento da viabilidade celular na comparação entre os grupos FBM-IV+FC1:1 e FBM-IV+FC1:13 ($p < 0,001$).

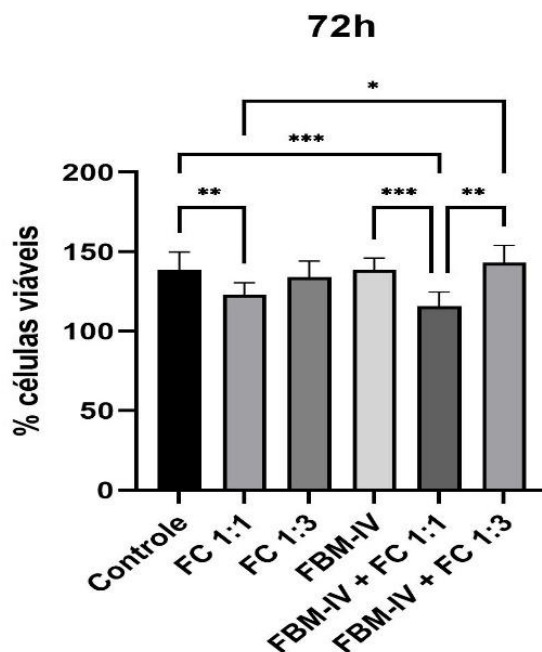


Figura 3. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de MTS na linhagem HFF-2 após 72h do tratamento com FC nas proporções 1:1 e 1:3; associados ou não à FBMIV com LED 810nm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

5.1.2 Ensaio por Cristal Violeta

A viabilidade celular também foi avaliada por meio do ensaio de cristal violeta, que quantifica a aderência e o número total de células viáveis após os diferentes tratamentos. Os mesmos procedimentos estatísticos descritos anteriormente foram adotados nesta análise.

Com 24 h de tratamento, houve redução da viabilidade celular no grupo FBM-IV + FC 1:1 em relação ao grupo controle. Além disso, o grupo FBM-IV + FC 1:3 apresentou maior viabilidade celular quando comparado com o grupo FBM-IV + FC 1:1 (Figura 4).

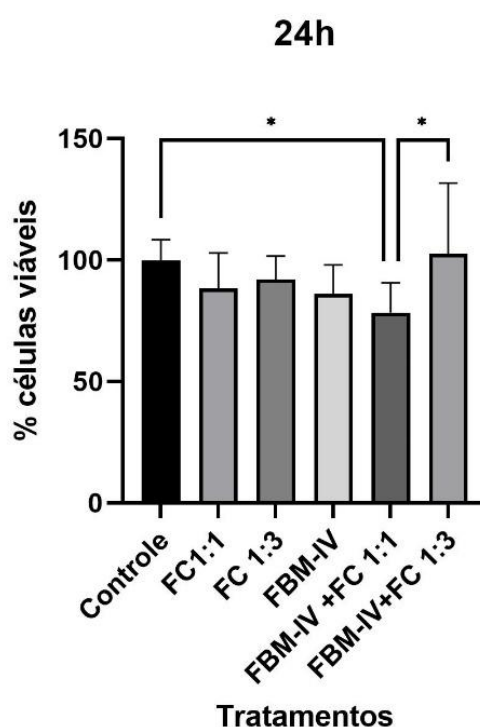


Figura 4. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 24h do tratamento com FC 1:1; FC 1:3; FBMIV, FBMIV+FC 1:1; FBMIV + FC 1:3. Dados representam o valor em porcentagem das células viáveis em cada grupo em relação ao grupo Controle no período de 24h. * $p < 0,05$

Após 48 horas (Figura 5), foram encontradas redução da viabilidade nos grupos FC 1:1 ($p < 0,05$) e FBM-IV+FC1:1 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Também foi observada redução da viabilidade no grupo FBM-IV quando comparado ao grupo FBM-IV+FC1:1 ($p < 0,001$).

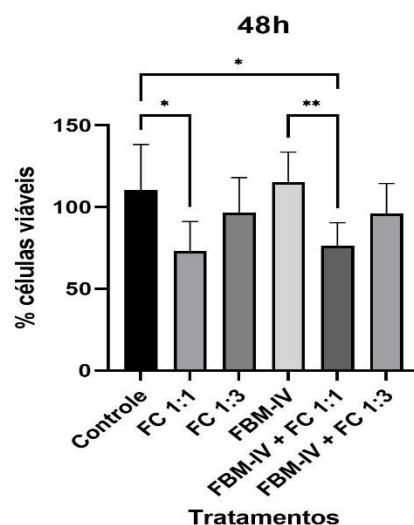


Figura 5. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 48h do tratamento com FC 1:1; FC 1:3; FBMIV, FBMIV+FC 1:1; FBMIV + FC 1:3. Dados representam o valor em porcentagem das células viáveis em cada grupo em relação ao grupo Controle no período de 48h. * $p < 0,05$, ** $p < 0.001$.

Após 72h do tratamento (Figura 6), houve redução da viabilidade celular no grupo FBM-IV+FC1:1 quando comparado com o grupo controle ($p < 0,001$), FC 1:1 ($p < 0,05$) e FBM-IV ($p < 0,001$). Adicionalmente, observou-se que a viabilidade celular foi maior no grupo FBM-IV+FC1:3 em relação ao grupo FBM-IV+FC1:1.

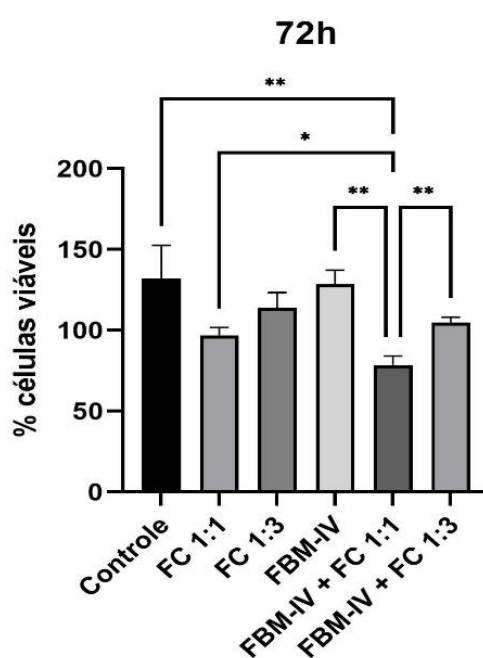


Figura 6. Análise da viabilidade celular por meio do ensaio de CV na linhagem HFF-2 após 72h do tratamento com FC 1:1; FC 1:3; FBMIV, FBMIV+FC 1:1; FBMIV + FC 1:3. Dados representam o valor em porcentagem das células viáveis em cada grupo em relação ao grupo Controle no período de 72h. * $p < 0,05$, ** $p < 0.001$ (One-way ANOVA).

5.2 Análise da expressão gênica de *COL1A1*, *COL3A*, *Elastina* e *TGF β 1* por RT-qPCR

Como foi observada redução da viabilidade celular com o parâmetro FC 1:1 no período de 48h e 72h, a análise da expressão gênica foi realizada nos grupos Controle, FC 1:3, FBM-IV e FBM-IV+FC 1:3.

Todos os tratamentos aumentaram a expressão do gene *COL1A1* em relação ao Controle. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados.

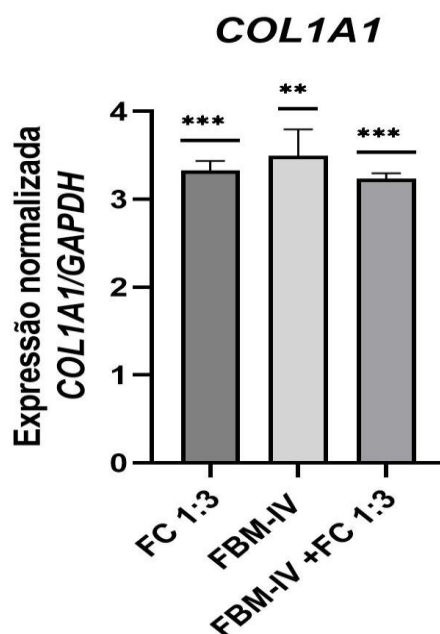


Figura 7: Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de *COL1A1* nos grupos tratados com FC 1:3, FBM-IV e FBM-IV + FC 1:3. One Sample t Test, utilizado para comparação dos valores de expressão gênica em relação ao grupo controle, e One Way ANOVA, empregado para a comparação múltipla entre os grupos. ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ e entra o grupo controle .

Para o gene *COL3A* (Figura 8), somente os grupos FMB-IV e FBM-IV FC 1:3 mostraram aumento do mRNA em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Adicionalmente, a expressão de *COL3A* foi maior nos grupos FMB-IV e FBM-IV FC 1:3 em relação ao grupo FC 1:3.

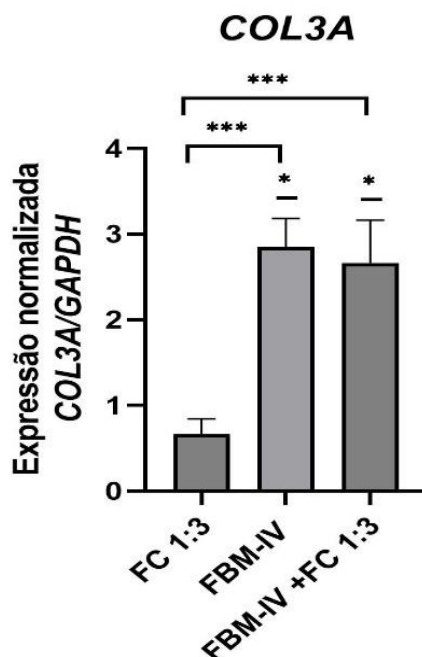


Figura 8: Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de *COL3A* nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3. One Sample t Test, utilizado para comparação dos valores de expressão gênica em relação ao grupo controle, e One Way ANOVA, empregado para a comparação múltipla entre os grupo.

Na análise da expressão de *Elastina* (Figura 9), todos os grupos mostraram aumento dos níveis de mRNA em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, a expressão de *Elastina* foi maior nos grupos FC 1:3 ($p < 0,0001$) e FBM-IV FC 1:3 ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo FBM-IV.

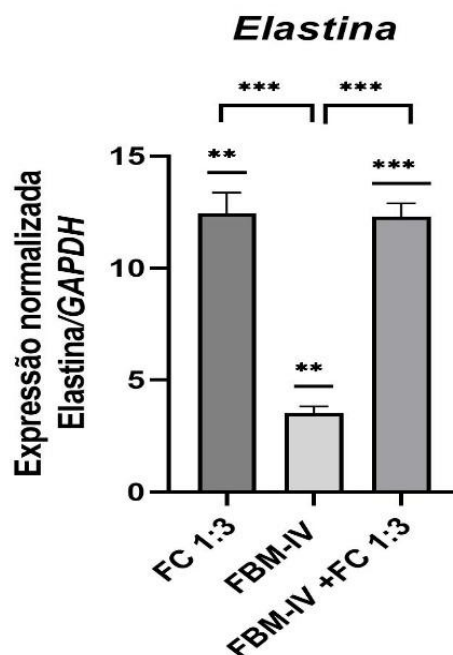


Figura 9: Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de *Elastina* nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3, em comparação ao controle * $p < 0,05$. One Sample t Test, utilizado para comparação dos valores de expressão gênica em relação ao grupo controle, e One Way ANOVA, empregado para a comparação múltipla entre os grupos. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$.

Quanto ao *TGF β 1* (Figura 10), todos os tratamentos promoveram aumento em relação ao Controle (FC 1:3, $p < 0,05$; FBM-IV, $p < 0,0001$ e FBM-IV FC 1:3, $p < 0,001$) mas sem diferenças entre os grupos.

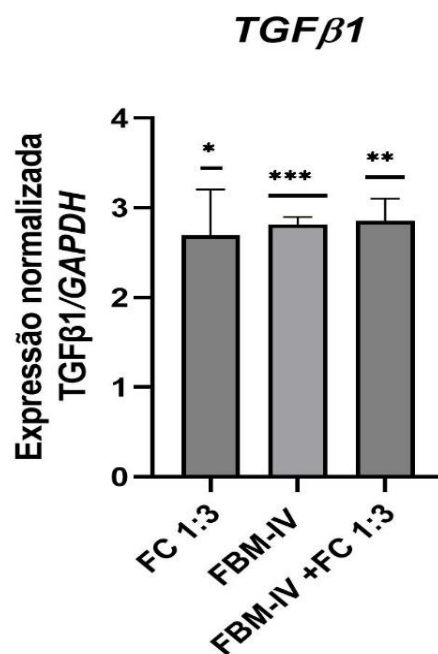


Figura 10: Análise da expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) de *TGFβ1* nos grupos tratados com FC 1:3, FBMIV e FBMIV + FC 1:3, em comparação ao controle * $p < 0,05$. One Sample t Test, utilizado para comparação dos valores de expressão gênica em relação ao grupo controle, e One Way ANOVA, empregado para a comparação múltipla entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo abordou o efeito da fotobiomodulação com luz infravermelha de 810nm associada a fatores de crescimento *TGF-β3*, *IDP2* e *IGF* em fibroblastos dérmicos humanos. Em nossos resultados, a diluição 1:3 foi a única que manteve viabilidade semelhante ao controle, sendo utilizada a mesma para análises posteriores. Em relação FC, não foram encontrados estudos na literatura que tenham avaliado esse tipo de composto com fibroblastos, tornando este presente estudo, um trabalho inédito.

A ausência de um efeito impulsionador significativo na viabilidade em 24 e 48 horas, conecta com artigos que sugerem que os efeitos da FBM na proliferação celular podem ser dependentes do estado metabólico celular e da fluência utilizada (Karu, 1999). Em fibroblastos saudáveis, o efeito de bioestimulação pode ser menos acentuado do que em células estressadas ou em modelos de feridas.

A análise de viabilidade por CV em 72 horas demonstrou uma predisposição de diminuição da viabilidade em alguns grupos tratados como o Controle *versus* FBM-IV + FC 1:1 *versus* FBM-IV + FC 1:1, FBM-IV *versus* FBM-IV + FC 1:1, FBM-IV + FC 1:1 *versus* FBM-IV + FC 1:3. O efeito promotor da viabilidade da FBM em fibroblastos é frequentemente observado na literatura, com comprimentos de onda próximos a 830nm ou em modelos de células estressadas (células diabéticas) (Oyebode, Houreld, 2022). A ausência de um efeito promotor neste estudo, pode-se dar a linhagem celular utilizada de fibroblastos saudáveis e não estressados ou à dose específica de FBM-IV de 810nm utilizada. Em outros estudos, foi demonstrado que fonte de luz como o infravermelho ou com luz de LED, resultou em aumento da proliferação celular de fibroblastos cultivados (Li et al., 2010).

Podemos observar neste estudo que na análise de expressão gênica com a FBM IV e com os FC foram capazes de aumentar a expressão dos genes associados à MEC, com *COL1A1*, *COL3A*, *Elastina* e *TGF-β1*, quando comparado ao controle. Contudo, destacamos que a combinação dos tratamentos não potencializou o efeito do FC ou da luz de forma isolada.

O Colágeno Tipo I, é o colágeno mais abundante na derme e fundamental para a resistência e integridade da pele, tendo um papel fundamental no rejuvenescimento e terapias antienvhecimento (Wang et al., 2025). Para a expressão de *COL1A1*, todos os tratamentos (FC 1:3, FBM-IV, FBM-IV + FC 1:3) aumentaram em relação ao controle, mas sem diferenças significativas entre eles.

A literatura reforça que a FBM a 810nm é capaz de aumentar a produção de colágeno em fibroblastos (Karoussis et al., 2021), agindo principalmente sobre o citocromo c oxidase (CcO) que é um dos componentes da cadeia respiratória. Ao absorver os fótons, ocorre o aumento de atividades enzimáticas, ascensão da produção de ATP e liberação controlada de ROS, atuando como mensageiros intracelulares (Dompe et al., 2020).

O fato do FC isolado entregar o mesmo efeito que a FBM isolado e que a combinação não tenha superado os tratamentos individuais, sugere que, para a expressão de *COL1A1*, o limiar máximo de estímulo foi atingido por qualquer um dos tratamentos, ou que as vias de sinalização ativadas (pela luz e pelo FC) convergem para o mesmo ponto de regulação, sem efeito aditivo.

O Colágeno tipo III é mais prevalente na pele jovem e em tecidos em fase de reparo, permitindo elasticidade e maleabilidade (Wang et al., 2025). Para a expressão do *COL3A*, a FBM-IV e FBM-IV + FC 1:3 aumentaram a expressão de *COL3A* em relação ao controle. Apenas o tratamento com FC 1:3 não diferiu do controle. Esse achado sugere que a FBM a 810nm possui mecanismo de ação mais potente ou específico na regulação do *COL3A* do que o FC na concentração e composição utilizadas. Esse aumento é desejável no rejuvenescimento, pois é ligada a uma MEC mais organizada e com características de uma pele mais jovem.

Na análise da elastina, todos foram superiores ao controle, havendo também diferença entre os tratamentos, sendo o menor nível observado para FBM-IV. A diminuição da expressão de Elastina na combinação em comparação com a FBM isolada reforça a conclusão de que a combinação não potencializa o efeito, e pode até sugerir uma leve interferência ou regulação por feedback negativo induzida pelo FC.

No estudo de Barolet e Boucher (2010), o uso de produtos dermatológicos tópicos contendo fator de crescimento IGF-1 resultou em melhora significativa na espessura dérmica e em firmeza de pele. Além disso, foi associado a FBM com 830nm sendo um comprimento de onda próximo a 810nm, demonstrando efeito semelhante.

O *TGF-β1* é um fator de crescimento fundamental no reparo de cicatrizes e síntese de MEC, e está ligado a formação de fibroses. Quanto ao *TGF-β1*, todos os tratamentos promoveram aumento de *TGF-β1* em relação ao controle, mas sem diferenças entre os grupos ativos. O aumento da expressão de *TGF-β1* é um efeito esperado tanto para a FBM quanto para a aplicação de FC, pois ambos visam a ativação do reparo tecidual. O fato dos FCs (que contém TGF-β3) ter induzido o aumento do TGF-β1 endógeno sugere uma regulação cruzada ou que o *TGF-β3* exógeno ativou vias que culminam na expressão do *TGF-β1* (Pakyari et al., 2013).

Um dos achados mais importantes deste estudo é que a combinação da FBM-IV a 810 nm com FCs não foi capaz de potencializar o efeito de nenhum dos tratamentos isolados na modulação da expressão gênica dos genes avaliados.

Este resultado contrasta com a hipótese de que a FBM, ao otimizar o metabolismo celular e a absorção de ativos, potencializaria a ação dos FCs tópicos. A literatura, embora sugira uma potencial combinação, carece de estudos que comprovem a potencialização da expressão gênica de MEC com a combinação exata de FBM 810 nm e os FCs específicos (*TGF-β3*, *IGF*, *IDP-2*).

7. Limitações do estudo e perspectivas futuras

Neste estudo, existem algumas limitações que devem ser destacadas. O modelo experimental restringiu-se a fibroblastos dérmicos humanos (HFF-2) cultivados *in vitro*, e que embora permita controle detalhado das variáveis, não reproduz fielmente o microambiente da pele *in vivo*, onde fatores como inflamação, vascularização e interação entre células modelam significativamente os processos regenerativos.

Em relação aos fatores de crescimento (FC), apenas a proporção 1:3 foi testada, pois não comprometer a viabilidade celular em nenhum dos períodos avaliados. Contudo, na prática clínica, os FCs são corriqueiramente utilizados em associação com outras terapias e técnicas, como *drug delivery* pós microagulhamento e laser ablativo fracionado, situações que não podem ser reproduzidas no presente modelo *in vitro*.

Outra limitação refere-se aos parâmetros de FBM que foram mantidos constantes quanto à dose, irradiância ou modo de emissão. Estudos anteriores demonstraram que a resposta celular à FBM pode variar em função desses parâmetros, de modo que estudos futuros devem explorar diferentes intensidades, curvas dose-resposta, diferentes potências e tempos de exposição, além de investigar possíveis efeitos da sequência e da combinação com FC.

Os resultados indicam que a luz infravermelha modula a síntese de colágeno por fibroblastos. Contudo, o direcionamento da resposta celular, estimulação ou inibição, é condicionada aos parâmetros adotados e do contexto experimental. Esses achados, reforçam a necessidade de melhorar protocolos experimentais e clínicos, autenticando os resultados em modelos tridimensionais, tecidos equivalentes e ensaios *in vivo*, antes de adotar a combinação entre FBMIV e FC em protocolos estéticos.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou o efeito isolado e combinado da fotobiomodulação infravermelha (FBMIV, 810 nm) e dos fatores de crescimento (FCs) (TGF- β 3, IDP2 e IGF) sobre fibroblastos dérmicos humanos, visando otimizar estratégias de rejuvenescimento cutâneo.

A viabilidade celular da linhagem HFF-2 foi avaliada pelos ensaios MTS e Cristal Violeta (CV) ao longo de 24, 48 e 72 horas após o tratamento com diferentes proporções de FC (1:1 e 1:3), isolado ou em combinação com FBM-IV. Nos períodos de 24 e 48 horas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle, indicando que os tratamentos não apresentaram efeito citotóxico inicial. Entretanto, após 72 horas, os grupos FC 1:1 e FBM-IV + FC 1:1 apresentaram redução significativa da viabilidade celular, enquanto a combinação FBM-IV + FC 1:3 manteve níveis de viabilidade superiores aos grupos com proporção mais alta, sugerindo menor toxicidade nesta condição. Os resultados obtidos pelos dois ensaios foram consistentes, demonstrando que concentrações mais elevadas de FC comprometem a sobrevivência celular, enquanto a proporção 1:3 é segura e preserva a integridade celular, permitindo a avaliação subsequente da expressão gênica.

Os resultados das análises de expressão gênica demonstraram que tanto a FBM-IV a 810 nm quanto o tratamento com FCs, de forma isolada, são eficazes na modulação positiva de genes da Matriz Extracelular (MEC), especificamente COL1A1, COL3A e Elastina, bem como do fator de crescimento TGF- β 1 em fibroblastos dérmicos. Estes achados representam um resultado promissor no desenvolvimento de tratamentos para o rejuvenescimento cutâneo.

Todavia, a associação da FBMIV com os FCs não potencializou o resultado na modulação da expressão gênica. Este fato sugere que, nos parâmetros e concentrações testados, a combinação não oferece um benefício adicional, podendo ser necessária a alteração da concentração dos FCs, da dose de FBMIV e do tempo de aplicação em estudos futuros para se obter um efeito sinérgico.

Assim, este estudo evidencia o efeito positivo da FBMIV isolada e conclui que a junção com FCs, nas condições experimentais avaliadas, não teve efeito aditivo na modulação gênica, portanto, não justificando a utilização das terapias combinadas para o antienvhecimento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ablon G. Phototherapy with light-emitting diodes: treating a broad range of medical and aesthetic conditions in dermatology. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(2):21-27.
2. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Veccho D, Pam Z, Pam N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg*. 2013;32(1):41-52.
3. Boraldi F, Lofaro FD, Bonacorsi S, Mazzilli A, Garcia-Fernández M, Quaglino D. The role of fibroblasts in skin homeostasis and repair. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1432
4. Barolet D, Boucher A. Anatomical changes in retronychia and onychomadesis detected using ultrasound. *Dermatol Surg*. 2010;36(10):1615-20.
5. Barolet D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27(4):227-238.
6. BROWN, T. M.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, Dermis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan
7. Chen W, Schlichte MJ, Tuchin VV, Hamblin MR. Photobiomodulation in the treatment of acne vulgaris: a review of the literature. *Lasers Med Sci*. 2024;39(1):15.
8. Costa Amaral IC, Barbosa DA, Izolani A, Izolani Neto O. Revisão do uso de fatores de crescimento e suas evidências clínicas em procedimentos estéticos antienvhecimento. *Braz J Surg Clin Res*. 2020;31(2):96-105.
9. Csekes E, Račková L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):12641.
10. De Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron*. 2016;22(3):7000417.
11. Díaz-Ley B, Cuevas J, Alonso-Castro L, Calvo MI, Ríos-Buceta L, Orive G, Anitua E, Jaén P. Benefits of plasma rich in growth factors (PRGF) in skin photodamage: clinical response and histological assessment. *Dermatol Ther*. 2015;28(4):258-63.
12. Dieamant G, Costa A, Bechelli L, Tibério J, Pereira C. Avaliação *in vitro* do perfil de segurança de cosmeceúticos contendo fatores de crescimento e seus análogos. *Surg Cosmet Dermatol*. 2012;4(3):229-36.

13. Dompe C, Moncrieff L, Matys J, Grzech-Leśniak K, Kocherova I, Bryja A, et al. Photobiomodulation—Underlying Mechanism and Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6259
14. Fabi S, Sundaram H. The potential of topical and injectable growth factors and cytokines for skin rejuvenation. *Facial Plast Surg*. 2014;30(2):157-162.
15. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther*. 2003;5(1):25-34.
16. Fore J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. *Wounds*. 2006;18(8):201–10.
17. Ganceviciene I, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol*. 2012;4(3):308-19.
18. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med*. 2010;16(1-2):113-125.
19. Gaur M, Dobke M, Lunyak VV. Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):208.
20. Gilchrest BA. Retinoids and photodamage. *Br J Dermatol*. 1992;127 Suppl 41:14-20.
21. Gorrindo T, Brendel D. Avatars, cybercoaches, and search engines: Internet technology's value in modern psychiatry. *Harv Rev Psychiatry*. 2010;18(2):77-9.
22. Gupta A, Dai T, Hamblin MR. Effect of red and near-infrared wavelengths on low-level laser (light) therapy-induced healing of partial-thickness dermal abrasion in mice. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):257-65.
23. Hamblin MR. Virulence profile: Michael R. Hamblin. *Virulence*. 2016;7(7):836-
24. Höhn A, Weber D, Jung T, Ott C, Hugo M, Kochlik B, et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol*. 2017;11:482-501.
25. Jagdeo J, Austin E, Mamalis A, Wong C, Ho D, Siegel DM. Light-emitting diodes in dermatology: A systematic review of randomized controlled trials. *Lasers Surg Med*. 2018;50(6):613-628.
26. Kadoya K, Sasaki H, Maitra P, Boudreau N, Berthiaume F, Makino ET, et al. Upregulation of extracellular matrix genes corroborates clinical efficacy of human fibroblast-derived growth factors in skin rejuvenation. *J Drugs Dermatol*. 2017;16(12):1190-1197.

27. Karoussis, I. K., et al. Dosage Effects of an 810 nm Diode Laser on the Proliferation, Collagen Production and Growth Factor Expression of Human Gingival Fibroblasts. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. 2021;39(12), 803-809.
28. Karu, T. I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1999;49(1), 1-17.
29. Karu TI, Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg*. 2005;23(4):355-361.
30. Kim J, Jang JH, Lee JH, Choi JK, Park WR, Bae IH, Bae J, Park JW. Enhanced topical delivery of small hydrophilic or lipophilic active agents and epidermal growth factor by fractional radiofrequency microporation. *Pharm Res*. 2012;29(7):2017-29.
31. Kim YH, Kim HK, Choi JW, Kim YC. Photobiomodulation therapy with an 830-nm light-emitting diode for the prevention of thyroidectomy scars: a randomized, double-blind, sham device-controlled clinical trial. *Lasers Med Sci*. 2022;37(9):3583-3590.
32. Knaevelsrud C, Maercker A. Does the quality of the working alliance predict treatment outcome in online psychotherapy for traumatized patients? *J Med Internet Res*. 2006;8(4):e31.
33. KOHL, E.; STEINBAUER, J.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. *Skin ageing*. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 25, n. 8, p. 873-884, 2011.
34. Krasagakis K, Zouboulis CC, Schröpl F, Orfanos CE. Terminal differentiation of human sebocytes in vitro: a new model for the study of acne vulgaris. *Dermatology*. 1991;183(2):111-6.
35. Krutmann J, Schikowski T, Morita A, Berneburg M. Environmentally-Induced (Extrinsic) Skin Aging: Exposomal Factors and Underlying Mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2021;141(4 Suppl):1096-1103.
36. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun*. 2022;13(1):3409.
37. Le Thi Nhu Ngoc, Moon J-Y, Lee Y-C. Utilization of light-emitting diodes for skin therapy: Systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2023;39(4):303-317.
38. Li N, Guo P, Wang H, Xia F, Yi C. Recent advances in dermal fibroblast senescence and skin aging: unraveling mechanisms and pioneering therapeutic strategies. *Frontiers in Pharmacology*. 2025;16:1592596

39. Li WT, Leu YW, Wu JL, Chen CW, Lee YC, Chen SH, et al. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(Suppl 1):S157–S165.
40. Limerick H, Coyle D, Moore JW. The experience of agency in human-computer interactions: a review. *Front Hum Neurosci.* 2014;8:643.
41. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell.* 2023;186(2):243-278.
42. Macaluso M, Preskorn SH. How biomarkers will change psychiatry: from clinical trials to practice. Part I: introduction. *J Psychiatr Pract.* 2012;18(2):118-
43. Mehta RC, Kadoya K, Maitra P, Goberdhan LT, Makino ET, Naughton GK, et al. Fibroblast-derived growth factors and exosomes as cosmeceuticals. *Dermatol Rev.* 2023;4:250-259.
44. Mineroff J, Maghfour J, Ozog DM, Lim HW, Kohli I, Jagdeo J. Photobiomodulation CME part II: Clinical applications in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2024;91(5):805-815.
45. Ngoc LT, Moon JY, Lee YC. Utilization of light-emitting diodes for skin therapy: Systematic review and meta-analysis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2023;39(4):303-317.
46. Oyeboode, O. A., & Houreld, N. N. (2022). Photobiomodulation at 830 nm Stimulates Migration, Survival, and Proliferation of Fibroblast Cells. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*, 40(10), 661-667.
47. Pakyari, M., et al. Critical role of TGF- β in wound healing. *BioMed Research International*, 2013, 2013-21.
48. Park KY, Han TY, Kim IS, Yeo IK, Kim BJ, Kim MN. The Effects of 830 nm Light-Emitting Diode Therapy on Acute Herpes Zoster Ophthalmicus: A Pilot Study. *Ann Dermatol.* 2013;25(2):163-7.
49. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005;31(3):334-40.
50. Prochaska JJ, Vogel EA, Chieng A, Baiocchi M, Maglalang DD, Pajarito S, Weingardt KR, Darcy A, Robinson A. A randomized controlled trial of a therapeutic relational agent for reducing substance misuse during the COVID-19 pandemic. *Drug Alcohol Depend.* 2021;227:108986.
51. Provoost S, Kleiboer A, Ornelas J, Bosse T, Ruwaard J, Rocha A, Cuijpers P, Riper H. Improving adherence to an online intervention for low mood with a virtual coach: study protocol of a pilot randomized controlled trial. *Trials.* 2020;21(1):860.

52. Quan TH, Shao Y, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):415-24.
53. Rai R, Natarajan K. Laser and light based treatments of acne. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2013;79(3):300-309.
54. Ramirez H, Patel SB, Pastar I. The role of TGF β signaling in wound epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(7):482-491.
55. Russell BA, Kellett N, Reilly LR. A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther*. 2005 Dec;7(3-4):196-200.
56. Sagar M, Broadbent E. Participatory medicine: model based tools for engaging and empowering the individual. *Interface Focus*. 2016;6(2):20150092.
57. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, et al. Molecular mechanisms of dermal aging and antiaging approaches. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9):2126.
58. Trelles MA, Allones I. Red light-emitting diode (LED) therapy accelerates wound healing post-blepharoplasty and periocular laser ablative resurfacing. *J Cosmet Laser Ther*. 2006;8(1):39-42.
59. Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B*. 2017;170:197-207.
60. Varani J, Dame MK, Rittie L, Fligiel SEG, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ. Decreased Collagen Production in Chronologically Aged Skin: Roles of Age-Dependent Alteration in Fibroblast Function and Defective Mechanical Stimulation. *Am J Pathol*. 2006;168(6):1861-1868.
61. Wang Q, An Q, Wang YZ, Yang J, Zhang X, Jiang S, Chen M, Lu L, Zhu Y. Development and mechanistic investigation of recombinant type III humanized collagen gel for mid-facial soft tissue repair. *Collagen and Leather*. 2025;7(1):14.
62. Yousef H, Alhajj M, Fakoya AO, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
63. Zhang J, Yu H, Man MQ, Hu L. Aging in the dermis: Fibroblast senescence and its significance. *Aging Cell*. 2024;23(2):e14054.
64. Zhang S, Duan E. Fighting against skin aging: The way from bench to clinic. *Cell Transplant*. 2018;27(5):729–738.