



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

GEYZA LOPES BORGES ARAÚJO

Efeito das Fototerapias LED IV e LED Violeta em mastócitos da
mucosa de língua de ratos *Wistar* – Estudo Histoquímico

Salvador - BA
2020

GEYZA LOPES BORGES ARAÚJO

Efeito das Fototerapias LED IV e LED Violeta em mastócitos da mucosa de
língua de ratos *Wistar* – Estudo Histoquímico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito
para obtenção do grau Mestre em Biotecnologia. Orientador:
Prof. Dr. Luiz Guilherme Pinheiro Soares. Co-orientador: Prof.
Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro.

Salvador - BA
2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Araújo, Geyza Lopes Borges
Efeito das Fototerapias LED IV e LED Violeta em mastócitos da mucosa de língua de ratos *Wistar*: Estudo histoquímico. / Geyza Lopes Borges Araújo. -- Salvador, 2020.
45 f. : il

Orientador: Luiz Guilherme Pinheiro Soares.
Dissertação (Mestrado - PPGBiotec Mestrado) -- Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2020.

1. Fotobiomodulação. 2. LED. 3. Mastócitos I. Guilherme Pinheiro Soares, Luiz. II. Título.

“O temor ao Senhor é o princípio
da sabedoria, e o conhecimento
do Santo a prudência”

Provérbios 9:10

AGRADECIMENTOS

Toda honra e toda a Glória sejam dadas ao autor da vida! Aquele que sonda e conhece os desejos do coração.

Meu muito obrigada ao querido e renomado professor Antônio Luiz Barbosa Pinheiro, que me aceitou para trabalhar em seu grupo, muito conhecido no mundo da ciência, por seus diversos trabalhos publicados para contribuição e avanço da ciência.

Meu muito obrigada também ao professor Luiz Guilherme Pinheiro Soares, que aceitou o desafio de ser meu orientador, sendo sempre atencioso e compreensivo. Agradeço ao meu pai Carlos José Barbosa Borges e minha mãe Maria Celeste Lopes, que sempre investiram na minha educação e torceram por minhas conquistas. Meu esposo Alessandro Araújo da Silva, que se alegra junto comigo e não se opõe ao que proponho a fazer, acreditando que juntos podemos nos apoiar e realizar nossos sonhos. Aos meus irmãos deixo o incentivo de que é possível seguir em frente quando desejamos e nos dedicamos a alcançar nossos objetivos. À todos os colegas do Centro de Biofotônica da UFBA meu muito obrigada por me receberem com todo carinho e ajuda no início da caminhada com o Laser. Agradeço ao professor Jean Nunes dos Santos por sua disponibilidade em me ajudar sempre que precisei e por suas dicas valorosas.

À professora Cristina Cangussú pelas inúmeras conversas até chegarmos ao resultado final, sempre gentil, muito obrigada. Hoje estou podendo concluir mais esse passo em minha vida e sou muito grata por todos os benefícios que me foram concedidos!

Agradeço também a FAPESB pelo auxílio financeiro, que foi fundamental para o cumprimento deste trabalho.

ARAÚJO, Geyza Lopes Borges. Efeito das Fototerapias LED IV e LED violeta em mastócitos da mucosa de língua de ratos *Wistar* – Estudo Histoquímico. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2020.

RESUMO

A resposta inflamatória é definida como uma reação de defesa do organismo, frente a agentes agressores, cujo objetivo final é devolver a homeostase e recuperar os tecidos lesados. Dentre os principais tipos celulares envolvidos neste processo encontramos os mastócitos, cuja função é sintetizar, armazenar e liberar potentes mediadores químicos do processo inflamatório, através da sua degranulação. É conhecido que os Lasers e os LEDs de baixa potência, emitindo na região do vermelho e infravermelho, podem modular o processo inflamatório, sendo a degranulação de mastócitos, um dos fenômenos observados. Porém, pouco se sabe sobre efeitos da utilização clínica do LED violeta sobre os tecidos biológicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das fototerapias LED Infravermelho (λ 850 \pm 10 nm, emissão contínua, Dose = 20 J/cm²) e LED violeta (λ 405 \pm 10 nm, emissão contínua, Dose = 20 J/cm²), com a fotobiomodulação dos mastócitos após o estímulo da luz, bem como seu índice de degranulação, em mucosa de língua de ratos. Para tanto, foram utilizados 27 ratos da linhagem *Wistar*, que foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle, Grupo LED IV (λ 850 \pm 10 nm) e Grupo LED violeta (λ 405 \pm 10 nm). Os tempos de remoção do tecido oral foram: imediatamente, 20 minutos, 45 minutos e 2 horas após o procedimento de irradiação. Após a remoção da língua, os tecidos foram processados para análise histológica, através da coloração Azul de Toluidina, e feita a contagem dos mastócitos íntegros e degranulados. Em relação ao grupo controle, os grupos irradiados mostraram um aumento no número de mastócitos (íntegros e degranulados) no tecido superficial em todos os tempos, e no tecido profundo no tempo imediato do grupo LED violeta. Os maiores índices de degranulação foram observados no tecido profundo dos dois grupos irradiados. O grupo do LED violeta, apresentou destaque da degranulação no tecido profundo dos tempos imediato (70,25%) e 20 minutos (81,11%). Dessa forma, foi possível concluir que a luz LED infravermelha e violeta mostraram-se efetivas no processo de estimulação da proliferação e degranulação de mastócitos em mucosa de língua de rato.

Palavras chave: Fotobiomodulação; LED; Mastócitos.

ARAÚJO, Geyza Lopes Borges. Effect of LED IV and violet LED phototherapy on mast cells of the tongue mucosa of Wistar rats - Histochemist study. Dissertation (Master) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2020.

ABSTRACT

The inflammatory response is defined as a defense reaction of the body, against aggressive agents, whose ultimate goal is to return homeostasis and recover damaged tissues. Among the main cell types involved in this process, mast cells are found, whose function is to synthesize and release potent chemical mediators of the inflammatory process, through degranulation. It is well-known that low power Lasers and LEDs, emitting in the red and infrared region, can modulate biological process, with mast cell degranulation being one of the observed phenomena. However, the literature is scarce about the effects of the clinical use of the violet LED on biological tissues. The aim of this study was to evaluate the effects of infrared LED phototherapies ($\lambda 850 \pm 10$ nm, continuous emission, Dose = 20 J/cm^2) and violet LED ($\lambda 405 \pm 10$ nm, continuous emission, Dose = 20 J/cm^2), with mast cells photobiomodulation after light stimulation, as well as their degranulation index, in tissues of the mucosa of tongue of rats. To this end, 27 Wistar rats were used, which were randomly distributed into three groups: Control Group, LED IV Group ($\lambda 850 \pm 10$ nm) and violet LED Group ($\lambda 405 \pm 10$ nm). Tissue removal times were oral: immediately, 20 minutes, 45 minutes and 2 hours after the irradiation procedure. After removal of the tongue, the tissue was processed for histological analysis with Toluidine Blue staining technique and count of intact and degranulated mast cells. In relation to the control group, the irradiated groups showed an increase in the number of mast cells (intact and degranulated) in the superficial tissue at all times, and in the deep tissue in the immediate time of the violet LED group. The highest rates of degranulation were observed in the deep tissue of the two irradiated groups. The group of the violet LED, showed a highlight of the degranulation in the deep tissue of the immediate (70.25%) and 20 minutes (81.11%) times. Thus, it was possible to conclude that the infrared and violet LED light proved effective in the process of stimulating the proliferation and degranulation of mast cells in the mucosa of the rat's tongue.

Keywords: Photobiomodulation; LED; Mast cells.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS, QUADROS E GRÁFICOS

Figura 1 -	Protocolos de irradiação.	24
Figura 2 -	Coloração com HE da língua do rato. A - Camada superficial do tecido. B – Camada profunda do tecido.	26
Figura 3 -	Fotomicrografia com aumento de 400x, mostrando coloração do tecido com azul de toluidina, evidenciando os mastócitos corados em roxo.	27
Figura 4 -	Fotomicrografia de mastócitos degranulados, identificados com a seta.	27
Tabela 1 -	Parâmetros da fonte de luz do protótipo LED IV e Violeta.	25
Tabela 2 -	Comparação do grupo LED Violeta com o grupo Controle, na remoção imediata.	28
Tabela 3 -	Comparação do grupo LED IV com o grupo Controle, na remoção imediata.	29
Tabela 4 -	Comparação entre os tempos experimentais dos grupos LED Violeta e LED IV.	30
Quadro 1 -	Grupo I – Controle.	22
Quadro 2 -	Grupo II – LED IV (FisioLED, MMOptics [®] , λ 850 \pm 10nm, modo contínuo) com dose de 20J/cm ² .	22
Quadro 3 -	Grupo III - LED violeta (BMW, MMOptics [®] , λ 405 \pm 10 nm, modo contínuo) com dose de 20J/cm ² .	23
Gráfico 1 -	Índice de degranulação dos mastócitos na camada superficial do tecido de cada grupo de tempo.	30
Gráfico 2 -	Índice de degranulação dos mastócitos na camada profunda do tecido de cada grupo de tempo.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
bFGF	Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto
Ca ²⁺	Íon cálcio
Cl ⁻	Íon cloreto
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FBM	Fotobiomodulação
FcεRI	Receptor da porção Fc da IgE
GaAsAl	Arseneto de Gálio e Alumínio
HASC	Células Tronco do tecido Adiposo Humano
He-Ne	Hélio-Neônio
HGF	Fibroblastos Gengivais Humanos
IgE	Imunoglobulina E
IV	Infravermelho
K ⁺	Íon potássio
LBI	Laser de Baixa Intensidade
LED	Diodo Emissor de Luz
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
λ	Comprimento de onda

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Referencial teórico.....	14
3.1. Mastócitos.....	14
3.2. Mediadores Químicos.....	15
3.3. LED.....	17
3.4. Fotobiomodulação.....	18
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1. População e grupos.....	22
4.1.1. Cálculo amostral.....	22
4.1.2. Dos critérios de inclusão/exclusão.....	23
4.2. Procedimento experimental.....	23
4.2.1. Procedimentos de irradiação e cirúrgicos.....	23
4.3. Equipamentos.....	25
5. Análise Histológica.....	25
5.1. Coloração Azul de Toluidina.....	26
6. Análise Estatística.....	27
7. Resultados.....	28
7.1. LED Violeta x Controle – Remoção imediata.....	28
7.2. LED IV x Controle – Remoção imediata.....	28
7.3. LED Violeta x LED IV – Tempos experimentais.....	29
8. Discussão.....	31
9. Conclusão.....	38
Referências.....	39
ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	46

1. Introdução

O processo inflamatório é classicamente definido como uma reação de defesa do organismo, inespecífica, a princípio local, frente a agentes agressores de natureza física, química ou biológica, sendo considerada, fundamentalmente, uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências desta (KUMAR *et al.*, 2015).

Os tipos celulares mais envolvidos com a inflamação são as células leucocitárias oriundas do sangue. Além destes tipos celulares, há a presença dos mastócitos, células derivadas de uma célula hematopoiética progenitora originada na medula óssea. Encontrados em todos os tecidos vascularizados, os mastócitos foram descritos como células que possuem o citoplasma repleto de grânulos metacromáticos, e sua função é produzir e liberar potentes mediadores químicos que fazem parte das diversas fases da inflamação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A importância do mastócito está diretamente ligada à sua degranulação, provocada por reações moleculares que culminam com a liberação de Ca^{2+} , a partir de reservatórios intracelulares, que ativam a proteína quinase C e promovem liberação dos seus fatores pré-formados. Essas reações são desencadeadas pela ação de agentes químicos derivados da ativação do Sistema Complemento, de reações imunes mediadas pela IgE, de citocinas e de toxinas bacterianas, dentre outros estímulos (SIRAGANIAN, 2003).

Alguns mediadores dos mastócitos, como a histamina, causam um rápido aumento na permeabilidade vascular e na contração do músculo liso, resultando em muitos sintomas dessas reações. Outros mediadores, como as citocinas, recrutam neutrófilos e eosinófilos ao local da reação durante muitas horas. As reações de fase tardia, derivadas dos componentes inflamatórios da hipersensibilidade imediata, são responsáveis pela lesão tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2013). Os mastócitos também podem estimular fibroblastos a secretarem colagenases, sugerindo que esses podem modular a função das células do tecido conjuntivo e influenciar a maturação e degradação das fibras de colágeno nos tecidos. No entanto, a ativação dos mastócitos também pode levar a fibrose tecidual, como resultado do aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos. (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Na tentativa de minimizar os efeitos do processo inflamatório, com os seus sinais cardinais (dor, calor, rubor, tumor/edema, perda de função) e diminuir o tempo de recuperação, diminuindo o uso de medicamentos como os AINEs (anti-inflamatórios não esteróides) e seus efeitos colaterais, que representam grande problema de saúde pública, além do alto custo, outras

opções terapêuticas vêm sendo estudadas, e entre elas pode-se observar que as fototerapias, principalmente a laser, têm ganhando relevância (MORAIS, 2010).

Há um grande número de trabalhos que relatam o uso das fototerapias laser e LED no processo de reparo tecidual, quando aplicadas particularmente nas fases iniciais da inflamação, onde é marcante a presença de mediadores químicos, moléculas e células que são mais facilmente estimuladas, (BAROLET, 2008; KARU, 2008; BRUGNERA, ZANIN, PINHEIRO, 2010; SAMPAIO, 2013) e recrutadas ao local da inflamação, facilitadas por meio da vasodilatação, que é um dos efeitos induzidos pelas fototerapias nos tecidos (EL SAYED; DYSON, 1990).

Este processo de modificação do metabolismo/função celular é denominado fotobiomodulação. É resultante da alteração bioquímica e molecular que ocorre a partir da absorção de baixa intensidade de energia pela cadeia respiratória ou membrana celular, ao se irradiar um organismo vivo, com comprimento de onda específico, normalmente localizado na região do vermelho e infravermelho próximo do espectro de radiação eletromagnética (BRUGNERA, ZANIN, PINHEIRO, 2010). Alguns estudos demonstraram que a fototerapia com o laser aumenta a degranulação de mastócitos em mucosa de animais e humana, provocando a liberação de substâncias como a histamina, serotonina e bradicinina, presentes durante um processo inflamatório e, assim, o modificam. (EL SAYED; DYSON, 1990; 1996; SILVEIRA, 2008; SAWASAKI, 2009; MONTEIRO, 2011; MANDRILLO, 2017).

Assim, com surgimento de novos equipamentos utilizando comprimentos de onda pouco utilizados para fotobiomodulação, como o violeta, através de dispositivos LED, em tecidos biológicos, torna-se necessária a maior compreensão de seus efeitos nos tecidos orais, principalmente em relação à influência deste tipo de luz sobre células envolvidas em processos celulares importantes como a inflamação, quadros alérgicos e doenças crônicas. Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das fototerapias com LED infravermelho e violeta sobre os mastócitos em mucosa de língua de ratos *Wistar*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o número total de mastócitos e os índices de degranulação após a irradiação com LED infravermelho ($\lambda 850 \pm 10$ nm) e LED violeta ($\lambda 405 \pm 10$ nm) em mastócitos da mucosa de língua de ratos *Wistar*, com tecido intacto (sem lesão).

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da irradiação com LED Infravermelho ($\lambda 850 \pm 10$ nm) sobre a contagem do número total de mastócitos e sobre o índice de degranulação dos mesmos, após os tempos de irradiação imediato, 20 minutos, 45 minutos e 2 horas, em tecido superficial e profundo da mucosa da língua de ratos *Wistar*, realizada através da coloração com Azul de Toluidina.

Avaliar os efeitos da irradiação com LED violeta ($\lambda 405 \pm 10$ nm) sobre a contagem do número total de mastócitos e sobre o índice de degranulação dos mesmos, após os tempos de irradiação imediato, 20 minutos, 45 minutos e 2 horas, em tecido superficial e profundo da mucosa da língua de ratos *Wistar*, realizada através da coloração com Azul de Toluidina.

3. Referencial teórico

3.1. Mastócitos

Os mastócitos originam-se na medula óssea, provenientes de células progenitoras hematopoiéticas CD34⁺, que também originam linfócitos, eritrócitos, megacariócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos (KRISHNASWAMY *et al.*, 2001). Os progenitores dos mastócitos humanos deixam a medula óssea e tornam-se células agranulares indiferenciadas na circulação periférica, amadurecendo sob influências microambientais locais e se diferenciando nos tecidos (GALLI, 1990; KNUDSEN, JOHANSEN, 1990).

Os mastócitos são numerosos sob as superfícies epiteliais da pele, no sistema respiratório, nos tratos gastrointestinal e geniturinário, adjacentes a vasos sanguíneos e linfáticos e próximos ou dentro de nervos periféricos, tornando seus produtos disponíveis para uma larga variedade de tipos celulares incluindo fibroblastos, células epiteliais glandulares, nervos, células endoteliais vasculares, células musculares lisas e células do sistema imune (BIENENSTOCK *et al.*, 1989). Os locais de distribuição dos mastócitos têm relação com a proximidade de parasitas e outros patógenos, além de antígenos ambientais que entram em contato com a pele e superfícies mucosas (GALLI, 1993).

Estão relacionados com diversos processos fisiológicos, patológicos e imunológicos, incluindo reações alérgicas, remodelamento tecidual, reparo de ferimentos, fibrose patológica, artrite, angiogênese e reações do hospedeiro às neoplasias (METCALFE; BARAM; MEKORI, 1997). O mastócito expressa o receptor FcεRI que se liga com alta afinidade a porção Fc do anticorpo IgE. Quando os anticorpos IgE se ligam aos receptores destas células, reconhecendo antígenos multivalentes específicos, os mastócitos sofrem um padrão característico de mudanças bioquímicas e morfológicas coletivamente denominadas degranulação anafilática, que resultam na liberação de um painel de mediadores biologicamente ativos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2013).

Os mastócitos expressam moléculas de superfície com atividade co-estimulatória ou co-inibitória, produzindo uma série de mediadores que podem direcionar as células dendríticas ou diferenciação e função das células T. O fato é que as interações entre mastócitos e células T existem, e constituem um componente normal da maioria das respostas imunes adaptativas, sendo uma das melhores ilustrações para afirmar que as respostas imunes adaptativa e inata não são entidades completamente independentes (SAYED; BROWN, 2007).

Em várias revisões recentes sobre inflamação e doenças inflamatórias, os mastócitos nem sempre são mencionados, ou quando se referem a eles, apenas são listados como simples participantes. Talvez essa ausência no reconhecimento seja em parte pelo papel já estabelecido dos mastócitos em doenças alérgicas, o que de uma certa forma obscureceu os demais papéis dos mastócitos em outros contextos. Essa omissão pode ocorrer, simplesmente, pelo fato dos mastócitos estarem em menor quantidade em lesões inflamatórias, quando comparadas com número de linfócitos e neutrófilos nestas lesões. Entretanto, os mastócitos apesar de se apresentarem em menor quantidade, são essenciais na promoção da resposta inflamatória (KINET, 2007).

Os mastócitos podem desempenhar um papel protetor na imunidade inata e um papel pró-inflamatório em certas circunstâncias. Este papel protetor e pró-inflamatório, parece ser contraditório. No entanto, esta aparente contradição é um fator importante a ser levado em conta, se levarmos em consideração que os mastócitos podem ser um bom alvo terapêutico (KINET, 2007). Sua maior importância está relacionada a degranulação, pois proporciona uma série de reações em cadeia, que vão desde o aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de outras células ao local da inflamação, até a estimulação de fibroblastos para a síntese de colágeno no reparo tecidual, a partir da liberação dos mediadores químicos primários e secundários.

3.2. Mediadores Químicos dos Mastócitos

Os mastócitos são caracterizados por sua habilidade de sintetizar, estocar e liberar numerosas moléculas de efeito biológico. Além da heparina, os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos também contêm histamina, proteases neutras (triptase, quimase e carboxipeptidases), aril-sulfatase, assim como outras enzimas, tais como: β -glicuronidase, quinogenase, peroxidase, superóxido dismutase, fator quimiotático para eosinófilos e fator quimiotático para neutrófilos (GARTNER; HIATT, 2003).

Estes agentes farmacológicos presentes nos grânulos são denominados mediadores primários ou pré-formados. Além das substâncias encontradas nos grânulos, os mastócitos sintetizam vários mediadores a partir de precursores derivados dos fosfolipídeos da membrana, chamados de mediadores secundários ou neoformados. Dentre os mediadores lipídicos incluem leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄), tromboxanos (TXA₂ e TXB₂), e prostaglandinas (PGD₂) (GARTNER; HIATT, 2003).

Dentre os mediadores pré-formados, destacam-se a histamina, as proteases neutras (triptase e quimase) e os proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina E). A histamina, produzida pela ação da enzima histidina-descarboxilase, tem um papel decisivo na hiperemia associada aos estágios iniciais da inflamação e atua através de três tipos de receptores específicos: H1, H2 e H3 (FALAUS; MERETÉY, 1992).

Nos receptores H1 e H3, a histamina exerce efeito do tipo inflamatório, atuando como uma potente amina vasoativa, aumentando a permeabilidade vascular e a secreção de muco, resultando em edema inflamatório, e contribuindo para o recrutamento de células circulantes. Enquanto no receptor H2 os efeitos são do tipo anti-inflamatório, funcionando como um sistema de retroregulação (FALAUS; MERETÉY, 1992).

Também são liberadas várias outras citocinas cujos precursores não se originam do ácido araquidônico, tais como fator ativador de plaquetas (PAF) e bradicininas. A PGD2 regula negativamente a degranulação do mastócito, enquanto o PAF tem ação broncoconstritora direta. Os leucotrienos têm efeitos semelhantes à histamina, porém mais potentes, tardios e prolongados (CHURCH; LEVI-SHAFFER, 1997). Todos estes mediadores são formados no momento de sua liberação (GARTNER; HIATT, 2003).

Os mastócitos também sintetizam e liberam um painel de citocinas multifuncionais como a IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, TNF α (Fator de Necrose Tumoral alfa), GM-CSF (Fator Estimulador de Colônia do Macrófago e Granulócito) e também alguns dos mais poderosos fatores de crescimento como o bFGF (Fator de Crescimento Básico do Fibroblasto), o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e o TGF β (Fator de Crescimento Transformante beta), além de quimiocinas como MIP-1 α (Proteína Inflamatória do Macrófago 1 alfa), MCP-1 (Proteína Quimiotática do Monócito 1) e RANTES (Regulador da Ativação Normal de Célula T Expressa e Secretada) (GORDON *et al.*, 1990; CHURCH *et al.*, 1991; AOKI *et al.*, 2003).

As proteases neutras são enzimas proteolíticas. A quimase estimula a secreção mucosa nos brônquios, enquanto a triptase é liberada, juntamente com a histamina, durante a degranulação e ativa o fibrinogênio, a colagenase e o C3 por via alternativa (SALMÚN *et al.*, 1994). O proteoglicano dominante nos mastócitos é a heparina. Uma vez liberada, ela pode afetar a estabilidade ou a função de outros mediadores mastocitários. Atua como anticoagulante e anticomplemento, melhora a ligação do colágeno com a fibronectina, auxiliando o remodelamento tecidual e ativando numerosos fatores de crescimento (KRISHNASWAMY *et al.*, 2001).

Enquanto essa fase inicial da inflamação é principalmente governada por transmissores não-celulares, durante o próximo estágio, neutrófilos e monócitos atraídos pelos leucotrienos mastocitários, como fator quimiotático para neutrófilos, aparecem na área da inflamação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Estas citocinas não apenas regulam a produção de IgE e outras respostas imunes, mas também afetam a inflamação, a homeostase, a hematopoiese, a angiogênese, a remodelagem tissular e o desenvolvimento ou resistência a tumores (GALLI *et al.*, 1991; DETHLEFSEN *et al.*, 1995; LICHTENBELD *et al.*, 1996).

A ativação dos mastócitos e a liberação dos seus mediadores químicos podem ocorrer por diversos meios, como reações de hipersensibilidade mediadas pela IgE, por agentes químicos derivados da ativação do Sistema Complemento (denominados de anafilatoxinas), de citocinas e de toxinas bacterianas; dentre outros estímulos (SIRAGANIAN, 2003). Entre esses estímulos estão os efeitos produzidos pela irradiação da luz de baixa intensidade nas células dos tecidos, que provocam reações moleculares culminando com a liberação de Ca^{2+} , a partir de reservatórios intracelulares, ativando a proteína quinase C e promovendo a liberação dos fatores pré-formados dos mastócitos.

3.3. LED`s

LED é a sigla em inglês para *Light Emitting Diode*, ou Diodo Emissor de Luz. O diodo é a união de semicondutores do tipo p e do tipo n, formando a junção p-n. Quando aplicada uma diferença de potencial elétrico, positiva no lado p e negativa no lado n, o diodo passa ao estado polarizado. O lado p contém excesso de orifícios, enquanto o lado n contém excesso de elétrons. Ocorre a recombinação de elétrons e lacunas na região da junção, cujo resultado é a emissão espontânea de energia sob a forma de fótons (SEEGER, 1997).

Segundo Smith (2005), o importante é o comprimento de onda da luz, não a coerência ou a ausência da mesma. Inicialmente, se atribuíam os efeitos do laser à coerência, mas foi demonstrado que fontes não coerentes como os LEDs também alcançavam resultados semelhantes (KARU, 1999).

Apesar de o LED emitir luz em uma banda espectral maior do que o laser, Karu (1989) afirma que não é necessária alta monocromaticidade da luz, e sim que ela apresente uma largura de banda (de comprimento de onda) dentro da faixa de absorção da molécula fotorreceptora (WEISS *et al.*, 2005). Em relação à coerência da luz devem-se distinguir dois aspectos

essenciais: seu efeito físico e a interação da luz com as moléculas, células ou tecidos (KARU *et al.*, 2010).

Entre as peculiaridades do LED constam a longa durabilidade, baixo custo, confiabilidade, não geração de calor, dimensões reduzidas, temperatura de cor, alta eficiência energética, isto é, praticamente toda a energia incrementada no LED é transformada em luz e apenas uma pequena fração é perdida na forma de calor, tendo ainda a vantagem de ser bastante sustentável, ou seja, de causar um impacto ambiental reduzido (DOURADO *et al.*, 2012).

Quanto menor o comprimento de onda, maior é a energia. A luz azul tem um comprimento de onda de aproximadamente 380 nm a 500 nm, tornando-o um dos comprimentos de onda mais curtos e com maior energia. A luz gerada do LED não coerente com $\lambda 415 \pm 15$ nm é tecnicamente violeta, mas geralmente é chamada de luz azul e faz parte do espectro de luz visível (MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015), que embora produza maior quantidade de espécies reativas de oxigênio que o LED infravermelho, se tornando citotóxico quando em grandes quantidades, ambos estão dentro do espectro de luz que produz efeito fotobiomodulador (400 a 900 nm), pois emitem energia para os tecidos biológicos, que ao absorverem essa energia, alteram o estado redox das células, aumentando o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, o metabolismo e a produção de energia (ATP) (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005).

3.4. Fotobiomodulação

A especificidade de cada célula e o estado fisiológico apresentam um determinado limiar de sobrevivência, que pode ser modulado de acordo com a energia oferecida. O efeito molecular da absorção de baixa intensidade de energia em estruturas bioquímicas das células resulta na busca da manutenção ou normalização das suas funções, chamado de biomodulação (CHAVANTES *et al.*, 2009).

Ao irradiar um organismo vivo, é introduzida energia em um sistema biológico, que utiliza e transforma essa energia para seu próprio consumo. É importante salientar que a dose, o comprimento de onda, a potência e a superfície irradiada são de extrema importância. A eficácia da irradiação está intimamente relacionada com a fluência adequada, aplicada de modo regular e gradual, de maneira que fluências baixas ou altas podem não produzir efeitos ou gerar prejuízos, respectivamente. A fluência define muitas vezes a fronteira da obtenção de um processo estimulatório ou inibitório (BAGNATO; MARIYAMA, 2007).

Citocromos mitocondriais foram postulados como fotorreceptores para o vermelho e para o infravermelho à energia da luz, que reativa espécies de oxigênio e têm sido usados como potenciais mediadores dos efeitos biológicos desta luz. O mecanismo de fotobiomodulação, pelo comprimento de onda no vermelho à luz infravermelha no nível celular, tem sido atribuído à ativação dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, resultando na iniciação de uma cascata de sinalização que promove a proliferação celular e citoproteção (KARU, 1999).

Uma comparação do espectro de ação para a proliferação celular após fotoirradiação, com o espectro de absorção de potenciais fotorreceptores levou Karu (2008) a sugerir que o citocromo C oxidase é um fotorreceptor primário de luz.

O citocromo-C-oxidase, integrante da cadeia respiratória na mitocôndria, interage com a luz nos tecidos biológicos, que ao absorver energia nos comprimentos de onda do violeta ao infravermelho próximo (400 a 900 nm) altera o estado redox das células, aumentando o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, o metabolismo e produção de energia (ATP), aumentando o metabolismo oxidativo mitocondrial e a liberação de mediadores químicos como o óxido nítrico, potente vasodilatador, e espécies reativas de oxigênio (EROs) (KARU; PYATIBRAT; AFANASYEVA, 2005).

Esses processos iniciam uma cascata de reações celulares que modulam o comportamento biológico, a angiogênese, os macrófagos e os linfócitos; a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, bem como a diferenciação de células mesenquimais (DE SOUZA *et al.*, 2013).

Segundo Karu *et al.* 1991, a estimulação da síntese de DNA pode ser observada em uma faixa de comprimento de onda de 320 a 450, 600 a 650, 660 a 720, 740 a 840 nm, com máximos próximos a 400, 630, 680 e 760 nm. O espectro de ação da síntese de RNA está muito próximo do espectro de ação correspondente a luz na síntese de DNA. Os máximos na estimulação da síntese de RNA correspondem aproximadamente aos comprimentos de onda de 400, 615, 680, 780 e 820 nm.

Respostas fotobiológicas resultam de alterações fotoquímicas e/ou foto físicas produzidos pela absorção da radiação eletromagnética não ionizante. Em uma região visível, quando um fóton é absorvido por uma molécula, os elétrons são elevados a um estado de energia mais elevada e esta molécula excitada perde a sua energia extra. Isto pode ocorrer por reemissão de um fóton de comprimento de onda mais longo (menor energia) como em fluorescência ou fosforescência, ou a molécula pode perder energia por liberação de calor, ou ela pode perder energia provocando alteração fotoquímica em citocromos mitocondriais. A absorção de radiação na região do infravermelho resulta em rotações moleculares (rotação de toda a

molécula sobre alguns eixos) e vibrações moleculares (o estiramento ou dobramento de ligações) resultando no deslocamento de núcleos atômicos (SMITH, 1991).

A foto ativação de enzimas da mitocôndria por luz visível inicia uma cascata de eventos moleculares que levam a uma fotorresposta. A radiação de infravermelhos produz a mesma resposta final, mas inicia a resposta ao nível da membrana (provavelmente através de efeitos fotofísicos sobre canais de Ca^{2+}) por meio da cascata total de acontecimentos moleculares que levam à bioestimulação (SMITH, 1991). Porém as células dos tecidos absorvem dez vezes mais fótons com a luz azul/violeta do que com a luz vermelho/infravermelho. Tanto a absorção quanto a difusão e os níveis de espécies reativas de oxigênio são maiores na região do azul, e o principal cromóforo dos tecidos é a hemoglobina, que tem bandas de alta absorção de comprimentos de onda menores que 600 nm. A absorção do citocromo C oxidase (CCO) pela luz azul é vinte vezes maior que a luz infravermelha. Com isso se observa que essa absorção é muito pequena no espectro do vermelho ao infravermelho para ser a causa principal da regulação positiva de ATP, assumindo-se como causa principal um simplesmente processo físico, envolvendo uma redução na viscosidade da água intracelular nas mitocôndrias irradiadas e um aumento na expansão dessa água, do líquido do citosol celular (SOMMER, 2019).

As reações que ocorrem durante a irradiação, ainda não foram totalmente esclarecidas, gerando uma série de hipóteses relativamente à geração de oxigênio singlete (KARU, 1989), alteração das propriedades do estado excitado redox dos centros CuA e CuB ou *heme a* e *heme a3* (KARU, 1988), presença de óxido nítrico (NO), aquecimento local transiente ou aumento da produção de ânions superóxidos (KARU; ANDREICHUK; RUABYKH, 1993).

Foi observado que o estado geral redox da célula e seu pH no momento da irradiação podem levar a diferentes respostas das células irradiadas, isto é, a resposta à excitação, depende das condições iniciais da célula (DIAS *et al.*, 2009). Essas terapias não somente agem diretamente nos fotorreceptores celulares, como também estimulam a liberação de metabólitos vasodilatadores teciduais ou mediadores vasculares humorais, como os liberados pelos mastócitos após lesão tecidual (EL SAYED; DYSON, 1990).

Relativamente à ativação do fluxo de elétrons na cadeia respiratória, pode-se esperar um aumento da produção de radicais hidroxila (OH) e de ânion superóxido como consequência da redução por um elétron. O principal uso do oxigênio na cadeia é a sua redução a água por quatro elétrons. Pequenos aumentos na concentração de O_2 e, subsequentemente, incremento da concentração do produto de sua dismutação (H_2O_2) em uma célula resultam em múltiplas respostas secundárias (KARU, 1989).

Os mastócitos, como células secretoras, irão reagir com o aumento dos níveis de ATP causadas por luz laser. O aumento da atividade de mastócitos pode ocorrer como um resultado do desequilíbrio do nível de Ca^{2+} , ativação de serina-esterase, a necessidade de energia adicional, e mudanças intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico, que conduz a degranulação celular. A extrusão de grânulos de mastócitos e a liberação dos seus conteúdos causam o aparecimento de algumas substâncias bioativas na matriz extracelular, o que pode provocar a reação inflamatória. Como estas células não proliferam localmente, o aumento pode ser atribuído à migração direta de células vizinhas ao local irradiado sendo este estimulado pela luz laser (MONTEIRO, 2011).

A fotobiomodulação gerada pela irradiação da terapia a laser de baixa intensidade (LBI) tem uma influência importante no aumento da taxa de proliferação celular, reduzindo o processo inflamatório e promovendo a angiogênese agindo positivamente em diferentes tipos de células, como fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos, células-tronco mesenquimais, células cardíacas, células musculares e células endoteliais (DE CASTRO, 2014).

Estes mecanismos apresentam dependência de vários parâmetros como a dose de irradiação, o comprimento de onda, o modo de operação da excitação luminosa (pulsado/contínuo) e a intensidade de excitação. Quanto maior for o comprimento de onda, maior é a profundidade de penetração no tecido. O intervalo do espectro eletromagnético, entre 600 nm (vermelho) e 1200 nm (infravermelho próximo), apresenta a maior capacidade de penetrar nos tecidos devida ao espalhamento e à absorção da água e do sangue (EDUARDO, 2010).

A dosimetria, para ser entregue a um tecido, será melhor estabelecida levando-se em consideração o seu estado fisiológico. Um tecido em processo inicial de inflamação, rico em células, deve receber uma dose maior, uma vez que a irradiação sofre mais espalhamento por causa dessas células, devendo diminuir conforme o processo inicial de inflamação regride e ocorre a entrada na fase reparadora, com menor presença de células. As condições do tecido quando ulcerado, pigmentados ou queratinizados possuem propriedades ópticas diferentes, tendo assim diferentes coeficientes de absorção, sendo necessário nesses casos uma avaliação das condições desse tecido para aumentar ou diminuir a dosimetria. Quando ulcerados ou expostos requerem menor energia para alcançar o alvo e produzir o efeito desejado da fotobiomodulação (EDUARDO, 2010).

4. Materiais e Métodos

4.1. População e grupos

O modelo animal utilizado foi o rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe Mammalia, ordem Roedentia, da linhagem *Wistar*, de fácil obtenção, manuseio e manutenção.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos na experimentação animal, bem como as normas para a prática didático científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 11.794 (08 de outubro, 2008), com o Decreto 6.899 (15 de julho, 2009), bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, sendo aprovado sob o CEUA nº 3681160119 (ANEXO A).

4.1.1. Cálculo Amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra foram considerados 2 grupos experimentais e 4 subgrupos em cada um deles, além de um grupo controle. A variável dependente do estudo é a contagem de mastócitos por campo, considerando uma diferença mínima de 25% entre os subgrupos experimentais na variável de efeito (SAWASAKI, 2009). Como variável independente considera-se o tipo de terapia aplicada. O número mínimo calculado em cada subgrupo foi o de 3 animais, totalizando 27 animais.

Utilizou-se um poder de 80%, nível de significância de 95 % e um erro de desenho de 1,5, por se tratar de uma análise estratificada. Reforça-se que para este cálculo amostral utilizou-se a fórmula proposta por Mlot (2011).

Foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) adultos jovens, machos, com idade aproximada de 03 meses, pesando aproximadamente 250 gramas cada um. Foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de estudo, com a seguinte organização:

Quadro 01. Grupo I - Controle

Subgrupo	Descrição	Qtde
C – 1	Controle	03

Quadro 02. Grupo II – LED IV (FisioLED, MMOptics®, $\lambda 850 \pm 10\text{nm}$, modo contínuo) com dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$

Subgrupo	Descrição	Qtde
LI – 1	LED $\lambda 850 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ remoção do tecido imediata	03
LI – 2	LED $\lambda 850 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 20 minutos	03
LI – 3	LED $\lambda 850 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 45 minutos	03
LI – 4	LED $\lambda 850 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 2horas	03

Quadro 03. Grupo III - LED violeta (BMW®, MMOptics, $\lambda 405 \pm 10$ nm, modo contínuo) com dose de $20\text{J}/\text{cm}^2$

Subgrupo	Descrição	Qtde
LV – 1	LED $\lambda 405 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ remoção do tecido imediata	03
LV – 2	LED $\lambda 405 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 20 minutos	03
LV – 3	LED $\lambda 405 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 45 minutos	03
LV – 4	LED $\lambda 405 \pm 10$ nm; $20\text{J}/\text{cm}^2$ em 2horas	03

4.1.2. Dos critérios de inclusão/exclusão

Os animais incluídos, no experimento, apresentaram as seguintes características:

- Foram todos da raça proposta;
- Não apresentaram debilitação do estado geral de saúde, o que poderia levar a problemas e desconforto ao animal durante o período dos testes – tanto no período de aplicação, como no momento do sacrifício.

4.2. Procedimento experimental

Os procedimentos cirúrgicos e a manutenção dos animais ocorreram no Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Biofotônica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, assim como a morte dos mesmos. Os animais permaneceram em gaiolas individuais, forradas com serragem, a qual foi substituída a cada 48 h. A dieta foi livre e padronizada (Nuvilab®), e beberam água filtrada *ad libidum*. Os animais foram mantidos em condições normais de temperatura, umidade e luminosidade.

4.2.1. Procedimentos de irradiação e cirúrgicos

Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de Quetamina 40 mg/kg (Cetamin[®], 10%) e cloridrato de Xilazina 5 mg/kg (Xylazin[®], 2%). Em seguida, os protocolos de irradiação foram executados com aplicações dos LEDs realizadas no dorso da língua dos animais (Fig. 1 A e B), com a mucosa intacta (sem lesões), utilizando-se uma pinça clínica para expor a língua do animal e colocá-la em contato com o sistema de entrega da luz. A dose da densidade energética de 20J/cm² e os comprimentos de onda de λ 850 \pm 10 nm ou λ 405 \pm 10 nm foram aplicados dependendo do grupo experimental a que pertenciam.

A aplicação da luz foi feita uma única vez no tecido e esperado os tempos de cada grupo para a produção do efeito. Após decorridos os tempos das irradiações, os animais foram mortos de acordo com o tempo do grupo ao qual pertenciam, com uma overdose intraperitoneal de anestésicos. Os animais do grupo de remoção do fragmento da língua, após 2 horas de aplicação da luz, precisaram ser anestesiados novamente, antes da dose aplicada para provocar a overdose anestésica. Depois de verificada e confirmada a morte dos mesmos, o fragmento da língua do animal foi removido utilizando-se uma pinça para puxá-la para fora da cavidade oral e feito o corte com tesoura cirúrgica reta na base da língua.

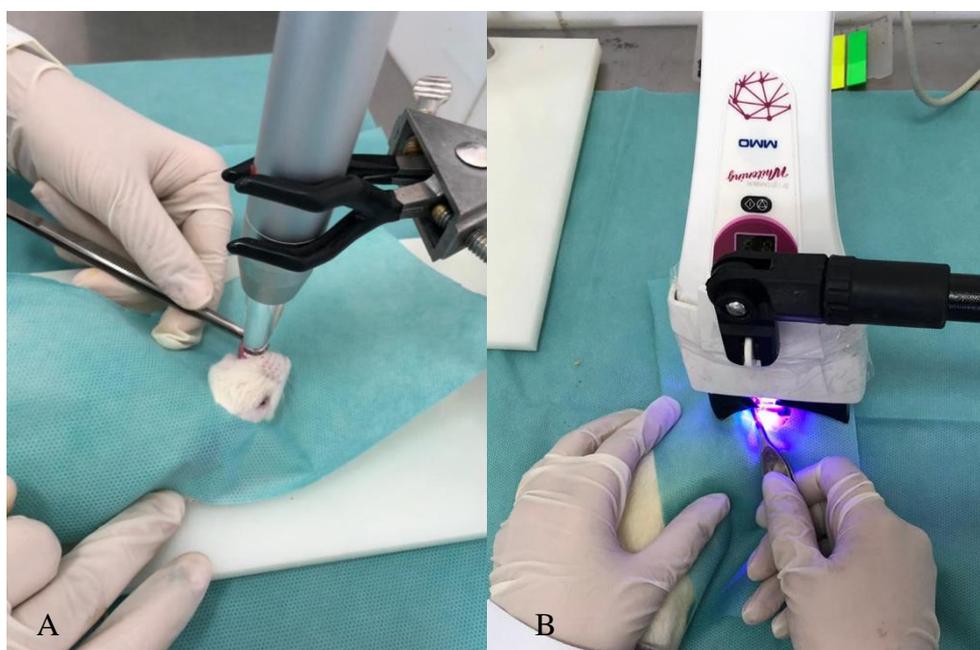


Figura 01 –Protocolos de irradiação. (A) LED infravermelho (λ 850 \pm 10 nm). (B) LED Violeta (λ 405 \pm 10 nm)

4.3. Equipamentos

LED Infravermelho

O aparelho utilizado foi o Fisioted (Arseneto de Gálio e Alumínio – GaAsAl, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) com os parâmetros: λ 850 \pm 10 nm, 150 mW, emissão contínua, Φ = 0,5 cm², 20 J/cm² por sessão, t = 128 s).

LED Violeta

O aparelho utilizado foi o Bright Maxx Whitening (Arseneto de Gálio e Alumínio – GaAsAl, MMOptics, São Carlos, SP, Brasil) com os parâmetros: λ 405 \pm 10 nm, 65 mW, emissão contínua, Φ =1 cm², 20 J/cm² por sessão, t = 5min 11s. Para a utilização deste equipamento foi preciso realizar uma adaptação, uma vez que ele é composto por quatro LEDs espalhados por uma superfície, indicada para aplicações intraorais. Dessa forma, três LEDs foram obliterados com fita tipo isolante preta, em seguida, foi calculada a área do LED que seria utilizada e sua potência foi medida com auxílio do medidor de potência (PowerMeter, ThorLabs, Newton, Nova Jersey, EUA). Assim foi possível calcular o tempo necessário para entregar a dose de 20J/cm².

Tabela 1 - Parâmetros da fonte de luz do protótipo LED IV e Violeta

Parâmetros	LED IV	LED Violeta
Comprimento de onda (nm)	λ 850 \pm 10 nm	λ 405 \pm 10 nm
Modo	Contínua	Contínua
Potência (mW)	150 mW	65 mW
Tempo de irradiação	128 s	5min 11s
Área de entrega	0,5 cm ²	1 cm ²

5. Análise Histológica

Após a remoção, os tecidos foram imersos isoladamente em solução de formol 10% tamponado, em frascos coletores individuais e devidamente identificados, durante o período de 24 horas, para a fixação dos tecidos. No Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia foi realizada a análise macroscópica de cada peça e colocadas em recipientes apropriados com as suas identificações. Um técnico do laboratório foi

responsável pela confecção das lâminas histológicas, onde os espécimes foram lavados em água corrente e desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e dois banhos em álcool absoluto à temperatura ambiente, seguido de diafanização em xilol e inclusão em parafina.

5.1. Coloração Azul de Toluidina

Todas as lâminas foram coradas com Azul de Toluidina. Os mastócitos intactos e degranulados foram submetidos à contagem com um microscópio de luz (Axiolab®, Zeiss, Thornwood, NY), com aumento de 400x, em dez áreas adjacentes à camada basal do epitélio oral (tecido superficial) e em dez áreas da musculatura profunda (tecido profundo) da língua. Em uma coloração feita com Hematoxilina-Eosina (HE) pode ser vista essa divisão das camadas superficial e profunda do tecido, onde foram feitas as contagens (Fig. 02). Depois foram somados para se obter o número total de mastócitos e a quantidade dos mastócitos degranulados para cada espécime e divididos por 10, para se obter a média aritmética.

Os mastócitos mostraram-se metacromáticos, quando corados com Azul de Toluidina, e exibiram morfologia variada (oval, alongado ou redondo) (Fig. 03). Para avaliação da degranulação, foi considerado qualquer “cluster” de grânulo de mastócito claramente distinto da membrana celular adjacente (HUANG *et al.*, 2013) (Fig. 04).

O índice de degranulação foi calculado utilizando o número de mastócitos degranulados multiplicado por 100, dividido pelo o número total de mastócitos (intactos mais degranulados). Os resultados dos índices de degranulação podem ser visualizados nos Gráficos 1 e 2. Os cortes histológicos foram examinados por um patologista experiente de modo cego.

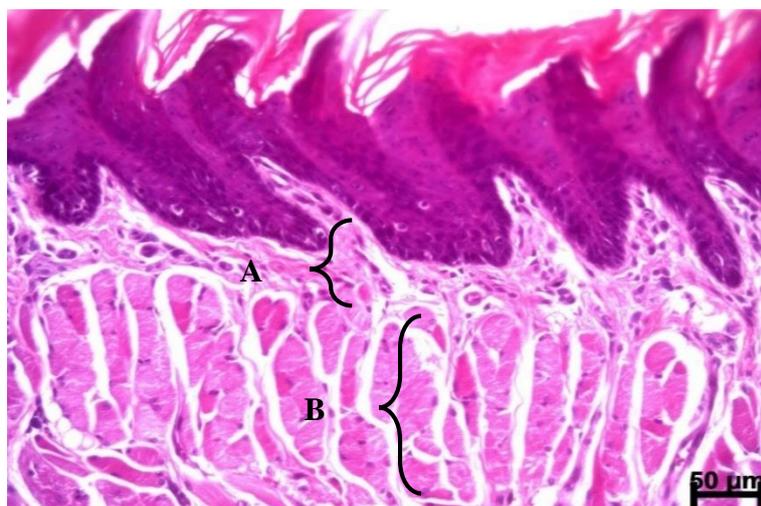


Figura 02 – Coloração com HE da língua do rato. A – Tecido superficial. B – Tecido profundo.

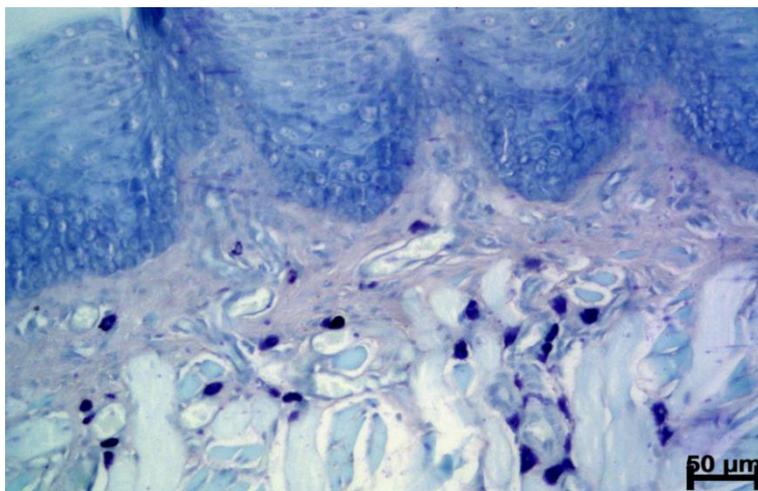


Figura 03 – Fotomicrografia com aumento de 400x, mostrando coloração do tecido com azul de toluidina, evidenciando os mastócitos corados em roxo.

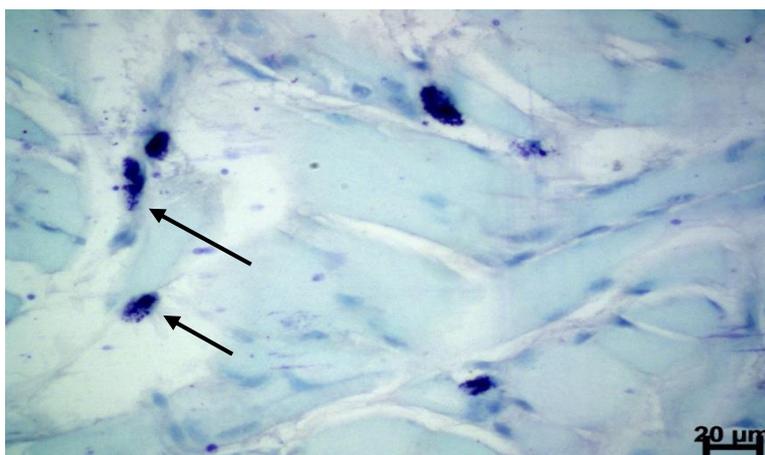


Figura 04 – Fotomicrografia de mastócitos degranulados, identificados com a seta.

6. Análise Estatística

Após a tabulação dos resultados, os valores obtidos foram submetidos à análise estatística através do teste t de *Student*, utilizado para avaliar se houve diferença significativa entre as médias das amostras, sendo considerados significativos os resultados quando $p < 0,05$. Também foi aplicado o teste One-way ANOVA para a análise de variância e o teste de Tukey para comparação das médias.

7. Resultados

Foram separados três grupos gerais para análise: grupo controle, com animais que não sofreram irradiação; grupo de animais irradiados com LED violeta e grupo de animais irradiados com LED infravermelho. Cada grupo geral foi dividido em dois subgrupos, onde foram realizadas as contagens da quantidade do total de mastócitos (íntegros e degranulados) e dos mastócitos degranulados, em tecido superficial e em tecido profundo da língua do animal.

Os valores obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística através do teste t de *Student*, utilizado para avaliar se houve diferença significativa entre as médias das amostras. Após a verificação da diferença significativa, o teste One-way ANOVA foi aplicado para a análise de variância e o teste de Tukey para comparação das médias.

7.1. LED Violeta x Controle – Remoção Imediata

Os resultados obtidos demonstraram que o grupo do LED violeta no tecido superficial, removido imediatamente após a irradiação, mostrou um aumento no número total de mastócitos e de mastócitos degranulados ($p=0,002$) quando comparado ao grupo controle. No tecido profundo também foi encontrada diferença significativa entre os grupos controle e LED violeta ($p=0,05$), com aumento de células no grupo irradiado, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Comparação do grupo LED Violeta com o grupo Controle, na remoção imediata

	Controle (Superficial)	LED Violeta (Superficial)	Controle (Profundo)	LED Violeta (Profundo)
	<i>Média (DP*)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>
Total	11,90 ($\pm 3,84$)	17,20 ($\pm 3,55$)	23,00 ($\pm 5,45$)	27,57 ($\pm 4,83$)
Degranulados	4,10 ($\pm 1,72$)	10,20 ($\pm 4,61$)	11,50 ($\pm 4,26$)	19,37 ($\pm 5,38$)

* DP- Desvio Padrão

7.2. LED IV x Controle – Remoção Imediata

Na contagem de células do grupo da remoção imediata, no tecido superficial irradiado com LED IV, foi observada uma quantidade maior no total de mastócitos e degranulados, quando comparados ao grupo controle ($p<0,0001$). Entre os grupos controle e LED IV no tecido profundo, não houve diferença significativa no número total de mastócitos ($p=0,9$) e o número de células degranuladas foi menor no grupo irradiado. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação do grupo LED IV com o grupo Controle, na remoção imediata

	Controle (Superficial)	LED IV (Superficial)	Controle (Profundo)	LED IV (Profundo)
	<i>Média (DP*)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>
Total	11,90 (\pm 3,84)	23,00 (\pm 5,45)	23,00 (\pm 5,45)	20,23 (\pm 3,82)
Degranulados	4,10 (\pm 1,72)	11,50 (\pm 4,26)	11,50 (\pm 4,26)	2,93 (\pm 0,99)

* DP- Desvio Padrão

O tecido superficial do grupo LED IV com remoção imediata apresentou valores maiores tanto no número total de mastócitos, quanto na quantidade de células degranuladas, quando comparado com os grupos LED violeta e grupo controle ($p < 0,0001$) (Tabela 3).

7.3. LED Violeta x LED IV – Tempos experimentais

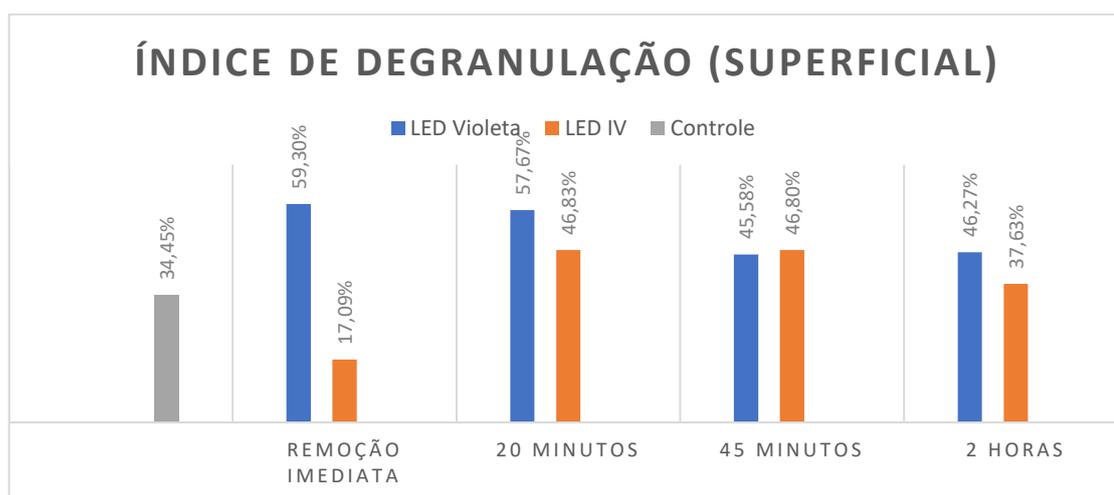
No tecido superficial, o grupo LED violeta apresentou maior quantidade de mastócitos degranulados em 20 minutos após a irradiação no tecido ($p=0,04$) (Gráfico 01). Comparando os mastócitos degranulados, entre os tempos de remoção 20 e 45 minutos após a irradiação, identificou-se um maior número de mastócitos degranulados em 20 minutos no tecido profundo, tanto com o LED Violeta ($p=0,03$) quanto com o LED IV ($p=0,01$) (Gráfico 02).

Entre o grupo de 45 minutos e o grupo de 2 horas, não foram observadas diferenças significativas no efeito da luz sobre as células, com uma única exceção, no tecido superficial irradiado com luz infravermelha, no período de 2 horas, onde se observou a redução do número total de mastócitos ($p=0,05$) e de mastócitos degranulados ($p=0,03$) (Tabela 4).

O número total de mastócitos foi maior no tecido superficial, do LED Violeta, na remoção imediata do que em 20 minutos ($p=0,016$). No grupo LED IV, houve redução significativa de mastócitos totais (íntegros e degranulados) no grupo de 45 minutos, quando comparados com o de 20 minutos, tanto no tecido superficial ($p=0,03$) quanto no profundo ($p=0,02$). Os resultados descritos podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparação entre os tempos experimentais dos grupos LED Violeta e LED IV * DP- Desvio Padrão

	LED Violeta (Superficial)	LED IV (Superficial)	LED Violeta (Profundo)	LED IV (Profundo)
	<i>Média (DP*)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>	<i>Média (DP)</i>
	Total/Degranulado	Total/Degranulado	Total/Degranulado	Total/Degranulado
Imediato	17,20(±3,55) / 10,20(±4,61)	23,00(±5,45) / 11,50(±4,26)	27,57(±4,83) / 19,37(±5,38)	20,23(±3,82) / 2,93(±0,99)
20 min	12,60(±2,40) / 7,27(±2,24)	18,93(±5,09) / 8,87(±3,57)	16,77(±3,55) / 13,60(±2,91)	21,77(±3,39) / 11,13(±2,55)
45 min	12,13(±2,32) / 5,17(±2,10)	14,10(±2,85) / 6,60(±1,71)	17,57(±3,90) / 10,07(±3,73)	19,87(±2,62) / 7,93(±2,49)
2 horas	12,67(±2,69) / 6,00(±1,21)	12,13(±3,32) / 4,57(±1,99)	18,97(±5,23) / 10,73(±4,08)	18,63(±5,00) / 7,40(±3,29)

**Gráfico 01** – Índice de degranulação dos mastócitos na camada superficial do tecido de cada grupo de tempo.

No tecido profundo do grupo irradiado com LED Violeta, no tempo de 20 minutos, houve redução significativa no número total de mastócitos ($p < 0,0001$), em relação ao grupo de efeito imediato após a irradiação, porém o índice de degranulação foi maior em 20 minutos ($p = 0,01$) (Gráfico 02). Já no tecido profundo do grupo irradiado com LED IV, em 20 minutos foi observado um aumento significativo na quantidade de mastócitos degranulados ($p < 0,0001$), comparado com grupo de efeito imediato (Gráfico 02). Em todos os tempos observados, a maior quantidade total de mastócitos esteve no grupo do efeito imediato após a irradiação, com exceção do grupo do LED IV no tecido profundo, que apresentou a maior quantidade em 20 minutos. Os índices de degranulação foram maiores nos grupos irradiados com a luz violeta,

exceto no grupo de 45 minutos do tecido superficial irradiado com luz infravermelha, com uma pequena diferença sem significância estatística (Gráfico 01).

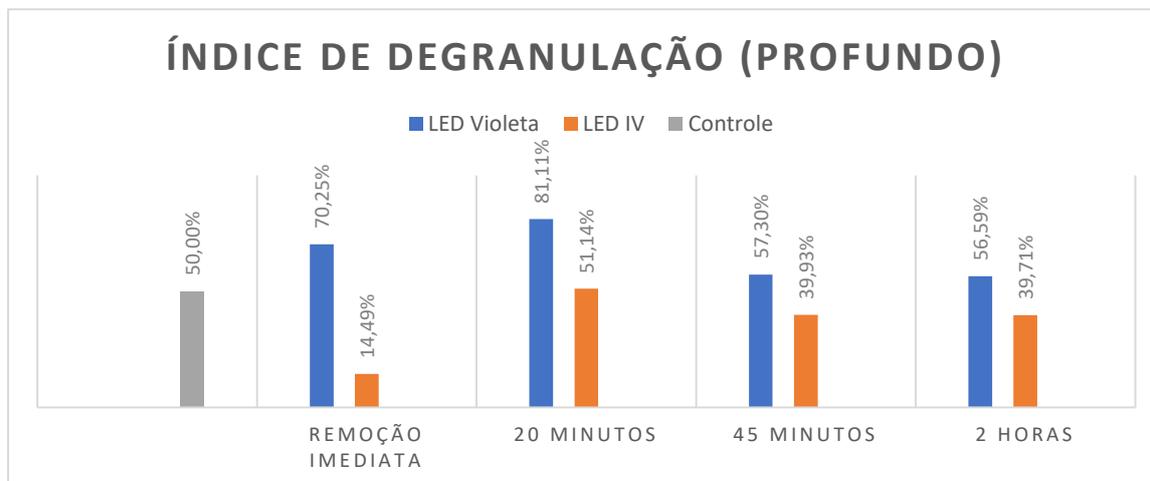


Gráfico 02 - Índice de degranulação dos mastócitos na camada profunda do tecido de cada grupo de tempo.

8. Discussão

Neste estudo se utilizou tecido da mucosa oral de ratos *Wistar*, especificamente do dorso da língua, obtidos imediatamente após a irradiação, e após os tempos de 20 minutos, 45 minutos e duas horas, visando a avaliação do efeito de dois comprimentos de onda diferentes λ 850 nm (LED infravermelho) e λ 405 nm (LED violeta) emitidos por dispositivos LED em mastócitos. O presente protocolo foi adaptado do estudo realizado por Monteiro e colaboradores (2011), que utilizaram o LED vermelho (630 nm) e infravermelho (850 nm) em mastócitos na língua de ratos *Wistar*, quando observaram que os animais irradiados apresentaram, em 60 minutos, um maior número de células degranuladas, principalmente com o uso da luz infravermelha.

Os mastócitos são células presentes no processo inflamatório e o seu estímulo provocado por luz emitida no espectro infravermelho ou violeta pode intensificar sua proliferação e/ou degranulação, com conseqüente liberação de potentes mediadores químicos da inflamação e atuando como importante modulador deste processo. A ativação dos mastócitos e a liberação de mediadores químicos, como a histamina, dilata e aumenta a permeabilidade dos vasos cerca de 180 segundos após a degranulação (WALSH *et al.*, 1995).

A maioria dos trabalhos, que avaliaram os mastócitos e sua degranulação utilizaram a luz laser para estimular as células nos tecidos e produzir efeitos, principalmente com comprimentos de onda vermelho e infravermelho (LONEY, 2001; UHL, 2006). Wu e colaboradores (2010) e Yang e colaboradores (2007) verificaram que o laser azul/violeta (λ 405

- λ 490 nm) liberaram mais histamina dos mastócitos do que os lasers vermelho (λ 633 nm) e verde (λ 532 nm). O aumento do número de mastócitos, após irradiação, também foi relatado por Tsyganova (1974) em pele intacta de rato, irradiada com um laser de neodímio (λ 1.060 nm). Trelles e colaboradores (1989), observaram que na língua de rato intacta exposta ao laser He-Ne contínuo (λ 632,8 nm; densidade de energia = 2,4 J/cm²), diminuiu o número total de mastócitos (íntegros e degranulados). Na pele lesionada houve um significativo aumento no número total de mastócitos, o que é esperado devido ao processo inflamatório iniciado (YOUNG *et al.*, 1989). Como sugerido por Dyson e Luke (1986), os comprimentos de onda no vermelho e infravermelho induziram degranulação de mastócitos em lesões, mas não em pele intacta. Possivelmente indicando um aumento na sensibilidade (facilidade de degranular) dos mastócitos após a lesão. Neste estudo, com o intuito de observar apenas o efeito da luz sobre os mastócitos, sem interferência fisiológica por conta da ativação com lesões, a mucosa onde foi aplicada a irradiação LED, violeta e infravermelho, estava sadia, um tecido não doente.

A luz violeta apresenta comprimento de onda em torno de 410 ± 15 nm, fazendo parte do espectro de luz visível, mais precisamente na região azul. O componente azul da luz entre λ 380 e λ 500 nm também é conhecido como luz visível de alta energia. Em particular, os comprimentos de onda azul/violeta entre λ 380 e λ 440 nm, faixa onde se encontra um dos comprimentos de onda utilizados neste estudo, podem ser vistos como potencialmente prejudiciais e têm sido implicados como uma das possíveis causas de fotorretinite, ou seja, dano à retina causado por luz incidente de alta energia (MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015).

Yoshida e colaboradores (2013) sugeriram que a irradiação com luz azul (λ 460 nm), por mais de cinco minutos no clareamento dental, pode aumentar o efeito citotóxico de espécies reativas de oxigênio (EROs), sobre os tecidos moles da boca. Esses resultados sugerem que a irradiação da luz azul/violeta, especialmente por fontes de luz LED usadas no tratamento estético dental, podem ter efeitos adversos no tecido gengival humano. No presente modelo de estudo foram realizados protocolos diferentes para o LED infravermelho (λ 850 nm) e o LED violeta (λ 405 nm) com a mesma densidade de energia (20 J/cm²). Baseado no tempo de irradiação do protocolo de clareamento dentário descrito anteriormente, a irradiação, utilizada em modo contínuo, com o LED violeta totalizou cinco minutos e onze segundos. Com o LED infravermelho o tempo foi de dois minutos e oito segundos.

Nos procedimentos de fotoativação de resinas compostas, o tempo médio de irradiação com a luz azul é inferior a um minuto. No entanto, na realização do fotocclareamento, a luz violeta é utilizada por 10 a 15 minutos. Sabe-se que a luz violeta é capaz de gerar o radical hidroxila (OH), que é uma das espécies reativas de oxigênio, além de outros radicais

(KAWAMOTO; TSUJIMOTO, 2004). Uma rápida proliferação local dos mastócitos, após a irradiação neste estudo, foi vista nos tempos de observação escolhidos principalmente no tempo imediato, e diminuição com o passar do tempo, podendo estar associada a ausência de continuação do estímulo para continuidade da produção do efeito. Num protocolo de clareamento com LED violeta, onde são feitas muitas aplicações intervaladas numa mesma sessão, o tempo do estímulo no local é maior, o que conseqüentemente gera um aumento de mastócitos presentes e o aumento da sua degranulação, podendo ser prejudicial ao tecido oral, por liberarem fatores químicos que induzem a degradação do mesmo.

O cromóforo primário para os comprimentos de onda vermelho (λ 600 – λ 700 nm) e infravermelho próximo (λ 780 – λ 1100 nm) é o citocromo C oxidase que é a unidade IV (quatro) da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, existem evidências de que comprimentos de onda visíveis mais curtos, como luz azul/violeta (λ 415 nm) e verde (λ 540 nm), podem ter diferentes efeitos de fotobiomodulação (WANG, *et al.*, 2016). Dentre essas diferenças estão a profundidade de penetração no tecido, que é maior quanto maior for o comprimento de onda, porém a quantidade de energia é maior quanto menor este for. Uma diferença observada neste estudo foi o número total de mastócitos (íntegros e degranulados), nos tempos imediato e 20 minutos, maior no grupo do LED IV do que no grupo do LED violeta, porém o índice de degranulação foi maior no grupo do LED violeta, provavelmente por carregar uma maior quantidade de energia, que produziu uma ativação mais rápida e em maiores quantidades dos efeitos intracelulares.

Yoshida e colaboradores (2013) relataram que a irradiação, da luz azul por lâmpada de halogênio de quartzo tungstênio ou LED (λ 460 nm), diminuiu a atividade de proliferação celular de fibroblastos gengivais humanos (FGHs) de maneira dependente do tempo (<5 minutos). Além disso, em estudo morfológico, o efeito citotóxico foi observado nas organelas celulares, especialmente nas mitocôndrias dos FGHs com geração de EROs, devido a um desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante intracelular no núcleo e/ou mitocôndrias. Essas alterações podem ocorrer também na sinalização de TGF-beta, na diferenciação de miofibroblastos, nas citocinas, nos fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, indicando o envolvimento dos mediadores químicos liberados pelos mastócitos (MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015).

Os fibroblastos estão entre as principais células gengivais. Foi proposto que a recessão gengival pode ocorrer pela inibição da proliferação de fibroblastos e pela degradação da síntese de colágeno devido às espécies reativas de oxigênio. As EROs também podem induzir hipersensibilidade no colo do dente, expondo as superfícies radiculares associadas à recessão

gingival (LEFEUVRE *et al.*, 2005). Mamalis, Garcha e Jagdeo (2015) demonstram que o tratamento de fibroblastos primários de pele humana adulta, usando LED violeta (λ 415 nm), inibiu de forma significativa a sua proliferação, sendo esse efeito dose dependente.

Não se encontra na literatura, relatos que expliquem de forma clara, os efeitos da luz violeta sobre os processos celulares. A maioria dos estudos, no entanto, concorda que o efeito geral da FBM de luz azul/violeta é aumentar o nível de ERO celular. É provável que esse aumento iniba a proliferação em muitos casos (MAMALIS; GARCHA; JAGDEO, 2015), e pode até induzir apoptose e aumentar a citotoxicidade externa se as doses forem elevadas (YOSHIDA *et al.*, 2013).

Wang e colaboradores (2017) analisaram o efeito desses quatro comprimentos de onda na proliferação de células tronco derivadas do tecido adiposo humano, com uma clara diferença entre violeta/verde, que inibia a proliferação, e vermelho/IV, que estimulava a proliferação, com densidade de energia 3 J/cm². Violeta/verde reduziram o ATP celular, produziram um aumento nas espécies de cálcio intracelular e de EROs, reduziram o potencial da membrana mitocondrial e diminuíram o pH intracelular; enquanto vermelho/IV aumentaram o ATP e tiveram o efeito oposto. Na análise entre os grupos infravermelho e violeta, deste estudo, pôde ser observada uma diferença na quantidade total de mastócitos (íntegros e degranulados), em mucosa intacta, com maiores resultados encontrados sob o efeito do LED IV, até 45 minutos, com exceção do tecido profundo, do grupo LED violeta, removido imediatamente.

Além do aumento no número total de mastócitos (íntegros e degranulados), neste estudo foi observada também uma maior degranulação após a irradiação dos tecidos, até o tempo de 45 minutos, comparados com o grupo controle, utilizando tecido intacto, da mucosa oral de ratos, densidade de energia de 20 J/cm² e comprimentos de onda de λ 850 e λ 405 nm. No estudo feito por Monteiro e colaboradores (2011) a degranulação dos mastócitos foi maior no grupo irradiado com LED IV (λ 850 nm) do que com o LED vermelho (λ 630 nm). Porém, neste estudo, o índice de degranulação foi maior no grupo LED violeta do que no grupo LED IV. A variação na resposta, com aumento da degranulação, pode ser devida ao comprimento de onda utilizado. A energia foi entregue de modo contínuo e não foram observadas diferenças significativas entre o tecido superficial do grupo controle e o tecido superficial dos grupos LED violeta e LED IV, após duas horas de irradiação. Já no tecido profundo houve uma redução, tanto no número total de mastócitos (íntegros e degranulados), quanto no número de mastócitos degranulados, após duas horas da irradiação com as duas luzes, quando comparados com o tecido profundo do grupo controle.

A superfície dorsal da língua é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, apoiado sobre uma lâmina própria bastante vascularizada, constituída de tecido conjuntivo denso. Logo abaixo da lâmina própria se observam feixes musculares estriados esqueléticos seccionados em todas as direções, entremeados com quantidade variável de tecido adiposo e tecido conjuntivo onde se observam grandes quantidades de mastócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). No estudo feito por Monteiro e colaboradores (2011) usando LED vermelho (λ 630 nm) e infravermelho (λ 850 nm), os mastócitos foram contados em dois campos consecutivos, adjacentes à camada basal do epitélio oral. Com o intuito de realizar uma avaliação minuciosa, neste estudo foram contadas dez áreas, sendo cada área dividida em duas porções, uma adjacente à camada basal abaixo do epitélio oral, na lâmina própria (tecido superficial) e outra profunda, logo abaixo desta, onde se encontrou a maior quantidade de mastócitos, tanto no grupo controle quanto nos grupos irradiados, permitindo um campo maior de avaliação do efeito da luz, principalmente sobre a degranulação.

A doença periodontal humana e a gengiva saudável foram investigadas por Batista, Rodini e Lara (2005), que observaram um maior número de mastócitos na gengiva inflamada. Eles relataram uma média de 58,3 mastócitos/mm² em amostras saudáveis e mais de 100 células/mm² na doença periodontal. Assim, se evidenciou a participação dos mastócitos nas respostas imunes e inflamatórias, através da liberação de agentes pró-inflamatórios como heparina, histamina e fator quimiotático eosinófilo da anafilaxia, (NOLI; MIOLO, 2001) que na gengiva inflamada têm o potencial de degradar a matriz extracelular. Além disso, essas células sintetizam e liberam certas prostaglandinas e leucotrienos que, em conjunto, contribuem para a resposta inflamatória imediata. Como consequência da ativação dos mastócitos, outras células inflamatórias são recrutadas e ativadas, e uma cascata de produção e liberação de mediadores inflamatórios é acionada (COLEMAN, 2002).

O número aumentado de mastócitos na doença periodontal humana em comparação com tecidos saudáveis, sem haver proliferação localmente, pode ser deduzida por algum processo de migração direcionada de mastócitos para essas lesões, através do aumento dos vasos, que são induzidos pela histamina, logo após a degranulação dos mastócitos (WALSH, *et al.*, 1995). Esse aumento imediato dos mastócitos totais (íntegros e degranulados) no local irradiado foi visto após a aplicação da luz LED violeta, nas camadas superficial e profunda do tecido, quando comparada ao grupo controle. E no grupo tratado com LED IV o aumento imediato ocorreu na camada superficial.

Huang e colaboradores (2013) e Golijanin e colaboradores (2015) encontraram um aumento da população de mastócitos degranulados na periodontite e observaram fraca

evidência de degranulação de mastócitos em tecidos gengivais saudáveis. Estes resultados divergiram dos encontrados por Ribeiro e colaboradores (2018), que não verificaram relação significativa entre os mastócitos degranulados e o diagnóstico periodontal, nem associação estatisticamente significativa entre a maturação do colágeno e a degranulação dos mastócitos ($p \geq 0,30$). Sugeriram que os produtos dos mastócitos podem não ser o principal fator de destruição gengival, mas são fatores contribuintes ou secundários envolvidos na evolução da doença periodontal. Fica evidenciada a contribuição dos mastócitos e dos mediadores liberados, para o desenvolvimento e resolução da periodontite, que não é unidirecional, mas é interativa. As mesmas células que produzem as citocinas pró-inflamatórias destrutivas também podem produzir mediadores que ativam o processo de cicatrização (PAGE, 1998). Heparina, histamina, citocinas do tipo Th2, TNF- α e NO possivelmente contribuem para a destruição do tecido e perda óssea na tentativa de eliminar produtos bacterianos, enquanto o bFGF pode influenciar o reparo do tecido (BATISTA; RODINI; LARA, 2005).

Ferreira e colaboradores (2016) observaram a degranulação de mastócitos em casos de Hiperplasia Fibrosa Inflamatória ($n = 9$), e em Hiperplasia Fibrosa foi rara ($n = 4$). A degranulação também esteve presente nos casos de Hemangioma Capilar Lobular ($n = 3$) e em Lesão de Células Gigantes Periféricas ($n = 3$), próxima ao tecido ósseo. Os mastócitos foram frequentemente observados em áreas de ulceração e inflamação, no entanto, também foram observados em áreas de fibrose, mesmo na ausência de inflamação.

A presença de mastócitos em áreas de fibrose pode ser atribuída ao fato de seus grânulos serem rico em proteases, incluindo triptase (GAILIT *et al.*, 2001; PERALLES *et al.*, 2006). Além disso, em um estudo em ratos, De Castro e colaboradores (2014) mostraram que os mastócitos podem acelerar a migração e proliferação de fibroblastos e em outro estudo demonstrou a estimulação da síntese de colágeno por mastócitos humanos (AKINMOLADUN *et al.*, 2013).

O presente estudo mostrou que a maior quantidade total de mastócitos (íntegros e degranulados) foi observada imediatamente após a irradiação com os dois tipos de luz (violeta e infravermelho) quando comparados ao grupo controle, pela provável migração destes, dos vasos periféricos para o local irradiado. Contudo, os valores do índice de degranulação foram maiores nos grupos irradiados com o LED Violeta. O estímulo com radiação eletromagnética nos mastócitos, não produziu diferenças significativas entre os grupos de 45 minutos e duas horas, nos tecidos superficial e profundo.

Em relação à localização, o tecido profundo mostrou altos valores nos índices de degranulação, tanto com luz infravermelha quanto com luz violeta, sendo a maior degranulação,

de todos os subgrupos, produzida no período de 20 minutos com a luz violeta. No grupo do LED IV a maior degranulação ocorreu em 20 minutos no tecido profundo. No tecido superficial, as maiores degranulações também foram com a luz violeta, nos tempos imediato e 20 minutos, enquanto com a luz infravermelha foram nos tempos 20 e 45 minutos. O grupo do LED IV apresentou uma maior quantidade de mastócitos íntegros do que o grupo LED violeta, com exceção do subgrupo de remoção imediata do LED Violeta na camada profunda do tecido.

Os resultados do presente estudo mostraram um aumento do número total de mastócitos (íntegros e degranulados) nos dois protocolos utilizados, sendo esse aumento maior dentro dos primeiros 20 minutos após a irradiação, tanto na camada superficial quanto na camada profunda do tecido. Considerando que a luz violeta pode alterar o comportamento celular e modificar os tecidos biológicos, o que pode ser benéfico para resolução de processos inflamatórios, ou prejudicial como na doença periodontal, onde a maior quantidade de mastócitos e sua degranulação parecem estar associadas a uma possível piora no quadro da doença, é recomendável estudo clínico adicional.

9. Conclusão

Assim, de acordo com a metodologia utilizada, é possível concluir que as fototerapias com LED IV ($\lambda 850 \pm 10$ nm) e LED violeta ($\lambda 405 \pm 10$ nm) em tecido da mucosa oral de ratos *Wistar*, foi capaz de fotobiomodular a atividade dos mastócitos no que diz respeito ao aumento do número de células, bem como, indução de sua degranulação, através da contagem e análise morfológica após processamento histológico e coloração com azul de toluidina.

De forma geral, o grupo do LED IV apresentou uma quantidade maior de mastócitos totais (íntegros e degranulados), nos três primeiros tempos e manteve-se com a mesma proporção, nos grupos LED IV e LED violeta em duas horas. O maior índice de degranulação dos mastócitos, produzido com o LED IV, ocorreu em 20 minutos após a irradiação, com 46,83% no tecido superficial e 51,14% no tecido profundo, mantendo-se o mesmo índice em 45 minutos no tecido superficial e diminuindo em duas horas. No tecido profundo houve redução na degranulação em 45 minutos e em duas horas. O valor do índice de degranulação para o tempo imediato foi pequeno (próximo de 15%) nos dois tecidos.

O estímulo da luz produziu um efeito superior na degranulação dos mastócitos nos tecidos irradiados com o LED violeta, que apresentou os maiores índices de degranulação, nos tempos imediato com 70,25% e 20 minutos com 81,11%, no tecido profundo, e diminuiu em 45 minutos e duas horas (cerca de 56%) . No tecido superficial os maiores índices de degranulação também ocorreram nos dois primeiros tempos (aproximadamente 58%) e diminuíram em 45 minutos e duas horas (aproximadamente 46%).

Referências

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. 4. ed. **Editora Elsevier**, 2013.
- AKINMOLADUN, V. I. *et al.* Evaluation of the histopathology of orofacial lesions in a North-East Nigerian tertiary centre. **Ann Afr Med**. v. 12, p. 105-109, 2013.
- AMORIM, J. C. *et al.* Clinical study of the gingival healing after gingivectomy and low-level laser therapy. **Photomed Laser Surg**. v. 24, p. 588-594, 2006.
- AOKI, M., PAWANKAR, R., NIIMI, Y.; KAWANA, S. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int. Arch. Allergy Immunol.*v.130, n. 3, p. 216-223, 2003.
- ASHMOLE, I.; BRADDING, P. Ion channels regulating mast cell biology. **Clinical Et Experimental Allergy**. v. 43, p. 491-502, 2012.
- ASSUMA, R. *et al.* IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **J Immunol**. v. 160, p. 403-409, 1998.
- BAGNATO, V. S.; MARIYAMA, L. T. Dosimetria na terapia com laser de baixa intensidade. **J Bras Laser**. v. 1, p. 26-29, 2007.
- BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. v. 27, n. 4, p. 227-238, 2008.
- BATISTA, A. C.; RODINI, C.O.; LARA, V. S. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. **Oral Dis**. v. 11, p. 249-254, 2005.
- BENYON, R.C. The human skin mast cell. **Clin. Exp. Allergy**. v. 19, n. 4, p. 375-87, Jul. 1989.
- BIENENSTOCK, J. *et al.* Evidence for central and peripheral nervous system interaction with mast cells. In: *Mast cell and basophil differentiation and function in health and disease*. **New York: Raven Press**. p.275-284, 1989.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. **J Periodont Res**. v. 28, p. 500-510, 1993.
- BRADDING, P. Mast Cell Ion Channels. **Chem Immunol Allergy**. v. 87, p. 163-178, 2005.
- CAMBIER, D. C. *et al.* Low-power laser and healing of burns: a preliminary assay. **Plast. Reconstr. Surg**. v. 97, p. 555-558, 1996.
- CHAVANTES, M. A. *et al.* *Laser em Biomedicina Princípios e Práticas*. São Paulo, 20019.
- CHURCH, M.K. *et al.* Biological properties of skin mast cells. **Clin. Exp. Allergy**. v. 3, p. 1-9, 1991.

CHURCH, M.K.; LEVI-SHAFFER, F.J. Updates on cells and cytokines. **Allergy Clin. Immunol.** v. 99, p. 155-60, 1997.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin. Exp. Immunol.** v. 129, p. 4-10, 2002.

DE CASTRO, I. C. V. *et al.* Do laser and led phototherapies influence mast cells and myofibroblasts to produce collagen? **Laser Med Sci.** 2014.

DETHLEFSEN, S.M. *et al.* Mast cell accumulation at sites of murine tumor implantation: Implications for angiogenesis and tumor metastasis. **Invasion Metastasis.** v. 14, n. 1-6, p. 395-408, 1995.

DIAS, I. F. L.; SIQUEIRA, C. P. M.; FILHO, D. O. T.; LAURETO, E; LIMA, F. M.; KASHIMOTO, R. K.; DURANTE, H. Efeitos da luz em sistemas biológicos. **Ciências Exatas e Tecnológicas.** Londrina. v. 30, n. 1, p. 33-40, 2009.

DOURADO D. M.; FÁVERO, S.; MATIAS, R.; CARVALHO, P. de T.; da CRUZ-HÖFLING, M. A. Low-level laser therapy promotes vascular endothelial growth factor receptor-1 Fernandes, M.J.C, 2012.

DYSON, M.; LUKE. D. Induction of mast cell degranulation in skin by ultrasound. **Inst Elect Electron Engns Transact Ultrason Ferroelect Freq Cont.** v. 33, p. 194-201, 1986.

EDUARDO, C. P. Fundamentos de Odontologia: Lasers em Odontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multi-wavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and each individual diode on mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Laser Surg Med.** v. 10, p. 559-558, 1990.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg Med.** v. 19, p. 433-437, 1996.

FALAUS, A.; MERETHEY, K. Histamine: An early messenger in inflammatory and immune reaction. **Immunology Today.** v. 13, p. 154-156, 1992.

FATHABADIE, F. F. *et al.* Effectes of pulsed infra-red low level-laser irradiation on mast cells number and degranulation in open skin wound healing of healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy.** p. 1-11, 2013.

FERREIRA, S. V. *et al.* **Involvement of mast cells and microvessels density in reactive lesions of oral cavity:** A comparative immunohistochemical study. Pathology Research and Practie, Elsevier, 2016.

GAILIT, J. *et al.* The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. **J Investig Dermatol.** v. 117, p. 1113-1119, 2001.

GALLI, S. J. New insights into “the riddle of mast cells”: micro environmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.** v. 62, p. 5-33, 1990.

- GALLI, S.J. et al. Cytokine production by mast cells and basophils. **Curr. Opin. Immunol.** v. 3, p. 865-872, 1991.
- GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **New Eng. Jour. Med.** v. 328, n. 4, p. 257-264, 1993.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- GOLIJANIN, R. *et al.* Morphometric analysis of collagen and inflammatory cells in periodontal disease. **Vojnosanit Pregl.** v. 72, n. 3, p. 219-224, 2015.
- GORDON, J.R. et al. Mast cells as a source of multifunction alcytokines. **Immunol. Today.** v. 11, p. 458-464, 1990.
- GRABBE, J. Photomecanisms in physical urticaria. **J Investig Dermatol Symp Proc.** v. 6, p. 135-136, 2001.
- HUANG, S. *et al.* Mast cell degranulation in human periodontitis. **J Periodontol.** v. 84, n. 2, p. 248-255, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12^aed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.
- KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Laser Life Sci.** v. 2, p. 53-74, 1988.
- KARU, T. I. **Photobiology of Lower-Power Laser Therapy.** London: Harwood Academic, 1989.
- KARU, T. I. et al. Comparison of the effects of visible pulses of femtosecond laser and low-intensity continuous wave laser radiation on the clonogenicity of Escherichia coli. **J Photochem Photobiol B.** v. 10, n. 4, p. 339-344, 1991.
- KARU T. I.; ANDREICHUK, T.; RUABYKH, T. Changes in oxidative metabolism of murine splenn following diode laser (660-950 nm) irradiation: effect of cellular composition and radiation parameters. **Lasers in Surgery and Medicine, New York.** v. 13, n. 4, p. 453-462, 1993.
- KARU T. I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near – IR radiation cells. **J Photochem Photobiol B.** v. 49, n. 1, p. 1-17, Mar 1999.
- KARU, T. I. ; PYATIBRAT, L. V.; AFANASYEVA, N. I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. **Lasers in Surgery and Medicine.** v. 36, n. 4, p. 307-314, 2005.
- KARU, T. I. et al. Absorption Measurements of Cell Monolayers Relevant to Mechanisms of Laser Phototherapy: Reduction or Oxidation of Cytochrome c Oxidase Under Laser Radiation at 632,8 nm. **Photomedicineand Laser Surgery.** v. 26, n. 6, p. 593-599, 2008.

KARU, T. I. Multiple Roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. **Critical Review, IUBMB Life.** v. 62, n. 8, p. 607–610, 2010.

KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y. Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. **Journal of Endodontics.** v. 30, p. 45–50, (2004).

KINET, J. P. The essential role of mast cells in orchestrating inflammation. **Immunological Reviews.**v. 217, p. 5-7, 2007.

KITAMURA, Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic changes between subpopulations. **Annu. Rev. Immunol.**v. 7, p. 59-76, 1989.

KNUDSEN, T.; JOHANSEN, T. The mast cell. **Ugeskr Laeger.**v. 19,n. 152, p. 3516-3520, 1990.

KRISHNASWAMY, G., KELLEY, J., JOHNSON D., YOUNGBERG, G., STONE, W.,HUANG, S-K., BIEBER, J.; CHI, D.S. The human mast cell: functions in physiology and disease. **Frontiers in Bioscience.**v. 1,n. 6, p. 1109-1127, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ROBBIMS, S. L.; COTRAN, R. S. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease.** Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.

LEFEUVRE, M. *et al.* TEGDMA induces mitochondrial damage and oxidative stress in human gingival fibroblasts. **Biomaterials.** v. 26, p. 5130-5137, 2005.

LICHTENBELD, H.H. *et al.* Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance. **Neth. J. Med.**v. 49, n. 1, p. 42-51, Jul. 1996.

LONEY, R.W.; PRICE, R.B. Temperature transmission of high-output light-curing units through dentin. **Operative Dentistry.** v. 26, p. 516–520, 2001.

MAMALIS, A.; GARCHA, M.; JAGDEO, J. Light Emitting Diode-Generated Blue Light Modulates Fibrosis Characteristics: Fibroblast Proliferation, Migration Speed, and Reactive Oxygen Species Generation. **Lasers Surg Med.** v. 47, n. 2, p. 210-215, Feb., 2015.

MANDRILLO, P. M.; FISCHETTO, G.; ODORISIO, P.; CURA, F.; AVANTAGGIATO, C. F. Effects of Light-Emitting Diode (LED 640 nm) On Human Gingival Fibroblasts: A comparativa *in vitro* study. **Oral Implantology (Rome).** v. 10, n. 2, p. 151-161, 2017.

MEYLE, J. Neutrophil chemotaxis and serum concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α). **J Periodont Res.** v. 28, p. 491-493, 1993.

METCALFE, D.D.; BARAM, D.; MEKORI, A. Mast cells. **Physiol. Rev.** v. 77,p. 1033-1079, 1997.

MLOT, H. M. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J. Vasc. Bras.* [online]. v.10, n.4, p.275-278, 2011.<http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492011000400001>

MONTEIRO, J. S. C.; de OLIVEIRA, S. C.; de FATIMA, F. L. M.;SOUSA, J. A.;PINHEIRO,

- A. L. B.; dos SANTOS, J. N. Effect of LED Red and IR photobiomodulation in tongue mast cells in Wistar rats: histological study. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 29, p. 767–771, 2011.
- MORAIS, N. C. R.; BARBOSA, A. M.; VALE, M. L.; VILLAVARDE, A. B.; LIMA, C. J.; COGO, J. C.; ZAMUNER, S. R. Anti-inflammatory Effect of Low-Level Laser and Light-Emitting Diode in Zymosan-Induced Arthritis. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 28, n. 2, p. 227-232, 2010.
- NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. **Vet. Dermatol**. v. 12, p. 303-313, 2001.
- PAGE, R. C. Periodontal diseases: a new paradigm. **J Dent Educ**. v. 62, p. 812-821, 1998.
- PERALLES, P. G. *et al.* Gingival and alveolar hyperplastic reactive lesions: clinico pathological study of 90 cases. **Brasilian J Oral Sci**. v. 5, p. 1085-1089, 2006.
- PINFLDI, C. E. *et al.* Effect of low-level laser therapy on mast cells in viability of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. **Photomed Laser Surg**. v. 27, p. 337-343, 2009.
- RIBEIRO, L. S. F. *et al.* Association Between Mast Cell and Collagen Maturation in Chronic Periodontitis in Humans. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. p. 1-9, 2018.
- SALA, A.; PROSCHAK, E.; STEINHILBER, D.; ROVATI, G. E. Two-pronged approach to anti-inflammatory therapy through the modulation of the arachidonic acid cascade. **Biochemical Pharmacology**. v. 158, p. 161-173, 2018.
- SALMÚN, N.; JOSVIACK, D.; ROSTAN, M. y PAULIN, P. Papel de la triptasa en el diagnostico de la rinitis. **Archivos Argentinos Alergia e Inmunología Clínica**.v. 25, p. 217-218, 1994.
- SAMPAIO, S. C. P. O.; MONTEIRO J. S. C.; CANGUSSU, M. C. T.; SANTOS, G. M. P.; SANTOS, M. A. V.; SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. B. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers Med Sci**. v. 28, n. 3, p. 799–806, 2013.
- SAWASAKI, I., MARTINS, G. V. R., RIBEIRO, M. S., MARQUES, M. M. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. **Lasers Med. Sci**. v. 24, p. 113-116, 2009.
- SAYED, B. A.; BROWN, M. A. Mast cell as modulators of T-cell responses. **Immunological Reviews**. v. 217, p. 53-61, 2007.
- SEEGER, K. **Semiconductor Physics–Na Introduction**. 6 ed, Austria: Springer, cap. 13, 1997.
- SIRAGANIAN, R. P. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. **Current Opinion in Immunology**. v. 15, p. 639–646, 2003.
- SILVEIRA, L. B.; PRATES, R. A.; NOVELLI, M. D. *et al.* Investigation of mast cells in human

gingiva following low-intensity laser irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 26, n. 4, p. 313-319, 2008.

SMITH, K.C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Ther**. v. 3, p. 19–24, 1991.

SMITH, K.C. Laser (and LED) Therapy is Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 23, n. 1, p. 78-80, 2005.

SOMMER, A. P. Mitochondrial cytochrome c oxidase is not primary acceptor for near infrared light – it is mitochondrial bound water: the principles of low-level light therapy. **Annals of Translational Medicine**. v. 7, 2019.

TSYGANOVA, N.V. Changes in mast cells in the loose subcutaneous connective tissue after laser irradiation. **Bull Exp Biol Med**. v. 76, p. 1047-1049, 1974.

TURNER, H.; DEL CARMEN, K. A.; STOKES, A. Link between TRPV channels and mast cell function. **Handb. Exp. Pharmacol**. v. 179, p. 457-471, 2007.

UHL, A.; VOLPEL, A.; SIGUSCH, B.W. Influence of heat from light curing units and dental composite polymerization on cells in vitro. **Journal of Dentistry**. v. 34, p. 298–306, 2006.

VASHEGHANI, M. M. *et al.* Low-Level Laser Therapy Using 80-Hz Pulsed Infrared Diode Laser Accelerates Third-Degree Burn Healing in Rat. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 6, p. 959-964, 2009.

WALSH, L. J. *et al.* Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J Oral Pathol Med**. v. 24, p. 266-272, 1995.

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. **Scientific Reports**. v. 6, p. 33719, 2016.

WANG, Y. *et al.* Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cell. **Scientific Reports**. v. 7, p. 7781-7791, 2017.

WEISS, R.A.; McDANIEL, D.H.; GERONEMUS, R.G.; *et al.* Clinical Experience with Light Emitting Diode (LD) Photomodulation. **Dermatol Surg**. v. 31, p. 1199-1205, 2005.

WU, Z. H. *et al.* Mitochondrial signaling for histamine releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cell. **Laser Surg. Med**. v. 42, p. 503-509, 2010.

YANG, W. Z. *et al.* Effects of low Power laser irradiation on intracellular calcium and histamine release in RBL-2H3 mast cell. **Photochem. Photobiol**. v. 83, p. 979-984, 2007.

YOSHIDA, A. *et al.* Reactive oxygen species production in mitochondria of human gingival fibroblast induced by blue light irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 129, p. 1-5, 2013.

YOUNG, S. *et al.* Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med.** v. 9, p. 497-505, 1989.

ANEXO A- Registro no CEUA com autorização para utilização dos ratos Wistar.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da Fototerapia LED Infravermelho e violeta em mastócitos da mucosa oral de ratos Wistar - Estudo histológico.", protocolada sob o CEUA nº 3681160119 (ID 000066), sob a responsabilidade de **Antonio Luiz Barbosa Pinheiro e equipe; Luiz Guilherme Pinheiro Soares; Geyza Lopes Borges Araújo; Jean Nunes dos Santos; Amanda Dos Santos Vitória** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 24/04/2019.

We certify that the proposal "Effect of Infrared and violet LEDs phototherapy on mast cells of the oral mucosa of Wistar rats - Histological study.", utilizing 27 Isogenic rats (27 males), protocol number CEUA 3681160119 (ID 000066), under the responsibility of **Antonio Luiz Barbosa Pinheiro and team; Luiz Guilherme Pinheiro Soares; Geyza Lopes Borges Araújo; Jean Nunes dos Santos; Amanda Dos Santos Vitória** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 04/24/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **03/2020** Área: **Biotecnologia**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **27**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: Os procedimentos serão realizados no Laboratório de Experimentação animal da Faculdade de odontologia da UFBA, devidamente registrado no CIUCA.

Salvador, 24 de abril de 2019

Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)