



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE – UFRN
CENTRO DE BIOCÊNCIAS – CB
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ESTRUTURAL E
FUNCIONAL – PPGBioEF

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE
DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)**

Mestrando: Diego Filgueira Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza

Natal/RN

2019

DIEGO FILGUEIRA ALBUQUERQUE

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional (PPGBioEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS
AUGUSTO GALVÃO BARBOZA

NATAL/RN

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson –
Centro de Biociências - CB

Albuquerque, Diego Filgueira.

Efeito da fotobiomodulação na proliferação e viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) / Diego Filgueira

Albuquerque. - Natal, 2019.

67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional - PPGBioEF.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza.

1. Irradiação a laser de baixa intensidade - Dissertação. 2. Células endoteliais - Dissertação. 3. Viabilidade celular - Dissertação. 4. Proliferação celular - Dissertação. 5. Proteína Ki67 - Dissertação. I. Barboza, Carlos Augusto Galvão. II. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 542.85

Elaborado por KATIA REJANE DA SILVA - CRB-15/351

DIEGO FILGUEIRA ALBUQUERQUE

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE
CÉLULAS ENDOTELIAIS DA VEIA UMBILICAL HUMANA (HUVEC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional (PPGBioEF) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Natal, 30 de agosto de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(Orientador)

Prof^o Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(Membro interno)

Prof^o Dr. Raniere Fagundes de Melo Silveira
Faculdade Maurício de Nassau
(Membro externo)

Dedico este trabalho primeiramente à Deus,
que sempre foi o autor da minha história,
meu maior apoio nos momentos difíceis.
Também homenageio toda a minha família,
pois vocês foram o meu combustível nessa
jornada de crescimento profissional e
pessoal. Em especial, o meu filho Gabriel,
maior razão da minha vitória.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, e por ser o meu guia nessa trajetória.

Aos **meus pais**, “Miltoneto e Luciene”, por sempre acreditarem em mim, e por todo o apoio para que esse sonho se tornasse realidade.

À minha **irmã**, Gilkelly, que foi uma inspiração para mim e sempre me impulsionou com palavras de apoio.

À minha **esposa** Thalya e ao meu **filho** Gabriel, por todo apoio, torcida e compreensão durante esta longa caminhada.

Ao meu **orientador**, o Prof. Carlos Augusto Galvão Barboza, no qual espero levar essa amizade para a vida. Obrigado por todos os ensinamentos, pela oportunidade e confiança. Vou sempre levá-lo como uma das maiores referências para a minha vida profissional.

Ao **companheiro de laboratório** e também amigo Vladimir Sabino, obrigado por todo o apoio nos experimentos, você foi fundamental nessa trajetória.

A todos os **professores** do Programa de Pós-graduação em Biologia estrutural e Funcional – PPG BioEF da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Sou muito grato a todos vocês.

A todos os **colegas de mestrado**, pela amizade e por todo conhecimento compartilhado. Tenho muito orgulho de vocês.

Aos **meus amigos e colegas de trabalho**: André Davim, João Faustino, Leandro Moura e Flávio Eduardo, por me apoiarem nessa importante etapa da minha vida.

Ao Prof. **Hugo Alexandre Rocha** e todos que fazem parte do **Biopol**, que cedeu os laboratórios e equipamentos para a realização desta pesquisa.

À Profa. **Manoela Domingues Martins**, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, por nos ceder as células para realização do estudo.

Ao **Centro Universitário do Rio Grande do Norte – UNI-RN**, por todo o apoio dado para o meu crescimento profissional.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN**. Em especial, ao Departamento de Morfologia e ao Departamento de Bioquímica, por proporcionarem todas as condições para realização desse trabalho.

A **todos os amigos** que de maneira direta ou indireta fizeram parte dessa caminhada.

Muito obrigado a todos!

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho
que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho”*

Abraham Lincoln.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, através de experimentos *in vitro*, o efeito da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade na proliferação e viabilidade de células endoteliais humanas. Células endoteliais da veia do cordão umbilical humano (HUVEC) foram cultivadas e divididas em quatro grupos: C - controle (sem irradiação) e grupos L1, L4 e L7.5 – células irradiadas com doses de 1; 4; e 7,5 J/cm², respectivamente, de laser diodo (InGaAlP; comprimento de onda de 660 nm; potência de 30 Mw, em dose única). A atividade metabólica das células foi avaliada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação, através do ensaio do *Alamar Blue*. A viabilidade e a proliferação celular também foram avaliadas no intervalo de 72h, através dos ensaios de *Live/Dead*, *Annexin V/PI*, análise das fases do ciclo celular e imunomarcagem da proteína Ki67. Os dados do ensaio do *Alamar Blue* mostraram que no intervalo de 72h todos os grupos irradiados exibiram percentuais de redução significativamente maiores do que o grupo controle não irradiado ($p < 0,01$), sendo a diferença ainda mais evidente em L4 e L7.5 ($p < 0,001$). A análise da viabilidade celular por *Live/Dead* demonstrou um grande número de células viáveis em todos os grupos, o que também foi observado através da imunomarcagem por *Annexin V/PI*, que mostrou alta porcentagem de viabilidade celular nos grupos estudados (C: 95,2%; L1: 96,1%; L4: 96,1%; L7.5: 96,9%). A avaliação das fases do ciclo celular mostrou que os grupos irradiados exibiram aumento gradativo do percentual de células nas fases proliferativas do ciclo (S e G2/M), de modo dose-dependente (C: 36,9%; L1: 38,0%; L4: 38,3%; L7.5: 40,4%). A irradiação promoveu um aumento significativo na expressão da proteína nuclear Ki67, com resultado mais acentuado quando comparado o grupo G7.5 com os demais grupos. Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstraram que a fotobiomodulação, principalmente na dose de 7,5 J/cm², promoveu aumento da proliferação e viabilidade de células HUVEC, o que pode sugerir o uso potencial do laser nos parâmetros estudados como estímulo à endotelização nas técnicas de engenharia tecidual vascular.

Palavras-chave: Irradiação a laser de baixa intensidade. Células endoteliais. Viabilidade celular. Proliferação celular. Proteína Ki67.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, through *in vitro* experiments, the effect of photobiomodulation using low-level laser irradiation on the proliferation and viability of human endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured and divided into four groups: C - control (without irradiation) and L1, L4 and L7.5 groups - cells irradiated with doses of 1, 4, and 7.5 J/cm², respectively, of diode laser (InGaAlP, wavelength of 660 nm, power of 30 Mw, in a single dose). The metabolic activity of the cells was assessed at the 24, 48 and 72 h after irradiation by the Alamar Blue assay. Cell viability and proliferation were also evaluated at 72 h through the Live/Dead, Annexin V/PI assays, cell cycle phase analysis and Ki67 protein immunostaining. Data from the Alamar Blue assay showed that at 72 h all irradiated groups exhibited significantly greater reduction percentages than the non-irradiated control group ($p < 0.01$), the difference being even more evident in L4 and L7.5 ($p < 0.001$). The analysis of cell viability by Live/Dead demonstrated a large number of viable cells in all groups, which was also observed through Annexin V/PI immunostaining, which showed a high percentage of cell viability in the studied groups (C: 95.2%, L1: 96.1%, L4: 96.1%, L7.5: 96.9%). The evaluation of the phases of the cell cycle showed that the irradiated groups exhibited a gradual increase of the percentage of cells in the proliferative phases of the cycle (S and G2/M), in a dose-dependent manner (C: 36.9%, L1: 38.0 %, L4: 38.3%, L7.5: 40.4%). Irradiation promoted a significant increase in Ki67 nuclear protein expression, with a more pronounced result when the G7.5 group was compared with the other groups. Taken together, the results of this study demonstrated that photobiomodulation, especially at a dose of 7.5 J/cm², promoted increased proliferation and viability of HUVEC cells, which may suggest the potential use of the laser in the parameters studied as a stimulus to endothelialization in the vascular tissue engineering techniques.

Key words: Low-level light therapy. Endothelial cells. Human umbilical vein endothelial cells. Cell viability. Cell proliferation. Ki67 protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1** - Parâmetros do Laser.....39
- Figura 1** - Desenho experimental do trabalho, mostrando os grupos de estudo, a sequência do cultivo celular, o momento da irradiação (T0: tempo zero), os intervalos de análise (24, 48 e 72 h) e os ensaios realizados em cada intervalo.....39
- Figura 2** - Percentual médio (\pm desvio padrão) da redução do Alamar Blue nos diferentes grupos ao longo do experimento. Observa-se que nos dois primeiros intervalos do estudo (24 e 48h) os valores numéricos dos grupos irradiados foram maiores do que o controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Já no intervalo de 72h todos os grupos irradiados exibiram percentual de redução significativamente maior do que o grupo controle não irradiado (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; teste de Mann-Whitney).....43
- Figura 3** - **A.** Fotomicrografias das células HUVEC viáveis (citoplasmas marcados em verde pela calceína AM) e inviáveis (núcleos marcados em vermelho pelo homodímero de etideo), no intervalo de 72 h (barra: 200 μ m). **B.** Médias do número de células viáveis/campo nos diferentes grupos. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; teste de Mann-Whitney). **C.** Médias do percentual de células mortas/campo, nos diferentes grupos.....44
- Figura 4** - A análise de morte celular/apoptose através dos dados do ensaio da imunomarcção por Anexina V/PI em citometria de fluxo mostraram uma alta porcentagem de viabilidade celular nos grupos estudados (C: 95,2%; L1: 96,1%; L4: 96,1%; L7.5: 96,9%). Q1: Anexina V-/PI+; Q2: Anexina V+/PI+; Q3: Anexina V+/PI-; Q4: Anexina V-/PI-.....45
- Figura 5** - A avaliação das fases do ciclo celular mostrou que os grupos irradiados (L1; L4; L7.5) exibiram aumento gradativo do percentual de células nas fases proliferativas do ciclo (S e G2/M), sendo o grupo L7.5 o que exibiu o percentual mais alto de células nestas fases.....46
- Figura 6** - **A** – Imunoexpressão de Ki67; **B** – Médias da intensidade de fluorescência da proteína Ki67 nos diferentes grupos, fornecidos pelo software do citômetro (FlowJo). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney). Os dados mostram diferenças entre todos os grupos, com expressão maior da Ki67 no grupo que recebeu irradiação de 7.5 J/cm² (L7.5).....47

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micrômetro
AsGa	Arseniato de gálio
AsGaAl	Arseniato de gálio alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo controle (não irradiado)
CE	Célula endotelial
CPEs	células progenitoras endoteliais
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dióxido de Carbono
Cox	Citocromo c oxidase
CPEs	Células progenitoras endoteliais
CRM	Cirurgia de revascularização miocárdica
DCVs	Doenças cardiovasculares
DLL4	Delta-like 4
DMEM	<i>Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ET	Endotelina
FGFs	Fator de crescimento de fibroblasto, do inglês <i>Fibroblast growth factor</i>
GAGs	glicosaminoglicanos
He-Ne	Hélio-Neônio
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana, do inglês <i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular, do inglês <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
ICP	Intervenção coronariana percutânea
IL-8	Interleucina 8
InGaAlP	Índio gálio alumínio e fósforo (ou lasers diodo)
J	Joules
J/cm²	Joules por centímetro quadrado
KDR	Receptor de domínio de Inserção de quinase, do inglês <i>Kinase insert domain receptor</i>
L1	Grupo irradiado com 1J/cm ²
L4	Grupo irradiado com 4J/cm ²
L7.5	Grupo irradiado com 7.5J/cm ²
LBI	Laser de baixa intensidade
LBP	Laser de baixa potência
LEDs	Diodo emissor de luz, do inglês <i>Light-emitting diode</i>
LLLT	Terapia a laser de baixa intensidade, do inglês <i>Low-level laser therapy</i>
Mg	Miligrama

mL	Mililitro
mW	Miliwat
NIR	Próximo ao infravermelho, do inglês <i>Near Infrared</i>
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
°C	Grau celsius
PBM	Fotobiomodulação, do inglês <i>Photobiomodulation</i>
PBMT	Terapia de fotobiomodulação, do inglês <i>Photobiomodulation therapy</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PE	Polietileno
PGA	Poliglicolídeo
PIGF	Fator de crescimento placentário, do inglês <i>Placental growth factor</i>
PLA	Polilactídeo
PMMA	Poli (metacrilato de metila)
PU	Poliuretano
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
ROS	Espécie reativa de oxigênio, do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
RTKs	Receptor tirosina quinase, do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SFB	Soro fetal bovino
SVG	Veia safena magna, do inglês <i>Greater saphenous vein</i>
T0	Tempo 0 (momento da irradiação)
TEM	Migração transendotelial, do inglês <i>Transendothelial migration</i>
TEVGs	Enxertos vasculares produzidos por engenharia de tecidos
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
TPS	<i>Sistema de perfusão tubular</i> , do inglês <i>Tubular perfusion system</i>
UV	Radiação ultravioleta
VCAM	Proteína de adesão celular vascular, do inglês <i>Vascular Cell Adhesion protein</i>
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR-1	Fator de crescimento endotelial vascular 1, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i>
VEGFR-2	Fator de crescimento endotelial vascular 2, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VEGFs	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VIS	Luz visível
VSMCs	Células do músculo liso vascular, do inglês <i>Vascular smooth muscle cells</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCVs)	14
2.2 ENGENHARIA TECIDUAL	15
2.3 CÉLULAS ENDOTELIAIS E ENDOTELIZAÇÃO.....	22
2.4 FOTOBIMODULAÇÃO	27
2.5 FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	32
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA.....	37
4.1 TIPO DE ESTUDO	37
4.2 AMOSTRA	37
4.3 CULTIVO DE CÉLULAS	37
4.4 LOCAL	37
4.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	37
4.6 PROTOCOLO DE FOTOBIMODULAÇÃO.....	38
4.7 ENSAIO DO ALAMAR BLUE®	39
4.8 ENSAIO DO LIVE/DEAD®	39
4.9 IMUNOMARCAÇÃO POR ANNEXINA V/PI.....	40
4.10 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR.....	40
4.11 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI67.....	40
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	41
5 RESULTADOS	42
5.1 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR – ALAMAR BLUE	42
5.2 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – LIVE/DEAD	43
5.3 IMUNOMARCAÇÃO POR ANNEXINA V/PI	44
5.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR	45
5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE KI67	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Após a exposição de um tecido a estímulo destrutivo, quase todos os tecidos passam por um processo de reparo da ferida (GURTNER *et al.*, 2008). Um fator chave para a reconstrução tecidual é a formação de novos vasos sanguíneos ou angiogênese (LIMAN; ENDRES, 2012), um processo que ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica das células endoteliais (GÓRALCZYK *et al.*, 2015).

Fatores que apresentem capacidade de criar, reparar e regular o sistema vascular humano possuem ampla aplicação terapêutica. Os pesquisadores buscam utilizar essa capacidade para desenvolver novas ferramentas de tratamento para doenças como o infarto do miocárdio, isquemias, cicatrização de feridas e doenças vasculares (DEAN, *et al.*, 2012). Neste sentido, uma das áreas de grande destaque na medicina é a engenharia tecidual, que atualmente utiliza diferentes modelos de polímeros sintéticos em aplicações de enxertos vasculares na terapia de doenças cardiovasculares. Entretanto, trombose, reestenose e baixa patência a longo prazo sempre atrapalham e limitam seu uso, especificamente para enxertos vasculares artificiais de pequeno diâmetro (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Um desafio crítico para o sucesso dos enxertos vasculares biodegradáveis é o estabelecimento de um endotélio saudável. Para estabelecer esta monocamada de células endoteliais, uma variedade de técnicas foi desenvolvida, incluindo semeadura celular (MELCHIORRI *et al.*, 2016). Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados em busca de substâncias ou fatores que promovam a proliferação de células endoteliais, por seu grande potencial de aplicação clínica (GÓRALCZYK *et al.*, 2015). O aumento da adesão de células endoteliais para formação de uma monocamada (ou endotelização) é um evento desejável, por exemplo, na superfície de dispositivos médicos que entram em contato com o leito vascular, pois inibe a adesão plaquetária e, portanto, reduz os riscos de coagulação e trombose (KONO *et al.*, 2016).

Uma das ferramentas utilizadas na clínica para induzir o reparo tecidual é a fotobiomodulação (PBM) com o laser de baixa intensidade (LBI). Ao se aplicar o laser sobre o tecido, algumas funções celulares podem ser estimuladas, como proliferação e viabilidade (MARQUES *et al.*, 2016). Neste sentido, a fotobiomodulação pode ser também uma estratégia alternativa nos protocolos de engenharia tecidual, já que a

laserterapia aumenta a taxa proliferativa *in vitro*, mantendo a viabilidade celular (GINANI *et al.*, 2015).

A literatura mostra os efeitos positivos da fotobiomodulação sobre diversos tipos celulares, incluindo células-tronco (GINANI *et al.*, 2015). Tem sido sugerido que o LBI estimula a proliferação de células endoteliais (SILVA *et al.*, 2010; SCHINDL *et al.*, 2003) e a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (SILVA *et al.*, 2010), além de influenciar a organização do citoesqueleto endotelial (RICCI *et al.*, 2009). Todavia, a ação da laserterapia em modelos *in vitro* utilizando células endoteliais ainda precisa ser melhor investigada, em virtude da grande variabilidade nos parâmetros de irradiação utilizados nos trabalhos anteriores, especialmente no tocante ao comprimento de onda e à dosimetria. No presente estudo, foi testada em experimentos *in vitro* a hipótese de que a fotobiomodulação com LBI no espectro vermelho (660 nm) influencia positivamente a proliferação e a viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), contribuindo assim para o processo de endotelização. Os resultados podem ter impacto nas técnicas de engenharia tecidual vascular, sugerindo o uso potencial da laserterapia na promoção da endotelização nestas técnicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES (DCVs)

As doenças cardiovasculares (DCVs), incluindo acidente vascular cerebral e ataque cardíaco, são as principais causas de mortes em todo o mundo (RADKE *et al.*, 2018). Dados sobre a taxa de mortalidade mostram que as DCVs representaram 31,9% (787.650) de todas as 2.468.435 mortes em 2010, ou seja, 1 de cada 3 mortes nos Estados Unidos (GO *et al.*, 2014). Além disso, a Organização Mundial de Saúde estimou que 17,5 milhões de pessoas morreram em todo o mundo devido a doenças cardiovasculares no ano de 2013, e este número deverá crescer para 23,6 milhões até 2030 (RADKE *et al.*, 2018).

A causa mais notável da doença cardiovascular é a aterosclerose, uma placa de gordura nas paredes das artérias. A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, que produz placas arteriais caracterizadas por infiltrados inflamatórios, acúmulo de lipídios, morte celular e fibrose (ANDERSSON *et al.*, 2010). A DCV também pode causar estenose ou oclusão de vasos sanguíneos e está comumente associada à doença arterial coronariana, doença cerebrovascular, trombose venosa profunda e outras complicações graves (RADKE *et al.*, 2018). Doenças como infarto do miocárdio, isquemia, doenças vasculares e cicatrização de feridas causam um grande impacto na qualidade de vida de milhões de pessoas atingidas ao redor do mundo. Isso leva pesquisadores a desenvolverem novas ferramentas para o tratamento dessas doenças, afim de encontrar uma ferramenta capaz de criar, reparar e regular o sistema vascular humano (DEAN, *et al.*, 2012).

O termo intervenção coronariana percutânea (ICP) é comumente usado para descrever procedimentos que podem melhorar mecanicamente a perfusão miocárdica sem recorrer à cirurgia. A ICP é comumente realizada com a inserção de um stent. Stents feitos de metal ainda são tradicionais e têm sido aplicados desde os anos 80. Ainda que a ocorrência de infecção na artéria coronária após implante de stent seja rara, o impacto de uma complicação desse tipo é potencialmente fatal. Além disso, a resposta inflamatória a essa infecção pode contribuir para a reestenose em stents metálicos. Além do stent, o padrão ouro para uma substituição vascular é o uso de um vaso nativo autólogo, que possui propriedades fisiológicas ideais (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

As doenças isquêmicas são consequência de dano endotelial e as principais causas deste dano é inflamação e estresse oxidativo (TAO *et al.*, 2015), que têm sido apontados como responsáveis por prejudicar o crescimento endotelial e a angiogênese, levando à morte celular (DREGER *et al.*, 2010). O tratamento mais comum é a cirurgia de revascularização miocárdica (CRM). Nesta cirurgia, são utilizados vasos como a artéria mamária interna, artéria radial e veia safena maior (SVG) como substitutos vasculares. Entretanto, a disponibilidade de segmentos de veias e artérias nativas é limitada, o que limita as cirurgias tradicionais de transplante (ADIPURNAMA *et al.*, 2017). Para o tratamento dessas doenças, há uma demanda de produção de condutos vasculares para reconstruir ou contornar oclusões vasculares e aneurismas. Além disso, a demanda por tecidos e órgãos funcionais para bioengenharia aumentará no futuro, afim de lidar com a escassez de tecidos e órgãos transplantados. No entanto, um dos principais gargalos nessa abordagem ainda é a vascularização desses construtos de bioengenharia (CHANDRA; ATALA, 2019).

Os enxertos sintéticos são uma alternativa útil para vasos de grande diâmetro, mas não são ideais para vasos de pequeno calibre (diâmetros inferiores a 6 mm), devido à baixa taxa de desobstrução. Os enxertos vasculares produzidos por engenharia de tecidos (TEVGs) prometem superar as limitações observadas nos enxertos sintéticos e servem como vasos de substituição alternativos para aplicações clínicas. No entanto, materiais de engenharia para imitar as propriedades dos tecidos nativos são desafiadores devido à estrutura e composição complexas. Para desenvolver um enxerto vascular funcional de pequeno diâmetro, é essencial entender a superfície de contato com o sangue e os mecanismos antitrombogênicos (RADKE *et al.*, 2018).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual possui um enorme potencial para substituir ou restaurar a função de tecidos danificados. Embora progressos significativos na combinação de células e estruturas de polímeros tenham sido alcançados, pouquíssimos sistemas reais semelhantes a tecidos foram desenvolvidos até o momento. As aplicações clínicas mais bem-sucedidas foram de fato limitadas a tecidos como pele, cartilagem e bexiga. Isso se deve

principalmente à dificuldade de obter um sistema vascular funcional (BAIGUERA; RIBATTI, 2013).

Atualmente a engenharia de tecidos tem apresentado avanços importantes na impressão de órgãos em 3D, como fígado, rim, pulmão e coração (MELCHIORRI *et al.*, 2016), todavia um pré-requisito básico para a sobrevivência e função dessas construções teciduais tridimensionais (3D) é o estabelecimento de vasos sanguíneos (MIRIA *et al.*, 2019).

A bioimpressão 3D de redes vasculares com estruturas hierárquicas que se assemelham a estruturas *in vivo* permitiu que a circulação sanguínea dentro de construções de tecidos espessos acelerasse a vascularização e aumentasse a regeneração tecidual. A rápida vascularização bem-sucedida de construções de tecido requer sinergia entre a fabricação de canais perfusáveis e funcionais que induzem a angiogênese e a formação de capilares nos construtos (MIRIA *et al.*, 2019). Para obter sucesso nessa aplicação é necessário que essa estratégia de vascularização seja eficiente, e que possibilite a entrega de sangue para a parte interna do tecido. Durante os últimos anos, diferentes estratégias de vascularização têm sido empregadas no campo da engenharia de tecidos e as células endoteliais têm demonstrado um papel fundamental na obtenção de redes de vasos funcionais e adequados dentro de construções de engenharia de tecidos (MELCHIORRI *et al.*, 2016).

A engenharia de tecidos vasculares tem o potencial de causar um impacto significativo no tratamento de uma ampla variedade de condições médicas, incluindo o fornecimento de construções de tecidos e órgãos vascularizados gerados *in vitro* para transplante (CHANDRA; ATALA, 2019). Assim, ela representa um desafio para encontrar uma abordagem consistente para a escolha de um material apropriado em enxertos vasculares produzidos por engenharia tecidual (TEVG). Os requisitos necessários para a engenharia de tecidos de enxertos vasculares incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade e biomimética. Em outras palavras, ele deve replicar as propriedades da matriz extracelular cardíaca em termos de geometria, propriedades mecânicas e interação com as células, e degradar em produtos de degradação não-tóxicos à medida que a necessidade de suporte mecânico diminui (BOFFITO; SARTORI; CIARDELLI, 2014).

Os vasos sanguíneos têm uma estrutura complexa e um tecido funcionalmente dinâmico, com potencial mínimo de regeneração (THOTTAPPILLIL; NAIR, 2015). A

função diversa desempenhada pelos vasos sanguíneos é mantida pela presença da sua matriz extracelular (MEC) cardíaca, que varia em composição, espessura e arquitetura geral, diferenciando-se entre artérias, capilares e veias (RHODES; SIMONS, 2007).

Diversos enxertos vasculares artificiais comerciais já foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e milhões de pacientes se beneficiaram desses produtos. Devido à facilidade de síntese de polímeros, o ajuste controlado de suas propriedades, alta reprodutibilidade e rápida disponibilidade de polímeros como polietileno (PE), poli (metacrilato de metila) (PMMA), poliuretanos (PUs), poliglicolídeo (PGA) e polilactídeo (PLA), estes têm sido os principais biomateriais selecionados para implantes e outros dispositivos médicos (REN *et al.*, 2015).

O desenvolvimento de uma superfície de contato biocompatível com o sangue ainda é um grande desafio. Os pesquisadores estão usando biomimética para gerar enxertos vasculares funcionais e redes vasculares. Uma abordagem multidisciplinar está sendo usada, incluindo biomateriais, células, fatores pró-angiogênicos e tecnologias de microfabricação (CHANDRA; ATALA, 2019).

Os enxertos vasculares sintéticos baseados em polímeros são uma das opções que estão disponíveis comercialmente desde a década de 1970, e que são utilizados há mais de 50 anos (LI; SENGUPTA; CHIEN, 2014). No entanto, os problemas gerais em todos esses polímeros são que eles têm resistência limitada à formação de trombos na superfície, o que leva à obstrução dos enxertos. Para melhorar ainda mais o potencial do poliuretano, é necessária uma abordagem estratégica para modificar sua superfície (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

As reações do hospedeiro à prótese vascular começam imediatamente após a restauração da circulação sanguínea. As interfaces tecido-prótese e sangue-prótese são microambientes complexos, e várias propriedades físico-químicas como carga, energia, molhabilidade e topografia podem ser responsáveis pela permeabilidade do enxerto e, assim, influenciar o comportamento interfacial adjacente ao biomaterial (HOFFMAN, 1982).

Afim de diminuir a resposta inflamatória e promover a endotelização, o uso de materiais biodegradáveis como arcabouços têm recebido atenção especial. Eles geralmente demonstram propriedades mecânicas adaptáveis e alta reprodutibilidade e, comparados a polímeros naturais, podem ser produzidos em grandes quantidades

(KOCH *et al.*, 2010; CATTO *et al.*, 2014). Existem vários exemplos desses polímeros, como poli (ϵ -caprolactona) (PCL), PGA e PLA. No entanto, nenhum dos materiais biodegradáveis geralmente pode ser implantado para bio-aplicações de longo prazo. Embora os polímeros não degradáveis tenham sido descritos como sendo excelentes para a preparação de enxertos vasculares artificiais em aplicações a longo prazo, existem preocupações quanto à sua falta de boas propriedades de superfície. Para enxertos vasculares artificiais ideais, suas propriedades de superfície, como hemocompatibilidade e atividades anti-trombóticas e anti-infecciosas, devem ser consideradas. Assim, para atingir esses objetivos, várias estratégias foram desenvolvidas ao longo dos anos (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Diferentes estratégias têm sido propostas para simular o crescimento de novos vasos sanguíneos em tecidos modificados, como o uso de fatores de crescimento, fabricação de tecnologias de arcabouços, prevascularização *in vivo* e estratégias baseadas em células, e foi demonstrado que as células endoteliais desempenham um papel central no processo de neovascularização e no controle da função dos vasos sanguíneos. Em particular, diferentes configurações "ambientais" (origem, presença de células de suporte, superfície do biomaterial, presença de forças hemodinâmicas) influenciam fortemente a função das células endoteliais, o potencial angiogênico e a formação *in vivo* de vasos duráveis (BAIGUERA; RIBATTI, 2013). Para a engenharia vascular, o entendimento da biologia da superfície de contato com o sangue e dos mecanismos antitrombogênicos é fundamental para o desenvolvimento de enxertos vasculares funcionais ou tecidos vascularizados. O lúmen do vaso sanguíneo é coberto por uma monocamada confluyente de CEs e um endotélio saudável desempenha um papel crítico na manutenção da saúde vascular e hemostasia (CHANDRA; ATALA, 2019).

Para entender a formação do trombo, cada passo dentro das interações entre o sangue e o material precisa ser observado. O primeiro passo dessa reação é o processo de adsorção/dessorção de proteína plasmática, que é comumente conhecido como efeito Vroman, seguido de adesão plaquetária e, eventualmente, migração de células endoteliais e células musculares. Uma vez aderidas à superfície, as plaquetas se agregam e tornam-se ativas. Essa ativação leva à liberação de várias moléculas que atuam como sinal, disparando posteriormente uma série de reações complexas. Durante esse estágio, a trombina converte o fibrinogênio solúvel em fitas insolúveis de fibrina.

Esses fios são então reticulados, formando um trombo. O trombo resultante pode se soltar da superfície e ser levado através da circulação sanguínea, resultando no bloqueio de um vaso sanguíneo, conhecido como tromboembolismo (DE MEL *et al.*, 2012). Isso geralmente acontece nos pulmões, no cérebro, no trato gastrointestinal, nos rins ou nos membros inferiores, sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade dos pacientes (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Implantes cardiovasculares, especialmente enxertos vasculares feitos de polímeros sintéticos, apresentam aplicações clínicas amplas no tratamento de doenças cardiovasculares. Entretanto, casos de falha ainda existem, notadamente causados por reestenose e formação de trombo (ADIPURNAMA *et al.*, 2017). O desenvolvimento de uma superfície de contato biocompatível com o sangue permanece um grande desafio. A superfície luminal enxerto produzido deve evitar respostas inflamatórias negativas e trombogênese imediatamente após o implante e promover a endotelização. A superfície tornou-se, portanto, um foco primário para os esforços de pesquisa nesta área (RADKE *et al.*, 2018). Com o objetivo de resolver esses problemas, várias abordagens para a modificação da superfície de enxertos vasculares sintéticos têm sido usadas para melhorar tanto a hemocompatibilidade quanto a patência a longo prazo dos enxertos vasculares artificiais (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Para reduzir a trombogenicidade e manter a patência, os enxertos vasculares produzidos por engenharia tecidual (TEVGs) exigiriam o processamento da superfície de contato com o sangue. Para aplicações clínicas correntes, o uso de mensurantes antimicrobianos sistêmicos e anticoagulantes são comuns na manutenção da patência da artéria. A modificação adequada da superfície que entra em contato com o sangue pode reduzir ou eliminar a necessidade de tais drogas, diminuindo assim o risco correspondente de sangramento sistêmico. A heparina é o agente anti-trombogênico amplamente utilizado no revestimento de superfícies de contato com sangue de enxertos e aparelhos vasculares (CHANDRA; ATALA, 2019).

Em geral, a engenharia de tecidos vasculares com o uso de estruturas poliméricas representa uma abordagem promissora no atendimento da crescente demanda por substituições de vasos sanguíneos. Para resolver esse problema cardiovascular, a abordagem mais viável é a utilização de veias e artérias autólogas de diâmetro pequeno (<6 mm) (ROCCO *et al.*, 2014; RADKE *et al.*, 2018). Devido à limitação em fornecer esse material e ao risco crescente de trombose e oclusão em

enxertos vasculares de pequeno diâmetro, a necessidade de uma nova estratégia para melhorar a complacência e a hemocompatibilidade de enxertos vasculares sintéticos tornou-se importante (RADKE, *et al.*, 2018). Um desafio crítico para o sucesso dos enxertos vasculares biodegradáveis é o estabelecimento de um endotélio saudável. Para estabelecer esta monocamada de células endoteliais, uma variedade de técnicas foi desenvolvida, incluindo semeadura celular (MELCHIORRI *et al.*, 2016).

As abordagens mais comuns usadas para resistir à adesão inespecífica de proteínas, melhorar a hemocompatibilidade e melhorar a permeabilidade a longo prazo de enxertos vasculares artificiais são as modificações superficiais, físicas ou químicas. Porém, algumas pesquisas também consideraram a endotelização da superfície interna dos biomateriais vasculares (LI; SENGUPTA; CHIEN, 2014). Enxertos vasculares podem ser semeados com tipos de células relevantes e deixados amadurecer antes da implantação. Devido à baixa capacidade proliferativa das células endoteliais adultas e à morbidade do sítio doador, tem havido um interesse crescente no uso de células progenitoras endoteliais (CPEs) para procedimentos de cicatrização vascular (MELCHIORRI *et al.*, 2016).

O desafio mais significativo na engenharia de tecidos vasculares é o desenvolvimento de enxertos de pequeno diâmetro com propriedades antitrombóticas e alta patência. Numerosas tentativas têm sido feitas para melhorar a patência e o sucesso desses enxertos com diâmetros internos inferiores a 6 mm. A patência reduzida é geralmente causada por trombose e hiperplasia intimal, e a noção prevalente é que o estabelecimento precoce de um endotélio pode reduzir o risco dessas questões (MELCHIORRI *et al.*, 2016). A fim de suportar células semeadas *in vitro*, uma variedade de tipos de células, materiais, técnicas de fabricação e biorreatores têm sido usados para fornecer o ambiente mecânico e biológico para o desenvolvimento de enxertos vasculares de engenharia tecidual (TEVGs) (PUNSHON *et al.*, 2008; TONDREAU *et al.*, 2015).

O caráter da interface material-sangue é determinado pelas propriedades do material, pelos efeitos do fluxo sanguíneo e pelo ambiente biológico. A seleção de materiais e a compreensão de seus efeitos sobre as células sanguíneas são fundamentais para a engenharia do TEVG (RADEC, *et al.*, 2018). A hemocompatibilidade dos biomateriais depende principalmente de suas características físicas e químicas de superfície. Desta forma, a modificação da superfície é uma das estratégias mais diretas e

eficazes para minimizar a trombogenicidade e melhorar a hemocompatibilidade. Uma vantagem notável é que as propriedades mecânicas intrínsecas dos biomateriais e enxertos não são significativamente alteradas após o processo de modificação da superfície (HEWETT; MURRAY, 1993; SANTOS; REIS, 2010).

Há classes principais de técnicas de modificação de superfície que podem ser consideradas (FERREIRA, *et al.*, 2015). A primeira diz respeito à modificação de superfície por agentes físicos. Estes incluem o tratamento de descarga corona, tratamento com plasma, condicionamento, exposição à radiação ultravioleta (UV), tratamento de ablação a laser, irradiação gama e tratamentos de raios-X. A primeira inclui a modificação da superfície usando agentes químicos e incorporação de grupos funcionais, como oxidação de superfície, hidrólise, enxerto químico e revestimento de superfície (FERREIRA, *et al.*, 2015). A segunda classe envolve o uso e a imobilização de moléculas biológicas ou células na superfície dos materiais, como no processo de endotelização (REN *et al.*, 2015). Revestimentos de superfície com compostos bioativos, modulando as interações celulares com uma superfície implantada, fornecendo sinais que direcionam as atividades biológicas na interface (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Enxertos produzidos a partir de biomateriais ou enxertos celulares fabricados por células alogênicas ou autólogas, todos os TEVGs requerem uma superfície funcional de contato com o sangue para reduzir a trombogenicidade e manter a patência. Diferentes estratégias, como inclusão de células antitrombóticas no lúmen do enxerto, estimulação da endotelização *in vivo*, utilização de biomateriais de enxerto resistentes à trombose e modificação química da superfície do enxerto, têm sido empregadas para produzir superfícies de contato com sangue em TEVGs (RADKE, *et al.*, 2018).

A modificação da superfície desempenha um papel importante em aplicações biomédicas, uma vez que os revestimentos podem ser usados para adaptar a superfície às propriedades desejadas sem comprometer suas propriedades de volume (DE MEL, *et al.*, 2012). Modificação de superfície usando moléculas hidrofílicas pode aumentar a hemocompatibilidade, mas isso pode limitar a adesão inicial da célula endotelial vascular. Portanto, a melhoria da endotelização desses enxertos com peptídeos, biomoléculas e células específicas é agora um campo estimulante de pesquisa (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

2.3 CÉLULAS ENDOTELIAIS E ENDOTELIZAÇÃO

As células endoteliais (CEs) formam uma monocamada contínua entre o sangue e o tecido conjuntivo subepitelial. A superfície da CE em um humano adulto é composta por aproximadamente 6×10^{13} células e cobre uma área superficial de aproximadamente 7 m^2 (BAIGUERA; RIBATTI, 2013). As CE desempenham papéis importantes na manutenção da homeostase corporal. Elas estão relacionadas com a logística de transporte, controle de permeabilidade vascular e regulam o tônus vascular (POBER; SESSA, 2007). As CEs ainda sintetizam, metabolizam e liberam substâncias humorais e hormonais gerando uma superfície antitrombótica ativa que facilita o trânsito de constituintes plasmáticos e celulares por toda a vasculatura. Perturbações induzem CEs a criar um microambiente protrombótico e antifibrinolítico (BAIGUERA; RIBATTI, 2013).

O formato de paralelepípedo é a principal característica histológica da EC, mas elas constituem mais do que placas mecanoprotetoras estáticas. As CEs que revestem a parede interna do vaso não são totalmente inertes e externas, possuem também partes centrais e ativas em dois importantes sistemas do corpo, o sistema imunológico e o vascular. Como consequência, danos, (hiper) ativação e disfunção da CE são frequentemente relacionados com a etiologia das doenças cardiovasculares. Esses dois sistemas geralmente agem em conjunto, por exemplo, durante a cicatrização de feridas, mas também há condições em que a CE se envolve em papéis distintos em cada um deles, como durante o desenvolvimento e a regeneração tecidual (POBER; SESSA, 2007).

O sistema vascular é composto por CE revestindo o interior dos vasos e por tecido conjuntivo e células musculares lisas que suportam a estrutura do vaso. Fortemente adaptado aos vários tecidos, o sistema linfático e o vaso sanguíneo permeiam todo o corpo. Os vasos linfáticos são tubos com extremidades cegas equipados com válvulas para cumprir eficientemente sua principal tarefa de coleta e drenagem do líquido intersticial que vaza dos vasos sanguíneos. Assim, eles também são uma rota de transporte de nutrientes ou células móveis, como glóbulos brancos, mais uma vez interligando a função com o sistema imunológico (ALITALO, 2011).

A CE isolada de diferentes tecidos exibirá adaptações específicas do órgão e ajustes na forma e função. Por exemplo, a CE do sistema nervoso central forma parte da

barreira hematoencefálica, a CE uterina expressa os receptores estrogênicos, a CE das vênulas endoteliais altas permitem rotas extracelulares para o extravasamento de leucócitos durante o retorno, CE do endocárdio se dobram e se adaptam ao batimento cardíaco constante e CE comprometida para vasos arteriais ou venosos mostram diferentes capacidades de germinação (HAACK; ABDELILAH-SEYFRIED, 2016). Durante a angiogênese, a CE é ativada, e linhas únicas de células começam a migrar de um vaso preexistente em direção a um gradiente de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um fator de crescimento produzido sob condições hipóxicas (GERHARDT, 2008).

As CEs de fontes diferentes são conhecidas por apresentar comportamentos diferentes em termos de potencial angiogênico, permeabilidade molecular, homeostase, tônus vascular e até tolerância imunológica. A fonte celular é, portanto, um importante aspecto que deve ser considerado. As CEs da veia umbilical humana (HUVECs) têm sido frequentemente usadas para o estudo *in vitro* da angiogênese (estudos de vascularização) (BAIGUERA; RIBATTI, 2013). É comumente aceito que novos vasos são formados como brotos crescentes de células de ponta/ caule. A célula de ponta principal é altamente migradora e ressalta muitos filopódios, que expressam receptores de VEGF para detectar o gradiente de VEGF. As chamadas células do caule seguem atrás da célula da ponta. Estes são altamente proliferativos e acabarão por formar um novo vaso lumenizado. O Delta-like 4 (DLL4), um ligante do receptor Notch, expresso em células de ponta, induz a sinalização Notch na célula vizinha, sobre a qual a expressão de superfície do receptor KDR (VEGF 2) é regulada negativamente implementando o fenótipo da célula peduncular (OTTAVIANI *et al.*, 2009).

Vários fatores podem selecionar uma célula para se tornar uma célula de ponta, incluindo superexpressão local aleatória de KDR, vantagens metabólicas de algumas células em termos de glicólise elevada conferindo maior mobilidade, ou arranjos celulares orientando as células em certas direções para facilitar a migração (BLANCO; GERHARDT, 2013). Quando um broto encontra outro, eles se anastomosam e o sangue pode fluir através de um vaso recém-formado (WACKER; GERHARDT, 2011).

EC não apenas funciona como um dispositivo de transporte para células imunes móveis e formação de uma barreira mecânica contra intrusos (POBER; SESSA, 2007), mas também possui função parácrina essencial ao secretar quimiocinas, interleucinas, interferons e fatores de crescimento (ALITALO, 2011), organiza o

recrutamento de células do sistema imunológico e regula o extravasamento de leucócitos em locais de inflamação por meio da expressão de moléculas de adesão como E-selectina, P-selectina, ICAM ou VCAM, bem como mantém hemostasia e coagulação apropriada (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011).

É um grande desafio para a CE manter o equilíbrio entre a vedação das paredes dos vasos para evitar o vazamento de fluidos transportados, por um lado, e facilitar o extravasamento de células imunes móveis, por outro. No entanto, durante a inflamação, o aumento da permeabilidade vascular e migração transendotelial (TEM), refletindo a imunidade inata e adaptativa, são necessários em diferentes momentos. A liberação de moléculas como anticorpos ou componentes do complemento para o tecido lesionado deve restringir as infecções. Como segunda linha de defesa, os leucócitos se juntam. Para esse fim, a CE expressa moléculas de adesão em sua superfície com diversas especializações operatórias para direcionar a cascata de extravasamento de leucócitos. Em geral, TEM pode ser retratada como leucócitos migrando através da parede do vaso em etapas sequenciais identificadas como: (1) adesão fraca, (2) rolagem, (3) adesão firme, (4) diapedese (VESTWEBER, 2015).

A CE também controla o tônus vascular ao enviar sinais parácrinos para as células musculares lisas que circundam os vasos, o que pode contrair os vasos por contração ou dilatá-los por relaxamento. O vasoconstritor mais potente é a endotelina (ET), um peptídeo de 21aa existente em três isoformas sintetizadas principalmente por EC. O tônus vascular é regulado no equilíbrio de sinais vasodilatadores e vasoconstritores para adaptar a pressão arterial e o fluxo às necessidades atuais da atividade (DAVENPORT *et al.*, 2016).

As células endoteliais são culpadas e vítimas, ao mesmo tempo, durante doenças vasculares, como no infarto do miocárdio. Embora a CE tolere a hipóxia melhor do que outros tipos de célula cardíaca, sua ativação pró-angiogênica causa perda da função de barreira e formação de edema. Além disso, sua ativação pró-inflamatória aumenta a expressão de moléculas de adesão e causa o influxo de leucócitos. A infiltração excessiva de células imunes pode ser prejudicial ao tecido já danificado. A perda de síntese vasodilatadora de óxido nítrico (NO) pela CE agrava ainda mais a oclusão do vaso no coração. Além disso, a ativação endotelial os desloca em direção a um estado protrombótico perigoso (STURTZEL, 2017).

O endotélio desempenha um papel central nas cascatas da coagulação devido às suas propriedades únicas antitrombogênicas, fibrinolíticas e anticoagulantes (RADKE, *et al.*, 2018). O rompimento das funções endoteliais clássicas de formação de vasos, hemostasia e regulação do tônus vascular subjaz à maioria das alterações cardiovasculares, e seu papel central na organização da resposta imune exacerba os danos. Por isso, é necessário também ter como alvo terapêutico a CE durante as doenças cardiovasculares (RADKE, *et al.*, 2018; STURTZEL, 2017).

Quando os pacientes são implantados com um enxerto, os resultados são considerados ruins quando não ocorre a aderência e proliferação das células endoteliais no enxerto implantado. Por outro lado, com o passar do tempo, os animais endotelizam qualquer enxerto, mesmo que não sejam previamente semeados. Isso explica o desenvolvimento de inúmeros sistemas de perfusão *in vitro* para testar a endotelização das superfícies dos enxertos (STURTZEL, 2017).

Uma maneira de resolver esse problema é incorporar uma grande quantidade de células, o que requer 2 a 4 semanas de tempo de cultura. No entanto, este método tornou-se inadequado para o uso. Esta abordagem leva semanas a meses de incubação em biorreatores antes que as embarcações estejam prontas para implantação. O termo utilizado para esse processo é endotelização (CHONG, *et al.* 2015).

A maioria dos arcabouços vasculares sintéticos frequentemente sofre de pouco reconhecimento pelas células devido à falta de interações celulares específicas, enquanto a endotelização é essencial para melhorar a compatibilidade entre os componentes do sangue e os enxertos vasculares artificiais. As células endoteliais são então cultivadas na superfície de enxertos vasculares artificiais e isso é chamado de endotelização *in vitro* (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

Atualmente, a endotelização é a estratégia mais promissora para produção de materiais não trombogênicos. As células endoteliais podem ser aplicadas sobre o implante sintético antes do procedimento (endotelização *in vitro*) ou podem ser recrutadas da corrente sanguínea e áreas adjacentes (endotelização *in situ*) (ADIPURNAMA *et al.*, 2017). Chong *et al.* (2015) desenvolveram uma abordagem para investigar o papel sinérgico da topografia e química da superfície na promoção da endotelização em materiais de enxerto vascular nanocompósito.

A superfície ideal do enxerto vascular não precisa apenas de hemocompatibilidade, mas também precisa de uma superfície não trombogênica.

Idealmente, eles devem ter hemocompatibilidade superior e regular as respostas do enxerto sanguíneo espacialmente, aumentar a endotelização e acelerar a formação de uma monocamada endotelial (ADIPURNAMA *et al.*, 2017). Uma camada endotelial intacta pode impedir a ativação de fatores promotores de trombos na cascata de coagulação. Fatores de anticoagulação presentes nas CE incluem heparans, trombomodulina e ADPase. ECs sintetizam heparans (ou glicosaminoglicanos semelhantes à heparina (GAG), que diminuem grandemente a trombogênese pela desativação dos fatores de coagulação (RADKE, *et al.*, 2018).

Todas as propriedades físicas, biológicas e químicas das superfícies devem ser integradas e prontamente ajustadas para aplicações de enxertos vasculares. Cobrindo a superfície interna de um enxerto vascular artificial com uma camada biofuncional e confluyente de ECs poderia imitar um vaso sanguíneo saudável e potencialmente permitir a aplicação a longo prazo de implantes. Uma vez que a adesão celular a uma proteína artificial desempenha um papel importante na geração de uma camada EC, uma estratégia foi desenvolvida para melhorar a superfície com a capacidade de aderir seletivamente Ecs (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

A ativação de ECs pode estimular mudanças fenotípicas que influenciam as propriedades antitrombogênicas dos vasos sanguíneos. Os ECs podem ser ativados pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), adesão celular, várias citocinas, estimulação mecânica ou endotoxina. Uma compreensão da ativação endotelial e doenças endoteliais trombóticas pode ajudar a projetar as TEVGs com propriedades antitrombogênicas melhoradas (RADKE, *et al.*, 2018).

Em um estudo recente sobre o efeito das ECs transfectadas com VEGF na endotelização feito por Wu *et al.* (2016). Foi demonstrado que a superexpressão de VEGF promoveu proliferação celular, migração e formação de tubo semelhante a um capilar, enquanto, por outro lado, a regulação por baixa expressão de VEGF inibiu essas atividades (WU, *et al.* 2016). A ativação endotelial pode ajudar a prevenir o acúmulo de placa aterosclerótica, que poderia levar à oclusão vascular (RADKE, *et al.*, 2018).

Entretanto, a endotelização rápida em enxertos vasculares artificiais é um processo complexo que envolve adesão, migração, proliferação e diferenciação de CE, que são regulados por numerosos sinais. Proteínas da matrix extracelular agem para modular o destino celular através de cascatas de sinalização celular. Fatores de

crescimento, especialmente os VEGFs, estão implicados na regulação das atividades da CE e na formação de novos vasos sanguíneos (ADIPURNAMA *et al.*, 2017).

No entanto, os ECs são uma população heterogênea e seu crescimento, diferenciação, migração e sobrevivência resultaram em uma maneira complexa, por uma combinação da matriz extracelular circundante, contatos célula-célula, fatores de crescimento e sinais mecânicos. Como consequência, o processo angiogênico pode ser influenciado e modulado pela interação das CEs com outras células e com o ambiente (BAIGUERA; RIBATTI, 2013).

A endotelização revela-se uma promissora estratégia para melhorar a hemocompatibilidade e diminuição dos riscos de formação de trombo, formação de coágulos, isquemias (RADKE, *et al.*, 2018), e melhora do fluxo sanguíneo em pacientes com insuficiência cardíaca, especialmente para indivíduos que não são candidatos a técnicas padrão de revascularização (LI, *et al.*, 2005). A proliferação de células endoteliais pode ser estimulada pela Laserterapia de baixa intensidade ou Fotobiomodulação, pois essa estimula a proliferação celular e expressão do fator de crescimento endotelial vascular (SILVA *et al.*, 2010).

2.4 FOTOBIMODULAÇÃO

A Fotobiomodulação (PBM) é um método de tratamento baseado em pesquisas que mostram que a irradiação com certos comprimentos de onda de luz vermelha ou próximo ao infravermelho apresenta uma série de efeitos fisiológicos em células e tecidos de animais e humanos. A pesquisa científica sobre PBM foi iniciada no final dos anos 1960, utilizando os lasers desenvolvidos no início desta década, e a terapia rapidamente se tornou conhecida como “terapia a laser de baixa intensidade” (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

O laser consiste em um tipo de radiação eletromagnética que apresenta propriedades específicas, como a monocromaticidade, ou seja, emissão de radiações em um único comprimento de onda, o que determina a absorção seletiva por parte dos fotoreceptores celulares. A coerência espacial e temporal que se refere a propagação de ondas com a mesma fase no tempo e espaço; a direcionalidade ou colimação que permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos e a polarização (PINHEIRO *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2010).

O acrônimo LASER, de origem inglesa, é derivado do termo “light amplification by stimulated emission of radiation” e consagrou-se pelo uso, definindo uma fonte de luz monocromática, intensa, coerente e colimada, cuja emissão de radiação se faz pelo estímulo de campo externo, com aplicações variadas e crescentes na indústria, na engenharia e na medicina (INOE; ZAFANELLI; ROSSATO, 2008). Apesar de outras fontes de luz estarem disponíveis durante os primeiros 40 anos de pesquisa em PBM, os lasers permaneceram de longe o dispositivo mais comumente empregado e, de fato, alguns autores insistiram que os lasers eram essenciais para o benefício terapêutico (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Vários aparelhos surgiram nas últimas décadas, baseados nos estudos realizados após a criação do laser. Evidências dos efeitos bioestimulatórios da laserterapia de baixa intensidade têm sido descritas em pesquisas, e a partir disto, inúmeros estudos têm sido conduzidos para estabelecer sua eficácia. (MOREIRA et. al., 2011). Pode se classificar os lasers como sendo de alta potência ou cirúrgicos; e laser de baixa intensidade (LBI) ou terapêuticos (PINHEIRO *et al.*, 2010).

Os primeiros proporcionam efeitos térmicos, propriedades de corte, vaporização e hemostasia. Enquanto os lasers terapêuticos ou de baixa intensidade, geram efeitos analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes. Neste grupo está o laser de hélio-neônio (He-Ne), cujo comprimento de onda é 632,8nm, ou seja, na faixa de luz visível (luz vermelha), o laser de arseniato de gálio (AsGa), arseniato de gálio alumínio (AsGaAl) e índio gálio alumínio e fósforo (InGaAlP) ou lasers diodo, cujo comprimento de onda se situa tanto no espectro de luz visível quanto no infravermelho ou invisível (PINHEIRO *et al.*, 2010).

A terapia com Laser de baixa intensidade (LBI) ou laser de baixa potência (LBP) refere-se ao uso do laser em dois diferentes espectros que são estabelecidos a partir do comprimento de onda utilizado. A luz vermelha ou visível apresenta comprimento de onda entre o intervalo aproximado de 630 a 700 nm, enquanto o invisível ou infravermelho compreende uma faixa entre 700 a 904 nm (LIZARELLI, 2005). Esses comprimentos de onda da luz demonstraram penetrar nos tecidos humanos e afetar localmente (e possivelmente sistemicamente) o metabolismo celular, a sinalização celular, os processos inflamatórios e a produção de fatores de crescimento (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

De acordo com o espectro de onda utilizado, mecanismos de ação diferentes são observados, onde os lasers de luz vermelha atuam primeiramente nas mitocôndrias e lisossomos, já os de luz infravermelha agem nas membranas celulares através de alterações no potencial das mesmas, desencadeando efeitos fotofísicos e fotoelétricos, responsáveis pela excitação de elétrons, vibração e rotação de moléculas que se traduzem no aumento da síntese intracelular de ATP (LIZARELLI, 2005).

Este tratamento é hoje chamado de “terapia de fotobiomodulação” (PBM), mas também teve mais de 60 outros nomes na literatura científica; “Terapia a laser de baixa intensidade” (LLLT) tem sido o termo mais comumente usado. As razões para preferir o uso de “PBM” sobre “LLLT” são duas: Em primeiro lugar, a PBM não implica que um laser seja necessário para que os benefícios terapêuticos ocorram. Em segundo lugar, a PBM implica que os efeitos terapêuticos poderiam, em algumas circunstâncias, ser devidos a efeitos de inibição, bem como aos efeitos estimulatórios. Atualmente, o PBM vem sendo estudado em aproximadamente 40 países diferentes. Até hoje, foram publicados mais de 3.500 artigos científicos sobre fotobiomodulação (HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Na abordagem terapêutica com PBM, as células ou tecidos são expostos a lasers de baixa potência ou diodos emissores de luz (LEDs) na faixa de luz visível (VIS, 400–700 nm) e infravermelho próximo (NIR, 700–1000 nm). Essas fontes de luz são chamadas de Blow-level® em alternativa aos lasers de potência elevada que são prejudiciais para seus importantes efeitos fototérmicos, enquanto a PBM atua através de mecanismos fotoquímicos e fotomecânicos (Khan, 2015). O Laser de baixa intensidade diferencia-se de outras modalidades fototerapêuticas por seus efeitos não serem produzidos pela indução térmica, mas através de um processo denominado fotobioestimulação ou fotobiomodulação. Essa característica o diferencia da luz emitida por fontes convencionais incandescentes e faz com que ele possua propriedades terapêuticas importantes, o que tornou seu uso viável em múltiplas aplicações médicas (BARBOZA *et al.*, 2014).

Ultimamente observa-se um vasto número de pesquisas voltadas para o conhecimento e melhoras no processo de reparo tecidual, dentre elas, a laserterapia de baixa intensidade (LLLT) tem se destacado, pois apresenta efeitos terapêuticos positivos sobre diferentes eventos biológicos, como a cicatrização, que pode ser mais eficaz quando tratada com laser de baixa intensidade (BUSNARDO; BIONDO-SIMÕES,

2010). Durante as últimas décadas, numerosos estudos também demonstraram os efeitos benéficos da terapia de luz de baixa intensidade (LLLT) para o tratamento de várias patologias, como na melhora na regeneração nervosa periférica (ROCHKIND *et al.*, 2007), redução de reações inflamatórias (AIMBIRE, 2006), aumento da formação óssea (SILVA JÚNIOR, 2002), a promoção da cicatrização de feridas e angiogênese (TUBY; MALTZ; ORON, 2006; MITTERMAYR *et al.*, 2007).

Ao se aplicar o laser sobre o tecido, algumas funções celulares podem ser estimuladas (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012), no entanto a magnitude desse efeito depende do estado fisiológico celular e/ou estágio clínico da condição antes da irradiação, sendo a ação do laser mais acentuada sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos (TUNER; HODE, 2007). Em consonância com diferentes estratégias e terapias convencionais, como a cirurgia, a terapia fotodinâmica tem sido amplamente aplicada para a inibição da angiogênese no contexto de lesões de câncer (OTTAVIANI *et al.*, 2016). Em relação à intensidade de laser, a irradiação de baixa intensidade (LLLI) pode estimular e/ ou inibir a taxa de angiogênese como observado em vários experimentos *in vitro* e *in vivo* (DIAS *et al.*, 2012; AKBARZADEH *et al.*, 2016).

Acredita-se que a fotobiomodulação a laser nos níveis moleculares e celulares produz danos às células musculares. Por exemplo, a irradiação pode ser absorvida pelas mitocôndrias, especialmente pela citocromo C oxidase, levando à ativação de numerosas cascatas em diferentes tipos de células (KARU, 2008). Afetam o ciclo celular e a taxa de proliferação, por exemplo, a ativação do eixo Akt/ GSK3 β promovendo a apoptose derivada do laser (HUANG; WU; XING, 2011).

Graças as suas propriedades, a fotobiomodulação tem sido aplicada na modulação de vários processos biológicos em modelos animais e humanos, atenuando a resposta inflamatória, aumentando a angiogênese, estimulando a cicatrização, promovendo a regeneração musculoesquelética e nervosa, reparo ósseo, bem como na biomodulação de linhagens celulares, acarretando em aumento na taxa de proliferação com manutenção da viabilidade celular (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010; FÁVARO-PÍPI *et al.*, 2011; YAZDANI *et al.*, 2012; FAHIMIPOUR *et al.*, 2012; SPERANDIO *et al.*, 2014; GINANI *et al.*, 2015;). Os estudos que avaliaram viabilidade e proliferação celular demonstraram que as células responderam positivamente ao a fotobiomodulação (GINANI *et al.* 2015; MARQUES *et al.*, 2016).

O mecanismo de ação do laser de baixa intensidade no sistema biológico envolve inicialmente a fotoativação de uma molécula fotorreceptora da célula, seguida de absorção da luz e o desencadeamento de dois tipos de reações. A luz é composta de fótons cuja energia depende de seu comprimento de onda; os fótons transferem sua energia para moléculas orgânicas específicas, chamados cromóforos. Os principais alvos celulares do PBM incluem a citocromo c oxidase (Cox) nos canais mitocôndricos (KARU, 2010) e cálcio (Ca^{2+}) nas membranas plasmáticas, que parecem ser afetados pela luz laser NIR (AMAROLI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016). A interação inicial entre luz e fotorreceptores celulares (chamada de “mecanismo fotorreceptor primário”) é seguida pela ativação de múltiplos mediadores secundários. Estes acabam por levar a grandes mudanças na expressão gênica, sinalização celular, metabolismo celular e secreção de citocinas. Esses efeitos foram descritos em numerosos artigos de revisão na literatura (PRINDEZE; MOFFATT.; SHUPP, 2012; FREITAS DE; HAMBLIN, 2016).

Por muitos anos, a ação da PBM foi essencialmente considerada como uma interação entre luz e mitocôndria, provavelmente através da estimulação da respiração mitocondrial e consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (KARU, 2010). Existe uma estreita relação entre a liberação de ROS, principalmente pelas mitocôndrias, e a sinalização de Ca^{2+} , com ROS regulando a sinalização de Ca^{2+} e a sinalização de Ca^{2+} que afetam as atividades mitocondriais e a produção de ROS (GÖRLACH *et al.*, 2015). Além disso, foi mostrado que a PBM estimula a produção de colágeno (DE LOURA *et al.*, 2015), promove a síntese de DNA (LOEVSCHALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994) e síntese de proteína (AVCI *et al.*, 2013) aumenta a produção de ATP (LAPCHAK, DE TABOADA, 2010), modula a migração e proliferação de células (SKOPIN; MOLITOR, 2009; GINANI *et al.*, 2015), acelera o reparo tecidual (HOPKINS *et al.*, 2004) e induz a diferenciação de células-tronco (AMAROLI, 2018).

As reações primárias ocorrem na presença da luz e resultam em alterações na configuração molecular e função do fotoreceptor. Acredita-se que essas reações estejam relacionadas à formação de oxigênio singlete, modificações das propriedades do estado redox, presença de óxido nítrico, aumento da temperatura local por tempo determinado ou superprodução de ânions superóxidos. Já as reações secundárias ocorrem sem a presença da luz, podendo ser horas ou dias após a irradiação, compreendendo alterações

na sinalização e funções celulares como a foto resposta dos receptores localizados nas mitocôndrias e a síntese de DNA e RNA no núcleo celular (KARU, 2008).

A Associação Mundial de Terapia a Laser (WALT, [www. Walt.nu](http://www.Walt.nu)) sugere usar doses inferiores a 10 J/ cm², em <100 mW, porque doses mais elevadas podem danificar o DNA e outros biopolímeros (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2007). No entanto, tanto a absorção de luz quanto o espalhamento são elevados para a radiação VIS, com a conseqüente redução da penetração, enquanto a profundidade de penetração aumenta para o NIR, sendo máxima a cerca de 810 nm. Apenas evidências limitadas sugerem que a luz VIS pode ser aplicada em tecidos profundos com a mesma eficiência de células *in vitro* para organismos *in vivo* (AVCI, *et al.*, 2013).

Com a vantagem de ser não-invasiva, a abrangência das aplicações de laserterapia é ampla, passando de alívio da dor para promover a recuperação de tendinopatias, lesões nervosas, osteoartrite à cicatrização de feridas. Porém, ainda existem lacunas sobre o efeito do LBI sobre os diversos tipos de linhagens celulares em cultivo, principalmente relacionadas aos parâmetros ideais de irradiação para cada tipo celular (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016).

2.5 FOTOBIMODULAÇÃO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

A terapia de fotobiomodulação (PBMT) demonstra um potencial de alterar a função celular e tecidual, inclusive estimulando a produção de colágeno (GRYKO *et al.*, 2012), promovendo a síntese de DNA (BASSO *et al.*, 2013) e aumentando o conteúdo de ATP (KHANNA; SHANKAR; KEELAN, 1999). Nas células endoteliais, o laser de baixa intensidade (LBI) estimula a proliferação celular, a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), contribuindo para a angiogênese (SILVA *et al.*, 2010), além de influenciar a organização do citoesqueleto endotelial (RICCI *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos *in vitro* sobre PBM empregou luz VIS (600-700 nm) para estimular queratinócitos e fibroblastos (SKOPIN; MOLITOR, 2009), e apenas alguns estudos usaram células endoteliais (SCHINDL *et al.* 2003; SZYMANSKA *et al.*, 2013; GÓRALCZYK *et al.*, 2015). Além disso, as células endoteliais foram geralmente estimuladas pela luz VIS emitida pelos lasers de baixa energia porque, ao contrário dos

queratinócitos e fibroblastos, pareciam não responder ao comprimento de onda NIR (PEPLOW; CHUNG; BAXTER, 2010).

O estudo de Schindl *et al.* (2003) teve como objetivo determinar o efeito da irradiação com laser de baixa intensidade na proliferação de HUVEC. Foi utilizado um laser diodo de 670 nm (Helbo, Grieskirchen, Áustria) com doses de 2, 4 e 8 J/cm². Nos resultados, observou-se que houve proliferação celular de HUVEC de forma significativa, quando comparado com controle de culturas não irradiadas. Isso sugere que intensidades de pouca luz pode interagir diretamente com a célula endotelial humana para estimular a proliferação celular, um processo crítico na reparação de tecidos.

Também foram investigados os efeitos da luz laser na morfologia das células endoteliais, sugerindo que a LLLT influencia a organização do citoesqueleto endotelial (RICCI *et al.*, 2009). Schindl *et al.* (2003) observaram um aumento dose-dependente da proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) pela luz laser.

A proliferação de células endoteliais, estimulada por laser terapia de baixa intensidade, também tem sido estudada em células de origem animal. Os estudos de Ghali e Dyson (1992), usaram comprimentos de onda de 660 e 820 nm para irradiar células endoteliais de aorta bovina e encontraram efeitos na proliferação celular, apresentando um melhor resultado nas células irradiadas com laser de comprimento de onda de 660 nm (GHALI; DYSON, 1992). A proliferação de células endoteliais (CE) desempenha um papel fundamental no processo de reparação tecidual (SCHINDL *et al.*, 2003).

Góralczyk *et al.* (2015) também apresentou o efeito da radiação laser com o comprimento de onda de 635 nm (1.875 mW / cm²) no número de células endoteliais, dependendo da dose crescente de energia da radiação. Doses de energia de 2, 4 e 8 J/cm² aumentaram significativamente o número de células ($p = 0,0041$, diferenças significativas entre os grupos: I vs. II, III e IV). O maior valor foi observado em uma dose de energia de 2 e 4 J/cm² e foi cerca de 23% maior do que no grupo controle. As doses de 2 e 4 J/cm² ($\lambda = 635$ nm) apresentaram simultaneamente no nível mais alto de proliferação celular, sugerindo que nessas condições, a maioria das moléculas de VEGF-A está conectada com receptores que afetam significativamente o nível da proliferação da CE. Concentrações mais baixas de sVEGFR-1 e sVEGFR-2 no

sobrenadante em comparação com o grupo controle poderiam contribuir para o aumento da proliferação de células pela influência da LLLT.

Góralczyk *et al.* (2015) concluíram que a terapia com laser de baixa intensidade aumenta significativamente o número de HUVECs e diminui significativamente a concentração de VEGFR-1 solúvel.

Estudos *in vitro* realizados por Schindl *et al.* (2003) confirmaram o aumento da proliferação de HUVEC como resultado da radiação laser na faixa de comprimento de onda 670 em doses de 2; 4 e 8 J/ cm². A irradiação a laser ainda alterou a taxa de sobrevivência de HUVEC de maneira dose-dependente, onde doses mais elevadas (60 e 80 J/cm²) reduziram significativamente a viabilidade celular, quando comparado aos grupos irradiados com doses de 4 e 8 J/cm². (BAGHERI, *et al.*, 2018).

O potencial efeito de citotoxicidade da LLLI nas HUVECs foi determinado por um ensaio MTT. Como esperado, a irradiação com laser tinha o potencial de modular a viabilidade celular em uma maneira dose/dependente. A Fotoestimulação com doses de 2 J/cm² causou um aumento de 1,22 vezes nas taxas de sobrevivência comparadas ao controle não tratado (p <0,05; Fig.1). Aumentando a intensidade da dose, para doses de 4 e 8J/ cm², foi demonstrado uma leve diminuição, mas não declínio significativo na taxa de sobrevivência celular (BAGHERI, *et al.*, 2018).

Em relação ao comprimento de onda, o espectro de luz visível (vermelho), variando de 600 a 700nm, apresenta resultados mais eficazes na bioestimulação celular. Moore *et al.* (2005), objetivando avaliar o efeito do laser em diferentes comprimentos de onda (625, 635, 645, 655, 665, 675 e 810 nm) em dois tipos celulares (fibroblastos e células endoteliais), avaliaram a taxa de proliferação celular após um período de 72h de cultivo. Foi verificado um aumento no crescimento tanto das células endoteliais, quanto dos fibroblastos em todos os comprimentos de onda estudados, exceto para o de 810 nm.

Além do comprimento de onda, outros fatores influenciam a fotobiomodulação, tais como a potência, a densidade de energia e o tipo de célula que está sendo irradiada (MARQUES *et al.*, 2016). Assim, é necessário identificar a combinação ideal desses fatores para atingir a taxa máxima de proliferação e viabilidade celular, sendo importante analisar os efeitos de diferentes doses na Fotobiomodulação na proliferação e viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).

No presente estudo, testamos a hipótese de que a fotobiomodulação utilizando laser na faixa de luz vermelha (660 nm), potência de 30 mW e com doses de 1, 4 e 7,5 J/cm² pode influenciar positivamente a proliferação e viabilidade de HUVECs em condições normais de cultivo celular, o que poderá no futuro indicar a utilização desta metodologia nas técnicas de engenharia tecidual de enxertos vasculares, visando promover uma melhor endotelização nestes construtos teciduais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar, através de experimentos *in vitro*, o efeito da fotobiomodulação com laser de baixa intensidade na proliferação e viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar a influência do laser vermelho, aplicado nas doses de 1,0 J/cm², 4,0 J/cm² e 7,5 J/cm² com potência de 30 mW, na capacidade de proliferação *in vitro* de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC);
- ❖ Analisar a viabilidade e a apoptose/necose em células HUVEC submetidas a estes protocolos de fotobioestimulação;
- ❖ Avaliar qual dose apresenta melhores resultados nos parâmetros celulares estudados.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo se caracteriza por uma pesquisa experimental *in vitro*.

4.2 AMOSTRA

Foi utilizada nos experimentos uma linhagem comercial de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC-C; ATCC® CRL-1730™), obtidas da American Type Culture Collection (ATTC, USA) e gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Manoela Domingues Martins, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.3 CULTIVO DE CÉLULAS

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram cultivadas com meio D-MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução contendo antibiótico-antimicótico (todos da Gibco, USA). O cultivo foi realizado em incubadora de cultivo celular (ThermoFisher, USA), em ambiente de 99% de umidade, com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

4.4 LOCAL

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN.

4.5 DELINEAMENTO DO ESTUDO

A Figura 1 resume o desenho experimental do estudo. As células HUVEC foram pré-cultivadas por 24h sobre a superfícies de poliestireno das placas de cultivo, para garantir a adesão celular, e então divididas em quatro grupos:

C (Controle): células mantidas em condições regulares de cultivo, sem irradiação;

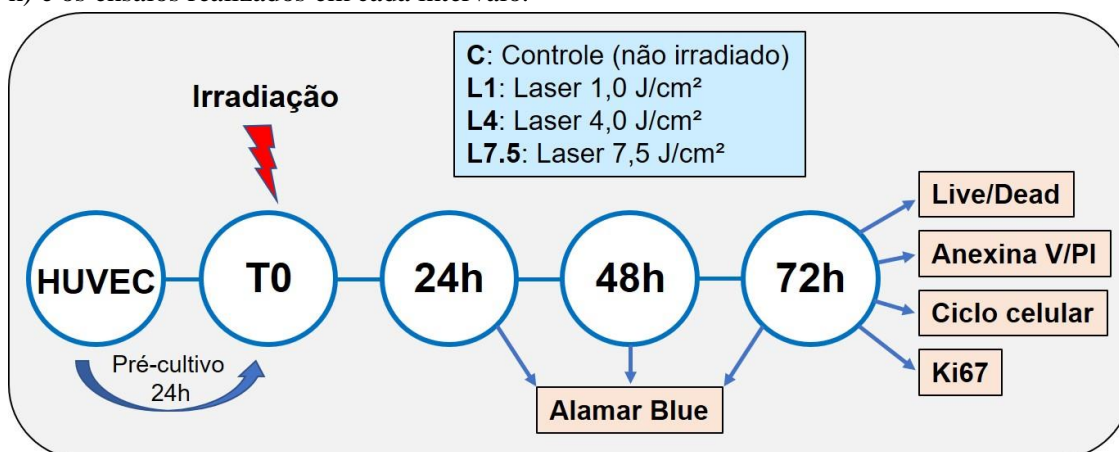
L1 (Laser 1): células irradiadas com dose de 1,0 J/cm²;

L4 (Laser 4): células irradiadas com dose de 4,0 J/cm²;

L7.5 (Laser 7.5): células irradiadas com dose de 7,5 J/cm.

As células dos quatro grupos foram utilizadas em experimentos para avaliar a viabilidade e proliferação celular, nos intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas após a aplicação do laser. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Figura 1: Desenho experimental do trabalho, mostrando os grupos de estudo, a sequência do cultivo celular, o momento da irradiação (T0: tempo zero), os intervalos de análise (24, 48 e 72 h) e os ensaios realizados em cada intervalo.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.6 PROTOCOLO DE FOTOBIMODULAÇÃO

As células foram plaqueadas sobre placas de cultivo (Kasvi, Brasil) e os grupos submetidos a irradiação com um aparelho de Laser diodo (Kondortech – Bio Wave LLLT Dual, Brazil), com as características apresentadas na Tabela 1. O cultivo das células nas placas foi feito de forma que entre os poços semeados foram mantidos três poços vazios, impedindo assim a dispersão de luz não intencional entre os poços durante aplicação da laserterapia.

Tabela 1 - Parâmetros do Laser	
Composição	InGaAlP
Potência	30mW
Comprimento de onda	660nm
Modo de ação	Contínuo
Diâmetro da ponta	0,01 cm ²
Dose utilizada	1 J/cm ² , 4 J/cm ² e 7,5 J/cm ²
Modo de aplicação	Sonda de irradiação perpendicular à placa, distante 0,5 cm das células.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

4.7 ENSAIO DO ALAMAR BLUE®

A proliferação celular foi analisada nos intervalos de 24, 48 e 72 horas após a irradiação, através do ensaio do Alamar Blue (Invitrogen, USA), um método fluorimétrico que permite a detecção da atividade metabólica das células. O método é baseado na redução da resazurina (7-hidroxi-3Hfenoxazina-3-ona 10-óxido), um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com altíssima fluorescência em vermelho. As células de cada grupo foram cultivadas em uma placa de 96 poços na densidade de 5×10^3 células/poço e em seguida submetidas ou não aos protocolos de fotobiomodulação. Decorridos os tempos experimentais, o meio foi removido, e foi adicionado 10 μ L Alamar Blue® (Invitrogen, USA) e 90 μ L de meio D-MEM (Gibco, USA). As células permaneceram em contato com a solução em condições adequadas (37°C e 5% de CO₂) por 4h. Após este período, a absorbância das amostras foi medida em um leitor de microplacas (Epoch-Biotech Instruments, USA) nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado). O meio de cultura puro, sem adição de células, foi considerado como branco do ensaio e o meio contendo 10% de Alamar Blue o controle negativo. A redução do Alamar Blue foi então calculada a partir da equação fornecida pelo fabricante.

4.8 ENSAIO DO LIVE/DEAD®

A viabilidade celular foi avaliada usando o *Live/Dead Assay Cytotoxicity kit for mammalian cells* (Invitrogen, USA), que permite a coloração simultânea com calceína-AM (fluorescência verde), que indica atividade de esterase intracelular em células vivas, e com homodímero-1 de etídio (fluorescência vermelha), que indica perda de integridade da membrana plasmática em células inviáveis. Após 72 horas da fotobiomodulação, três amostras de cada grupo foram lavadas com PBS para eliminar o meio de cultura e células não aderidas. Os poços foram então incubados com 2 μ M de calceína AM (que cora em verde o citoplasma de células vivas) e 4 μ M de homodímero de etídio (que cora em vermelho o núcleo de células mortas), por 20 minutos, em ambiente protegido da luz. As amostras foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager A2, Oberkochen, Alemanha) e foram obtidas fotomicrografias (n=4) do campo central de cada amostra para contagem do número de células vivas e mortas e obtenção do percentual de viabilidade celular.

4.9 IMUNOMARCAÇÃO POR ANNEXINA V/PI

A porcentagem de células em apoptose e necrose foi quantificada por dupla coloração com o *FITC Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit with FITC Annexin and PI, for Flow Cytometry* (Invitrogen, USA). Resumidamente, 72 horas após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS e ressuspensas em tampão de ligação 1x durante 15 min, depois as células foram incubadas com anticorpo Anexina V-FITC durante 15 min., lavado uma vez com tampão de ligação × 1, rotulado com solução 5 µl PI por 10 min, e analisado por sistema de citometria de fluxo. O marcador anexina V-FITC permite detectar os estágios iniciais de apoptose celular devido ao fato de se ligar preferencialmente aos fosfolipídios negativamente carregados (fosfatidilserina) expostos no início do processo apoptótico, enquanto o iodeto de propídeo (PI) permite avaliar os momentos finais deste processo de morte celular, por ser um marcador que interage com o DNA, mas não é capaz de atravessar a membrana plasmática, devido ao seu alto peso molecular. Assim, a marcação positiva para o PI indica que há poros na membrana, fenômeno característico de processos de necrose ou estágio final de apoptose.

4.10 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

Para análise dos efeitos da laserterapia sobre o ciclo celular, as células de cada grupo foram cultivadas em triplicata (n=3) em placas de seis poços na densidade de 2×10^5 células/poço. Após o intervalo estudado de 72h as células foram processadas e foram adicionados 5 µL de iodeto de propídeo (25 mg/mL, Invitrogen, USA), juntamente com 200 µL de PBS gelado, seguindo-se a análise das células em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). A partir das análises dos dados da citometria, foram obtidas em cada amostra os percentuais de células nas fases G0/G1, S e G2/M.

4.11 IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA Ki67

O antígeno KI-67, também conhecido como Ki-67 ou MKI67, é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene *MKI67* (antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67). O antígeno KI-67 é uma proteína nuclear que está associada e pode ser necessária para a proliferação celular. Além disso, está associado à transcrição do RNA ribossômico (BULLWINKEL et. al., 2006). Inativação do

antígeno KI-67 leva à inibição da síntese de RNA ribossômico (RAHMANZADEH et. al., 2007).

A expressão da proteína nuclear Ki67 foi avaliada por citometria de fluxo. Inicialmente as células foram cultivadas em triplicata (n=3), em placas de seis poços na densidade de 2×10^5 células/poço. No intervalo de 72 horas após a irradiação as células foram processadas e incubadas com 10 μ L do anticorpo monoclonal anti-Ki67 conjugado com FIT (Clone 7B11, Invitrogen, USA) por 20 minutos, em ambiente protegido de luz. Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, USA). Os dados da intensidade média de fluorescência do Ki67 para cada amostra foram fornecidos pelo software FlowJo v10 (BD Biosciences, USA).

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

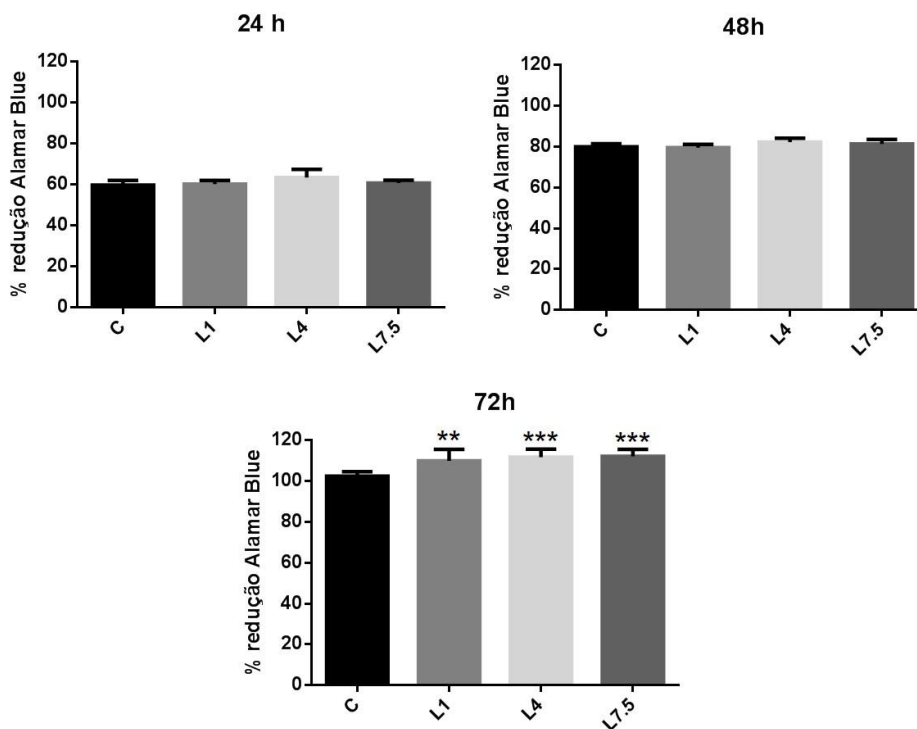
Os dados quantitativos do percentual de redução do Alamar Blue, do número de células viáveis por campo e do percentual de células mortas por campo no ensaio do Live/Dead e da intensidade média de fluorescência do Ki67 foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, utilizando-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Os dados não demonstraram distribuição gaussiana, sendo então submetidos a análises não paramétricas. A diferença entre os grupos para cada um dos intervalos de tempo estudados foi analisada pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIO DO ALAMAR BLUE

A análise da proliferação celular foi realizada a partir do Alamar Blue, que é um ensaio de redução metabólica. Os dados do percentual médio (\pm desvio padrão) da redução do Alamar blue de todos os grupos em todos os intervalos experimentais estão representados na Figura 2. Nos intervalos de 24 e 48 horas, os dados mostraram que os grupos irradiados com as diferentes doses de laser (1, 4 e 7,5 J/cm²) não exibiram diferenças estatística significativas entre si ou quando comparados com o grupo controle (não irradiado). Porém, no intervalo de 72 horas todos os grupos irradiados exibiram percentuais de redução significativamente maiores do que o grupo controle não irradiado, sendo a diferença ainda mais evidente em L4 e L7.5 ($p < 0,001$).

Figura 2 - Percentual médio (\pm desvio padrão) da redução do Alamar Blue nos diferentes grupos ao longo do experimento. Observa-se que nos dois primeiros intervalos do estudo (24 e 48h) os valores numéricos dos grupos irradiados foram maiores do que o controle, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Já no intervalo de 72h todos os grupos irradiados exibiram percentual de redução significativamente maior do que o grupo controle não irradiado (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; teste de Mann-Whitney).

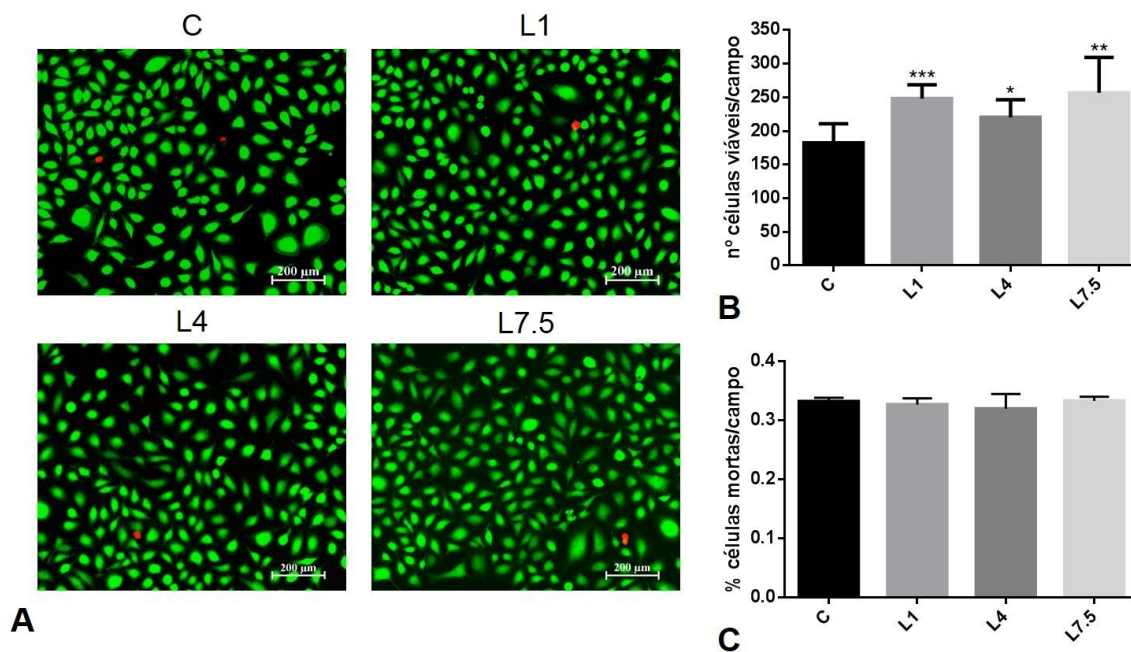


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.2 ENSAIO DO LIVE/DEAD

No ensaio do Live/Dead as fotomicrografias das células marcadas com calceína (verde) e com homodímero de etídeo (vermelho) (Figura 3-A) mostraram que todos os grupos apresentaram numerosas células de citoplasma marcado em verde pela calceína AM, o que evidencia um grande número de células viáveis. Houve um aumento no número de células nos grupos irradiados (Figura 3-B), sendo mais evidente no grupo irradiado com dose de 7.5 J/cm². Na análise do percentual do número de células mortas por campo (marcadas com núcleos em vermelho pelo homodímero de etídeo) (figura 3-C) foi observado um menor percentual de células mortas no grupo L4 quando comparado com os demais grupos. Esses achados corroboram com os resultados obtidos no Alamar Blue.

Figura 3: **A.** Fotomicrografias das células HUVEC viáveis (citoplasmas marcados em verde pela calceína AM) e inviáveis (núcleos marcados em vermelho pelo homodímero de etídeo), no intervalo de 72 h (barra: 200 µm). **B.** Médias do número de células viáveis/campo nos diferentes grupos. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; teste de Mann-Whitney). **C.** Médias do percentual de células mortas/campo, nos diferentes grupos.

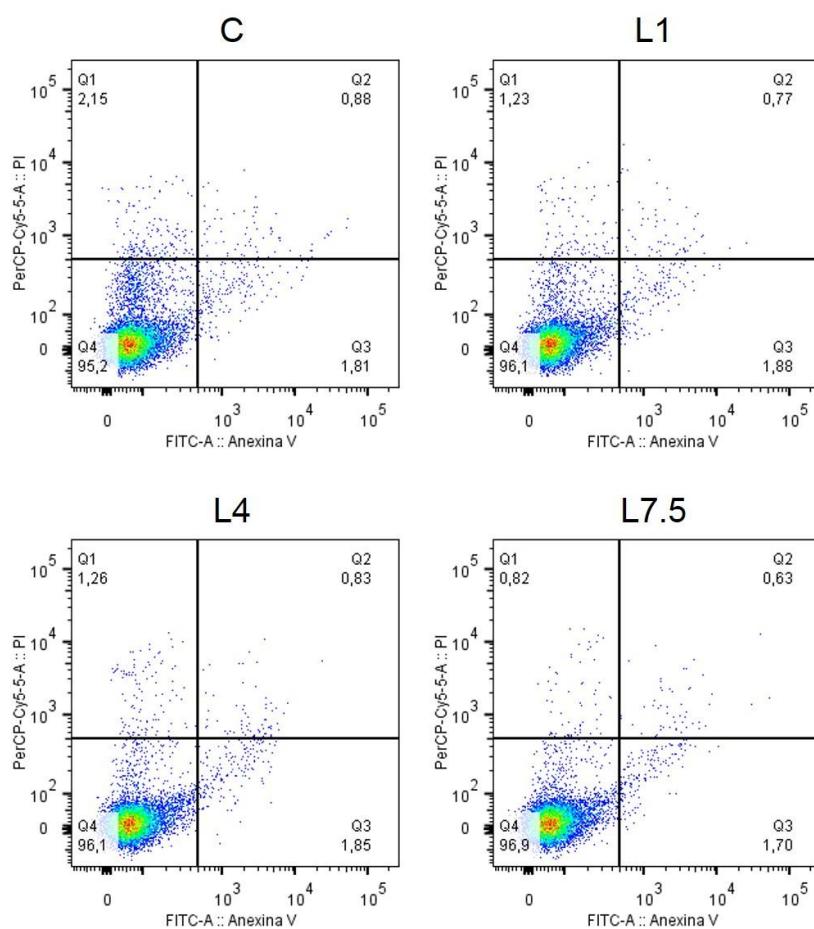


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.3 IMUNOMARCAÇÃO POR ANNEXIN V/PI

A análise de morte celular/apoptose através dos dados do ensaio da imunomarcação por Annexina V/PI em citometria de fluxo mostrou uma alta porcentagem de viabilidade celular nos grupos estudados (Figura 4). As células do grupo controle apresentaram um menor percentual de viabilidade celular (C: 95,2%), enquanto os grupos L1 e L4 exibiram 96,1% de células viáveis. O grupo L7,5, que recebeu dose de 7,5 J/cm², apresentou o maior índice de viabilidade neste experimento (96,9%), o que corroborou os resultados encontrados no ensaio metabólico do Alamar Blue e na análise das fotomicrografias no ensaio do Live/Dead. Este fato é um indicativo de que as doses estudadas não causaram danos celulares às HUVEC.

Figura 4: A análise de morte celular/apoptose através dos dados do ensaio da imunomarcação por Annexina V/PI em citometria de fluxo mostraram uma alta porcentagem de viabilidade celular nos grupos estudados (C: 95,2%; L1: 96,1%; L4: 96,1%; L7.5: 96,9%). Q1: Annexina V-/PI+; Q2: Annexina V+/PI+; Q3: Annexina V+/PI-; Q4: Annexina V-/PI-.

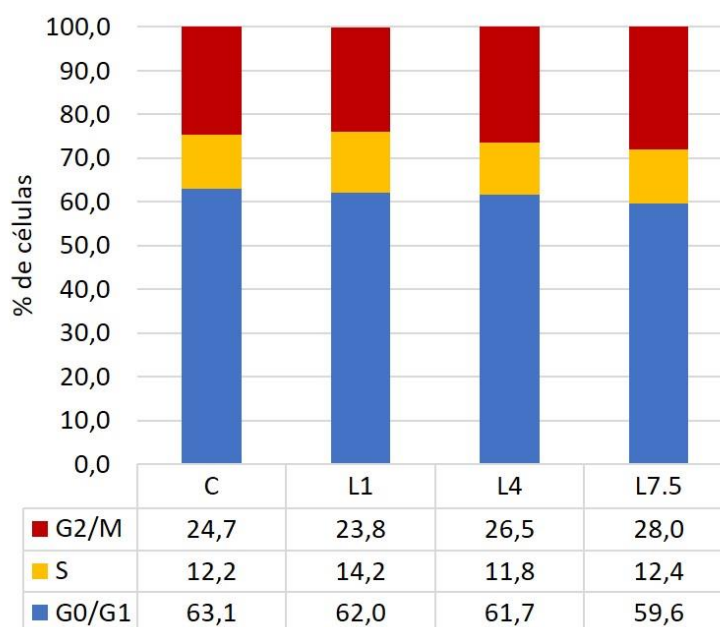


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.4 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR

A avaliação das fases do ciclo celular (Figura 5) mostrou que os grupos irradiados exibiram aumento gradativo do percentual de células nas fases proliferativas do ciclo (S e G2/M), de modo dose-dependente. O grupo controle apresentou o menor percentual de células nas fases proliferativas (36,9%); os grupos L1 e L4 mostraram percentuais de 38 e 38,3%, respectivamente; já o grupo L7.5 foi o que exibiu o maior índice de células nas fases proliferativas do ciclo celular, com 40,4% das células nas fases S e G2/M.

Figura 5: A avaliação das fases do ciclo celular mostrou que os grupos irradiados (L1; L4; L7.5) exibiram aumento gradativo do percentual de células nas fases proliferativas do ciclo (S e G2/M), sendo o grupo L7.5 o que exibiu o percentual mais alto de células nestas fases.

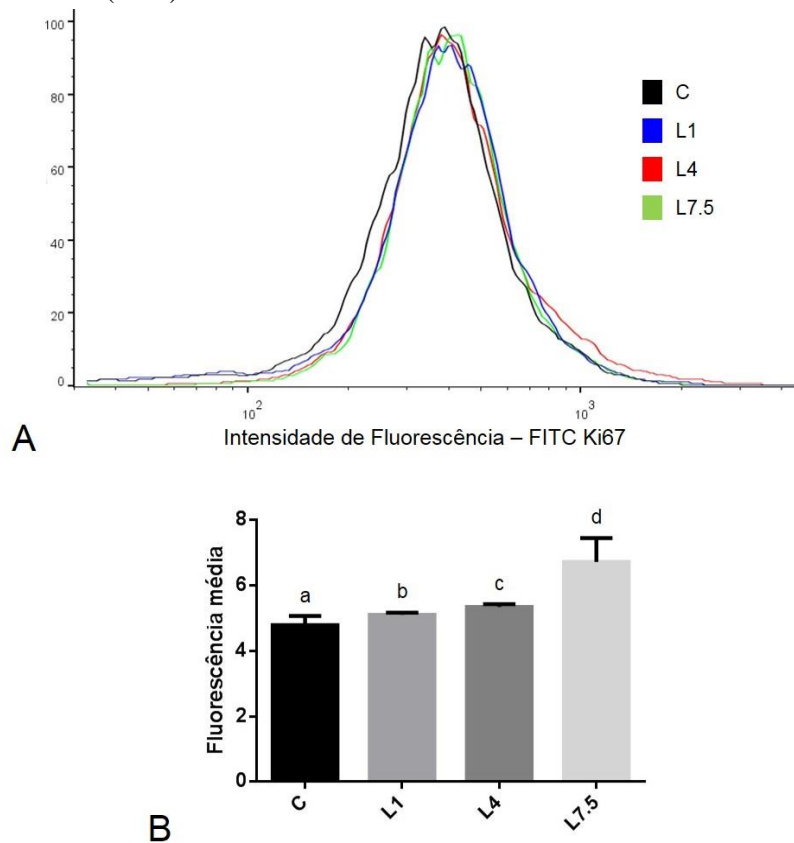


Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE KI67

A análise da imunomarcagem da proteína nuclear Ki67 mostrou diferenças significativas entre todos os grupos, com resultado mais acentuado quando comparado o grupo que recebeu irradiação de 7.5 J/cm² (L7.5) com os demais grupos (Figura 6). Esse resultado corrobora os dados da análise do ciclo celular, uma vez que confirma que as células do grupo L7.5 encontravam-se em maior percentual nas fases proliferativas.

Figura 6: **A** – Imunoexpressão de Ki67; **B** – Médias da intensidade de fluorescência da proteína Ki67 nos diferentes grupos, fornecidos pelo software do citômetro (FlowJo). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney). Os dados mostram diferenças entre todos os grupos, com expressão maior da Ki67 no grupo que recebeu irradiação de 7.5 J/cm^2 (L7.5).



Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou nos ensaios células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), linhagem celular já utilizada em diversos estudos anteriores. Davis *et al.* (2015) utilizaram HUVECs e células mesenquimais embebidas em uma matriz de colágeno para demonstrar a formação de redes capilares humanas contendo CE. Chen *et al.* (2009) usaram um método semelhante para criar uma rede vascular, mas utilizaram HUVECs e fibroblastos em um gel de fibrina. Este estudo avaliou a fotobiomodulação como ferramenta para estimular a proliferação de células endoteliais e manutenção da viabilidade do endotélio, o que representa um método promissor na área da engenharia tecidual vascular.

Diversos estudos tentaram induzir a brotação angiogênica *in vitro* utilizando o estresse de cisalhamento do fluido (SONG; MUNN, 2011; GALIE, *et al.* 2014) e os gradientes químicos (KIM, *et al.*, 2013). Em um estudo, Nguyen *et al.* (2013) usaram um coquetel de fatores angiogênicos incluindo VEGF, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), esfingosina-1-fosfato (S1P) e monócito proteína quimiotática-1 (MCP-1) para mostrar que os vasos pós-hematomas podem ser perfundidos. Porém, até o momento não há experimentos abordando a fotobiomodulação como estímulo para proliferação de células HUVEC visando induzir a endotelização de enxerto de vasos sanguíneos ou de dispositivos médicos que serão implantados, o que mostra a importância de um maior aprofundamento nesta área de pesquisa.

Para apoiar a endotelização em enxertos vasculares artificiais, um estudo mostrou a incorporação de anticorpos como marcador e suas perspectivas. A estratégia focou em promover a fixação e proliferação de células endoteliais e células progenitoras endoteliais (CPEs) no lúmen interno dos enxertos após o implante (LIU *et al.* 2013). Outros experimentos mostraram que as células endoteliais que são semeadas em uma superfície de biomaterial podem prevenir complicações trombogênicas e melhorar a patência a longo prazo (GRIESE *et al.* 2003). Também foram relatadas a aceleração na reendotelização e a redução da formação neointimal (NGUYEN *et al.* 2013).

Melchiorri *et al.* (2016) demonstraram com sucesso o aumento da proliferação, infiltração e diferenciação de células progenitoras endoteliais (CPEs) em células endoteliais semeadas em enxertos vasculares de engenharia tecidual (TEVGs) e cultivadas em um sistema de perfusão tubular (TPS) dinâmico, um método que se mostrou eficaz para aumentar a endotelização. Neste sentido, a presente pesquisa

demonstrou que a utilização de laserterapia de baixa intensidade em células HUVEC também poderá ser utilizada como uma alternativa para semear TEVGs de pequeno diâmetro, já que possibilitou o aumento da proliferação e manteve a viabilidade das células endoteliais, o que possivelmente contribuirá para o processo de endotelização, reduzindo drasticamente as complicações, como hiperplasia intimal e trombose em aplicações experimentais e clínicas.

Estudos prévios relataram as importantes propriedades terapêuticas da PBM, que vem sendo uma ferramenta utilizada em várias aplicações médicas (BARBOZA *et al.*, 2014), como no reparo de feridas (SZYMANSKA *et al.*, 2013; GÓRALCZYK *et al.*, 2015), regeneração nervosa periférica (ROCHKIND *et al.*, 2007), redução de reações inflamatórias (AIMBIRE, 2006), aumento da formação óssea (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2002), a promoção da cicatrização de feridas e angiogênese (TUBY, MALTZ; ORON, 2006; MITTERMAYR *et al.*, 2007). Todavia, os mecanismos moleculares subjacentes à ação da PBM ainda não estão claros.

Relatos sobre este assunto parecem confirmar que as reações fotoindutoras de transferência de elétrons podem iniciar a síntese e mudanças conformacionais de proteínas e podem influenciar no aumento da síntese de DNA e RNA (KARU; PYATIBRAT; KALENDO, 2004). Os dados do presente trabalho mostraram que a laserterapia nas doses de 1, 4 e 7,5 J/cm² foi capaz de promover proliferação celular nas HUVEC, primariamente demonstrado pelo ensaio de redução mitocondrial do Alamar Blue. Investigações recentes sugerem que a dinâmica mitocondrial afeta a função das células endoteliais, embora o conteúdo mitocondrial nas células endoteliais seja bastante modesto quando comparado a outros tipos de células (KLUGE; FETTERMAN; VITA, 2013).

O efeito bioestimulatório do LBI tem sido relatado há cerca de quatro décadas, porém os pesquisadores ainda têm buscado o melhor protocolo para o uso da laserterapia (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). O comprimento de onda de 660 nm (luz vermelha) utilizado no presente estudo, está de acordo com os achados de Ghali e Dyson (1992), que usaram comprimentos de onda de 660 e 820 nm para irradiar células endoteliais de aorta bovina e encontraram efeitos positivos na proliferação celular, apresentando um melhor resultado nas células irradiadas com laser de comprimento de onda de 660 nm.

Esse comprimento de onda também está próximo aos utilizados por Góralczyk *et al.* (2015) e De Araujo *et al.* (2007). O primeiro demonstrou em seu estudo que o uso da irradiação por luz vermelha com comprimento de onda de 635 nm foi associado a uma menor concentração, estatisticamente significativa, de VEGFR-1, um regulador da angiogênese. De Araujo *et al.* (2007) conduziram um estudo detalhado da cicatrização de feridas em camundongos após irradiação com laser He-Ne (632,8 nm), utilizando dose de 1 J/cm² e tempo de exposição de 3 min. As análises autoradiográficas e imunohistoquímicas realizadas após 15 dias de irradiação demonstraram redução da inflamação, aceleração da reepitelização, ativação de fibroblastos e aumento da quantidade de fibras colágenas na área de exposição.

Estudos *in vitro* realizados por Schindl *et al.* (2003) confirmaram o aumento da proliferação de HUVEC como resultado da radiação laser na faixa de comprimento de onda 670 em doses de 2; 4 e 8 J/cm², comprimento de onda e doses próximas às utilizadas na presente pesquisa. Assim, as células endoteliais parecem seguir a regra geral de exibirem efeitos bioestimulatórios alcançado com doses até 10 J/cm², como visto em outros tipos celulares (TUNER, HODE, 2007). De fato, um estudo mostrou que doses mais elevadas (60 e 80 J/cm²) reduziram significativamente a viabilidade celular, quando comparado aos grupos irradiados com doses mais baixas, como de 4 e 8 J/cm². (BAGHERI *et al.*, 2018).

Nossos resultados demonstraram que a irradiação com laser em células HUVEC apresenta potencial de modular a viabilidade celular de modo dependente da dose. O grupo onde as células foram irradiadas com dose de 7,5 J/cm² apresentou uma melhor taxa de viabilidade celular quando comparado com os grupos que receberam doses mais baixas (1 e 4 J/cm²). Porém, quando comparado com o grupo controle, os grupos irradiados com doses de 1 e 4 J/cm² também apresentaram um aumento na quantidade de células viáveis, como observado no ensaio de Live/Dead.

A apoptose e a disfunção das células endoteliais desempenham um papel importante em muitas doenças relacionadas à inflamação, incluindo aterosclerose, aloenxerto, lesão de isquemia-reperfusão, hipertensão, insuficiência cardíaca, sepse, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes (WINN; HARLAN, 2005). Portanto, o desenvolvimento de novas terapias para alcançar a regeneração funcional do tecido, envolve o restabelecimento e a manutenção do fluxo sanguíneo saudável. Vários mecanismos celulares e moleculares interconectados regulam os três principais

processos envolvidos no restabelecimento de circulação para regeneração tecidual efetiva: vasculogênese, angiogênese e arteriogênese (MADEDDU, 2005; POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011). A análise de morte celular/apoptose, nas células HUVEC dos grupos experimentais, foi realizada através dos dados do ensaio da imunomarcagem por Anexina V/PI em citometria de fluxo, que mostraram uma alta porcentagem de viabilidade celular em todos os grupos estudados (C: 95,2%; L1: 96,1%; L4: 96,1%; L7.5: 96,9%). Porém, o grupo que recebeu dose de 7,5 J/cm² apresentou o maior índice de viabilidade neste experimento (96,9%), o que corroborou com os resultados encontrados no ensaio metabólico do Alamar Blue e no ensaio do Live/Dead. Este fato é um indicativo de que as doses estudadas não causaram danos celulares às HUVEC.

Os dados obtivos neste trabalho sugerem que o uso da fotobiomodulação poderá ser uma alternativa eficiente para estimular a proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana, possibilitando a sua utilização como uma importante ferramenta na engenharia tecidual vascular e na endotelização de dispositivos médicos para o tratamento de diversos tipos de lesões vasculares, o que pode impactar na qualidade de vida de milhões de pessoas ao redor do mundo. O modelo de ensaio proposto apresenta, assim, perspectivas para futuras pesquisas utilizando células endoteliais cultivadas em arcabouços da engenharia tecidual e estimuladas através da fotobiomodulação.

7 CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstraram que a fotobiomodulação, principalmente na dose de $7,5 \text{ J/cm}^2$, promoveu aumento da proliferação e viabilidade de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC), o que pode sugerir o uso potencial do laser nos parâmetros estudados como estímulo à endotelização na terapia de diversas condições patológicas e na engenharia tecidual.

REFERÊNCIAS

AARABI, S.; LONGAKER, M. T.; GURTNER, G. C. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. **PLoS Med.** v. 4, p. 234, 2007.

ADAMS, D.C. E RAMSEY, M. L. Enxertos em cirurgia dermatológica: revisão e atualização de enxertos cutâneos com espessura total e parcial, enxertos de cartilagem livre e enxertos compostos. **Dermatol Surg** v. 31, p. 1055, 2005.

ADIPURNAMA, I. *et al.* Surface modification and endothelialization of polyurethane for vascular tissue engineering applications: a review. **Biomater. Sci.**, v. 5, p. 22. 2017.

ALITALO K. The lymphatic vasculature in disease. **Nat Med.** v. 17, p. 1371– 80. 2011.

ALGHAMDI, K.M.; KUMAR, A.; MOUSS, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. **Lasers Med Sci.**, v. 27, p.237– 49, 2012.

AIMBIRE, F. *et al.* Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF α Levels in Acute Inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 24, p. 33–37. 2006.

AKBARZADEH, M. *et al.* Effects of combination of melatonin and laser irradiation on ovarian cancer cells and endothelial lineage viability. **Lasers Med Sci.** v. 31 (8), p. 1565–1572. 2016.

AMAROLI, A. *et al.* The Effects of Photobiomodulation of 808 nm Diode Laser Therapy at Higher Fluence on the *in Vitro* Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells. **Front. Physiol.** v. 9, p. 123. 2018. Doi: 10.3389/fphys.2018.00123. Acesso em: 20 jun. 2018.

AMAROLI, A. *et al.* Photobiomodulation by infrared diode laser: effects on intracellular calcium concentration and nitric oxide production of Paramecium. **Photochem Photobiol** v. 92. n. 6, p. 854–862. 2016.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; G. K. HANSSON, G. K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clin. Immunol.**, v.134, n.1, p. 33–46. 2010.

- AUERBACH R, AKHTAR N, LEWIS RL, SHINNERS BL. Angiogenesis assays: problems and pitfalls. **Cancer Metastasis Rev.**; v.19, p. 167–72. 2000.
- AVCI, P. *et al.* Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. **Semin Cutan Med Surg** v. 32: p.41–52. 2013.
- BARBOZA, C.A.G. *et al.* Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein**, v. 12, p. 75-81, 2014.
- BASSO, F. G. *et al.* Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. **Laser Med Sci.** v. 28, p. 367–74. 2013.
- BAIGUERA; RIBATTI. Endothelialization approaches for viable engineered tissues. **Angiogenesis.** V. 16 p.1–14. 2013
- BENEDICENTI, S. The effects of photobiomodulation of 808 nm diode laser therapy at higher fluence on the in vitro osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. **Front. Physiol.**: p.123. 2018.
- BLANCO, R.; GERHARDT, H. VEGF and notch in tip and stalk cell selection. **Cold Spring Harb Perspect Med.**; v.3, p.006569. 2013.
- BOFFITO, M.; SARTORI, M.; CIARDELLI, S. A mechanical characterization of polymer scaffolds and films at the macroscale and nanoscale. **Polym. Int.**, v. 63, p. 2 – 11. 2014.
- BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMÕES, M. LP. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em s. **Rev bras fisioter**, v. 14, n. 1, p. 45-51, 2010.
- BULLWINKEL, J. *et al.* Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. **J. Cell. Physiol.** v. 206, n., p.624-35. 2006.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat Med.** v. 9, p. 653–60. 2003
- CATTO, V. *et al.* Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration. **Vasc. Med.**, v. 12014. p. 1-27. 2014

CHANDRA, P. ATALA, A. Engineering blood vessels and vascularized tissues: technology trends and potential clinical applications. **Clinical Science**. v.133, p. 1115–1135. 2019.

CHEN, X. *et al.* Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. **Tissue Eng. Part A**. v.15, p.1363–1371, 2009.

CHONG, D. S. T. *et al.* Nanotopography and plasma treatment: Redesigning the surface for vascular graft Endothelialisation. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v.49, p. 335–343. 2015.

CHEN, Q. H. *et al.* Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restores endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor in vitro. **Stem Cell Res Ther**. v.6, n.1, p. 44. 2015.

COLOMBO, F. *et al.* Effect of low-level laser therapy (λ 660 nm) on angiogenesis in wound healing: a immunohistochemical study in a rodent model. **Braz Dent J**. v.24, p. 308–312. 2013.

CRAWFORD, T. N. *et al.* Diabetic retinopathy and angiogenesis. **Curr Diabetes Rev** p.5, p. 8– 13. 2009.

DE ARAUJO, C. E. *et al.* Ultra structural and auto radiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **J Photochem Photobiol B**. v. 86, p. 87–96. 2007.

DAVENPORT, A. P. *et al.* Endothelin. **Pharmacol Rev**. v. 68, p. 357– 418. 2016.

DAVIS, G.E. *et al.* Endothelial cell polarization during lumen formation, tubulogenesis, and vessel maturation in 3D extracellular matrices. **In Cell Polarity 1: Biological Role and Basic Mechanisms** (Ebnet, K., ed.) p. 205–220, 2015.

DE FREITAS, F. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics**, v. 22, n. 3, p. 1-17, 2016.

DIAS, F. J. *et al.* Effects of low-level laser irradiation in ultrastructural morphology, and immunoexpression of VEGF and VEGFR-2 of rat masseter muscle. **Micron** v. 43, n. 2, p. 237–244. 2012.

DREGER, H. *et al.* Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2. **Cardiovasc Res**; v.85, p. 395-403. 2010.

DVORAK, H.F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol.** v.146, p.1029–39. 1995.

DVORAK, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol.** v.20, p. 4368-80. 2002.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol.** v. 146, p. 1029–1039. 1995.

DEAN, E. W.; UDELSMAN, B.; BREUER, C. K. Current advances in the translation of vascular tissue engineering to the treatment of pediatric congenital heart disease. **Yale J Biol Med**, v.85, p. 229-238. 2012.

DE LOURA, S. C. *et al.* Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds. **PLoS One.** v.10, p. 0122042. 2015.

DUVALL, C.L. *et al.* The role of osteopontin in recovery from hind limb ischemia. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.8, p. 290–295. 2008.

EMING, S.A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Sci. Transl. Med.**, vol. 6, p. 2014. 2014.

FÁVARO-PÍPI, E. *et al.* Low-level Laser Therapy Induces Differential Expression of Osteogenic Genes During Bone Repair in Rats. **Photomed Laser Surg.**, v. 29, p.311-7, 2011.

FERREIRA, P. *et al.* Improving polymeric surfaces for biomedical applications: a review. **J. Coat. Technol. Res.**, v.12, p. 463–475. 2015.

FISH, J. E.; SRIVASTAVA, D. MicroRNAs: opening a new vein in angiogenesis research. **Sci Signal.**;v.2, p. 252. 2009.

FONDER, M.A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **J. Am. Acad. Dermatol.**; v.58, p.185–206. 2008.

FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis. **J Biol Chem.** v.267, p.10931-4. 1992

LI, J. *et al.* TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol13-acetate-induced cell death in vitro and in vivo. **J Biol Chem.** v.274, p.4213-9. 1999.

GALIE, P.A. *et al.*, A macroporous hydrogel for the coculture of neural progenitor and endothelial cells to form functional vascular networks invivo, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.103. p.2512–2517. 2006.

GERHARDT, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. **Organogenesis.** v.4, p.241–6. 2008.

GHALI, L.; DYSON, M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. In: *Angiogenesis: Key Principles–Science– Technology– Medicine* (Steiner R, Weisz P, Langer R, eds). **Basel: Birkha"user**, p. 411–14. 1992.

GINANI, F. *et al.* Effect of low level laser therapy on mesenchymal stem cell proliferation: a systematic review. **Lasers Med Sci.**, v.30, n.8, p.2189-94, 2015.

GO, A. S.; MOZFFARIAN, D.; ROGER, V. L. *te al.* Heart Disease and Stroke Statistics – **A report from the American Heart Association**, p. 129. 2014.

DE MEL, A.; B. G. COUSINS AND A. M. SEIFALIAN. Surface Modification of Biomaterials: A quest for blood compatibility. **Int. J. Biomater.** p.1 –8. 2012.

GÓRALCZYK, K. *et al.* Effect of LLLTonendothelial cells culture. **Lasers Med Sci.** v.30, n.1, p. 273–278. 2015.

GÖRLACH, A. *et al.* Calcium and ROS: a mutual interplay. **Redox Biol.** v.6, p.260–271. 2015.

GRIESE, D. P. *et al.* Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. **Circulation**, v.108, p. 2710–2715. 2003.

GRYKO, Ł. *et al.* The concept of the set to object ification of LLLT exposure. **Proc.of SPIE: laser technology**. p. 8703. 2012.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**. v. 453, n.15. 2008.

HAACK, T.; ABDELILAH-SEYFRIED, S. The force within: endocardial development, mechanotransduction and signalling during cardiac morphogenesis. **Development**.v.143, p.373–86. 2016.

HASSANPOUR, M. *et al.* Functional convergence of Akt protein with VEGFR-1 in human endothelial progenitor cells exposed to sera from patient with type 2 diabetes mellitus. **Microvasc Res**. v.114, p.101–113. 2017.

HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg** v.25, n.3, p.159–169. 2007.

HEIDENREICH, P.A. *et al.* Fore casting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. **Circulation.**, v.123, p.933-944. 2011

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes?. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.17, p.1003–1017. 2018.

HEWETT, P. W.; MURRAY, J. C. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. **In Vitro Cell Dev Biol Anim** v.29, p.823–830. 1993.

HOFFMAN, A. S. Blood—Biomaterial Interactions: An Overview, in Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications, ed. S. Cooper, no. 3, **Advances in Chemistry, American Chemical Society**, p. 3–8. 1982.

HOPKINS, J. T. *et al.* Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **J Athl Train** v.39, n.3, p. 223–229. 2004.

HUANG, L.; WU, S.; XING, D. High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3 β signaling pathway. **J Cell Physiol** v.226, n.3, p. 588–601. 2011.

INOE, A.; ZAFANELLI, C.; ROSSATO, R. Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência HeNe em feridas cutâneas de coelhos. **Arq. Ciên.Vet. Zool. Unipar**, v. 11, p. 27–30, 2008.

JAFFE, E. A. *et al.* Culture of human endotelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **J Clin Investig** v.52, p.2745–275. 1973.

KARU, T. I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem. Photobiol.**, v. 84, n. 5, p. 1091–9, 2008.

KARU, T.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochem Photobiol Sci** v.3, p.211–216. 2004.

KARU, T. Mitochondrial mechanisms of photobiomodulation in context to new data about multiple role of ATP. **Photomed Laser Surg** v.28, n.2, p.159–160. 2010.

KHAN, I.; ARANY, P. Biophysical approaches for oral wound healing: emphasis on photobiomodulation. **Adv Wound Care (New Rochelle)** v. 4, n.12, p.724–737. 2015.

KHANNA A.; SHANKAR, L. R.; KEELAN, M. H. Augmentation of the expression of the proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. **Cardiovasc Radiat Med** v.1, p.265–269. 1999.

KIM, S. *et al.* Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. **Lab Chip**. v.13, p.1489–1500. 2013.

KING, A. *et al.* The role of stem cells in wound angiogenesis. **Adv. Wound Care**. v.3, p. 614–625. 2014.

KOCH, S. *et al.* Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation, **Biomaterials**, v.31, p. 4731–4739. 2010.

KONIGOVA, R. & RYCHTEROVA, V. Marjolin's ulcer. **Acta Chir. Plast.** v. 42, p. 91–94, 2000.

KONO, T. J. Y. *et al.* The role of deleterious substitutions in crop genomes. *Molecular Biology and Evolution*. v.33, p.1669-1678. 2016.

KLUGE, M. A.; FETTERMAN, J. L.; VITA, J. A. Mitochondria and endothelial function. *Circ Res.*; v.112, p.1171– 1188. 2013. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300233.

LAPCHAK, P. A.; DE TABOADA, L. Transcranial near infrared laser treatment (NILT) increases cortical adenosine-5'-triphosphate (ATP) content following embolic strokes in rabbits. *Brain Res* v.1306, p.100–105. 2010.

LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* v.14, n.4, p.347–354. 1994.

LI, S.; D. SENGUPTA, D.; CHIEN, S. Vascular tissue engineering: from in vitro to in situ. *Wiley Interdiscip. Rev.: Syst. Biol. Med.*, v.6, p. 61 –76. 2014.

LIMAN, T. G.; ENDRES, M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc. Dis.* v.33, p.492–499. 2012.

LIU, T. *et al.* Endothelialization of implanted cardiovascular biomaterial surfaces: The development from in vitro to in vivo. *Biomed. Mater. Res.*, Part A, v.102, p. 3754–3772. 2013.

LIZARELLI, R. T. Z. *Uso do laser de baixa intensidade: protocolos clínicos e odontológicos*. 2ª ed. São Carlos – SP, 2005.

MADEDDU, P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol.*; v. 90: p. 315–26. 2005.

MARQUES, L. *et al.* Drought impacts on tree growth of two pine species along an altitudinal gradient and their use as early-warning signals of potential shifts in tree species distributions. *Forest Ecology and Management*. v.381. p.157–167. 2016.

MELCHIORRI, A. J. *et al.* In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods*. Jul; v.22, n.7, p.663-70. 2016.

MOREIRA, F. F. *et al.* Low-level laser therapy in the expression of collagen after muscular surgical injury. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 18, n. 1, p. 37-42, 2011.

MITTERMAYR, R. *et al.* Blue Laser Light Increases Perfusion of a Skin Flap Via Release of Nitric Oxide from Hemoglobin. **Mol Med** v.13, p.22–29. 2007.

MIRIA, A. K.; KHALILPOURA, A.; BERIVAN CECENA, B. Multiscale bioprinting of vascularized models. **Biomaterials**. V.198, p.204-216. 2019.

MULDER, W. J.; GRIFFIOEN, A. W. Imaging of angiogenesis. **Angiogenesis**. v.13, p.71–74. 2010.

NGUYEN, D.H. *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.110, p.6712–6717. 2013.

OTTAVIANI, G. *et al.* Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. **Dev Cell**; v.16: p.196 – 208. 2009.

PEPLOW, P. V.; CHUNG, T.Y.; BAXTER, D. B. Laser photobiomodulation of proliferation of cell in culture: a review of human and animal studies. **Photomed Laser Surg** v.28, n.51, p.53–540. 2010.

POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**. v.146, p.873–87. 2011.

PINHEIRO, A.L.B.; BRUGNERA-JUNIOR, A.; ZANIN, F.A.A. Aplicação do laser na Odontologia. São Paulo: Santos, 428p. 2010

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat Rev Immunol**.v.7, p.803–15. 2007.

PRINDEZE, N. J.; MOFFATT, L. T. AND SHUPP, J. W. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. **Exp. Biol. Med.**, v.237, n.11, p. 1241–1248. 2012.

PUNSHON, G. *et al.* Assessment of the potential of progenitor stem cells extracted from human peripheral blood for seeding a novel vascular graft material. **Cell Prolif.** v.41, n.2, p.321, 2008.

RADKE, D. *et al.* Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. **Adv. Healthcare Mater.** v.7, p. 1701461. 2018.

RAHMANZADEH, R. *et al.* Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis". **Cell Prolif.** v.40, n.3, p. 422–30. 2007.

REN, X. *et al.* Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vasculatissue engineering applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 44, p.5680–5742. 2015.

REZAIIE, J. *et al.* Angiogenic and restorative abilities of human Mesenchymal stem cells were reduced following treatment with serum from diabetes mellitus type 2 patients. **J Cell Biochem.** Jan; v.119, n. 1, p. 524-535. 2018.

RHODES, J. M.; SIMONS, M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold, **J. Cell. Mol. Med.** v.11, p.176–205. 2007.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature.** v.386: p.671- 4. 1997.

RICCI, R. *et al.* Biomodulation with low-level laser radiation induces changes in endothelial cell actin filaments and cytoskeletal organization. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** v.95, p. 6–8. 2009.

ROCCO, K. A. *et al.* In Vivo Applications of Electrospun Tissue-Engi Grafts. **Tissue Eng.**, Part B, v.20, p. 628–640. 2014.

ROCHKIND, S. *et al.* Efficacy of 780-nm Laser Phototherapy on Peripheral Nerve Regeneration after Neurotube Reconstruction Procedure (Double-Blind Randomized Study). **Photomedicine and Laser Surgery** v.25, p.137–143. 2007.

SANTOS, M. I.; REIS, R. L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. **Macromol Biosci.** v.10, p.12–27. 2010.

SCHINDL, A. *et al.* Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **British Journal of Dermatology**. v.148, p.334–336. 2003.

SONG, J.W.; MUNN, L.L. Fluid forces control endothelial sprouting. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.108, p.15342–15347, 2011.

SILVA, T. C. *et al.* In vivo effects on the expression of vascular endothelial growth factor-165 messenger ribonucleic acid of an infrared diode laser associated or not with a visible red diode laser. **Photomed Laser Surg**. Feb; v.28, n.1: p.63- 8. 2010.

SILVA JÚNIOR, A. N. *et al.* Computerized Morphometric Assessment of the Effect of Low-Level Laser Therapy on Bone Repair: An Experimental Animal Study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery** v.20, p.83–87. 2002.

SEN, C. K. *et al.* Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen**. v.17, p.763–771. 2009.

SILVA, T. C. *et al.* In vivo effects on the expression of vascular endothelial growth factor-A165 messenger ribonucleic acid of an infrared diode laser associated or not with a visible red diode laser. **Photomed Laser Surg** v.28, p.63–8. 2010. doi:10.1089/pho.2008.2403

SINGER, A. J. & CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.** v. 341, p.738–746, 1999.

SKOPIN, M. D.; MOLITOR, S. C. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. **Photodermatol Photoimmunol Photomed** v. 25, p.75–80. 2009.

STURTZEL C. Endothelial Cells. **Adv Exp Med Biol.**; v.1003, p.71-91. 2017.

SZYMANSKA, J. *et al.* Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. **J Physiol Pharmacol** v. 64, n.3, p. 387–391. 2013.

TAO, L. *et al.* Exercise for the heart: signaling pathways. **Oncotarget**; v.6, p.20773-20784. 2015.

THOTTAPPILLIL, N.; NAIR, P. D. Scaffolds in vascular regeneration: current status. **Vasc. Health Risk Manage.**, v.11, n. 6, p.79–91. 2015.

TONDREAU, M. Y. *et al.* Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. **Acta Biomater.** v.18, p.176, 2015.

TRENT, J. T.; KIRSNER, R. S. Wounds and malignancy. **Adv. Skin Wound Care.** v.16, p. 31–34, 2003.

TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Lasers Surg. Med.** v.38, p.682–688. 2006.

TUNER, J.; HODE, L. The laser therapy handbook. Grangesberg: Prima Books, 590p. 2007.

WINN, R. K.; HARLAN, J. M. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. **J Thromb Haemost.** v.3, p.1815–1824. 2005.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat Rev Immunol.**; v.15, p. 692–704. 2015.

WACKER, A.; GERHARDT, H. Endothelial development taking shape. **Curr Opin Cell Biol.**; v.23, p.676–85. 2011.

WANG, Y. *et al.* Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. **Sci Rep** v.6, p.33719. 2016.

WOODRUFF, L.D. *et al.* The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed Laser Surg** v.22, n.3, p 241–7. 2004.

WU, X. *et al.* Re-endothelialization study on endovascular stents seeded by endothelial cells through up- or downregulation of VEGF. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.8, p. 7578–7589. 2016.

ZANDONÀ, L. *et al.* Laser therapy inhibits tumor growth in mice by promoting immune surveillance and vessel normalization. **E Bio Medicine** v.11, p.165–172. 2016.

ZHOU, B. *et al.* Therapeutic neovascularization for peripheral arterial diseases: advances and perspectives. **Histol. Histopathol.** v.22, p.677–686. 2007.

ZIYAD, S.; IRUELA, A. M. L. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis. **Genes Cancer.** v.2, n.12, p.1085– 1096. 2011. <https://doi.org/10.1177/1947601911432334>.