CARLA ANDREOTTI DAMANTE

**EFEITO DA TERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE (LILT)
NA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO DA FAMÍLIA FGF
POR FIBROBLASTOS GENGIVAIS HUMANOS**

São Paulo

2007

Carla Andreotti Damante

Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de
fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais
humanos

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
pelo Programa de Pós-graduação em
Odontologia.

Área de concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Giorgio De Micheli

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Damante CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2007.

São Paulo, / /

Banca Examinadora

1) Prof.(a) Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a) Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a) Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a) Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.(a) Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao **Gustavo**, porque sem ele, nada disso teria acontecido... Palavras não são suficientes para agradecer seu apoio, carinho, amor, preocupação, dedicação, ajuda e tudo o que ele tem feito por mim nesses anos de convívio.

Aos **meus pais** e à **minha avó**, pela educação e princípios que me foram ensinados. Tudo que sou, hoje, devo a vocês, que sempre estiveram presentes em mim, mesmo no momento em que tive que caminhar com minhas próprias pernas.

A **Juli**, minha irmã e minha melhor amiga, que sempre me apoiou em todos os momentos, vibrando com minhas alegrias e chorando com minhas tristezas.

A **Néia**, que cuida de mim há muito tempo, que sempre se preocupou comigo e que apesar de trabalhar em minha casa, é considerada parte da família fazendo, portanto, parte de nossas vidas.

A toda a **família Passanezi**, que me trata como parte dela e torce sempre desejando o melhor para mim.

Aos meus melhores amigos, os quais ficam verdadeiramente felizes com meu sucesso e ajudam quando há problemas.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Giorgio De Micheli**, meu orientador, que me recebeu de braços abertos na disciplina de Periodontia, confiando em meu projeto e abrindo portas para novos conhecimentos e oportunidades no estudo do laser. Seu comportamento atencioso e acolhedor me fez sentir em casa desde o primeiro dia em que fomos apresentados.

À **Prof^a. Dra. Márcia Martins Marques**, que além de me receber em seu laboratório, acolheu também a minha idéia e me ensinou tudo sobre cultivo de células. Um exemplo de pesquisadora séria e determinada a ser seguido e motivo de meu orgulho por ter sido a co-orientadora deste trabalho.

Aos professores do departamento de Periodontia, **Lotufo, Luis Lima, Pustiglioni, Todescan, Giuseppe, Cláudio e Silvia (in memorian)**, que me ensinaram muito e enriqueceram meus conhecimentos em pesquisa e em clínica.

A **Ilíria**, que me ajudou desde o início do projeto, ensinando, incentivando e me aproximando mais do mundo do laser.

Aos colegas do curso de pós-graduação, **Cássia, Hsu, Giovane, Adriane, Valéria, Verônica, Ricardo, Priscila, Ivan** os quais contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Obrigada pela companhia, amizade, troca de experiências e aprendizado em conjunto. Em especial ao **Fábio**, cuja amizade e desprendimento me ajudaram muito na adaptação à cidade de São Paulo.

Aos **colegas** das outras turmas de pós-graduação pelo convívio e troca de experiências, em especial a **Vanessa**, que me ajudou a conseguir o material para a realização da cultura primária de células.

A **Mara e Márcia**, funcionárias do departamento de Periodontia, que sempre estiveram prontas em ajudar e foram companheiras todos esses anos.

Aos alunos **Rogéria, Gabriel e Maurício**, cujo auxílio na clínica de Periodontia foi fundamental para o desenvolvimento dos meus trabalhos.

Ao **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, cujas sugestões foram preciosas para o refinamento do projeto.

Aos professores e funcionários do **Departamento de Dentística**, que me acolheram praticamente como sua aluna durante toda a realização deste experimento no **Laboratório de Pesquisas Básicas**.

A **Marilene**, técnica do Laboratório de Pesquisas Básicas, cuja ajuda sempre pronta e precisa foi imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada pela companhia durante tantas horas de trabalho dentro do laboratório.

A **Sueli, Lorena, Daiane e Dani** que me transmitiram seus conhecimentos sobre cultivo celular, laser, teste ELISA entre outros. Sua ajuda foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao **departamento de Materiais Dentários**, nas pessoas do **Prof. Fernando** e do **Douglas**, onde foi realizada uma das fases deste estudo.

A **Eloisa**, pela minuciosa correção gramatical desse trabalho. A cada tese, aprendo mais regras do nosso difícil Português.

Ao **LELO**, por ter fornecido o aparelho de laser, especialmente a **Lili**, que sempre me atendeu prontamente e com muita simpatia.

À **FOUSP**, que se tornou minha terceira casa.

À **FOB**, minha segunda casa, da qual me orgulho muito de minha formação de graduação e de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Sebastião Greggi**, orientador do mestrado, que inicialmente me incentivou a estudar laser em Periodontia.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa (protocolo nº 05/55431-0).

À **CAPES**, pela bolsa de doutorado de demanda social.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem

Ou que seus planos nunca vão dar certo

Ou que você nunca vai ser alguém...

...Mas eu sei que um dia a gente aprende

Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo

Quem acredita sempre alcança”

Renato Russo

RESUMO

Damante CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

A terapia com laser em baixa intensidade, conhecida como *Low-intensity laser therapy* (LILT), tem sido alvo de pesquisas que buscam esclarecer os mecanismos pelos quais o laser age na cicatrização de feridas. Este processo é dependente da transmissão de sinais entre epitélio e conjuntivo, os quais influenciam a proliferação e a migração celular, onde participam fatores de crescimento. O objetivo desta pesquisa foi verificar os efeitos da radiação com lasers vermelho e infravermelho em baixa intensidade na produção de fatores de crescimento por fibroblastos *in vitro*. Foi obtida uma cultura primária de fibroblastos gengivais humanos (linhagem FGH). As células foram cultivadas em placas de 96 poços (5×10^3 células /poço), em estado de quiescência (meio de cultura suplementado com 1% de soro fetal bovino) e irradiadas com lasers de diodo (AlGaAs - 660nm, e AlGaInP - 780nm). O laser em modo contínuo, foi aplicado em contato e na forma pontual. A potência utilizada foi de $\cong 40\text{mW}$ numa área de $0,042\text{cm}^2$ e com densidades de energia de 2, 3, 4, 5 e 6J/cm^2 com respectivos tempos de aplicação de 2, 3, 4, 5 e 6s. As culturas foram irradiadas duas vezes com 6h de intervalo. Os grupos controle positivo e negativo foram cultivados com 10% e 1% de soro fetal bovino, respectivamente e não receberam irradiação. A produção do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) foi analisada e quantificada por ensaio imunoenzimático (método ELISA) no meio condicionado pelas células. Os dados foram comparados estatisticamente pela análise de variância e teste de

Kruskal-Wallis complementados pelos testes de Tukey e Dunn, respectivamente ($p < 0,05$). Culturas de todos os grupos produziram KGF e bFGF. Controles positivos produziram maior quantidade de KGF e bFGF que controles negativos. A produção de KGF foi similar em todos os grupos experimentais. A produção de bFGF foi significativamente maior nos grupos tratados com o laser infravermelho nas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$ quando comparados com os controles. Baseados nas condições deste estudo, concluiu-se que a LILT não influencia a produção de KGF, porém, influencia positivamente a produção de bFGF de maneira dependente do comprimento de onda e da densidade de energia empregados. O infravermelho, nas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$, é capaz de aumentar a produção deste fator de crescimento. Portanto, a utilização da LILT nestes parâmetros poderá constituir papel relevante na cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Laser, Terapia com laser em baixa intensidade; Cicatrização de feridas; Fibroblastos; Fibroblasto, fatores de crescimento.

ABSTRACT

Damante CA. Low-intensity laser therapy (LILT) effects on fibroblast growth factors expression by human gingival fibroblasts. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

Low-intensity laser therapy (LILT) has been the subject of researches to understand the mechanisms by which the laser acts stimulating wound healing. This process is dependent of a signaling transfer between epithelium and connective tissue and it influences cellular proliferation and migration. Growth factors are directly involved in these mechanisms. The aim of this study was to analyze the effects of red and infrared low-level laser on production of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts *in vitro*. The cells were obtained by primary culture (FGH cell line). They were grown in 96 wells plates (5×10^3 cells / well) in a quiescence environment (1% fetal bovine serum) and then they were irradiated with a diode laser (GaAlAs - 660nm, and InGaAlP - 780nm). The continuous laser was applied in contact and in a punctual mode. The power was $\cong 40\text{mW}$, the area of irradiation was $0,042\text{cm}^2$, the energy densities were 2, 3, 4, 5 and 6J/cm^2 with 2, 3, 4, 5 and 6s of time application, respectively. The cultures were irradiated twice with 6 h-interval. The positive and negative control groups were grown in 10% and 1% of bovine fetal serum, respectively and didn't receive any irradiation. The production of keratinocyte growth factor (KGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) was analyzed and quantified by immunoenzymatic test (ELISA) in the conditioned medium. The data were compared statistically by analysis of variance and Kruskal-Wallis, complemented by Tukey's and Dunn's tests, respectively ($p < 0,05$). Positive controls produced more KGF and bFGF than negative controls. The KGF production was similar in all

experimental groups. The bFGF production was significantly higher in groups treated with infrared laser with energy densities of 3J/cm² and 5J/cm² when compared to controls. Based on these study conditions, authors concluded that LILT doesn't influence KGF production although it positively influences bFGF production in a dependent manner from wavelength and energy density. Infrared laser with energy densities of 3J/cm² and 5J/cm² is capable of improving the production of this growth factor. Therefore the LILT in these parameters can constitute a relevant role on wound healing.

Key words: Laser, Low-intensity laser therapy; Wound healing; Fibroblasts; Fibroblast, growth factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ - Lâmbida – comprimento de onda

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

COX2 – ciclooxigenase 2

DME – meio Eagle modificado por Dulbecco

DO – densidade óptica

DP – desvio-padrão

EGF – fator de crescimento epitelial

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Ensaio imunoenzimático

EPM – erro-padrão da média

Er:YAG – laser de érbio

FGF – fator de crescimento de fibroblasto

bFGF – fator de crescimento de fibroblasto básico

GaAlAs – arseneto de gálio e alumínio

GaAs - arseneto de gálio

He-Ne – hélio - neônio

Hz – Hertz – medida de frequência

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

AlGaInP – laser diodo de alumínio, gálio, índio e fósforo

J/cm² - Joules por centímetro quadrado – medida de densidade de energia

kDa – KiloDalton – medida de peso molecular de proteínas

KGF – fator de crescimento de queratinócito

LED – Light Emitting Diode - diodo emissor de luz

LILT – Low-intensity laser therapy – Terapia com laser em baixa intensidade

MTT - (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio)

Nd:YAG – laser de neodímio

nm – nanômetros – unidade de medida de comprimento de onda

PBSA – solução tampão fosfato salina

PDGF – fator de crescimento de plaquetas

PGE2 – prostaglandina E2

rpm – rotações por minuto

SFB – soro fetal bovino

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

W – Watt – medida de potência

W/cm² - Watts por centímetro quadrado – medida de densidade de energia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Laser em baixa intensidade	19
2.2 Estudos em humanos e animais	25
2.3 Estudos com cultura de células	26
2.4 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF)	30
2.5 Fator de crescimento de queratinócitos (KGF)	31
2.6 Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF)	34
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
5 RESULTADOS	52
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	83
APÊNDICE	87

1 INTRODUÇÃO

Os lasers em baixa intensidade, com comprimentos específicos de onda, têm a capacidade de alterar o comportamento celular na ausência de aquecimento. Os efeitos fotoquímicos e fotofísicos causados pela luz, nos tecidos, ocorrem com menos de 0,5°C de aumento de temperatura (TUNÉR; HODE, 1996). A potência desses lasers varia de 1mW a 500mW no modo contínuo e com picos maiores quando pulsados. Seus comprimentos de onda variam do espectro visível da luz ($\lambda = 400\text{nm}$) ao infravermelho ($\lambda = 1,064\text{nm}$) (CHOW; BARNSELEY, 2005).

Desse modo, os lasers em baixa intensidade são utilizados como agentes terapêuticos, após o tratamento convencional, mostrando propriedades antiinflamatórias (SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000), analgésicas (TAM, 1999) e de aceleração da cicatrização de feridas (TUNÉR; HODE, 1996), trazendo um pós-operatório mais confortável ao paciente com a possibilidade de redução do uso de medicamentos. Em Periodontia, esses efeitos são desejados, já que muitos dos tratamentos periodontais - apesar de nas últimas décadas terem-se tornado mais conservadores - ainda geram grande desconforto ao paciente, como hiperestesia dentinária, dor e tempo de cicatrização prolongado.

Os efeitos do laser em baixa intensidade na aceleração da cicatrização de feridas têm sido atribuídos ao estímulo de vários sistemas biológicos como aumento da proliferação e atividade celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KREISLER et al., 2002; PEREIRA et al., 2002; SOUDRY et al., 1988), aumento da produção de colágeno (CHOMETTE et al., 1987), aumento da síntese de DNA (LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; SKINNER et al., 1996), modulação da produção dos

fatores de crescimento (YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a, 1994b), redução na produção de prostaglandinas (SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000).

No entanto, a literatura a respeito da terapia com laser em baixa intensidade (*Low-intensity laser therapy* – LILT), na aceleração da cicatrização de feridas, é muito controversa (DE MICHELI et al., 2005). Estudos em animais ora mostram resultados positivos (MESTER; MESTER; MESTER, 1985), ora não mostram efeito algum (BRAVERMAN et al., 1989; WALKER et al., 2000). O mesmo acontece nos escassos estudos em humanos, onde a aceleração da cicatrização de feridas mostra-se mais rápida com o uso do laser (MESTER; MESTER; MESTER, 1985), e que contrastam com outros, em que o laser não auxiliou a reparação dos tecidos (DAMANTE et al., 2004a, 2004b; RYDÉN et al., 1994).

Essas disparidades podem ser resultantes dos diferentes protocolos utilizados pelos autores, já que é sabido que parâmetros de utilização dos lasers são definitivos para a determinação de seus efeitos. Assim, muitos autores, após revisarem a literatura sobre esse assunto, concluíram que há necessidade de estabelecimento de protocolos-padrão e mais estudos controlados para que o uso clínico dos lasers seja difundido (BRONDON; STADLER; LANZAFAME, 2005; COBB, 2006; WALSH, 1997).

Antes de se determinarem protocolos de aplicação, é necessário esclarecer os mecanismos de ação do laser nos tecidos. Existem apenas teorias, principalmente sobre seus efeitos na produção de substâncias relacionadas com a aceleração da cicatrização de feridas. Nesse sentido, estudos *in vitro* com cultura de células parecem ser promissores e trazem resultados positivos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; CHOMETTE et al., 1987; KREISLER et al., 2002; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; PEREIRA et al., 2002; SAKURAI; YAMAGUCHI;

ABIKO, 2000; SKINNER et al., 1996; SOUDRY et al., 1998; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a, 1994b). Atualmente, tem-se atribuído a diversos fatores de crescimento os vários eventos da regeneração tecidual. A bioestimulação pelo laser pode estar associada à regulação das células via produtos autócrinos dos diferentes fatores de crescimento (YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a, 1994b).

Os fatores de crescimento são classes de proteínas que agem em células específicas e circulam pelo organismo promovendo mitogênese (proliferação), migração e estímulo da atividade metabólica das células (LYNCH, 1994). Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) estão envolvidos na transmissão de sinais entre epitélio e tecido conjuntivo e influenciam o crescimento e diferenciação epitelial. A maioria deles expressa-se por células do tecido conjuntivo e exercem seus efeitos nas células epiteliais adjacentes, o que os define como mediadores parácrinos da proliferação e migração epitelial (LYNCH, 1994).

O fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), além de ser responsável pela aceleração da formação de tecido de granulação e reepitelização de feridas, é capaz de estimular a proliferação das células da camada basal do epitélio (ODA; KAGAMI; UEDA, 2004) e dos fibroblastos (FUJISAWA; MIYAMOTO; NAGAYAMA, 2003).

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF), na sua ultraestrutura, mostra homologia com moléculas da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Dentre os subtipos de KGF, o KGF-1 ou FGF-7, induz a proliferação e migração de células epiteliais, além da secreção de metaloproteinases da matriz. Assim, esse fator age na reepitelização de feridas (WERNER, 1998) mantendo a estrutura normal do epitélio. O KGF 1 é produzido por fibroblastos gengivais, logo abaixo do epitélio da mucosa oral e não nas camadas mais profundas (MACKENZIE;

GAO, 2001), e também por fibroblastos do ligamento periodontal. A expressão de KGF é regulada por vários mediadores da inflamação e cicatrização de feridas (McKEOWN et al., 2003).

Diante do exposto, e baseado em trabalhos anteriores (YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a, 1994b), é possível observar que tanto a terapia com laser em baixa intensidade, quanto os fatores de crescimento, podem exercer papel na cicatrização de feridas, principalmente os fatores da família do FGF, os quais são importantes mediadores das interações mesênquimo-epiteliais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Laser em baixa intensidade

A palavra LASER é um acrônimo de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, a qual pode ser traduzida por amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Após a descrição da teoria da emissão estimulada de radiação por Einstein em 1917, o primeiro laser – um laser de rubi - só veio a ser construído em 1960, por Mainman. Desde então, os efeitos térmicos desses lasers em alta intensidade vêm sendo pesquisados na área biomédica (MISERENDINO; PICK, 1995).

Já na área odontológica, o relato inicial de uso de um laser de Rubi em um dente vitalizado foi em 1965, por Goldman (BASFORD, 1985). Dois anos após, Endre Mester, um dos pioneiros na pesquisa com laser em baixa intensidade, publicou seu primeiro trabalho, mostrando os efeitos dessa terapia na cicatrização de feridas em dorso de ratos (RIBEIRO; ZECELL, 2004). A terapia com laser em baixa intensidade (LILT – *Low-intensity laser therapy*) utiliza a luz nas porções do espectro visível e infravermelho. As primeiras pesquisas nesse campo foram feitas com lasers de rubi, argônio e hélio-neônio, que estão no espectro visível (CARRILLO et al., 1990; CLOKIE; BENTLEY; HEAD, 1991; KANA et al., 1981; MESTER et al., 1971; NEIBURGER, 1999). Mais recentemente, os lasers de diodo semicondutor de arseneto de gálio (GaAs) e arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs) no espectro infravermelho têm-se tornado mais populares (AMORIM et al., 2006; DAMANTE et

al., 2004a, 2004b; KREISLER et al., 2002; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LOWE et al., 1998; SKINNER et al., 1996). Os lasers de diodo (semicondutores) possuem o mecanismo de funcionamento um pouco diferente da maioria dos lasers. Eles consistem em um “sanduíche” de pólos positivo e negativo, sendo a radiação emitida pelas laterais do mesmo (Figura 2.1). As faces laterais polidas perpendicularmente à saída do feixe, servem como os espelhos do ressonador, os quais garantem o retorno dos raios. Isso faz com que esses aparelhos sejam bem compactos.

Figura 2.1-Esquema do mecanismo interno de um laser de diodo (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004)

A junção positiva/negativa de arseneto de gálio e alumínio é levada à emissão de laser pela passagem de uma corrente elétrica. O emprego de materiais mistos (GaAs, GaAlAs, AlGaInP) permite alterar a distância entre as bandas e o comprimento de onda do laser (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Para que se obtenha a resposta biológica adequada, é necessário atingir a dose ótima de radiação, o comprimento de onda correto e o número de aplicações suficientes. Os seguintes parâmetros devem ser observados: escolha do comprimento de onda, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de

potência (intensidade), tipo de regime de operação do laser e número de tratamentos. A potência do laser é o valor dado pelo fabricante em watts (W). A densidade de potência é a potência de saída de luz por unidade de área medida em watts por centímetro quadrado (W/cm^2). A densidade de energia, também chamada de dose, é a grandeza que avalia a possibilidade de estímulo ou inibição dos efeitos do laser. É a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido. Geralmente, é expressa em Joules por centímetro quadrado (J/cm^2), sendo este o parâmetro mais importante que avalia a possibilidade de estímulo, inibição ou não-manifestação dos efeitos terapêuticos (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Comprimentos de onda longos são mais resistentes ao espalhamento e penetram profundamente nos tecidos. A luz vermelha do laser de He-Ne penetra 0,5 a 1mm antes de perder 37% de sua intensidade, enquanto que a luz infravermelha do laser de GaAlAs penetra mais de 2mm antes de perder a mesma quantidade de energia. A terapia a laser envolve usualmente exposições de $4\text{J}/\text{cm}^2$, o que significa uma penetração de 0,5 a 2,5cm, podendo atingir até nervos, músculos e articulações (BASFORD, 1985).

Outra característica relevante para ação do laser é a propriedade óptica do tecido alvo. Sabe-se que a distribuição da luz é diferente em tecidos normais e patológicos. Como exemplo, o laser penetra 2,5 vezes mais no tecido de granulação de úlceras de pele do que na pele normal (KOLAROVÁ; DITRICHOVÁ; WAGNER, 1999).

Os mecanismos biomoleculares da ação do laser em baixa intensidade são bem diferentes dos mecanismos térmicos do laser em alta intensidade. O evento inicial que ocorre é a absorção da luz por moléculas do tecido alvo as quais são chamadas de cromóforos. Outros exemplos de moléculas fotossensitivas são a

clorofila na fotossíntese e a rodopsina na visão. Os citocromos são enzimas da cadeia respiratória presentes nas mitocôndrias, participantes do mecanismo de conversão de adenosina di-fosfato (ADP) em adenosina tri-fosfato (ATP), que fornece energia para a célula e dirige o seu metabolismo (síntese de proteínas, replicação, motilidade celular, manutenção do potencial da membrana). Como os citocromos são fotossensíveis, a energia do laser é absorvida e convertida em energia para a célula (ATP) (HARRIS,1991; MISERENDINO; PICK, 1995; WILDEN; KERTHEIN, 1998).

A ação dos lasers em baixa intensidade nos tecidos ocorre dentro de um espectro limitado da luz de comprimentos de onda de 600 a 900nm, os quais possuem níveis de energia e absorção relevantes para a cadeia respiratória (WILDEN; KERTHEIN, 1998).

No espectro entre 500 e 1200nm, não há uma molécula específica que absorva toda energia do laser, como ocorre com a hemoglobina e melanina, as quais interagem com comprimento de onda de 500nm do laser de argônio. Toda energia é absorvida por esses pigmentos e a luz não atinge outras áreas do tecido. Já a água interage com o laser de CO₂ no espectro de 10.000nm. Esse intervalo de 500 a 1200nm é chamado de “janela óptica” dos tecidos (Figura 2.2). Por não haver moléculas de absorção específicas para esses comprimentos de onda, o tecido permite a livre passagem e espalhamento dos raios vermelhos e infravermelhos dos lasers em baixa intensidade até que cheguem aos citocromos das mitocôndrias (HARRIS,1991; MISERENDINO; PICK, 1995; WILDEN; KERTHEIN, 1998).

Figura 2.2- Espectro de ação dos lasers nos tecidos biológicos. Na chamada “janela óptica” não há um elemento específico com pico de absorção para os lasers utilizados na LILT (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004)

A irradiação com luz vermelha e infravermelha acelera os processos metabólicos na célula e pode ativar a proliferação. É mais provável que a irradiação cause um rearranjo do metabolismo celular e a luz seja apenas um gatilho para isso. Essa é a razão pela qual as doses necessárias para causar bioestimulação são baixas (0,1 a 10J/cm²), e o tempo de irradiação é curto (10 a 100s) (KARU, 1989).

Karu (1989) propôs um modelo de estimulação dos sistemas biológicos para a luz visível (vermelha), onde esta promove mudanças fotoquímicas nos receptores das mitocôndrias, alterando o metabolismo. Há envio dos sinais para outras áreas da célula e geração da fotoresposta (biomodulação) (Figura 2.3).

Já a absorção da radiação emitida na região do espectro infravermelho resulta em rotações e vibrações moleculares, propriedades que diferem da radiação visível. Partindo desse princípio, Smith (1991) sugeriu o que a luz infravermelha, devido a suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, inicia a cascata de eventos

metabólicos através de efeitos fotofísicos nas membranas, agindo nos canais de cálcio. Apesar de efeitos diferentes, a resposta final é a mesma (Figura 2.3) (RIBEIRO; ZECELL, 2004).

Figura 2.3-Modelos para estimulação dos sistemas biológicos pelo laser em baixa intensidade. A ação da LILT pode ocorrer tanto nas mitocôndrias como na membrana celular, porém a fotoresposta é a mesma (SMITH, 1991)

Karu (1989), em seu artigo de revisão da literatura sugere que, nas feridas, algumas condições como baixa concentração de oxigênio, baixo pH e falta de nutrientes podem atrasar a proliferação. Portanto, são encontradas células que entram na fase G_0 ou permanecem na fase G_1 do ciclo celular e que podem interpretar a luz como um sinal para aumentar a proliferação.

Nenhum efeito colateral foi observado com o uso de lasers no espectro vermelho e infravermelho, pois seus fótons são de baixa energia causando somente

excitação e calor e não ionização. Já o raio ultravioleta B e o raio X estão no espectro abaixo do ultravioleta. Estes possuem fótons de alta energia e podem ionizar átomos, partindo suas ligações químicas e causando mutações (TUNÉR; HODE, 1996).

2.2 Estudos em humanos e animais

Os estudos realizados em humanos e animais, em sua maioria, mostram resultados duvidosos em relação aos efeitos da LILT na cicatrização de feridas. Muitos deles são mal delineados e pouco controlados, o que torna seus resultados pouco confiáveis. E ainda, pesquisas bem delineadas, que utilizaram metodologias semelhantes na avaliação dos efeitos da LILT na cicatrização de gengivoplastias em humanos (AMORIM et al., 2006; DAMANTE et al., 2004), não são passíveis de comparação pela utilização de parâmetros de aplicação e lasers totalmente diferentes.

Em relação às pesquisas com humanos, algumas mostraram resultados positivos como cura de úlceras persistentes (MESTER et.al., 1974¹, apud MESTER; MESTER; MESTER, 1985), redução de dor após extração de terceiros molares (CLOKIE; BENTLEY; HEAD, 1991), cicatrização de incisões na mucosa bucal (NEIBURGER, 1999) e cicatrização após gengivoplastia. (AMORIM et al., 2006).

¹ Mester E, Korenyi-Both A, Spiry T, Scher A, Tisza S, Varga L.[Latest studies on the effect of laser beams on wound healing. (Clinical and eletronoptic experiences)]. Z Exp Chir 1974;7(1):9-17.

Outras, não mostraram efeito algum na redução da inflamação gengival (RYDÉN et al., 1994), na aceleração da cicatrização de gengivoplastias (DAMANTE et al., 2004a, 2004b) e na melhora da dor, edema e trismo após extração de terceiros molares (FERNANDO; HILL; WALKER, 1993; CARRILLO et al., 1990).

Os trabalhos em animais seguem um padrão semelhante. A maioria dos estudos em ratos e camundongos mostra melhores resultados na aceleração da cicatrização de feridas (ANDERS et al., 2002; GARCIA; OKAMOTO; KINA, 1996; KANA et al., 1981; MESTER; SZENDE; TOTA, 1969² apud MESTER; MESTER; MESTER, 1985; MESTER et. al., 1971; PINFILDI et al., 2005; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997). Já outros, não relatam a observação dos efeitos do laser na cicatrização de feridas em cães (IN de BRAEKT et al., 1991), ratos (HALL et al., 1994; WALKER et al., 2000), camundongos (LOWE et al., 1998) e coelhos (BRAVERMAN et al., 1989).

2.3 Estudos com cultura de células

As pesquisas com cultura de células têm mostrado, em sua maioria, resultados positivos da LILT na cicatrização de feridas, pois permitem avaliar, separadamente, cada tipo celular envolvido nesse processo.

² Mester E, Szende B, Tota JG [Effect of low intensity laser radiation, repeatedly administered over a long period, on the skin and inner organs of mice]. *Radiobiol Radiother (Berl)* 1969;10(3):371-7.

Soudry et al. (1988) realizaram uma pesquisa *in vitro* dos efeitos do laser de He-Ne em cultura de fibroblastos gengivais humanos. Foi utilizado o laser de He-Ne (632,8nm) por vários dias e com dose de 1,2J/cm². Houve aceleração do crescimento celular em relação ao grupo controle e o melhor efeito foi obtido com 4 dias de tratamento.

Para verificar os efeitos do laser He-Ne (632,8nm) na cicatrização de feridas, Pourreau-Schneider et al. (1989) fizeram um estudo com cultura de fibroblastos gengivais humanos. As células foram irradiadas com laser de He-Ne, com densidade de potência de 10 mW/cm², densidade de energia de 1,2J/cm² durante 10 min. Os grupos receberam 0, 1, 2 e 3 aplicações de laser no 4º, 7º e 11º dia de plaqueamento, respectivamente. Os resultados mostraram que a irradiação aumentou a proliferação dos fibroblastos e induziu mudanças morfológicas em nível ultraestrutural como hiperplasia mitocondrial e desenvolvimento de microfilamentos citoplásmicos. As células que receberam múltiplas irradiações dobraram seu número em comparação as que receberam única aplicação.

Utilizando cultura de fibroblastos humanos, van Breugel e Bär (1992) testaram a proliferação celular e produção de colágeno tipo I, variando a potência e o tempo de exposição durante a aplicação de um laser He-Ne (630nm). A irradiação foi feita por 3 dias, em períodos de 0,5 a 10min, e potências entre 0,55 a 5,98mW. Seus resultados mostraram que potências abaixo de 2,91mW intensificaram a proliferação celular, enquanto que as mais altas não produziram efeito algum. Tais efeitos foram mais pronunciados com 0,5 e 2min de irradiação. Já a produção de colágeno mostrou-se inversamente proporcional à proliferação celular.

Loevschall e Arenholt-Bindslev (1994) realizaram um trabalho *in vitro* com cultura de fibroblastos da mucosa oral de humanos. O laser de GaAlAs (812nm) foi

aplicado uma vez com doses de 4,5 a 4500mJ/cm² (0,004 a 4,5J/cm²). Após a aplicação, timidina tritiada foi incorporada à cultura. Não houve mudanças morfológicas e nem na viabilidade das células após a irradiação, mas a incorporação de timidina tritiada foi mais alta em alguns grupos, o que significou um aumento da síntese de DNA. O grupo que mostrou melhores resultados foi o que recebeu 0,45J/cm².

Num estudo *in vitro*, Yu, Naim e Lanzafame (1994b) investigaram a produção do fator de crescimento transformador (TGFβ) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), por fibroblastos irradiados com laser em vários comprimentos de onda: 630, 640, 650, 660nm. Todos os valores testados provocaram aumento significativo em relação ao controle. Os autores concluíram que o laser modula a liberação de TGFβ e PDGF pelos fibroblastos e sugeriram que a bioestimulação pelo laser pode estar associada à regulação das células via produtos autócrinos dos diferentes fatores de crescimento.

Sakurai, Yamaguchi e Abiko (2000), na realização de uma pesquisa *in vitro*, verificaram os efeitos do laser GaAlAs 830nm na produção de prostaglandina E2 (PGE2) por fibroblastos gengivais humanos. As células foram colocadas em contato com lipopolissacarídeos bacterianos para que a produção da PGE2 fosse estimulada. O laser foi aplicado com doses de 0,95 a 6,32J/cm² e inibiu a produção da PGE2 de forma dose dependente. Após 10 min de irradiação, houve inibição de 90% da sua produção e, após 20min, sua produção estava em nível controle. O mecanismo pelo qual a produção da PGE2 foi reduzida também foi estudado. Os autores chegaram à conclusão de que há uma redução da expressão do gene Ciclooxigenase 2 (COX2) que regula a produção de prostaglandinas.

Almeida-Lopes et al. (2001), utilizando cultura primária de fibroblastos

gingivais humanos, avaliaram os efeitos da LILT no crescimento celular, mantendo a dose fixa ($2\text{J}/\text{cm}^2$) e variando os comprimentos de onda (670, 780, 692, 786nm). Os autores puderam observar que os lasers infravermelhos estimularam o crescimento celular em valores significativamente maiores do que os vermelhos. Outro achado importante foi que as células cultivadas em déficit nutricional (5% SFB) mostraram crescimento significativamente maior que os controles na mesma condição, enquanto que as cultivadas em condições ideais (10% SFB), apresentaram crescimento semelhante ao controle quando irradiadas. Foi sugerido, também, que períodos mais curtos de exposição – conseguidos com aumento da potência - aumentaram o crescimento celular.

Kreisler et al. (2002) investigaram os efeitos do laser GaAlAs (890nm) na taxa de proliferação de fibroblastos humanos gengivais em cultura, com diferentes doses de energia. Foram aplicadas doses de 1,96; 3,92; $7,84\text{J}/\text{cm}^2$ a cada 24h durante dois ou três dias. Em todos os grupos teste houve maior atividade celular em relação aos controles. Houve pico de atividade após 24 horas e depois um decréscimo até o terceiro dia. Os autores sugeriram que a proliferação de fibroblastos pode estar associada a uma produção autócrina de fatores de crescimento.

Marques et al. (2004) avaliaram a síntese de proteínas e a morfologia ultra-estrutural de uma linhagem de fibroblastos gengivais humanos após irradiação com laser GaAlAs – 904nm. A potência utilizada foi 120mW e a densidade de energia $3\text{J}/\text{cm}^2$, durante 24s. Foram observadas algumas mudanças ultra-estruturais importantes nas mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, diminuindo a produção de colágeno tipo I e proteínas por esses fibroblastos.

Com o intuito de investigar os efeitos da LILT com um laser Er:YAG, Pourzarandian et al. (2005) utilizaram uma cultura de fibroblastos gengivais

humanos e irradiação pulsada de 30 a 350 mJ/pulso, com taxa de repetição de 30Hz e 200µs de duração do pulso. A densidade de energia variou de 1,68 a 5J/cm², sendo que a ponta do aparelho foi colocada a uma distância de 15cm da placa de cultura. Após 3 dias de cultivo, observou-se que o laser aumentou significativamente o número de células com irradiações até 3,37J/cm², sendo essa a dose ótima para a proliferação dos fibroblastos.

Azevedo et al. (2006) realizaram um estudo para avaliar o efeito de diferentes densidades de potência (mW/cm²) na biomodulação de fibroblastos gengivais humanos. O laser utilizado foi um diodo GaAlAs, com 2J/cm² de densidade de energia. A variação foi na potência, onde em um grupo foram utilizados 10mW (142,85mW/cm²) e, em outro, 29mW (428,57mW/cm²). O grupo controle não recebeu irradiação e seu número de células foi estatisticamente significante menor do que os outros grupos. O grupo de 10mW apresentou maior crescimento celular durante todo o experimento, levando à conclusão de que quanto menor a densidade de potência, maior o crescimento celular.

2.4 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF)

O termo, fator de crescimento, é utilizado para definir uma classe de proteínas presentes no organismo, as quais coordenam a proliferação celular, a migração direcionada e o metabolismo celular. Cada fator de crescimento é específico para um determinado tipo celular, porém, costuma agir em conjunto uma vez que o organismo possui tecidos variados (LYNCH, 1994).

A descoberta da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) data de observações feitas antes de 1939, em estudos sobre o cérebro, que é particularmente uma fonte rica de atividade mitogênica para fibroblastos (THOMAS, 1987).

A resposta das células alvo aos fatores de crescimento depende da expressão de seus receptores específicos. Tais receptores são antígenos transmembrana que, ao se ligarem ao fator de crescimento, produzem uma cascata de sinais intracelulares que estimulam a quimiotaxia, o crescimento celular, a diferenciação e a produção da matriz extracelular (PARKAR et al., 2001). Existem quatro receptores para os FGF sendo denominados FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4 que são divididos em 3 isoformas cada (IIIa, IIIb, IIIc). Os receptores possuem uma região extracelular, com número variado de sítios semelhantes à imunoglobulina, e uma porção intracelular. Os diferentes membros da família FGF ligam-se aos quatro receptores com diferentes afinidades (WERNER, 1998). Uma das isoformas de FGFR2 (IIIb) tem alta afinidade pelo FGF-7 ou KGF, enquanto que o FGFR-2 tem mais afinidade pelo bFGF (PARTRIDGE et al., 1996).

2.5 Fator de crescimento de queratinócitos (KGF)

Os KGFs são membros da família dos FGFs com características únicas, porque são mediadores parácrinos específicos do crescimento epitelial. As células do estroma produzem esse fator para que ele aja nas células epiteliais que expressam seu receptor. Portanto, é um potente e importante regulador das

interações mesênquimo-epiteliais. O KGF-1 é produzido, principalmente, por fibroblastos dos tecidos conjuntivos e em menor quantidade por células endoteliais e células da musculatura lisa. É o fator responsável pela homeostasia epidermal e também age durante a cicatrização de feridas e doenças de pele. Na cavidade bucal, o KGF-1 está presente em fibroblastos da mucosa e do ligamento periodontal, em inflamações periapicais e epitélio de lesões císticas (SANAIE et al., 2002).

Inicialmente isolado de fibroblastos humanos embrionários, o KGF possui peso molecular de 22.5 kDa, mostrando grande homologia com a família FGF, sendo também chamado de FGF-7. Sua expressão usualmente se restringe aos fibroblastos da derme superficial ou da submucosa logo abaixo da lâmina própria (MACKENZIE; GAO, 2001). O KGF liga-se somente ao receptor FGFR2-IIIb pelo qual tem alta afinidade. É o fator de crescimento mais importante na cicatrização de feridas de pele, particularmente na reepitelização. Também pode influir na proliferação celular e na diferenciação normal dos queratinócitos (WERNER, 1998).

A expressão do KGF é estimulada pelo soro e seus fatores de crescimento principalmente, pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tendo grande importância biológica, pois esses fatores são liberados pelas plaquetas imediatamente após a lesão (Figura 2.4) (WERNER, 1998). Além da fase inicial do processo inflamatório, o KGF é encontrado em estágios mais tardios do processo cicatricial. Nessa fase, as citocinas pró-inflamatórias produzidas por polimorfonucleares e macrófagos (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) são as responsáveis pelo estímulo da expressão do KGF (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Modelo proposto para regulação da expressão do KGF. Lado direito – indução por PDGF imediatamente após a lesão. Lado esquerdo – indução tardia por citocinas pró-inflamatórias oriundas de macrófagos e polimorfonucleares

Para saber o papel do KGF na manutenção gengival e a influência que o ácido retinóico teria na expressão do KGF, Mackenzie e Gao (2001) examinaram a expressão regional do KGF em fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal, comparando-os com os padrões para a pele humana. Os autores puderam observar que a expressão do KGF pelos fibroblastos gengivais foi muito semelhante aos da derme. Já os fibroblastos periodontais tiveram uma expressão bem menor. O KGF foi encontrado nas células logo abaixo das cristas epiteliais e não nos tecidos mais profundos, o que reforça a sua natureza de mediador parácrino. Também puderam concluir que o ácido retinóico influencia o grau de expressão do KGF nessas células, podendo ter um papel importante na diferenciação do epitélio gengival.

Sanaie et al. (2002), investigaram a expressão do KGF por fibroblastos gengivais estimulados por soro, por citocinas pró-inflamatórias e por lipopolissacarídeos. O soro nas concentrações de 5% e 10% foi capaz de estimular 2x a 5x a expressão do fator de crescimento, respectivamente, em fibroblastos

quiescentes cultivados em 1% de SFB nas primeiras 24h. Também foi observado que a IL-1 α , IL-1 β , TNF α e IL-6 induziram de 1,1 a 1,8x a expressão do KGF, tal qual os lipopolissacarídeos. Os autores concluíram seu trabalho com a hipótese de que o aumento da produção de KGF pode estimular a proliferação, migração e invasão do epitélio durante o estabelecimento e progressão da doença periodontal.

McKeown et al. (2003) realizaram um estudo para comparar a produção de KGF por fibroblastos do ligamento periodontal e por fibroblastos gengivais da lâmina própria logo abaixo do epitélio. Também investigaram a influência de citocinas IL-1 β e dos fatores TGF- β , EGF e PDGF na expressão do KGF por essas células. Utilizaram-se de culturas primárias com células entre as passagens 3 e 5. Os autores puderam observar um estímulo na produção do KGF pela IL-1 β , enquanto que o TGF- β , PDGF e EGF causaram uma inibição na sua expressão.

2.6 Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF)

O fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) é também conhecido como FGF-2, tem peso molecular de 18kDa e foi primeiramente identificado como uma proteína isolada da pituitária (BIKFALVI et al., 1997). É um potente mitógeno para uma grande variedade de células mesodérmicas e neuroectodérmicas, sendo produzido no cérebro, na glândula pituitária, nos rins, no corpo lúteo e na adrenal. Ele age na angiogênese, na neurogênese e no desenvolvimento embrionário (TAKAYAMA et al., 2002). De todos os fatores de crescimento, o bFGF tem provavelmente a maior variedade de células alvo, incluindo todas as diversas células

envolvidas na cicatrização de feridas. Diferente do KGF, o bFGF não é restrito em sua especificidade e modula as células epiteliais e mesenquimais com ações parácrinas e autócrinas (MACKENZIE; GAO, 2001). O bFGF é liberado das células por processos passivos como morte celular, lesão ou injúria química. Também pode ser estimulado por irradiação, produtos resultantes da quebra da fibrina, e liberado por células endoteliais quando estas são expostas aos polimorfonucleares (BIKFALVI et al., 1997).

Yu, Naim e Lanzafame (1994a) avaliaram a capacidade do laser de estimular a produção do bFGF. Para isso, utilizaram fibroblastos 3T3 irradiados por um laser vermelho (660nm) com densidades de potência de 2,16 e 3,24J/cm², durante 4 e 6min, respectivamente. A produção dos fatores de crescimento foi determinada pelo teste ELISA. Os resultados mostraram que a concentração de bFGF foi significativamente maior no grupo irradiado com 2,16J/cm² em relação ao controle. Os autores concluíram que o laser pode estimular a produção de bFGF e que esse estímulo gera crescimento dos fibroblastos via produção autócrina do fator de crescimento.

Partridge et al. (1996) estudaram a expressão de bFGF, KGF e receptores FGFR-1 e FGFR-2 em mucosa humana normal e em carcinoma de células escamosas. Na mucosa oral normal, apenas algumas células próximas às projeções epiteliais expressaram bFGF. Já nos tumores, houve forte expressão desse fator de crescimento. Os autores sugerem que o bFGF é armazenado nos queratinócitos e liberado somente em caso de lesão. Já o KGF é fortemente expresso nas bordas de feridas, sugerindo um papel no processo reparativo. O receptor predominante na mucosa oral foi o FGFR-2 que se liga ao KGF produzido pelo tecido conjuntivo. Tal

fato leva à conclusão de que há um mecanismo parácrino de ação desse fator de crescimento que influencia tanto a mucosa normal quanto a mucosa dos carcinomas.

Takayama et al. (2002) examinaram a expressão e distribuição do FGF-2 e de seus receptores no epitélio gengival, juntamente com seus efeitos na proliferação celular. Os autores puderam observar que as células epiteliais expressaram os quatro receptores para FGF, sendo que as do ligamento periodontal expressam somente o FGFR-1 e 2. Um achado interessante foi que o epitélio não produz FGF-2, enquanto que os fibroblastos gengivais sim. Porém, esse fator de crescimento está presente nos espaços intercelulares do epitélio, ancorados em proteoglicanas, como se fossem uma reserva, tendo um importante papel na homeostasia, citodiferenciação e cicatrização de feridas. Os autores sugeriram que a expressão do FGF-2 pelo epitélio pode ser influenciada pelas lesões teciduais.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa é verificar os efeitos da irradiação com laser em baixa intensidade na produção de fatores de crescimento (FGFb, KGF) por fibroblastos gengivais humanos *in vitro*, comparando-se os lasers vermelho e infravermelho em diferentes densidades de energia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob protocolo 202/05 (Anexo A). Foram escolhidos pacientes que necessitassem de cirurgia periodontal de aumento de coroa clínica onde a mucosa bucal, que seria descartada, foi doada para a realização das culturas primárias e deste trabalho. Foram excluídos do estudo pacientes fumantes, etilistas, grávidas, portadores de doenças sistêmicas que contra-indicassem o procedimento cirúrgico e portadores de hiperplasia gengival medicamentosa ou hereditária. O procedimento foi realizado após leitura da carta de informação ao paciente, esclarecimento de todas as dúvidas e assinatura do consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

4.2 Fase 1 - Obtenção da cultura primária

No presente estudo, culturas primárias de fibroblastos foram obtidas a partir de fragmentos de gengiva humana através da técnica combinada de explantes e processamento enzimático (FRESHNEY, 2000) (Figura 4.1).

Das culturas obtidas, foi conseguida uma linhagem primária com o material fornecido por uma paciente do sexo feminino, 59 anos, raça branca. A linhagem recebeu a denominação de FGH (fibroblastos gengivais humanos).

Figura 4.1: Esquema demonstrando obtenção da cultura primária. Após dissecção minuciosa do fragmento mergulhado em PBS, foi feita centrifugação e ressuspensão em tripsina. Após ressuspensão em meio de cultura, os fragmentos foram colocados em frascos de cultivo. No primeiro detalhe, foto do explante gengival rodeado de fibroblastos e no segundo, fibroblastos no estágio de subcultivo (Aumento original 10x)

As várias etapas do crescimento celular podem ser observadas na figura 4.2.

Figura 4.2 - Etapas da proliferação dos fibroblastos. **a** - Adesão das células. **b** – Fibroblastos sem atingir a subconfluência. **c/d** – Fibroblastos subconfluentes com núcleos alongados e distribuição paralela (Aumento original 10x)

4.3 Fase 2 - Determinação da concentração de soro fetal bovino

Antes de iniciar as fases propostas deste projeto, foi necessário encontrar a porcentagem de soro fetal bovino ideal para suplementar o meio de cultivo das células de forma que estas entrassem em estado de quiescência. Dessa forma, obteve-se uma uniformização da etapa do ciclo celular (G0) para todas as células (CAMPISI; MORREO; PARDEE, 1984; SANAIE et al., 2002). Para tal, foram testadas cinco concentrações de soro fetal bovino no meio de cultivo.

Quatro placas de 96 poços foram plaqueadas com 500 células FGH por poço,

na 5ª passagem. Cada placa foi analisada em um tempo experimental: 24, 48, 72 e 96h após o plaqueamento celular. Os grupos constituíram-se de DME com 10%, 7,5%, 5%, 2,5%, 1% e 0% de SFB, sendo que para o *blank* foi utilizado DME sem SFB. Todos os grupos continham 8 réplicas (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Distribuição dos meios com diversas concentrações de SFB nos poços da placa

Os dados do crescimento celular em função de diferentes concentrações de SFB foram obtidos através da análise da viabilidade celular. Essa análise se baseou no teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difeniltetrazólio) (MOSSMAN, 1983). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e, então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562nm. Para análise estatística, os dados de densidade óptica (DO), ou seja, de viabilidade celular, obtidos em oito réplicas para cada grupo, foram apresentados como média, desvio-padrão e erro-padrão da média (EPM). Os dados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi 5 % ($p < 0,05$).

4.4 Fase 3 - Irradiação com laser em baixa intensidade

Para essa etapa do experimento utilizaram-se fibroblastos FGH na 5ª passagem, os quais foram contados pela técnica da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan (FRESHNEY, 2000). Foram plaqueadas 5×10^3 células em poços alternados obedecendo ao esquema da figura 4.4. Cada grupo experimental (G1 a G12) foi constituído de 4 réplicas denominadas por letras (a,b,c,d).

Figura 4.4 - Distribuição alternada dos grupos em duas placas de 96 poços para evitar interferência do laser entre eles. Os controles (G1 e G7) foram colocados na primeira fileira de cada placa. Todos os grupos foram constituídos de 4 réplicas

O experimento que determinou o número de 5×10^3 células/poço está descrito no apêndice B (Tabela Ap.B1).

Os grupos experimentais e seus respectivos tempos de aplicação foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo 1 (G1):** Controle negativo sem irradiação – 1% SFB
- **Grupo 2 (G2):** laser infravermelho - $2\text{J}/\text{cm}^2$ - 2s
- **Grupo 3 (G3):** laser infravermelho – $3\text{J}/\text{cm}^2$ - 3s
- **Grupo 4 (G4):** laser infravermelho - $4\text{J}/\text{cm}^2$ - 4s
- **Grupo 5 (G5):** laser infravermelho – $5\text{J}/\text{cm}^2$ - 5s
- **Grupo 6 (G6):** laser infravermelho - $6\text{J}/\text{cm}^2$ - 6s
- **Grupo 7 (G7):** Controle positivo sem irradiação – 10% SFB
- **Grupo 8 (G8):** laser vermelho – $2\text{J}/\text{cm}^2$ - 2s
- **Grupo 9 (G9):** laser vermelho – $3\text{J}/\text{cm}^2$ - 3s
- **Grupo 10 (G10):** laser vermelho – $4\text{J}/\text{cm}^2$ - 4s
- **Grupo 11 (G11):** laser vermelho – $5\text{J}/\text{cm}^2$ - 5s
- **Grupo 12 (G12):** laser vermelho – $6\text{J}/\text{cm}^2$ - 6s

4.4.1 Determinação da real potência do laser na monocamada celular

Como o laser teria que atravessar uma camada de poliestireno de 1mm de espessura do fundo da placa, até atingir a monocamada celular, optou-se por realizar um experimento que permitisse calcular a real potência que as células receberiam. Inicialmente, a área do *spot* do feixe laser ($0,04\text{cm}^2$) foi calculada em

função de sua divergência e da distância de 1mm da ponta ativa, passando a ser considerada com 0,042cm². Para a complementação dos cálculos, a real emissão de potência de cada comprimento de onda do equipamento na monocamada celular foi medida conforme o experimento descrito abaixo.

Foi cortado um disco do fundo de 1 poço da placa de 96 poços, com um diâmetro compatível com a cavidade circular do medidor de potência, onde se encaixa a ponta do laser. Foram realizadas então, cinco irradiações, sem o plástico, com o laser vermelho e logo em seguida, mais cinco irradiações com o plástico em posição. O mesmo procedimento foi repetido para o laser infravermelho.

As diferenças entre os valores obtidos, com e sem o disco de plástico, foram avaliados estatisticamente com o teste t a um nível de significância de 5%(p<0,05).

Para os cálculos de tempo de aplicação, a potência utilizada foi de 40mW para ambos os grupos e a seguinte fórmula foi utilizada:

$$t = \frac{dE \cdot A}{P}$$

Considerou-se t, o tempo de aplicação em s, dE, a densidade de energia em J/cm², A, a área do feixe em cm² (0,042cm²) e P, a potência em W. A densidade de potência utilizada foi 1W/cm².

De posse dos valores calculados e após o plaqueamento em meio com 10% SFB, as células foram incubadas em estufa por 24h para atingir o estado de subconfluência nos poços. Após esse período, todos os poços receberam meio com 1% SFB, e este foi mantido por mais 24h para que as células entrassem em estado de quiescência (SANAIE et al., 2002).

No dia seguinte, foi adicionado meio com 10% SFB em todos os poços, com exceção do G1, que foi substituído por novo meio com 1% SFB e procederam-se as duas irradiações com intervalo de 6h entre elas. Todas as amostras sofreram as mesmas induções ambientais como luz, temperatura e tempo fora da incubadora. A irradiação foi feita com o laser diodo em baixa intensidade Twin laser (MM Optics – São Carlos-SP) com comprimento de onda de 780nm (infravermelho próximo) e 660nm (vermelho) (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Aparelho Twin laser utilizado no estudo. As irradiações foram feitas obedecendo às normas de segurança com a utilização de óculos de proteção específicos para cada comprimento de onda

O equipamento de laser, cujas especificações estão no quadro 4.1, foi fornecido pelo Laboratório Especial de Laser em Odontologia da FOU SP (LELO). A potência foi aferida com o LaserCheck Powermeter (Coherent, Inc., Santa Clara, CA) a cada aplicação (Figura 4.6).

	Potência Máxima	Comprimento de onda	Meio ativo
Vermelho	40 mW	780 nm	AlGaInP
Infravermelho	70 mW	660 nm	GaAlAs

Quadro 4.1 - Especificações do Twin laser

Figura 4.6 - Aferição da potência de saída do laser com o medidor de potência

As placas foram posicionadas de maneira que a ponta ativa do laser ficasse totalmente em contato com o fundo dos poços (Figura 4.7). O laser não sofreu alterações inerentes ao fato de ter que atravessar o meio de cultura, ainda assim, optou-se pela utilização de um meio de cultura transparente (sem fenol vermelho) (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; MOORE et al., 2005).

Figura 4.7 - Aplicação do laser diretamente na base da placa a fim de que a irradiação seja feita diretamente na monocamada celular

Além disso, as placas foram envolvidas por uma máscara de cartolina negra com furos localizados na posição dos poços dos grupos experimentais (Figura 4.8 a,b,c). Uma tela interna deslizante de cartolina negra com apenas um furo (Figura 4.8 b,e) era encaixada de maneira que somente o poço a ser irradiado ficasse descoberto (PEREIRA et al., 2002). O orifício da máscara tinha exatamente o diâmetro da ponta ativa do laser (Figura 4.8 d,f).

Figura 4.8 - Máscara feita de cartolina negra adaptada à placa (a/c), com tela interna deslizante (b/e), a fim de deixar exposto somente o orifício que recebeu irradiação (d/f)

Após a primeira irradiação, aguardaram-se 6h e realizou-se uma segunda aplicação de forma idêntica à primeira. No dia seguinte, o meio condicionado foi transferido para tubos tipo Eppendorf e centrifugados a 15000g (13000 rpm), durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado, congelado a -70°C e estocado até o momento da realização dos testes para a determinação da quantidade de bFGF e KGF.

4.7 Fase 4 – Quantificação dos fatores de crescimento (KGF e bFGF)

A quantificação dos fatores de crescimento foi feita através de testes imunoenzimáticos (ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay). Para sua realização, os meios condicionados, estocados a -70°C , foram descongelados em geladeira e mantidos em gelo durante todo o experimento a fim de preservar as proteínas existentes. Foram utilizadas apenas 3 réplicas de cada grupo experimental (réplicas a,b,c), as quais foram distribuídas em duplicata na placa ELISA conforme o esquema da figura 4.9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BK	BK	G1a	G1a	G1b	G1b	G1c	G1c	G2a	G2a	G2b	G2b
B	ST1	ST1	G2c	G2c	G3a	G3a	G3b	G3b	G3c	G3c	G4a	G4a
C	ST2	ST2	G4b	G4b	G4c	G4c	G5a	G5a	G5b	G5b	G5c	G5c
D	ST3	ST3	G6a	G6a	G6b	G6b	G6c	G6c	G7a	G7a	G7b	G7b
E	ST4	ST4	G7c	G7c	G8a	G8a	G8b	G8b	G8c	G8c	G9a	G9a
F	ST5	ST5	G9b	G9b	G9c	G9c	G10a	G10a	G10b	G10b	G10c	G10c
G	ST6	ST6	G11a	G11a	G11b	G11b	G11c	G11c	G12a	G12a	G12b	G12b
H	ST7	ST7	G12c	G12c								

Figura 4.9 - Distribuição dos grupos experimentais (3 réplicas), em duplicata, nas placas de ELISA para KGF e bFGF. BK – blank, ST – padrões, G1 a G12 - amostras

Foram utilizados os kits ELISA - Human KGF/FGF-7 Quantikine, Human FGF basic Quantikine (ELISA Kit - R & D Systems Inc. MN – EUA) (Figura 4.10 a/b/c/d/e) - para os quais foram seguidas as instruções de diluição, preparo e leitura, descritos pelo fabricante para cada um dos kits. As etapas podem ser acompanhadas pela figura 4.10.

O imunoensaio utilizado nesse estudo foi o sanduíche ELISA quantitativo, onde um anticorpo monoclonal específico para o KGF ou FGF básico é previamente preparado na placa. Os padrões foram diluídos 10x, já que a quantidade de fator de crescimento, detectável em meio condicionado, é mínima. As amostras e padrões foram pipetadas nos poços e o fator de crescimento presente ligou-se ao anticorpo imobilizado (Figura 4.10f). Após lavagem das substâncias livres um anticorpo monoclonal ligado a uma enzima foi adicionado e novamente foi realizada a lavagem (Figura 4.10g). Após adição da solução substrato, houve desenvolvimento de cor proporcional à quantidade de fator de crescimento presente (Figura 4.10h). A reação de cor então foi paralisada (Figura 4.10i) e sua intensidade foi medida no espectrofotômetro ajustado para 450nm (Figura 4.10j).

Figura 4.10 - Kit ELISA para KGF humano (a). Placa com anticorpo (b). Reagentes utilizados no ensaio (c,d,e). Placa com os padrões e amostras (f). Lavadora automática para ELISA (g). Adição da solução substrato (h). Adição da solução de paralisação (i). Leitora de ELISA programada para 450 nm (j)

O cálculo dos resultados da análise foi feito automaticamente pelo espectrofotômetro através das médias das leituras em duplicata de cada padrão e amostra, subtraídas da média da densidade óptica do padrão zero. A densidade óptica dos padrões *versus* a concentração dos padrões foi colocada em uma curva e os dados foram transformados usando análise de regressão e transformação logarítmica. Os valores, em triplicata, foram analisados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey e análise de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Dunn, quando obedeciam à distribuição normal e não-normal, respectivamente. O nível de significância adotado foi o de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Fase 2 - Determinação da concentração de soro fetal bovino

Foi realizada a curva de crescimento das células FGH nas suas condições ideais de crescimento, quando há a suplementação do meio de cultivo com 10% de soro fetal bovino. Observa-se, na figura 5.1, que essas células levaram 48 h para atingir a confluência. Como esperado, apresentaram inibição de contato, que foi mantida pelos dois dias seguintes (72h e 98h). Os valores podem ser vistos na tabela Ap.A1 (Apêndice A).

Figura 5.1 - Proliferação de fibroblastos FGH, em condições ideais de crescimento (10% SFB), através de densidade óptica (DO) em função do tempo. Barras de erro-padrão da média

Ainda neste experimento, pode-se observar que os meios com 5 % e 7,5 % de SFB promoveram aproximadamente metade do crescimento celular obtido nas condições ideais (10 % SFB) (Figura 5.2). Já as outras concentrações de soro (2,5%, 1%, 0%) promoveram crescimento mínimo, apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao grupo 10% SFB. Optou-se por utilizar a concentração de 1% no experimento com o laser, pois havia necessidade de criar um estado de quiescência, porém, sem morte celular. Houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os períodos de 24h e 48h, que foi o tempo levado pelas células para atingir a confluência. Os dados numéricos encontram-se na tabela Ap.A1 (Apêndice A).

Figura 5.2 - Resposta ao soro fetal bovino em diferentes concentrações. Observa-se a proliferação celular, medida em densidade óptica, em função do tempo. Barras de erro-padrão da média

5.2 Fase 3 - Irradiação com laser em baixa intensidade

5.2.1 – Determinação da real potência do laser na monocamada celular

A média das mensurações, no medidor de potência, para o laser vermelho, sem o plástico, foi $44,1 \pm 0,44\text{mW}$, enquanto que com o plástico em posição, a média foi de $38,8 \pm 0,37\text{mW}$ (Tabela 5.1). A porcentagem calculada de diminuição da potência foi de 12%. Já o laser infravermelho sem o plástico, mostrou $40,04 \pm 0,08\text{mW}$ em média, enquanto que com o plástico, o valor obtido foi $35,3 \pm 0,20\text{mW}$ (Tabela 5.1), ou seja, uma perda de 11,75% na sua potência.

O teste t mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para irradiação direta ou com o plástico em posição ($p < 0,05$).

Tabela 5.1 - Valores medidos pelo medidor de potência quando o laser foi utilizado diretamente ou através do disco de plástico

	Laser vermelho		Laser infravermelho	
	direto	com plástico	direto	com plástico
	43,5	38,5	40,1	35,2
	44,2	39,4	40,1	35,6
	44,6	38,6	40,1	35,6
	43,8	39,1	40	35,3
	44,4	38,7	39,9	35,2
Média	44,1	38,86	40,04	35,38
DP	0,447	0,378	0,089	0,205
EPM	0,183	0,154	0,037	0,084

$p < 0,05$

Como a média de potência real, para o laser vermelho, foi de 44,1mW, calculando-se uma perda média de $\pm 12\%$ chegou-se a um valor próximo dos 40mW necessários para o estudo, portanto manteve-se essa mesma potência no *display* do aparelho (40mW).

Em relação o laser infravermelho, a potência real média foi de 40,04mW, portanto, para compensar a perda causada pela distância, que foi de cerca de 12%, houve a necessidade de se aumentar no *display* o valor da potência para se chegar a uma emissão real final de 40mW. Como no equipamento utilizado só é possível se aumentar a potência de 10 em 10mW, optou-se por utilizar, no *display*, 50mW, que causava uma irradiação sem o plástico de 52,58mW. Calculando-se a perda de 12% pela distância, a monocamada recebeu uma potência de 46,27mW. Devido às restrições que o equipamento oferece, trabalhou-se com duas potências diferentes, porém próximas, que foram descritas como $40 \pm 6,27\text{mW}$ ou $\cong 40\text{mW}$.

5.3 Fase 4 - Quantificação dos fatores de crescimento (KGF e bFGF)

Os resultados da quantificação dos fatores de crescimento, no meio condicionado, mostraram que todos os grupos produziram ambos os fatores de crescimento e que essa produção foi dependente da concentração de soro. Os controles positivos estimularam maior produção de KGF e bFGF que os negativos, com significância estatística (Figuras 5.3 e 5.5; Tabelas Ap.A2 e Ap.A3, apêndice A).

Em relação ao KGF, o teste ANOVA, complementado pelo teste de Tukey, mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) apenas entre os grupos

G1 e G7, ou seja, controles negativo (18,7pg/ml) e positivo (41pg/ml), respectivamente (Figura 5.3) (Tabela Ap.A2, apêndiceA). Os grupos experimentais apresentaram valores intermediários de KGF em relação aos controles, os quais variaram entre 21 e 38,4 pg/ml.

Figura 5.3 - Produção de KGF pelos fibroblastos gengivais submetidos a diferentes densidades de energia. Barras de erro-padrão da média (a,b: $p < 0,05$)

A comparação dos diferentes lasers, isoladamente, como mostra a figura 5.4, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($P > 0,05$), através do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn.

Figura 5.4 - Produção de KGF por fibroblastos gengivais. Comparação entre o laser vermelho e infravermelho. Barras de erro-padrão da média ($P > 0,05$)

Com relação ao bFGF, o teste ANOVA, complementado pelo teste de Tukey, mostrou diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os controles negativo (G1 - 3,13pg/ml) e positivo (G7 - 6,39pg/ml), como pode ser visto na figura 5.5 e tabela Ap.A2 (Apêndice A).

A comparação entre os grupos experimentais e os controles mostrou diferenças estatisticamente significantes entre o controle positivo (G7 - 6,39pg/ml) e o laser infravermelho nas densidades de energia de 3J/cm² (9,65pg/ml) e 5 J/cm² (9,49pg/ml). Esses dados podem ser visualizados na figura 5.5 e tabela Ap.A2 (Apêndice A).

Figura 5.5 - Produção de bFGF por fibroblastos gengivais humanos após diferentes densidades de energia. Barras de erro-padrão da média (comparado aos controles, letras diferentes = $p < 0,05$)

Ao se comparar os dois comprimentos de onda isoladamente, através da análise de Kruskal-Wallis complementada pelo teste de Dunn, o laser infravermelho na densidade de energia de 3J/cm^2 promoveu a maior produção de bFGF ($9,65\text{pg/ml}$). Esta, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas em relação à densidade de energia de 5J/cm^2 do laser vermelho ($5,16\text{pg/ml}$), a qual mostrou a menor produção desse fator de crescimento. (Figura 5.6; Tabela Ap.A2, Apêndice A).

Figura 5.6 - Produção de bFGF por fibroblastos gengivais. Comparação entre os lasers vermelho e infravermelho. Barras de erro-padrão da média (letras diferentes = $p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho procurou esclarecer alguns dos mecanismos de ação da LILT na cicatrização de feridas e estabelecer parâmetros para sua utilização. Os resultados puderam mostrar que ambos os fatores de crescimento estudados foram estimulados pelo soro. Os lasers não foram capazes de influir na produção do KGF pelos fibroblastos, enquanto que o laser infravermelho aumentou a produção do bFGF com densidades de energia específicas.

Apesar de apenas dois fatores de crescimento terem sido estudados, já foi possível mostrar a complexidade dos mecanismos químicos que ocorrem no organismo, pois o KGF e o bFGF agem de forma totalmente diferente. O controle da proliferação e secreção, no caso do organismo como um todo, é um processo muito mais dinâmico comparado a uma cultura de células, porque no organismo há uma hierarquia de estruturas que as controlam. É importante ter em mente que, nos diversos estudos com culturas de células, os passos para o subcultivo, tais como tripsinização, troca do meio, troca dos componentes do soro e variações de temperatura também podem influir na sensibilidade celular à irradiação em baixa intensidade (KARU, 1989). Entretanto, é a partir desses estudos que é possível se encontrarem respostas para os mecanismos de ação do laser e ainda há necessidade de muito mais pesquisas para se chegar a uma resposta concreta.

Na busca de uniformizar parâmetros e mostrar efeitos positivos do laser, Lowe et al. (1998) sugeriram que mais estudos histológicos deveriam ser realizados, onde a histologia de rotina serviria para determinar tipos celulares, proliferação celular e vascular, produção de colágeno e resposta inflamatória. Isso mostra que as

pesquisas com laser têm seguido a ordem inversa pela qual um estudo científico deve ser conduzido. As pesquisas mais antigas eram realizadas em humanos e tratavam de pequenos grupos doentes ou saudáveis. Essas investigações são classificadas como pesquisa clínica de fase I e II. Como os resultados em humanos foram inconclusivos, houve uma tendência a regredir aos estudos pré-clínicos com animais e, mais recentemente ainda, as pesquisas pré-clínicas com cultura de células. Tal fato pode ser claramente observado na revisão de literatura de Cobb (2006), onde um levantamento, entre 1990 e 2005, de artigos sobre laser em Periodontia mostrou que 21% dos trabalhos publicados são laboratoriais *in vitro* enquanto que 13,6% são estudos em humanos com relevância clínica. Vale a pena ressaltar que, nesse mesmo levantamento, 31,7% dos artigos são revisões de literatura.

Seguindo essa tendência inversa, os estudos de Damante et al. (2004 a, b) mostraram que a clínica e a histomorfometria não foram capazes de detectar efeitos da LILT na cicatrização de gengivoplastias em humanos, se eles realmente existirem. É por isso que, na busca dos efeitos do laser em nível molecular, optou-se por realizar o presente estudo.

A utilização de cultura primária justifica-se pelo fato de que alguns aspectos de função especializada são fortemente expressos nesse tipo de cultura, particularmente quando ela se torna confluenta. Nesse estágio, a aparência morfológica está mais próxima do tecido original e, após a terceira passagem, a cultura adquire uma estabilidade e é constituída por células resistentes e de rápida proliferação (FRESHNEY, 2000). Por isso, utilizaram-se células na quinta passagem, o que está de acordo com outros estudos que empregaram células na 3ª (MACKENZIE; GAO, 2001), entre 3ª e 5ª (McKEOWN et al., 2003) e entre 5ª e 15ª

passagens (SANAIE et al., 2002).

Foram utilizadas diversas metodologias para a realização desta pesquisa. Em uma delas, na fase onde se avaliou a resposta da cultura às diferentes concentrações de soro fetal bovino, utilizou-se o método do MTT. Quanto à sua acurácia, Mossman (1983) afirmou que o ensaio é capaz de detectar pequenas quantidades de células vivas, tendo uma grande variação de sensibilidade de 200 a 50000 células/poço. Acrescentou, ainda, que a absorbância é diretamente proporcional ao número de células, sendo que o método não detecta células mortas. Isso o torna mais eficaz, fácil e rápido do que a contagem manual das células.

No experimento com laser, certas dificuldades foram encontradas em relação à definição da metodologia. Foi comprovado que as células cultivadas em déficit nutricional apresentam uma taxa de proliferação menor, mas, quando irradiadas com laser, podem apresentar crescimento semelhante àquelas cultivadas em condições ideais (10% SFB) (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Esta condição é encontrada clinicamente, onde tecidos sob estresse ou afetados por condição patológica, respondem melhor ao estímulo do laser (KARU 1999; TUNÉR; HODE, 1996; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997). Na literatura há uma grande variedade na concentração de SFB utilizada. Os trabalhos de Almeida-Lopes et al. (2001), Marques et al. (2004) e Azevedo et al. (2006) utilizaram 5% de SFB a fim de observar estímulo do laser em baixa intensidade no metabolismo de fibroblastos gengivais humanos. O mesmo ocorreu com Sakurai, Yamaguchi e Abiko (2000), porém, para sua linhagem celular, utilizaram 2% de SFB. Pourzarandian et al. (2005) cultivaram suas células em 0,5% de SFB para observar efeitos de um laser de alta intensidade quando utilizado para LILT.

Devido a experiências anteriores de trabalhos realizados no Laboratório de

Pesquisas Básicas do Departamento de Dentística da FOU SP (ALMEIDA-LOPES et al., 2001, MARQUES et al., 2004, AZEVEDO et al., 2006), a princípio, optou-se por cultivar as células com 5% de SFB para que se criasse uma condição de estresse celular. Logo após a irradiação, houve substituição por um meio sem soro para que houvesse seu condicionamento. Segundo Freshney (2000), o meio condicionado deve ser livre de soro para que não sejam detectadas proteínas pré-existentes e somente sejam analisadas aquelas secretadas pelas células do experimento. Porém, seguindo esse modelo experimental, não se obtiveram quantidades detectáveis de fator de crescimento no meio. Foram feitos vários ajustes na metodologia e repetições do experimento, para se chegar ao resultado final.

Foi necessário utilizar um meio com 1% de SFB para criar um estado de quiescência nas células, conforme descrito no trabalho de Sanaie et al. (2002). Embora esses autores não tenham feito uma pesquisa com laser, eles avaliaram a produção de fatores de crescimento, o que forneceu bases para a modificação da metodologia do presente trabalho. No estado de quiescência, todas as células entram na fase G0 do ciclo celular, e voltam a ser estimuladas para a fase S (síntese de DNA) ao se adicionar meio com 10% SFB (CAMPISI, MORREO E PARDEE, 1984). As células necessitam de soro para metabolizar e secretar fatores de crescimento (WERNER, 1998), portanto, após o estado de quiescência, foi adicionado o meio com 10% SFB e em seguida, se procederam as irradiações. Para evitar qualquer dúvida quanto ao fato do soro conter fatores de crescimento, realizou-se um teste ELISA prévio, onde não se detectaram os fatores de crescimento KGF e bFGF. Assim, as quantidades avaliadas no experimento foram produzidas exclusivamente pelas células.

A determinação de quatro réplicas para os grupos experimentais foi

determinada pelo espaço físico das placas de 96 poços e para garantir uma alíquota extra de material. De acordo com Freshney (2000), culturas de células são preparadas em suspensão uniforme, portanto, grandes números de réplicas são desnecessários para as análises estatísticas, sendo que, usualmente, 3 réplicas são suficientes.

A escolha do Twin laser, para a realização dessa pesquisa, baseou-se na facilidade do laser vermelho e do infravermelho estarem no mesmo aparelho, e na opção de variar a potência e a densidade de energia.

A opção de se utilizar dois comprimentos de onda veio a fim de sanar dúvidas existentes na literatura onde ora o laser vermelho (AZEVEDO et al., 2006; BRONDON; STADLER; LANZAFAME, 2005; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; PORREAU-SCHNEIDER et al., 1989; van BREUGEL; BÄR, 1992; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a,1997), ora o laser infravermelho (KREISLER et al., 2002; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; PEREIRA et al., 2002; SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000; SKINNER et al., 1996), mostraram efeito positivo nos estudos relacionados à cicatrização de feridas.

Poucos trabalhos comparam lasers vermelho e infravermelho, sendo que seus resultados são conflitantes e de difícil comparação por serem realizados em diferentes modelos experimentais. Almeida-Lopes et al. (2001) mostraram que fibroblastos gengivais humanos irradiados com laser infravermelho apresentaram maiores taxas de proliferação do que com o vermelho, enquanto que Moore et al. (2005) encontraram resultados positivos na proliferação de fibroblastos de rato com o laser vermelho e inibição pelo laser infravermelho. No presente trabalho o laser infravermelho estimulou o metabolismo celular aumentando a produção do bFGF. Já

no artigo de Yu, Naim e Lanzafame (1994a) esse resultado foi obtido com o laser vermelho, embora esses autores não tenham feito comparação entre lasers. Almeida-Lopes et al. (2001) afirmaram que ao se utilizar a mesma potência, densidade de energia e tempo de aplicação ambos os lasers tiveram o mesmo efeito na proliferação celular. Já no caso da produção de proteínas, nesta pesquisa, ao comparar G3 com G9 e G5 com G11 (Figura 5.4, Tabela Ap.A2, apêndice A), pode-se concluir que o laser infravermelho estimulou a produção de bFGF sendo o único fator de variação.

Os grupos com diferentes densidades de energia foram baseados no protocolo utilizado por Pereira et al. (2002), onde se verificou que a densidade de energia de 3 e 4J/cm² promoveu significativo aumento da proliferação celular e a de 5J/cm² não teve efeito. Por isso, optou-se por utilizar 2 a 6J/cm² com o intuito de testar se densidades de energia menores, iguais e maiores que o estudo anterior, iriam influir na produção dos fatores de crescimento, partindo-se da hipótese de que a produção de proteínas seria um evento posterior à proliferação celular.

Quanto à potência, utilizou-se $40 \pm 6,24\text{mW}$ para ambos os lasers a fim de evitar mais uma variável no estudo e de facilitar o cálculo do tempo de irradiação que foi de 2, 3, 4, 5 e 6s. Utilizando-se a fórmula para determinação do tempo de irradiação, obtiveram-se números quebrados, impossíveis de se reproduzir de fato, portanto estes foram arredondados para valores inteiros de segundos de exposição. O cálculo dos valores reais dos parâmetros dos lasers pode ser visto na tabela Ap.A4 do Apêndice A.

Em cultura de células, deve-se optar por aumentar a potência para diminuir o tempo de irradiação, pois, se a cultura fica fora da estufa por tempo prolongado, pode haver danos celulares devido a alterações na temperatura e pH do meio

(AZEVEDO et al., 2006). O trabalho de Hawkins e Abrahamse (2006), realizado com cultura de fibroblastos de pele, mostrou um efeito inibitório do laser após irradiar a cultura por 55 min e 88 min. Nesse caso, não só a dose alta de irradiação foi responsável por esse resultado, mas também o tempo em que a cultura ficou fora da estufa.

Van Breughel e Dop Bär (1992) afirmam que a densidade de potência é determinante para a cicatrização de feridas. Azevedo et al. (2006) observaram que menores valores de potência (143mW) foram associados ao maior crescimento celular. Na presente pesquisa, a densidade de potência foi de $1\text{W}/\text{cm}^2$, que é considerada alta e capaz de causar dano térmico às células (RIBEIRO; ZECELL, 2004), o que não foi observado, tal como em outros trabalhos, que utilizaram densidades de potência de até $5\text{W}/\text{cm}^2$ e tiveram crescimento celular maior que os controles positivos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; MOORE et al., 2005). A densidade de potência não costuma ser informada e deve ser descrita, nos artigos, juntamente com os outros parâmetros de irradiação. Os autores, citados no início deste parágrafo (VAN BREUGEL; BÄR, 1992), afirmaram que a maioria dos estudos com laser calcula densidade de potência como um quociente entre a potência total e a área irradiada, assumindo um perfil achatado do feixe de luz. Em seu estudo, comprovaram que a densidade de potência não é constante em todo o feixe, portanto um valor exato não pode ser calculado. Mostram, ainda, que a intensidade nas beiradas do poço é 12x menor que no centro. Por isso optaram em utilizar a potência total como variável em seus experimentos e sugeriram que os resultados encontrados nos estudos são, na verdade, resultados de diferentes efeitos dentro de cada poço, tanto estimulantes, como inibitórios.

O uso do medidor de potência é fundamental em uma pesquisa com laser e apenas metade dos artigos desta revisão de literatura o relataram (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; MOORE et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; POURZARANDIAN et al., 2005; SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a, 1997). Para avaliar se a potência do aparelho era constante, foi utilizado o medidor de potência a cada aplicação do laser.

Apesar de a irradiação ser feita através do fundo da placa, o que não acarretaria interferências na travessia da luz pelo meio, utilizou-se um meio sem fenol vermelho, já que trabalhos anteriores questionaram a possibilidade de o indicador de pH absorver o laser (PORREAU-SCHNEIDER et al., 1989; MOORE et al., 2005)

A frequência de tratamento é extremamente variada nos artigos. A maioria dos estudos com cultura de células, utiliza uma única aplicação do laser (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006;; MARQUES et al., 2004; MOORE et al., 2005; POURZARANDIAN et al., 2005, SAKURAI; YAMAGUCHI; ABIKO, 2000). Já os estudos em humanos variam entre duas (MESTER; MESTER; MESTER, 1985), três vezes por semana (LOWE et al., 1998; IN de BRAEKT et al., 1991), aplicação a cada 48h (DAMANTE et al., 2004a,2004b) ou a cada 72h (AMORIM et al., 2006; RYDÉN et al., 1994). E ainda, os estudos com animais, pela facilidade de controle, testam aplicações diárias (BRAVERMAN et al., 1989; HALL et al., 1994; KANA et al., 1981; YU; NAIM; LANZAFAME, 1997). Os trabalhos, em cultura de células, que comparam irradiações únicas e múltiplas têm mostrado que a segunda opção gera melhores resultados em relação à proliferação e aumento de metabolismo celular. (BRONDON; STADLER;

LANZAFAME, 2005; KREISLER et al., 2002; PORREAU-SCHNEIDER et al., 1989). Brondon, Stadler e Lanzafame (2005) mostraram que duas aplicações ao dia, em cultura de células, proporcionaram maior proliferação celular e aumento do metabolismo, sendo que frequências maiores causaram certa inibição. Apesar de sua pesquisa ter sido feita com um LED, sua metodologia serviu de base para a presente investigação, onde foram utilizadas duas irradiações com intervalo de 6h (que corresponde a um ciclo celular completo).

A escolha do ensaio imunoenzimático (ELISA), para a quantificação dos fatores de crescimento, foi baseada em estudos anteriores que utilizaram essa mesma metodologia (McKEOWN et al., 2003, SANAIE et al., 2002, YU; NAIM; LANZAFAME, 1994a). E também, por ser um ensaio quantitativo extremamente sensível, que pode detectar doses menores que 15pg/ml de KGF e 3pg/ml de bFGF.

O fato de o laser não estimular a produção do KGF, nas condições criadas neste estudo, pode ser explicada por recentes pesquisas que sugerem uma indução ativa da expressão desse fator de crescimento vinda dos queratinócitos. O artigo de Mackenzie e Gao (2001) mostrou que o KGF é produzido apenas por fibroblastos, logo abaixo do epitélio, não sendo encontrado nas camadas mais profundas. Os dados sugerem que esse estímulo é feito através da liberação da interleucina1 β pelas células epiteliais, a qual aumenta a proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular (WITTE; KAO, 2005). Portanto, as interações mesênquimo-epiteliais podem ser interdependentes. Sanaie et al. (2002) encontraram indução significativa da produção de KGF após a adição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL - 1 α) no meio de cultivo dos fibroblastos. Porém, esta só foi significativa quando comparada ao grupo cultivado com 1% SFB. Nas condições ideais (10% SFB), não houve diferenças significantes quanto à indução pelas citocinas. Esses resultados

estão de acordo com os encontrados no presente estudo, já que nenhum dos fatores estimulantes da produção de KGF ultrapassou os valores obtidos no grupo com 10% SFB. As diferenças, entre os grupos controle positivo e negativo, mostraram que o KGF é diretamente estimulado pela quantidade de soro, o que confirma a afirmação feita no artigo de Werner (1998). Uma pesquisa interessante em relação a esse fator de crescimento seria aliar a indução das citocinas pró-inflamatórias com a do laser, uma vez que no organismo vivo, todos esses fatores agem em conjunto.

Apesar da semelhança dos resultados apresentados, com o trabalho de Sanaie et al. (2002), onde as diferenças foram significantes entre o controle negativo (G1 - 1% SFB) e o positivo (G7 - 10% SFB), houve uma enorme diferença entre as quantidades de KGF encontradas. Ambas as metodologias foram bem semelhantes, porém, neste estudo, o grupo G1 apresentou média de 18,7 pg/ml e o G7, 41 pg/ml. (2.1 vezes). Já naquele, as médias foram de 150 pg/ml e 480 pg/ml respectivamente (3.2 vezes). Essas disparidades talvez se devam a peculiaridades da linhagem celular, como pode ser observado no artigo de McKeown et al. (2003), onde 3 linhagens celulares produziram diferentes quantidades dos fatores de crescimento estudados.

Já no caso da produção de bFGF, houve uma resposta positiva das células ao estímulo do laser. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de Yu, Naim e Lanza fame (1994a) que encontraram aumento da produção do bFGF após irradiação com laser, porém, estes, utilizaram um laser no comprimento de onda vermelho, com densidade de energia de 2,16 J/cm², sendo que densidades maiores não produziram efeito.

Neste trabalho, as densidades de energia de 3 e 5 J/cm² foram capazes de aumentar a produção do bFGF. O fato do valor 4 J/cm² não ter o mesmo efeito

causa certas dúvidas. Uma sugestão, para explicá-lo, seria que o espectro de absorção dos compostos, capazes de estimular a produção do bFGF pelos fibroblastos, estaria diretamente relacionado ao laser infravermelho em densidades de energia específicas. Outra sugestão seria que ao se observar o gráfico comparativo entre os lasers (Figura 5.5), o valor de $3\text{J}/\text{cm}^2$, para o laser infravermelho, foi a densidade de energia que gerou a maior produção do fator de crescimento. Esse valor mostrou diferenças estatisticamente significantes e um erro-padrão da média bem baixo quando comparado ao valor de $5\text{J}/\text{cm}^2$. Talvez, $3\text{J}/\text{cm}^2$ seja a densidade de energia única e mais indicada para se observar tais efeitos em fibroblastos gengivais humanos.

Fujisawa, Miyamoto e Nagayama (2003) mostraram que o bFGF promoveu a proliferação de fibroblastos gengivais de coelhos de maneira dose-dependente quando aplicado na cultura, chegando a aumentar em 18x a síntese de DNA dos fibroblastos. Além de ações parácrinas, esse fator tem ação autócrina (MACKENZIE; GAO, 2001), provavelmente influenciando um mecanismo de autorregulação da proliferação dos fibroblastos. Também aumenta a formação de tecido de granulação e maturação de tecido conjuntivo (ODA; KAGAMI; UEDA, 2004). Bikfalvi et al. (1997) afirmam que o mecanismo pelo qual o bFGF é liberado das células ainda não está claro. Uma suposição seria a liberação por mecanismos passivos como morte celular, lesão, injúria química causada por radiação, calor e citocinas dos polimorfonucleares.

Pourzarandian et al. (2005) sugeriram que a irradiação age como um estímulo mecânico induzindo a proliferação dos fibroblastos e também os trazendo para uma fase secretória ativa precocemente. Como o laser induz mudanças fotoquímicas e fotofísicas nas células, tendo sido sugerido que a vibração dos átomos após a

irradiação gera algum calor e o laser infravermelho é responsável por mudanças físicas nas células (VIEIRA, TARCIRO, 2005)¹, talvez essa seja a explicação pela qual o laser infravermelho estimulou a liberação do bFGF para o meio de cultura.

De qualquer forma, os resultados encontrados são interessantes no sentido de que o laser, ao estimular a produção de bFGF por fibroblastos, pode realizar um importante papel na aceleração da cicatrização de feridas.

Como foi possível observar, a discussão sobre estudos de terapia com laser em baixa intensidade torna-se complexa, pois é difícil comparar trabalhos tão diferentes entre si quanto à metodologia e aos resultados (COBB, 2006). A controvérsia inicia-se a partir de sua denominação na literatura como pode ser observado na estratégia de busca da revisão sistemática de Chow e Barnsley (2005). Esses autores utilizaram cerca de 19 palavras-chave para que se conseguisse o levantamento detalhado dos artigos disponíveis sobre o uso da terapia com laser em baixa intensidade para tratamento de dores cervicais. O mesmo pode ser observado na área odontológica (Quadro 6.1).

¹ Informação obtida no curso “Mecanismos de interação fotoquímica pela laserterapia em baixa intensidade”. ministrado por Prof. Wouber H. Vieira e Prof. Charles Tarciro, na FOU SP, em 2005

Low-intensity laser therapy - LILT
Low-level laser therapy - LLLT
Low-energy laser therapy - LELET
Low reactive-level laser therapy
Low-incident laser therapy
Low-energy photon therapy - LEPT
Low-output laser therapy
Infrared laser therapy
Diode laser therapy
Biostimulation
Photobioactivation
Photobiomodulation
Photobiostimulation
Laser therapy
Light therapy
Phototherapy
Soft or cold or mid laser therapy
Narrow band light therapy
Visible laser therapy

Quadro 6.1 - Palavras-chave utilizadas na literatura em referência à terapia com laser em baixa intensidade (CHOW; BARNSELY, 2005)

Neste estudo, optou-se pelo termo terapia com laser em baixa intensidade (LILT), por ser o mais utilizado e o que melhor exprime o tipo de tratamento. A denominação “laser de baixa potência” – encontrada em muitos artigos - foi excluída pelo fato de que é possível fazer a fotobiomodulação com lasers de alta potência no modo desfocado e afastado dos tecidos como foi mostrado no estudo de Pourzarandian et al. (2005).

Outra dificuldade encontrada, ao tentar comparar estudos com laser em baixa intensidade, é a falta de informação sobre todos os parâmetros utilizados. Os

autores van Breugel e Bär (1992) comentaram sobre a causa dos resultados conflitantes desses estudos ser o grande número de variáveis utilizadas e sua pobre descrição. Após 13 anos, Chow e Barnsley (2005), numa revisão sistemática a respeito do uso da LILT para tratamento de dores cervicais, relataram a mesma marcante heterogeneidade entre estudos, principalmente em relação aos parâmetros de utilização do laser, da dose, da técnica de aplicação e frequência de tratamento. E, ainda, evidenciaram falhas na informação desses parâmetros nos artigos, o que é fundamental para análise e comparação entre os estudos. Segundo esses autores, os seguintes parâmetros deveriam ser descritos no texto para uma correta análise dos dados:

- **Parâmetros do laser:** Potência (W ou mW), Modo (contínuo ou pulsado), parâmetros do pulso (frequência Hz, duração do pulso nanossegundos), Meio ativo do laser, comprimento de onda (λ), tipo de ponta, calibração do aparelho de laser em momentos apropriados do estudo.
- **Parâmetros da dose:** densidade de energia (J/cm^2), densidade de potência (W/cm^2), área tratada ou área da ponta ativa (cm^2 ou mm^2), tempo de aplicação (s), número de pontos tratados, número de Joules por ponto (energia por ponto), número total de Joules por tratamento (energia total).
- **Técnica de aplicação:** modo de aplicação (ponto ou varredura), local de aplicação.
- **Tipo de tratamento:** frequência do tratamento (diária, etc.), número de tratamentos.

Brondon, Stadler e Lanzafame (2005) afirmam que em geral, os estudos utilizam fluências entre 1 e $10\text{J}/\text{cm}^2$ e os tratamentos são administrados diariamente, a cada 2 dias ou 3 a 4 vezes por semana. Essas estratégias de

tratamento parecem ter permanecido a partir do empirismo dos primeiros estudos e provavelmente devido às limitações da prática clínica como a necessidade de tratar grande quantidade de pacientes com, na maioria das vezes, apenas um aparelho de laser. Acrescentaram, ainda, que os efeitos fotobiomodulatórios são diferentes nas diversas linhagens celulares e espécies, e isso pode ser a explicação para os resultados conflitantes da literatura.

Baseado no exposto pode-se demonstrar que a terapia com laser em baixa intensidade tem influência positiva na produção de ao menos um fator de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos. Apesar das irradiações não terem influenciado a produção do KGF, em parâmetros específicos, aumentaram significativamente a expressão do bFGF. Esta indução provavelmente está relacionada com a modulação da cicatrização de feridas já reportada na literatura em trabalhos *in vivo*. Portanto, é possível sugerir que a terapia com laser infravermelho nas densidades de energia de 3 e 5 J/cm² seria de importância como coadjuvante na cicatrização de feridas *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

Baseados nas condições deste estudo, concluiu-se que a LILT não influencia a produção de KGF, porém, influencia positivamente a produção de bFGF de maneira dependente do comprimento de onda e da densidade de energia empregados. O laser infravermelho, nas densidades de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e $5\text{J}/\text{cm}^2$, é capaz de aumentar a produção deste fator de crescimento, enquanto que o laser vermelho não a altera.

REFERÊNCIAS¹

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29:179-84.

Amorim JCF, de Souza GR, Silveira LB, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Sur* 2006;4(5):588-94.

Anders JJ, Byrnes KR, Barna L, Chenault VM, Longo L, Miracco C. FGF expression increases with low power laser irradiation during healing of cutaneous wounds in normal and diabetic *psammomys obesus*. [abstract 41] *Lasers Surg Med* 2002;(suppl 14):12.

Azevedo LH, Eduardo F de P, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci* 2006;21(2):86-9.

Basford JR. Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med* 1985;16:331-42.

Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endoc Rev* 1997;18(1):26-45.

Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD, Forde DE, Overfield M, Bapna MS. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med* 1989;9:50-8.

Brondon P, Stadler I, Lanzafame RJ. A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg Med* 2005;36:409-13.

Campisi J, Morreo G, Pardee AB. Kinetics of G1 transit following brief starvation for serum factors. *Exp Cell Res* 1984;152:459-66.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de Periódicos segundo as bases Medline

Carrillo JS, Calatayud J, Manso FJ, Barberia E, Martinez JM, Donado M. A randomized double blind clinical trial on the effectiveness of helium-neon laser in the prevention of pain, swelling and trismus after removal of impacted third molars. *Int Dent J* 1990;40:31-6.

Chomette G, Auriol M, Zeitoun R, Mousques T. Effect of the soft laser on gingival connective tissue. I – Effect on fibroblast. *Histoenzymology and electron microscopy study [Abstract Pubmed]. J Biol Búchale* 1987;15(1):45-9.

Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med* 2005;37:46-52.

Clokie C, Bentley KC, Head TW. The effects of the helium-neon laser on postsurgical discomfort: A pilot study. *J Can Dent Ass* 1991;57(7):584-6.

Cobb CM. Lasers in periodontics: A review of the literature. *J periodontol* 2006;77:545-64.

Damante CA, Gregghi SLA, Sant'Ana ACP, Passanezi E, Taga R. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers Surg Med* 2004a;35:377-84.

Damante CA, Gregghi SLA, Sant'Ana ACP, Passanezi E. Clinical evaluation of the effects of low-intensity laser (GaAlAs) on wound healing after gingivoplasty in humans. *J Appl Oral Sci* 2004b;12(2):133-6.

De Micheli G, Feist IS, Damante CA, Andrade AKP, De Micheli PR. Laser em Periodontia. In: Paiva JS, Almeida RV. *Laser em Periodontia: Atualização clínica baseada em evidências científicas*. São Paulo: Artes Médicas;2005.cap.33,p.533-42.

Fernando S, Hill CM, Walker R. A randomized double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower third molar teeth. *Brit J Oral Maxillofac Surg* 1993;31:170-2.

Freshney IR. *Culture of animal cells : a manual of basic technique*. 4th ed. New York: Wiley; c2000.

Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2003;32(6):358-66.

Garcia VG, Okamoto T, Kina JR. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. Rev Odontol UNESP 1996;25(1):37-48.

Gutknecht N, Franzen R. O laser: função, interação e segurança. In: Gutknecht N, Eduardo CP. A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica. São Paulo: Quintessence; 2004. cap. 3, p. 25-60.

Hall G, Anneroth G, Schennings T, Zetterqvist L, Rydén H. Effect of low-level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. Swed Dent J 1994;18:29-34.

Harris DM. Biomolecular mechanisms of laser biostimulation. J Clin Laser Med Surg 1991;9(4):277-9.

Hawkins DH, Abrahamse H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. Lasers Surg Med 2006;38:74-83.

In de Braekt MMH, van Alphen FAM, Kujipers-Jagtman AM, Maltha JC. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in Beagle dogs. Lasers Surg Med 1991;11:462-70.

Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. Arch Surg 1981;116:293-6.

Karu TI. A suitable model for wound healing: how many times are we to stumble over the same block? Lasers Surg Med 1999;25:283.

Karu TI. Photobiology of low-power laser effects. Health Phys 1989;56(5):691-704.

Kreisler M, Christoffers A B, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809-nm diode laser induced *in vitro* stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. Lasers Surg Med 2002;30:365-9.

Kolarová H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. Lasers Surg Med 1999;24(3):231-35.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts *in vitro*. Lasers Surg Med 1994;14:347-54.

Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation impaired, wound healing model in murine skin. Lasers Surg Med 1998;23:291-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

Lynch SE. The role of growth factors in periodontal repair and regeneration. In: Periodontal Regeneration: current status and direction. St.Louis: Quintessence;1994.

Mackenzie IC, Gao Z. Keratinocyte growth factor expression in human gingival fibroblasts and stimulation of *in vitro* gene expression by retinoic acid. J Periodontol 2001;72:445-53.

Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. Lasers Surg Med 2004;34(3):260-5.

McKeown STW, Hyland PL, Locke M, Mackenzie IC, Irwin CR. Keratinocyte growth factor and scatter factor expression by regionally defined oral fibroblasts. Eur J Oral Sci 2003;111:42-50.

Mester E, Mester A, Mester A. The biomedical effects of laser application. Lasers Surg Med 1985;5(1):31-9.

Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. Amer J Surg 1971;122(4):532-5.

Miserendino LJ, Pick R. Lasers in dentistry. Carol Stream: Quintessence; 1995.

Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*. Lasers Surg Med 2005;36:8-12.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983;65:55-63.

Neiburger EJ. Rapid healing of gingival incisions by the Helium-Neon diode laser. *J Mass Dent Soc* 1999;48(1):8-13.

Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:73-80.

Parkar MH, Kuru L, Giouzele M, Olsen I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Arch Oral Biol* 2001;46:275-84.

Partridge M, Kiguwa S, Luqmani Y, Langdon JD. Expression of bFGF, KGF, and FGF receptors on normal oral mucosa and SCC. *Eur J Cancer* 1996;32B(2):76-82.

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31:263-7.

Pinfildi CE, Liebano RE, Hochman BS, Ferreira LM. Helium-Neon laser in viability of random skin flaps in rats. *Lasers Surg Med* 2005;37:74-7.

Porreau-Schneider N, Soudry M, Remusat M, Franquin JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int* 1989;20:887-93.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SMPM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2005;76(2):187-93.

Ribeiro MS, Zezell DM. Laser de baixa intensidade. In: Gutknecht N, Eduardo CP. *A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica*. São Paulo: Quintessence; 2004. cap. 5, p. 217-40.

Rydén H, Persson L, Preber H, Bergström J. Effect of low power level energy laser irradiation on gingival inflammation. *Swed Dent J* 1994;18:35-41.

Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Europ J Oral Sci* 2000;108(1):29-34.

Sanaie AR, Firth JD, Uitto VJ, Putnins EE. Keratinocyte growth factor (KGF) -1 and -2 expression in human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 2002;37:66-74.

Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J* 1996;41(3):188-92.

Smith K. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. *Laser Ther* 1991;3:19-24.

Soudry M, Franquin JC, Porreau-Schneider N, Martin PM. Effect of a helium-neon laser on cellular growth: an in vitro study of human gingival fibroblasts [Abstract Pubmed]. *J Biol Buccale* 1988;16(3):129-35.

Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol* 2002;73:1467-73.

Tam G. Low power laser therapy and analgesic action. *J Clin Laser Med Surg* 1999;17:29-33.

Thomas KA. Fibroblast growth factors. *FASEB J* 1987;1:434-40.

Tunér J, Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Edsbruk: Prima Books; 1996.

van Breugel HHFI, Bär D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992;12:528-37.

Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med* 2000;26(1):41-7.

Walsh LJ. The current status of low-level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust dent J* 1997;42(4):247-54.

Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998;9(2):153-65.

Wilden L, Kerthein R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Caser Med Surg* 1998;16(3):159-65.

Witte RP, Kao WJ. Keratinocyte-fibroblast paracrine interaction: the effects of substrate and culture condition. *Biomaterials* 2005;26:3673-82.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol* 1994a;59(2):167-70.

Yu W, Naim JO, Lanzafame R. The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF- β & PDGF from fibroblasts *in vitro* [abstract 34]. *Lasers Surg Med* 1994b;(Suppl 6):8.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers Surg Med* 1997;20(1):56-63.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 202/05**

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa *"Efeito da terapia com laser em baixa intensidade na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Carla Andreotti Damante**, sob orientação do Professor Doutor **Giorgio De Micheli**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2006

Prof.Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Carta de informação ao paciente e termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado Sr.(a)

A pesquisa **“Efeito da terapia com laser em baixa intensidade na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos,”** constitui o trabalho de tese de doutorado da Prof.^a Carla Andreotti Damante, sob orientação do Prof. Dr. Giorgio De Micheli e será desenvolvida nas dependências físicas da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os itens abaixo incluem esclarecimentos sobre os procedimentos a serem efetuados e por isso recomendamos-os à leitura cuidadosa:

- a) Esta pesquisa justifica-se pela importância de se avaliar os efeitos do uso do laser para acelerar a cicatrização de feridas, reduzir dor e inchaço. As pesquisas atuais mostram efeitos positivos do laser nessas situações, porém precisamos de mais estudos para avaliar quais são os mecanismos de ação desse laser para obter esses resultados.
- b) Para este estudo, necessita-se de um fragmento de gengiva que seria jogado fora durante a cirurgia periodontal pela qual o Sr. (a) irá passar. A cirurgia foi planejada pelo dentista que faz seu tratamento e autorizada pelo professor responsável pela clínica.
- c) Esse fragmento de gengiva será levado para um laboratório e experiências serão feitas com suas células para avaliar os efeitos do laser.
- d) O Sr. (a) não corre nenhum risco com a pesquisa, pois o fragmento gengival seria descartado e todos os procedimentos serão realizados em laboratório.
- e) O Sr. (a) tem a liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Se necessário, pode entrar em contato com o pesquisador responsável Carla Andreotti Damante, pelos telefones: (11)32831554 (residência) / 30917833 (Disciplina de Periodontia).

- f) Ao paciente está assegurado o sigilo dos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Na eventualidade de ocorrência de danos decorrentes da pesquisa, os pesquisadores são responsáveis pela assistência integral necessária à promoção do reparo de tais danos.
- g) Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo).

São Paulo, ____ de _____ de _____

Pesquisador responsável
Carla Andreotti Damante

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador de cédula de identidade nº _____, residente _____, telefones: _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente e/ou seu representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e, ciente de que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

São Paulo , ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador responsável

Carla Andreotti Damante

APÊNDICE A - Resultados das fases 2, 3 e 4 da pesquisa

Tabela Ap.A1 – Resultados do teste de resposta às concentrações de soro fetal bovino

Período	10%	7.5%	5%	2%	1%	0%
24h	0.032	0	-0.004	-0.027	-0.019	-0.041
	0.024	0.013	-0.009	-0.033	-0.011	-0.025
	0.027	0.034	-0.009	-0.024	-0.003	-0.008
	0.018	0.026	0.003	-0.017	-0.021	-0.016
	0.019	0.029	-0.01	-0.024	-0.034	0.054
	0.021	0.037	-0.003	-0.014	-0.035	-0.004
	0.029	0.035	0.008	-0.007	-0.027	-0.011
	0.037	0.034	-0.018	-0.029	-0.031	-0.042
MEDIA	0.026	0.026	-0.005	-0.022	-0.023	-0.012
DP	0.006	0.012	0.008	0.008	0.011	0.028
EPM	0.002	0.004	0.003	0.003	0.004	0.010
48h	0.08	0.047	0.047	0.054	0.027	0.02
	0.062	0.051	0.038	0.041	0.038	0.021
	0.071	0.062	0.051	0.003	0.001	0.004
	0.073	0.044	0.036	0.005	0.008	0
	0.083	0.052	0.054	0.009	0.007	0.002
	0.072	0.055	0.045	0.007	-0.002	-0.011
	0.084	0.062	0.046	0.008	-0.002	-0.009
	0.07	0.067	0.047	0.013	-0.001	-0.001
MEDIA	0.074	0.055	0.046	0.018	0.010	0.003
DP	0.007	0.008	0.006	0.018	0.014	0.011
EPM	0.002	0.003	0.002	0.006	0.005	0.004
72h	0.074	0.053	0.05	0.007	-0.002	-0.007
	0.069	0.038	0.04	0.008	0.001	0.007
	0.06	0.035	0.038	-0.001	0.003	0.007
	0.073	0.016	0.053	0.011	-0.003	-0.03
	0.076	0.055	0.046	0.009	0	0.018
	0.088	0.045	0.038	0.005	0.005	0.002
	0.076	0.055	0.052	0.007	0.009	-0.001
	0.07	0.054	0.041	0.016	0.003	0
MEDIA	0.073	0.044	0.045	0.008	0.002	-0.001
DP	0.007	0.013	0.006	0.005	0.004	0.013
EPM	0.003	0.005	0.002	0.002	0.001	0.005
96h	0.068	0.032	0.042	0.009	0.001	0.048
	0.108	0.047	0.041	-0.001	-0.006	-0.011
	0.094	0.035	0.021	-0.007	-0.003	-0.011
	0.071	0.043	0.037	-0.002	0.003	0
	0.091	0.043	0.041	0.006	0.001	0.006
	0.061	0.041	0.029	0.001	0.007	-0.002
	0.067	0.042	0.036	0.002	0.017	-0.007
	0.064	0.023	0.098	0.006	0.029	-0.004
MEDIA	0.078	0.038	0.043	0.002	0.006	0.002
DP	0.016	0.007	0.022	0.005	0.011	0.018
EPM	0.006	0.003	0.008	0.002	0.004	0.006

DP: Desvio-padrão EPM: Erro-padrão da média

Tabela Ap.A2 – Resultados do teste ELISA para concentração de KGF (pg/ml)

	1% SFB G1	2J/cm ² G2	3J/cm ² G3	4J/cm ² G4	5J/cm ² G5	6J/cm ² G6
	14,4	33,8	25,8	32,2	26,3	23,7
	18,5	32,2	27,9	12,3	22,1	29,5
	23,2	18	26,3	18,5	25,3	32,2
Média	18,7 *	28,0	26,6	21,0	24,5	28,4
DP	4,4	8,6	1,0	10,1	2,1	4,3
EPM	2,5	5,0	0,6	5,8	1,2	2,5

	10% SFB G7	2J/cm ² G8	3J/cm ² G9	4J/cm ² G10	5J/cm ² G11	6J/cm ² G12
	38,5	34,3	47,1	32,7	24,2	43,4
	46,05	35,9	27,4	35,9	31,6	38,5
	38,5	42,3	25,8	46,6	37,5	20,06
Média	41,0 *	37,5	33,4	38,4	31,1	33,9
DP	4,3	4,2	11,8	7,2	6,6	12,3
EPM	2,5	2,4	6,8	4,2	3,8	7,1

* P<0,05 DP - desvio-padrão EPM - erro-padrão da média

Tabela Ap.A3 – Resultados do teste ELISA para concentração de bFGF (pg/ml)

	1% SFB G1	2J/cm ² G2 (lv)	3J/cm ² G3(lv)	4J/cm ² G4(lv)	5J/cm ² G5(lv)	6J/cm ² G6(lv)
	3,42	8,2	9,48	7,82	7,66	6,6
	3,27	7,74	9,78	5,98	10,8	9,18
	2,72	11,4	9,71	6,06	10,01	8,95
Média	3,13 ^a	9,11 ^b	9,65 ^c	6,62 ^b	9,49 ^c	8,24 ^b
DP	0,36	1,99	0,15	1,04	1,63	1,42
EPM	0,21	1,15	0,09	0,60	0,94	0,82

	10% SFB G7	2J/cm ² G8 (V)	3J/cm ² G9 (V)	4J/cm ² G10(V)	5J/cm ² G11(V)	6J/cm ² G12(V)
	6,29	6,75	4,98	6,9	5,21	6,37
	5,68	7,44	5,37	6,37	4,36	8,04
	7,21	7,28	5,91	6,6	5,91	5,98
Média	6,39 ^b	7,15 ^b	5,42 ^{ab}	6,62 ^b	5,16 ^{ab}	6,79 ^b
DP	0,77	0,36	0,46	0,26	0,77	1,09
EPM	0,44	0,20	0,27	0,15	0,44	0,63

Comparado aos controles,
letras diferentes: P<0,05

DP - desvio-padrão EPM - Erro-padrão da média

Tabela Ap.A4 - Valores exatos para cálculo dos parâmetros do laser

Considerando-se a potência 46,27 mW e área do feixe 0,042 cm²

Laser Infravermelho	
Densidade de energia	Tempo (s)
2 J/cm ²	1,82
3 J/cm ²	2,73
4 J/cm ²	3,65
5 J/cm ²	4,56
6 J/cm ²	5,47

Considerando-se a potência 38,8 mW e área do feixe 0,042 cm²

Laser Vermelho	
Densidade de energia	Tempo (s)
2 J/cm ²	2,21
3 J/cm ²	3,31
4 J/cm ²	4,21
5 J/cm ²	5,52
6 J/cm ²	6,63

APÊNDICE B - Experimento que determinou o número ideal de células para plaqueamento

Para determinar a quantidade exata de células a ser plaqueada, por poço, na placa de 96 poços, optou-se por realizar a análise de proteínas totais intracelulares em diferentes concentrações celulares, quando cultivadas em condições ideais (10% SFB) e em condição de subnutrição (5% SFB). O método utilizado foi o de Lowry (1951).

Como esperado, quanto mais células, maior a quantidade de proteínas, porém os números mais altos (10^4 , 10^5), mostraram inibição por contato e morte celular, com as células se destacando das bordas do poço. Segundo o teste t de Student, houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo 10^3 células e os grupos 10^4 e 10^5 ($p < 0,05$). Os resultados foram semelhantes para ambas as concentrações de soro. Como não houve diferenças significantes entre a concentração de 5×10^3 e a de 10^4 células, optou-se pela primeira, a qual não apresentou morte e destacamento celular.

Tabela Ap.B1 – Proteínas totais intracelulares em $\mu\text{g/ml}$ produzidas por diferentes concentrações celulares

nº céls.	10%SFB	5% SFB
10^3 (a)	0	2,52
5×10^3 (ab)	57,23	45,4
10^4 (b)	89,20	89,03
10^5 (b)	78,71	102,46

Letras diferentes: $p < 0,05$

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.