UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

**Estudo *in vivo* dos efeitos biomoduladores de um laser em
baixa intensidade no fator de crescimento endotelial vascular**

BAURU

2007

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

**Estudo *in vivo* dos efeitos biomoduladores de um laser em baixa
intensidade no fator de crescimento endotelial vascular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Odontologia

Área de concentração: Odontopediatria
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

BAURU

2007

Silva, Thiago Cruvinel da
Si38e   Estudo in vivo dos efeitos biomoduladores de um
laser em baixa intensidade no fator de crescimento
endotelial vascular/Thiago Cruvinel da Silva. – Bauru,
2007.
154 p.: il.; 31 cm.

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

**Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.**

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética da FOB-USP: Projeto de pesquisa aprovado

Protocolo nº: 02/2005

Data: 04/04/2005

THIAGO CRUVINEL DA SILVA

Dados Curriculares

---

04 de março de 1979

Nascimento

São José do Rio Preto - SP

Filiação

Antonio Carlos Pereira da Silva

Maria Isabel R. Cruvinel F. Monteiro

1999 - 2003

Curso de Graduação em Odontologia
– Faculdade de Odontologia de Bauru
da Universidade de São Paulo - USP

2005 - 2007

Curso de Pós-graduação em
Odontologia, área de Odontopediatria,
nível Mestrado – Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade
de São Paulo – USP, com bolsa CNPq

Associações

- CROSP – Conselho Regional de Odontologia
- SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

A *Deus*, força motriz do universo, que em nós deposita uma pequena parte de sua energia para podermos caminhar em paz, em busca de nossa felicidade. Sua presença é notada nas mínimas coisas. Agradeço pela vida maravilhosa que possuo. Graças a Ti nunca estarei sozinho no mundo. Enquanto eu crer na Tua existência nada me faltará. Obrigado Senhor.

À minha querida mãe, *Maria Isabel* e meu padrasto, *João Monteiro*, pelo apoio e incentivo incondicionais. Vocês são meu porto seguro, pessoas com que posso contar em todos os momentos difíceis e desanimadores. Agradeço a Deus todos os dias por poder desfrutar de suas companhias e experiências.

Ao meu pai, *Antonio Carlos*, Cirurgião Dentista, que mesmo distante me mostrou como é importante acreditar e lutar para que barreiras até então intransponíveis sejam superadas de forma aparentemente simples.

Ao meu irmão, *Diogo*, amigo sensato e conselheiro. Sua forma de agir e pensar sempre influenciaram minhas condutas perante a vida. Com você aprendi a lutar, respeitando sempre as opiniões alheias e fortalecendo minhas próprias convicções.

Ao meu grande amor, *Agnes*, exemplo constante de dedicação e companheirismo. Agradeço por todos os momentos que você esteve ao meu

lado, compartilhando desejos, frustrações e realizações. Minha caminhada teria sido muito mais árdua sem sua presença. Você representa uma grande razão para que eu continue buscando meus objetivos. Obrigado.

Ao meu primo e padrinho, *Gustavo*, pessoa fundamental na escalada de mais um degrau. Nunca vou esquecer da sua disposição em ajudar e incentivar minhas conquistas. Guardo como exemplos importantes sua generosidade e abdicção.

Aos meus avós, *Edson* e *Neuza*, pela vitalidade, amor, perseverança e exemplos de uma vida digna. Seus ensinamentos ecoam e transgridem épocas ou costumes. A voz de suas experiências me acompanhará eternamente.

A vocês, com todo amor, carinho e admiração, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Mais que um trabalho realizado, esta pesquisa representa o ponto de chegada do curso de Mestrado em Odontopediatria. Sinto-me feliz em ter partilhado momentos de aprendizado tão intenso, seja ele profissional ou pessoal. Os contatos pessoais enriqueceram minhas experiências, possibilitando vencer desafios com mais coragem e determinação. Graças a vocês, hoje posso me considerar um profissional mais completo e preparado. Agradeço profundamente:

- À *Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado*, minha orientadora desde a graduação, verdadeira mestre, condutora dos meus princípios didáticos e científicos. Nossa convivência proporcionou a mim crescimento profissional e o mais importante, pessoal. Sou verdadeiramente grato por sua determinação, exigência e motivação. Sei como foi difícil conseguir concretizar a viabilidade deste estudo, o que me incentivou ainda mais para continuar. Sinto-me, aqui, responsável por representar seu nome e sua reputação profissional. Espero ter correspondido a suas expectativas.
- Ao *Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos*, co-orientador deste trabalho. Professor de magnífica didática, extremamente exigente e detalhista, sempre preocupado em ajudar e solucionar problemas referentes aos seus alunos, até mesmo os pessoais. Sinto-me honrado em poder ter participado, mesmo que de forma fugaz, da sua equipe de trabalho.

- Ao *Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato*, colaborador imprescindível na execução deste estudo. O curso realizado em São Carlos foi fundamental para o melhor entendimento dos mecanismos da laserterapia em baixa intensidade. Além disso, a parceria voluntária com a FOB/USP, cedendo materiais e equipamentos, foi um exemplo de postura de um cientista tão reconhecido e respeitado. Espero ainda poder contar muito com seus ensinamentos. Obrigado.

- À *Faculdade de Odontologia de Bauru – USP*, na pessoa do senhor diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro, e da senhora coordenadora de pós-graduação, Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

- À *Prof^a Dr^a Salete Moura Bonifácio da Silva*, coordenadora do curso de mestrado em Odontopediatria, professora a que eu constantemente recorri para solucionar questões clínico-didáticas. Sua contribuição para minha formação como mestre foi fundamental. Apesar de sua sólida formação acadêmica e científica, sempre esteve atenta às questões didáticas que interferiam na qualidade de aprendizagem dos alunos de graduação. Com isso, transmitiu a mim a essência e importância de um professor universitário da área de saúde: promover o bem social através da formação de recursos humanos mais qualificados para o exercício profissional.

- Ao *Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo* e *Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima*, incentivadores constantes da busca pelo aperfeiçoamento clínico, a essência da Odontologia de qualidade. Filósofos, seus pensamentos simples, adquiridos depois de anos de experiência, traduzem ao aluno sua maior necessidade, segurança para enfrentar o que lhes espera pela frente.
- Ao *Departamento de Ciências Biológicas, Disciplinas de Farmacologia, Fisiologia, Histologia e Anatomia* por propiciarem e facilitarem a realização deste trabalho através da concessão de seus materiais e equipamentos. Agradeço aos professores, Dr. Alceu, Dr^a Inge, Dr. Flávio, Dr. Jesus, Dr. Gérson, Dr. Rumio, bem como à secretária Vera, ao mirim Thiago, às funcionárias Dani e Tânia, sempre muito prestativos, bem-humorados e extremamente profissionais.
- Ao *Thiago José Dionísio*, técnico do laboratório de Fisiologia e Farmacologia, muito competente e extremamente participativo, responsável por solucionar diversos problemas ocorridos no transcorrer deste trabalho. Sua ajuda tornou minha caminhada mais simples e transmitiu segurança em momentos difíceis. Muito obrigado.
- À *Dr^a Elza*, profissional do setor de Imunogenética do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP (Centrinho), pela solicitude e pronta permissão na utilização de equipamentos daquele

setor. Pessoas como você são imprescindíveis para o aprimoramento técnico e científico de jovens pesquisadores brasileiros.

- Ao *Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris*, pela sempre atenciosa forma de nos atender e realizar a análise estatística de nossas pesquisas. Sua ajuda é crucial para a aceitação de nossos trabalhos em revistas de alto impacto científico.
- Aos funcionários do biotério central da FOB/USP, *Luiz, Erasmo, Elias e Richard*, sempre tão prestativos e cuidadosos. A qualidade do trabalho desta equipe foi fundamental para os bons resultados alcançados neste intento.
- À *Fátima, D. Lia, Estela, Lilian e Peterson*, funcionários da Odontopediatria, pelo respeito, carinho, compreensão e profissionalismo. Vocês foram essenciais para o bom andamento de nossas atividades. Conseguimos integrar uma equipe de trabalho saudável, alternando momentos de muita seriedade e descontração.
- À *Thaís e Vivien*, pela amizade, companheirismo e profissionalismo. Nossas relações foram estreitadas por uma série de coincidências, a começar pela orientadora e co-orientador. Porém, nosso trabalho em conjunto foi tão produtivo e prazeroso que acabamos desenvolvendo coisas até então impensáveis, pelo menos para mim. Aprendi muito com vocês durante esses anos. Graças a Deus pude contar com a ajuda de

duas pessoas tão competentes. Agora, espero podermos continuar trabalhando de alguma forma juntos. Muito obrigado, de coração.

- À *Ana Paula, Dafna e Vivian*, colegas e amigas do curso de mestrado, as quais me ajudaram a entender a importância de opiniões divergentes para o crescimento de um grupo de trabalho. Com o passar dos dias, acabamos formando uma grande equipe com poucos participantes. Conseguimos interagir com os colegas do doutorado, participar de projetos inovadores e aumentar o nível de nossas responsabilidades. Arriscamos e muitas vezes acertamos. Sinto orgulho de ter participado de uma turma tão pequena e com tantos frutos, os quais já começaram a ser colhidos. Desejo muita felicidade e sucesso profissional para todas vocês.
- À *Tiza, Andréa e Evaristo*, amigos do curso de doutorado, com os quais tive a honra de conviver de forma tão afável e próxima. Nossas experiências foram muito valiosas para o meu aprimoramento humano. Cada um de vocês, ao seu modo, contribuiu muito para que eu tomasse novas decisões e planejasse outras etapas da minha vida.
- Ao *Adriano, Dani Rios, Érica, Gládis, Heitor, Leandra, Marcelo e Marina*, amigos e verdadeiros professores. Vocês foram peças fundamentais na minha caminhada rumo à pós-graduação. Meu ano de estágio dentro da Odontopediatria tornou-se muito mais produtivo graças ao nosso convívio.

- Aos meus *tios* e *primos*, tão importantes durante a minha caminhada pessoal e profissional. Fazer parte de uma família de cirurgiões-dentistas torna o momento da conclusão deste curso ainda mais especial. Obrigado por estarem sempre presentes em minha vida, mesmo que não conseguindo partilhar constantemente de suas companhias.

- À *D. Ondina* e *Hermes*, pela simplicidade e hospitalidade em que sempre me receberam em sua casa. Espero logo ser admitido na família. Prometo tentar fazê-la crescer mais ainda, dentro em breve. Muito obrigado por todos os cuidados que vocês tiveram comigo esses anos. Sinto-me honrado em ter tido a oportunidade de tê-los conhecido.

- Aos meus amigos *Bruno Vidoti* (Kiwi), *Carlos Eduardo* (Baiacu), *Carol Magalhães*, *Danilo* (Tonto), *Danilo Costa Marques* (Verme), *Eduardo* (Noel), *Fábio Shiratori* (Xang), *Fernando* (Ozzy), *Humberto* (Sossego), *Juliano* (Jaca), *Leonardo*, *Marcelo* (Diastema), *Marcelo Hamata* (Kzo Raro), *Marcos Massaharu* (Mano), *Miguel*, *Otávio* (Alemão), *Moacyr Tadeu*, *Renato Yaedú* (Índio), *Renato Salina* (Barata), *Ricardo Henrique* (Napão), *Ricardo Chaguri* (Ostra), *Prof. Dr. Rodrigo* (Rodrigão), *Rodrigo* (Elias), *Tati Sales* (Nazaré), *William* (Palito), que compartilharam sonhos, desejos, alegrias, tristezas, comemorações e desabafos. Tenho certeza que durante esses anos de mestrado fui muitas vezes chato, impertinente,

ranzinza e extremamente senil. Isso faz com que eu respeite ainda mais cada um de vocês, afinal de contas sempre foram muito tolerantes. Espero poder continuar contando com vocês. Às vezes me calo diante da necessidade e importância da amizade. Porém, nem por isso amo-os menos.

- Aos *Pacientes*, crianças que despertaram em mim o interesse em ajudá-las, desbravando o tão interessante e complexo universo infantil. A vocês dedico meus estudos e aspirações pessoais e profissionais.
- À *MMOptics* pela concessão do equipamento “Twin Laser”, indispensável para realização deste trabalho.
- Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

“O que sou eu, gritei um dia para o infinito

E o meu grito subiu, subiu sempre

Até se diluir na distância.”

Vinícius de Moraes

Resumo

RESUMO

A irradiação laser em baixa intensidade (LLLT) pode promover acelerada epitelização, maior grau de vascularização e aumento da síntese de colágeno nas feridas cirúrgicas. Porém, poucas são as evidências demonstrando que a LLLT influencie diretamente na expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Este estudo investigou e correlacionou a cinética de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ durante o processo de reparo tecidual de feridas em língua de ratos, irradiadas (grupo GIII) ou não irradiadas (grupo GII) com o laser diodo GaAlAs. Foram realizadas pesagens sistemáticas (dias 0, 1, 2, 4 e 6) para estudar os padrões de crescimento e desenvolvimento dos animais. Animais não operados (grupo controle, GI) foram utilizados para posteriores comparações estatísticas dos valores de variação de peso (análise de variância a um critério, teste de Tukey, $p < 0,05$). Após a cirurgia (dia 0), duas sessões de irradiação laser foram realizadas, uma logo após o procedimento operatório (laser infravermelho, 35 J/cm²) e a segunda, 48h após o início do experimento (laser vermelho visível, 5 J/cm²). Os animais foram sacrificados 1, 3, 5 e 7 dias após a cirurgia, para obtenção de amostras de tecido lingual através de biópsia. O RNA total foi extraído pela utilização do método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio. Após a transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), os resultados da eletroforese horizontal permitiram avaliar a razão da expressão de RNAm para GAPDH e VEGF-A₁₆₅ nos grupos GI, GII e GIII (análise de variância a dois critérios, teste de Tukey, $p < 0,05$). A média de variação de peso dos animais do grupo GII foi ao mesmo tempo maior que a do grupo GIII e menor que a do grupo GI em todos os dias de análise, observando-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Apenas durante o sexto dia, não foram observadas diferenças significativas entre as médias de variação de peso dos grupos GII e GIII ($p = 0,220$) e GI e GII ($p = 0,409$). Os valores da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ no grupo GII foram estatisticamente maiores que os do grupo GI ($p = 0,0285$) e GIII ($p = 0,0101$) no primeiro dia de análise. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GI, GII e GIII quando comparados nos demais períodos de tempo. Portanto, o laser diodo GaAlAs foi

capaz de biomodular a expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅ durante o primeiro dia do processo de reparo tecidual de feridas em língua de ratos.

Palavras-chave: cicatrização de feridas, terapia a laser de baixa intensidade, fator de crescimento endotelial vascular, ratos.

Abstract

ABSTRACT

In vivo study of the biomodulator effects of low level laser therapy on vascular endothelial growth factor

Low level laser therapy (LLLT) can promote accelerated epithelization, greater of vascularization and increase of collagen synthesis in surgical wounds. However, few evidences proved that LLLT directly influence in the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF). This study investigated and correlated the kinetic of expression of mRNA VEGF-A₁₆₅ during the tissue repair of wounds in tongues of irradiated (group GIII) or not irradiated rats (group GII) with GaAlAs diode laser. Systematic weighings were performed on days 0, 1, 2, 4 and 6 to study the growth and development standards of the rats, using not operated animals (control group, GI) for future statistical comparisons (one-way ANOVA and Tukey's test, $p < 0.05$). Two sessions of laser irradiation were accomplished, the first one right after the surgical procedure (infrared laser, 35 J/cm²) and the second one, 48h after of the beginning of the experiment (visible red laser, 5 J/cm²). The animals were sacrificed on days 1, 3, 5 and 7 and samples of tongue tissue were obtained. The total RNA was extracted by using of guanidine-isotiocyanate-phenol-chloroform method. After the reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR), the results of horizontal electrophoresis permitted to assess the ratio of mRNA GAPDH and VEGF-A₁₆₅ expression for groups GI, GII and GIII (two-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$). The weight variation of animals of group GII was both greater than that of animals of group GIII and lower of than that of animals of group GI in daily analysis, observing statistically significant differences ($p < 0.05$). Only during the sixth day, significant differences between the averages of weight variation of the groups GII and GIII ($p = 0.220$) and GI and GII ($p = 0.409$) were not observed. The expression of mRNA VEGF-A₁₆₅ in group GII was statistically greater than that of group GI ($p = 0.0285$) and GIII ($p = 0.0101$) in the first day. Significant differences among the groups GI, GII and GIII were not observed in other time periods. Therefore, GaAlAs diode laser was able to modulate the expression of mRNA VEGF-A₁₆₅ during the first day of tissue repair process of wounds in rat tongues.

Keywords: wound healing, low level laser therapy, vascular endothelial growth factor, rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	41
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	47
2.1 Processo de reparo tecidual.....	49
2.2 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores..	56
2.3 Terapia laser em baixa intensidade (LLLT)	63
3 PROPOSIÇÃO.....	77
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1 Animais e caracterização dos grupos experimentais.....	83
4.2 Excisão cirúrgica lingual.....	83
4.3 Utilização do laser diodo arsenieto de gálio e alumínio.....	84
4.4 Critérios de exclusão da amostra.....	86
4.5 Obtenção de espécimes para a execução dos experimentos e número de animais.....	86
4.6 Extração de RNA total das biópsias de tecido lingual.....	87
4.7 Quantificação do RNA total.....	89
4.8 Avaliação da qualidade do RNA total.....	89
4.9 Tratamento do RNA total com DNase.....	89
4.10 Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) ...	90
4.11 Estudo da intensidade para expressão de RNAm para VEGF-A ₁₆₅	93
4.12 Análise estatística.....	94
5 RESULTADOS.....	95
6 DISCUSSÃO.....	105

6.1 A respeito dos métodos empregados.....	107
6.2 A respeito dos resultados obtidos.....	113
6.2.1 Em relação à variação de peso dos animais.....	113
6.2.2 Em relação à variação dos níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅.....	115
7 CONCLUSÕES.....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
APÊNDICES.....	147
ANEXO A.....	153
ANEXO B.....	155
ANEXO C.....	157

1 Introdução

---

1 INTRODUÇÃO

O processo de angiogênese é definido como o brotamento de vasos sanguíneos a partir de um outro pré-existente (GUPTA; ZHANG, 2005) e caracterizado por uma cascata de eventos incluindo degradação enzimática da membrana basal, migração e proliferação de células endoteliais e formação tubular (KLAGSBRUN; D'AMORE, 1996). Este fenômeno fascinou mentes por muitos séculos. Leonardo da Vinci comparou o sistema vascular com uma árvore que se desenvolvia a partir do coração. Comparava os brotamentos da raiz com os capilares sanguíneos e o tronco da árvore com a aorta e artérias (RISAU, 1997). Com a evolução das pesquisas, as explicações trazidas pela biologia molecular e celular permitiram um melhor entendimento da angiogênese fisiológica e patológica.

Uma vasta variedade de fatores de crescimento e citocinas agem diretamente no estímulo e inibição de processos que completam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). Dentre os fatores de crescimento envolvidos no processo de angiogênese tecidual, sabe-se que o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aparece como o mais importante (RISAU; FLAMME, 1995; FERRARA, 1996). O VEGF foi originalmente identificado como uma proteína capaz de aumentar a permeabilidade vascular (SENGER et al., 1983). Posteriormente, também foi constatada sua habilidade em promover crescimento e diferenciação das células endoteliais vasculares (LEUNG et al., 1989).

Estudos mostram a importância da angiogênese durante o processo de reparo tecidual (SCHAFFER; NANNY, 1996; MARTIN, 1997). O reparo tecidual após cirurgias consiste em processo fisiológico que envolve o fechamento e

epitelização da ferida cirúrgica, remodelação do tecido conjuntivo e a formação de cicatriz (CERTOSIMO et al., 1998).

Muitas pesquisas têm se preocupado com o desenvolvimento de terapias coadjuvantes que possam auxiliar o resultado clínico final de cirurgias, promovendo conforto e segurança ao paciente através de um processo cicatricial mais acelerado e eficaz, o que minimizaria riscos de complicações futuras decorrentes de infecções e cicatrizes pronunciadas. O laser em baixa intensidade foi desenvolvido na busca por procedimentos que pudessem diminuir a dor, estimular a reparação, a cicatrização e a regressão de edema, com conseqüente ação antiinflamatória e de bioestimulação celular (DONATO; BORAKS, 1993).

Atualmente, a laserterapia em baixa intensidade é indicada após procedimentos clínicos e cirúrgicos odontológicos realizados em crianças e adultos, como restaurações, exodontias, cirurgias periodontais e colocação de implantes osseointegrados. Além disso, também é bastante utilizada como coadjuvante no tratamento de alterações patológicas, tais como: gengivite, estomatite aftosa, gengivoestomatite herpética, hipersensibilidade dentinária, mucosite, pericoronarite, queilite angular, nevralgia trigeminal, disfunção temporomandibular e alveolite (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003).

Relatos na literatura sugerem que a irradiação laser em baixa intensidade pode promover acelerada epitelização, maior grau de vascularização e aumento da síntese de colágeno nas feridas cirúrgicas (TAKEDA, 1988; KERT; ROSE, 1989; REDDY; STEHNO-BITTEL; ENWEMEKA, 1998; BISHT et al., 1999; YAAKOBI et al., 2001; 2005; BAYAT et al., 2005; CORAZZA, 2005; MAIYA; KUMAR; RAO, 2005; MOHAMMED IHSAN, 2005; SALATE et al., GÁL et al., 2006). Além disso, trabalhos que investigaram os efeitos da terapia laser em culturas de células obtiveram

resultados satisfatórios quanto à proliferação celular e modulação da liberação de fatores de crescimento (YU et al., 1994; WEBB; DYSON; LEWIS, 1998; AGAIBY et al., 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KIPSHIDZE et al., 2001; SCHINDL, 2003; AIMBIRE et al., 2006).

Entretanto, não há fortes evidências científicas demonstrando que a irradiação laser em baixa intensidade influencie diretamente na angiogênese fisiológica e patológica, bem como na expressão do fator de crescimento endotelial vascular. Dessa forma, justifica-se a realização de estudos complementares para o esclarecimento deste aspecto. As informações geradas em tais experimentos poderão contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos do reparo tecidual, podendo gerar o desenvolvimento de formas terapêuticas que visam melhorar este processo.

2 Revisão de Literatura

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo foi dividido didaticamente em tópicos pertinentes às condições aplicadas neste trabalho.

2.1 Processo de reparo tecidual

Os tecidos podem ser lesados tanto por fatores traumáticos quanto por fatores patológicos. Lesões traumáticas podem ocorrer devido a agressões químicas e físicas. As formas físicas que produzem traumatismos aos tecidos incluem temperaturas extremas, ressecamento e/ou obstrução do fluxo sanguíneo arterial ou venoso, incisões, contusões e radiação. As lesões por causas químicas ocorrem pela exposição aos ácidos e/ou bases (HUPP, 1998).

Substituir células lesadas ou mortas precedendo ao reparo tecidual é fundamental para a sobrevivência do organismo. Os agentes lesivos, ao mesmo tempo em que provocam um dano celular, também estimulam importantes eventos para contenção da lesão, além de prepararem as células que não foram letalmente danificadas a se replicarem e substituírem as células mortas (ROBBINS et al., 2000).

O conceito de ferida tecidual pode ser definido como uma interrupção da continuidade anatômica e/ou funcional de tecidos vivos causada por um tipo de agente lesivo (KRAWCZYK, 1978). O processo de cicatrização de feridas consiste em uma seqüência altamente controlada de eventos bioquímicos e celulares que coordenadamente contribuem para a restauração global da integridade funcional de tecidos lesados (SCHARFFETTER-KOCHANKE; KLEIN; KRIEG, 1998). A reparação

não é linear e sim uma integração de processos dinâmicos, os quais envolvem mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas (CORAZZA, 2005).

A cicatrização ou reparo de feridas pode ser classificado em dois tipos: primeira intenção, quando ocorreu reaproximação das bordas do ferimento por meio de sutura; e segunda intenção, quando a ferida cirúrgica é deixada exposta, existindo espaço entre as bordas do ferimento. Este último tipo de cicatrização requer grande quantidade de migração epitelial, deposição de colágeno, contração e remodelação durante todo o processo. Além disso, a cicatrização por segunda intenção é mais lenta, produzindo um tecido conjuntivo mais fibroso (HUPP, 1998).

O reparo normal de tecidos pode ser dividido em três estágios caracterizados por inflamação, proliferação e remodelação, não ocorrendo distinção exata de tempo entre cada período, mas sim eventos característicos, prefixando a duração de cada fase (REED, 1996).

A resposta inflamatória aguda pós-traumática inicia-se logo após a formação da ferida por um agente lesivo e se estende aproximadamente por 10 dias (REED, 1996). Este estágio pode ser caracterizado por três fases que se sobrepõem (ALLER; ARIAS; ARIAS, 2004; ALLER et al., 2004a). A fase imediata ou também chamada de fase nervosa é caracterizada por respostas sensitivas e motoras (ALLER et al., 2004a). O sistema aferente é composto por múltiplos receptores neurais, particularmente de nociceptores, os quais detectam estímulos potencialmente danosos e provocam a sensação de dor (HOLDCROFT; POWER, 2003). A resposta eferente é mediada pelo sistema motor somático, usualmente consistindo na retirada de uma fonte de irritação da parte afetada do corpo (CLARKE; HARRIS, 2004).

Um trauma significativo também produz respostas vasomotoras locais, com o intuito de recuperar a hemostasia. A perda de sangue tecidual ativa as plaquetas e a coagulação sangüínea. O coágulo formado providencia uma barreira física, limitando o influxo de bactérias e debrís contaminados que prejudicariam o reparo tecidual. Além disso, mantém a hidratação do tecido subjacente, reduzindo a possibilidade de infecção e melhorando a migração de células e fatores necessários ao processo de reparo (CERTOSIMO et al., 1998).

Uma vasoconstrição transitória é observada após a ruptura de vasos sangüíneos, com duração de 10 a 15 minutos. Ela tem início pela liberação de aminas vasoativas e se mantém pela influência da liberação de prostaglandinas secretadas pelas células danificadas (MONACO; LAWRENCE, 2003). Porém, após um curto período de tempo, diversos fatores, como produtos endoteliais, prostaglandinas, fatores derivados de mastócitos e, em particular, a histamina, estimulam a ocorrência da vasodilatação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Além disso, a norepinefrina, responsável pela vasoconstrição da microcirculação, é destruída por enzimas intracelulares (CORAZZA, 2005).

À vasodilatação sobrevém um aumento do fluxo sangüíneo, causando eritema e calor, sinais clássicos da inflamação (ROBBINS et al., 2000; ALLER et al., 2006). A permeabilidade vascular facilitada promove extravasamento de líquidos ricos em proteínas em direção ao espaço intersticial, causando edema (ROBBINS et al., 2000). Este processo ocorre com o intuito fundamental de facilitar o acesso de células e mediadores inflamatórios ao local da injúria tecidual, representando um mecanismo de nutrição pela difusão, o que requer baixo consumo de energia (ALLER et al., 2006).

Durante a próxima fase do estágio inflamatório, chamada de fase intermediária ou imune, os tecidos epiteliais e órgãos são infiltrados por células inflamatórias e bactérias (ALLER et al., 2004b). As células inflamatórias liberam enzimas lisossômicas e produtos de oxigênio, além de facilitarem a limpeza de debris tecidual e bactérias (MEDRADO et al., 2003).

Em resposta a estímulos químicos e mecânicos, presença de bactérias e fatores derivados das células, neutrófilos e monócitos são as primeiras células atraídas até o local da lesão. A principal ação dos neutrófilos é a fagocitose. Além disso, estas células são fontes de espécies de oxigênio reativo, importante para a síntese protéica, ácidos nucleicos e uma ampla variedade de espécies moleculares (FUJIMAKI et al., 2003). Os monócitos se diferenciam em macrófagos no espaço tecidual, atuando como auxiliar dos neutrófilos na fagocitose de microorganismos invasores, resíduos de tecidos e células. Os mastócitos possuem grânulos dispersos no interior do seu citoplasma, compostos por um complexo heparina-protéico, atuando como receptores da histamina. A histamina pode estimular a formação de colágeno e cicatrização quando presente em baixas concentrações. Já a heparina estimula a migração de células endoteliais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). O processo de degranulação de mastócitos pode estimular a reparação tecidual devido à liberação de fatores quimiotáticos eosinofílicos de anafilaxia (ECF-A) e fator quimiotático neutrofílico (NCF) que modulam o processo inflamatório, agindo como atraentes químicos de células (EL SAYED; DYSON, 1996). Leucócitos semelhantes a neutrófilos, macrófagos, mastócitos e linfócitos-T são capazes de produzir citocinas e fatores de crescimento que regulam o processo de angiogênese e fibroplasia (AGAIBY et al., 2000).

A infiltração celular intersticial é favorecida pela ação de componentes intrínsecos e extrínsecos da cascata da coagulação. A ativação de trombina a partir do precursor protrombina catalisa a conversão de fibrinogênio de origem intravascular em fibrina insolúvel (ROBBINS et al., 2000; MONACO; LAWRENCE, 2003; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Durante a conversão, formam-se fibrinopeptídeos, indutores da permeabilidade vascular e atividade quimiotática de leucócitos. Além disso, a trombina tem capacidade de aumentar a aderência leucocitária e proliferação de fibroblastos (ROBBINS et al., 2000).

Na fase tardia ou endócrina do estágio inflamatório do processo de reparo tecidual, a nutrição é mediada pela recuperação da função capilar, possibilitando a utilização do oxigênio no metabolismo oxidativo. Este metabolismo é caracterizado por uma grande produção de trifosfato de adenosina (ATP), o qual é necessário para direcionar múltiplos processos celulares mais complexos e especializados. A quantidade produzida de ATP é fundamental para o fornecimento de energia metabólica e restauração das propriedades da membrana celular, além de regular a velocidade e a qualidade do reparo tecidual (ALLER et al., 2004b; ALLER et al., 2006).

As hemáceas ocupam o espaço intersticial na fase endócrina da inflamação com intuito de prover quantidades significativas de oxigênio aos tecidos lesados. Estas células sangüíneas são transportadas por capilares recém formados, o que confere à angiogênese um papel fundamental neste período inflamatório (MCCOURT et al., 1999; LINGEN, 2001).

O termo angiogênese pode ser definido como a emissão de novos capilares sangüíneos a partir de outros vasos pré-existentes (GUPTA; ZHANG, 2005). Após a vasodilatação inicial, ocorre o aumento da permeabilidade e

degradação da matriz circundante, o que permite ativar a proliferação de células endoteliais e a migração para formação de lumens (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001). A angiogênese é essencial para que ocorra o desenvolvimento de tecidos, a homeostasia, a cicatrização e reparo, processos inflamatórios e progressão de tumores sólidos (FOLKMAN; SHING, 1992).

A formação de novos vasos é um processo complexo e de vários estágios, regulado por moléculas indutoras e inibidoras da neovascularização (POLVERINI, 1995). O aumento de novos capilares através de vasos pré-existentes no processo de desenvolvimento e a diferenciação das células endoteliais durante a vasculogênese dependem em grande parte da atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (RISAU; FLAMME, 1995), o mais essencial fator pró-angiogênese (FERRARA, 1996; MCCOURT et al., 1999).

A angiogênese providencia uma rota de vasos sangüíneos para a distribuição de oxigênio e outros nutrientes, bem como um conduto para componentes da resposta inflamatória durante o reparo de feridas (GUPTA; ZHANG, 2005). Um crescimento inadequado ou não regulado de vasos sangüíneos pode resultar em atraso durante o processo de reparo. O VEGF é naturalmente expresso durante diferentes fases da cicatrização (BATES; JONES, 2003). O uso tópico de VEGF-A₁₆₅ foi capaz de reduzir em 50% o tempo de cicatrização de feridas em ratos diabéticos (KIRCHNER et al., 2003). A expressão aumentada de VEGF em terapias gênicas resulta em aumento da densidade vascular e mais rápido fechamento da ferida, havendo um significativo aumento na deposição do tecido de granulação (BATES; JONES, 2003).

Durante as primeiras 24 horas após uma lesão, fibroblastos e células endoteliais vasculares começam a proliferar para formar em 3 a 5 dias o tecido de

granulação, caracterizado histologicamente pela formação de novos e pequenos vasos permeáveis, proliferação de fibroblastos, presença de macrófagos, colágeno imaturo e substância matricial. Os macrófagos são responsáveis pela fagocitose e auxiliam na liberação de fatores de crescimento em conjunto com as plaquetas. Com a proliferação do tecido de granulação, ocorre o estímulo dos fibroblastos e conseqüente produção de colágeno, caracterizando o processo de fibroplasia, presente no estágio proliferativo do reparo tecidual. Na cicatrização de feridas por segunda intenção ocorre a formação de uma quantidade muito maior de tecido de granulação para completar o reparo, quando comparada com a cicatrização por primeira intenção (ROBBINS et al., 2000).

No estágio de proliferação, a presença de colágeno tipo III e tipo V produz parte da membrana basal e uma sustentação estrutural, respectivamente. Inicia-se o processo de contração da ferida, desenvolvido por fibroblastos especiais ricos em actina localizados nas bordas das feridas, denominados miofibroblastos. Tais células realizam contração concêntrica, promovendo o fechamento do ferimento (REED, 1996).

A remodelação, o último estágio do processo de reparo tecidual, consiste na reposição parcial do colágeno tipo III, predominante no estágio proliferativo, pelo colágeno fibrilar maduro, tipo I) (CORAZZA, 2005). As fibras colágenas tornam-se mais espessas e orientadas em paralelismo, resultando em maior resistência à tensão (REED, 1996).

2.2 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi originalmente descrito como uma proteína homodimérica, com peso molecular variando entre 34 e 42 KDa, que tinha a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular na pele. Por isso, foi inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular (VPF) (SENGER et al., 1983). Em 1989, Ferrara e Henzel identificaram um fator de crescimento para células endoteliais, chamando-o de VEGF, o qual foi posteriormente seqüenciado, verificando-se idêntica estrutura ao VPF (LEUNG et al., 1989; KECK et al., 1989).

O VEGF possui a capacidade de aumentar a vascularização tecidual através da indução da migração e proliferação das células endoteliais (FERRARA, 1996), bem como pela sobrevivência destas células, através da ligação com o receptor VEGFR-2 e aumento da regulação de uma proteína anti-apoptótica denominada Bcl-2 (NÖR et al., 1999; TELLES et al., 2003).

Um vasto número de células, incluindo plaquetas, leucócitos polimorfonucleares e neutrófilos, pode secretar o fator de crescimento endotelial vascular (MCCOURT et al., 1999), imprescindível para um correto desenvolvimento embrionário e para progressão de outras condições fisiológicas e patológicas, incluindo reparo tecidual, artrite reumatóide, neovascularização ocular, progressão tumoral, endometriose e doenças cardiovasculares (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

Bioquimicamente, o VEGF pode ser descrito como uma glicoproteína com ligante heparina. Atualmente, sete membros fazem parte de sua família: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F e o fator de crescimento placentário (PIGF) (HOEBEN et al., 2004; ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Todos

os membros da família possuem em comum um domínio homólogo, caracterizado por oito resíduos de cisteína (éxons) separadas por sete íntrons (FERRARA; GERBER; LE COUTER, 2003).

O VEGF-A está localizado no cromossomo 6p21.3 (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Em tecidos normais adultos, altos níveis de RNAm para VEGF-A são encontrados nos pulmões, rins, coração e glândula adrenal. O VEGF-A existe em pelo menos sete isoformas homodiméricas. Os monômeros são constituídos por 121, 145, 148, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos. Estas isoformas diferem umas das outras através da presença ou ausência das seqüências codificadas pelos éxons 6 e 7, exceto na isoforma VEGF-A₁₄₈, onde ocorre uma variável alternativa nos éxons 6 e 7, que codifica dois domínios distintos de ligante heparina (Figura 1). A presença ou ausência desses domínios influencia a solubilidade e a ligação com o receptor para VEGF. O ligante heparina decodificado pelo éxon 6 determina a ligação com a matriz extracelular, tornando as isoformas que possuem este domínio (VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₈₉ e VEGF-A₂₀₆) altamente ligadas a proteoglicanos da superfície celular, enquanto as isoformas que não possuem este domínio são difusíveis (NEUFELD et al., 1999; HOEBEN et al., 2004). Portanto, as isoformas apresentam distintas funções que se sobrepõem no processo de angiogênese (TAMMELA et al., 2005).

Por estimular às células endoteliais a realizarem proliferação, brotamento, migração e formação tubular (FERRARA; GERBER, LE COUTER, 2003), o VEGF-A é considerado uma molécula chave na indução de angiogênese e vasculogênese. A expressão aumentada de VEGF-A produz uma pronunciada resposta angiogênica em diferentes tecidos. Entretanto, resulta em vasos que são freqüentemente grandes, dilatados e com presença de orifícios (BHARDWAJ et al., 2003;

RISSANEN; RUTANEN; YLÄ-HERTTUALA, 2004). Além disso, o VEGF-A realiza a mediação do extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas, podendo contribuir para uma melhor migração de células endoteliais na matriz extracelular (BOOTLE-WILBRAHAM et al., 2001).

Fonte: Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AL, Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004; 56: 549-80.

Figura 1 – Estrutura gênica do VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. O VEGF-A é constituído por 8 éxons e possui 7 isoformas, constituídas por 121, 145, 148, 165, 183, 189 e 206 aminoácidos. Uma isoforma adicional de 110 aminoácidos é resultado de uma quebra proteolítica das isoformas 165 e 189. Existem duas isoformas do VEGF-B, a de 167 e a de 186 aminoácidos. Todos os membros da família VEGF preservam um domínio homólogo, decodificado pelos éxons de 1 a 5.

O gene humano VEGF-B é constituído por oito éxons e seis íntrons e está localizado no cromossomo 11. Apresenta duas isoformas expressas em humanos, uma constituída por 167 aminoácidos e outra constituída por 186 aminoácidos (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). O VEGF-B₁₆₇ é mais abundante e expresso em muitos tecidos, incluindo os músculos esqueléticos e miocárdio, enquanto a isoforma 186 é expressa em menores concentrações e somente em um número limitado de tecidos. O VEGF-B se liga aos receptores VEGFR-1 e Nrp-1 e pode

formar heterodímeros com o VEGF-A. Nenhuma de suas isoformas se liga aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 (NASH et al., 2005).

O papel preciso do VEGF-B *in vivo* não é precisamente conhecido. Estudos com ratos que apresentavam deficiência de VEGF-B mostraram um desenvolvimento de corações menores e recuperação prejudicada após infarto induzido do miocárdio, sugerindo que a formação coronariana colateral pode ser parcialmente atribuída ao VEGF-B (BELLOMO et al., 2000). Foi sugerida, também, a participação do VEGF-B na angiogênese inflamatória (MOULD et al., 2003).

O gene VEGF-C é constituído por sete éxons e localiza-se no cromossomo 4q34. Este fator de crescimento é produzido através da ativação de uma proteína precursora por proteases no espaço extracelular, com o intuito de gerar proteínas homodiméricas com alta afinidade aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGF-C induz mitose, migração e sobrevivência de células endoteliais (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). É considerado um fator de crescimento primariamente linfangiogênico, mediado pelo receptor VEGFR-3 (ENHOLM et al., 2001). Entretanto, o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF-C é mediada pelo receptor VEGFR-2 (KARKKAINEN et al., 2004). O VEGF-C também está envolvido em progressões tumorais e processos inflamatórios relacionados à linfangiogênese (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

O VEGF-D é expresso em muitos tecidos adultos como endotélio vascular, coração, músculos esqueléticos, pulmão e intestino. Seu gene está localizado no cromossomo Xp22.31. É secretado como uma glicoproteína com 48% de homologia estrutural ao VEGF-C. Liga-se aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 (JELSTCH et al., 1997) com o intuito de promover proliferação de células endoteliais e, portanto, mostrando potencial angiogênico e linfangiogênico. Em adultos, pode induzir

crescimento de vasos linfáticos como resposta a eventos patológicos (BALDWIN et al., 2005).

Um membro da família VEGF foi descoberto no genoma do *Orf virus* que infecta ovelhas, cabras e ocasionalmente humanos (LYTTLE et al., 1994). Este tipo de infecção causa lesões proliferativas de pele. Muitas cadeias deste vírus codificam diferentes variantes de VEGF-E, que se ligam especialmente aos receptores VEGFR-2 e Nrp-1, sendo hábeis para estimular mitogênese de células endoteliais e permeabilidade vascular. Sua expressão gênica induz forte resposta angiogênica (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

Recentemente foi descoberto o VEGF-F, identificado em veneno de cobras. O VEGF-F apresenta 50% de sua estrutura primária idêntica ao do VEGF-A₁₆₅ e se liga seletivamente ao receptor VEGFR-2 (SUTO et al., 2005), bloqueando a atividade do VEGF-A₁₆₅ *in vitro* e *in vivo* (YAMAZAKI et al., 2005).

As principais funções do VEGF são promover sobrevivência, induzir proliferação e melhorar a migração e invasão de células endoteliais, contribuindo para a angiogênese. Essas funções são reguladas pela interação do VEGF com seus receptores tirosinoquinase (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005) e conseqüente via de transdução de sinais, gerando uma resposta intracelular (ROBBINS et al., 2000).

Os receptores para VEGF foram inicialmente identificados em células endoteliais. O VEGF se liga a três tipos de receptores tirosinoquinases: flt-1 (VEGFR-1), Flk-1/ KDR (VEGFR-2) e flt-4 (VEGFR-3). Os dois primeiros receptores foram primariamente encontrados no endotélio vascular enquanto o VEGFR-3 foi encontrado no endotélio linfático. Todos eles possuem um domínio extracelular, uma simples região transmembrana e uma seqüência de tirosinoquinase interrompida

pela inserção de domínios de quinase (SHIBUYA et al., 1990; TERMAN et al., 1991). Mais recentemente foi identificada a neuropilina (Nrp-1), um receptor para a família semaforina/colapsina de guia de mediadores neuronais (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005). A Nrp-1 age como um co-receptor melhorando a interação entre VEGF e VEGFR-2, formando complexos com o receptor VEGFR-1 (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

O receptor VEGFR-1 (flt-1) é uma proteína transmembrana com peso molecular de 180 KDa, que se liga ao VEGF-A, PlGF e VEGF-B. A sua afinidade pelo VEGF é dez vezes maior que a do VEGFR-2, mas sua atividade de tirosinoquinase é dez vezes mais fraca que a do VEGFR-2 (PARK et al., 1994). Além de ser expresso em células endoteliais, o VEGFR-1 está presente em monócitos, osteoblastos, macrófagos, pericitos, células sangüíneas, células musculares lisas vasculares e em células coloretais tumorais (BARLEON et al., 1996).

O receptor VEGFR-2 é uma glicoproteína com 230 KDa de peso molecular e liga-se ao VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. É o mediador primário para VEGF (GILLE et al., 2001), transmitindo sinais do VEGF em células endoteliais, gerando vasodilatação, proliferação e migração dessas células (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006). Além das células endoteliais, células hematopoiéticas progenitoras, células endoteliais circulantes progenitoras, células do ducto pancreático, células progenitoras da retina e megacariócitos expressam VEGFR-2 (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005).

O receptor VEGFR-3 é uma proteína glicosilada com peso molecular de 170 KDa, primeiramente clonada a partir de células eritroleucêmicas humanas e cDNA placentário. Encontra-se expresso em células endoteliais embrionárias, mas durante o desenvolvimento humano, sua expressão em vasos sangüíneos diminui e

torna-se restrita ao tecido endotelial linfático adulto (KAIPAINEN et al., 1995). Entretanto, o VEGFR-3 é altamente regulado em células endoteliais de tumores vasculares (ROY; BHARDWAJ; YLÄ-HERTTUALA, 2006).

Células tumorais podem secretar elevados níveis de VEGF sob condições de estresse como hipóxia, radiação e quimioterapia (RIEDEL et al., 2004), o que pode contribuir inadvertidamente para a resistência de células tumorais aos tratamentos de câncer convencionais (LE GOUILL et al., 2004). Em resposta à hipóxia, tumores podem secretar fatores de crescimento angiogênicos para estimular o crescimento de vasos sanguíneos e distribuição de oxigênio. Este processo é mediado pelo fator induzido por hipóxia (HIF-1). Em normóxia, HIF-1 α , proteína citoplasmática sensível aos níveis de oxigênio, é rapidamente degradada, enquanto que em condições de hipóxia é estabilizada e translocada para o núcleo celular. Durante o processo de reparo tecidual, ovulação e arteriosclerose, situações fisiológicas em que se verifica a hipóxia, também ocorre um aumento da regulação dos níveis de VEGF (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005). Muitos fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador – β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) induzem a expressão de RNAm para VEGF-A (ENHOLM et al., 1997). Além disso, a prostaglandina E₂ também causa rápida indução de RNAm para VEGF-A. Os mecanismos dessa indução ainda não estão bem esclarecidos (HARADA et al., 1994).

2.3 Terapia laser em baixa intensidade (LLLT)

A palavra LASER é um acrônimo de origem inglesa que significa “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ou seja, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação (MELLO; MELLO, 2001).

A luz laser é monocromática, composta por fótons de mesmo comprimento de onda e cor. Esta característica é importante devido à absorção seletiva dos tecidos. Além disso, seus fótons são coerentes e propagam-se na mesma direção, movendo-se em fases no tempo e no espaço. A colimação é outra característica que distingue o laser de outras fontes luminosas, sendo possível através da unidirecionalidade e paralelismo da luz ao eixo do tubo que produz esta energia, possibilitando uma divergência angular muito pequena e conseqüente capacidade de concentração do feixe de luz em um ponto focal (GENOVESE, 2000).

Para produzir a luz laser, os aparelhos devem possuir alguns componentes básicos. Uma fonte externa utiliza de uma energia elevada para excitar os átomos através do bombeamento do meio ativo. O meio ativo é constituído por materiais (sólidos, semi-sólidos, líquidos, gasosos, semicondutores e excímeros) que podem produzir a radiação laser. Os átomos emitem fótons que se propagam em várias direções dentro da chamada cavidade ressonante. A cavidade ressonante nada mais é que um tubo contendo espelhos em suas extremidades. Em um dos lados, os espelhos são totalmente refletores e do outro lado são parcialmente refletores (80% da luz são refletidas e 20% transmitidas através do espelho para o exterior). Os fótons emitidos que se propagam paralelamente ao eixo da cavidade ressonante têm grande possibilidade de encontrar outro átomo excitado

e estimular a emissão de fótons adicionais coerentes, amplificando e gerando um grande fluxo de luz de alto nível energético (GENOVESE, 2000).

Dois meios ativos bastante utilizados nas irradiações com laser em baixa intensidade são a mistura gasosa de hélio e neônio (He-Ne) ou os semicondutores diodo de arsenieto de gálio (As-Ga), arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs) e arsenieto de gálio, índio e fósforo (AlGaInP) que produzem radiação na faixa situada entre 630 e 950 nm (BAXTER, 1994). A adição de alumínio na mistura de arsenieto de gálio permite a produção de lasers visíveis na faixa do vermelho. Este laser supostamente apresenta potencial terapêutico elevado em lesões superficiais e profundas, através de um regime de emissão contínua e com comprimento de onda variando entre 620 e 830 nm (GENOVESE, 2000).

Atualmente a luz laser é utilizada como “balanceador e normalizador de funções” (OSHIRO; CALDERHEAD, 1991), pois pode ser utilizada tanto como processo estimulador (TAKEDA, 1988) quanto como inibidor de efeitos (SASAKI; OSHIRO, 1989).

Estudos de Lyons et al. (1987) e Kameya et al. (1995) mostraram que a fotoestimulação com laser em baixa intensidade pode induzir proliferação e divisão celular, aumento da síntese de ATP e produção de ácidos nucléicos. Os ácidos nucléicos constituintes do DNA possuem um espectro de absorção significativa na faixa intermediária e inferior do ultravioleta e na região do infravermelho. Segundo Baxter (1994), na faixa do ultravioleta próximo e no espectro vermelho visível os ácidos nucléicos não apresentam absorção significativa.

A conversão de adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), necessária para o suprimento de energia e direcionamento do metabolismo celular, pode ser influenciada pela luz. Segundo Abt (1995), os citocromos mitocondriais,

responsáveis pela reação anteriormente descrita, são cromóforos ou moléculas fotossensíveis, portanto excitáveis pela luz laser que penetra através dos tecidos. Danhof (2000) observou que o laser trabalha diretamente na permeabilidade da membrana celular, facilitando a mobilidade de íons cálcio, sódio e potássio, portanto, normalizando o potencial da membrana, atuando como modulador da atividade funcional da célula. Também é capaz de aumentar indiretamente a produção de ATP. Silveira, Streck e Pinho (2007) avaliaram a atividade dos complexos II e IV da cadeia respiratória mitocondrial após irradiação de feridas cutâneas de ratos Wistar com utilização do laser diodo arsenieto de gálio (904 nm) pelo período de 10 dias. Os resultados mostraram um aumento significativo na atividade dos complexos estudados quando o laser foi utilizado.

O estudo de Takeda (1988) avaliou os efeitos da laserterapia em baixa intensidade (GaAs, 904 nm, 20 J/cm², 5 min, 1X/dia, 7 dias) no reparo tecidual de alvéolos dentários de primeiros molares superiores direitos de 24 ratos Wistar machos, através de achados histopatológicos. Os animais foram divididos em dois grupos, um experimental e o outro controle. Três animais de cada grupo foram sacrificados nos dias 0, 2, 4 e 7. Os resultados mostraram que a proliferação fibroblástica no segundo dia foi mais acentuada no grupo experimental. Além disso, a formação de tecido osteóide no quarto dia foi mais intensa nos alvéolos irradiados quando comparados aos não irradiados. No sétimo dia, verificou-se maior proeminência de deposição de trabeculado ósseo no grupo teste. Portanto, a utilização do laser semiconductor arsenieto de gálio foi efetiva no processo de reparo alveolar em ratos.

Kert e Rose (1989) relataram alguns efeitos positivos da terapia laser em baixa intensidade, incluindo estímulos no crescimento e regeneração celulares,

aumento da atividade celular e da revascularização. Honmura et al. (1992) compararam o efeito antiinflamatório do laser diodo arsenieto de gálio e alumínio (780 nm; contínuo; 10 mW; 31,8 J/s/cm²; 30s) com o efeito da administração diária de indometacina, um antiinflamatório não esteroide. Para isso, os autores avaliaram a formação granulomatosa, edema e permeabilidade vascular durante o processo inflamatório induzido em ratos Wistar, pelo período de sete dias. Os resultados mostraram que o laser inibiu em pelo menos 20% a permeabilidade vascular no estágio agudo e a formação granulomatosa no estágio crônico da inflamação. Comparado aos efeitos da indometacina, o laser foi mais eficaz apenas na diminuição da formação granulomatosa, enquanto a indometacina mostrou-se mais eficiente no controle do edema e permeabilidade vascular.

Fernando, Hill e Walker (1993) questionaram os efeitos benéficos da terapia laser em baixa intensidade após obterem resultados sem diferenças estatisticamente significantes entre o pós-operatório da exodontia de terceiros molares bilaterais simétricos, submetidos ou não à laserterapia.

Hall et al. (1994) avaliaram os efeitos do laser pulsado arsenieto de gálio (904 nm) na cicatrização de feridas bilaterais confeccionadas na região caudal de ratos Sprague-Dawley. Os animais foram divididos em dois grupos. O grupo I recebeu tratamento com laserterapia por 21 dias, com aplicações diárias de 0,2 J/cm² durante um minuto. O grupo II teve uma de suas feridas irradiada por uma luz placebo. Os animais de ambos os grupos apresentavam uma segunda ferida para controle. Os resultados clínicos (grau de sangramento, infecção, formação de crosta e epitelização) e microscópicos não diferiram em ambos os grupos durante o período observado.

Para investigar o possível efeito estimulatório da aplicação diária do laser de He-Ne (632,8 nm, 1 J/cm²) na produção de matriz de colágeno por fibroblastos, Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (1998) realizaram, durante 14 dias, irradiações sobre o tendão calcâneo direito, previamente seccionado e religado, de 24 coelhos, divididos em grupo teste e controle. A quantidade total de colágeno nos tendões tratados com laser (395,15 ± 9,5 µg) foi significativamente maior quando comparados com os tendões do grupo controle (314,85 ± 11,1 µg). Portanto, a terapia laser em baixa intensidade promoveu a produção de colágeno, melhorando o reparo tendinoso.

Webb, Dyson e Lewis (1998) observaram um aumento significativo na contagem das células oriundas de tecido hipertrófico após irradiação laser de 2,4 J/cm². Concluíram que a luz pode ter induzido a secreção de fatores de crescimento, aumentando as taxas de mitose e/ou diminuindo a morte celular. Bisht et al. (1999) verificaram que o laser He-Ne (5 mW) foi capaz de promover epitelização antecipada, consequência do aumento da reação fibroblástica, além de infiltração leucocitária e angiogênese em feridas cirúrgicas produzidas no dorso de ratos.

Agaiby et al. (2000) trataram culturas de células endoteliais da aorta com laser pulsado em baixa intensidade (5.000 Hz, 820 nm, 50 mW) em diversas densidades de energia (1,2, 3,6, 6,0 e 8,4 J/cm²). As células alcançaram a máxima atividade proliferativa quando foram tratadas com dosimetrias iguais a 1,2 e 3,6 J/cm², enquanto o tratamento com as maiores densidades de energia gerou um efeito inibitório na proliferação celular, notado por contagem mais baixa de células em relação ao grupo controle.

Almeida-Lopes et al. (2001) estudaram os efeitos proliferativos da aplicação de luz laser em baixa intensidade sobre cultura de fibroblastos advindos

da mucosa oral humana e nutridos com soro fetal bovino em concentrações de 5% (estresse nutricional) e 10% (condições ideais). Para tanto, utilizaram quatro diferentes comprimentos de onda e três diferentes potências de energia [670 nm, 10 mW (L1); 780 nm, 50 mW (L2); 692 nm, 30 mW (L3) e 786 nm, 30 mW (L4)] e a mesma dosimetria (2 J/cm^2). A primeira fase do estudo comparou os efeitos dos lasers L1 e L2, verificando-se indução significativamente maior da proliferação de fibroblastos quando o laser infravermelho (780 nm) foi utilizado em condições de estresse nutricional. Já os lasers de igual potência de energia (L3 e L4) apresentaram efeitos similares sobre os fibroblastos. A influência da irradiação laser no aumento da proliferação celular foi verificada somente em condições de estresse nutricional.

Kipshidze et al. (2001) observaram o efeito da irradiação do laser diodo He-Ne (contínuo, 632 nm) na secreção de VEGF por células musculares lisas, cardiomiócitos e fibroblastos, além da proliferação de células endoteliais humanas cultivadas *in vitro*. Culturas de células diversas foram irradiadas uma única vez com diferentes dosimetrias, as quais variaram de 0,1 a $6,3 \text{ J/cm}^2$. A irradiação laser aumentou a produção de VEGF por todos os tipos celulares estudados, além de estimular a proliferação de células endoteliais. Os máximos efeitos estimulatórios da irradiação laser foram observados em dosimetrias diferentes para cada grupo de células ($0,5 \text{ J/cm}^2$ para células musculares lisas, $2,1 \text{ J/cm}^2$ para fibroblastos e $1,05 \text{ J/cm}^2$ para cardiomiócitos). Nos cardiomiócitos também foram estudadas as expressões de RNAm para VEGF e TGF- β . Quando estas células foram tratadas com dosimetrias iguais a 1,05, 1,57 e $2,1 \text{ J/cm}^2$, ocorreu um aumento significativo na expressão de RNAm para ambos os fatores de crescimento, comparados aos

grupos não tratados. Em dosimetrias maiores, entretanto, o efeito estimulatório foi gradativamente diminuído.

Whelan et al. (2001) irradiaram feridas cirúrgicas de ratos com o uso de LED (880 nm, 4 J/cm²) durante 14 dias. Nos dias 0, 4, 7 e 14, os autores realizaram análise bioquímica dos níveis do fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela utilização de ELISA. Os níveis de FGF-2 foram mais expressivos no grupo teste quando comparado com o grupo controle em todos os dias de análise. Já os níveis de VEGF foram semelhantes em ambos os grupos estudados. A expressão aumentada de FGF-2 no grupo teste demonstrou eficiência de ação do LED durante o processo de cicatrização de feridas.

Yaakobi et al. (2001) ocluíram a artéria coronária de 18 ratos para simular uma lesão por reperfusão isquêmica no coração. Após a cirurgia, um tratamento com laser diodo de arsenieto de gálio (804 nm, 38 mW) começou a ser realizado com utilização de fibra óptica levada diretamente até o coração. O tratamento foi capaz de aumentar o número de vasos sangüíneos e células endoteliais. Schindl (2003) também verificou a capacidade da laserterapia em baixa intensidade (670 nm) em estimular a proliferação de células endoteliais cultivadas *in vitro*, especialmente quando tratadas com uma dosimetria igual a 8 J/cm².

Lucas et al. (2002) realizaram um estudo de metanálise com o objetivo de avaliar os resultados e qualidade de pesquisas voltadas ao entendimento da influência da terapia laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas em animais e em cultura de células. Para tanto, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: (1) o estudo avaliou o efeito da laserterapia na cicatrização de feridas em células ou animais; (2) o comprimento de onda estudado foi 632,8 nm (He-Ne)

ou 660-950 nm (GaAs/ GaAlAs); (3) publicações escritas em inglês, alemão, francês ou holandês. Após a seleção dos estudos, os autores atribuíram um ponto para cada uma das oito características avaliadas, quando foram realizadas e descritas de forma clara. As características foram: (1) relação investigada entre dose e resposta; (2) experimento aleatorizado; (3) tempo adequado para investigação; (4) monitoramento de parâmetros fisiológicos; (5) avaliação cega dos resultados; (6) avaliação de pelo menos dois resultados aferidos; (7) avaliação dos resultados na fase aguda da cicatrização da ferida (1-10 dias); (8) avaliação dos resultados na fase crônica do processo de cicatrização da ferida (3-30 dias). Os estudos foram classificados de acordo com a qualidade metodológica: pobre (pontuação <5), moderada (pontuação igual a 5 ou 6) e boa (pontuação igual a 7 ou 8). Ao todo, foram selecionados 36 estudos, os quais continham 49 parâmetros de resultados, 30 reportando um efeito positivo para a irradiação laser e 19 reportando um efeito negativo. Nenhum dos estudos que avaliaram a LLLT de forma positiva foi considerado de boa qualidade, enquanto quatro estudos que consideraram negativo o uso da terapia laser obtiveram 7 ou 8 pontos. A pontuação média obtida pelos estudos em relação à qualidade metodológica foi igual a 4 (pobre). Os resultados, portanto, não puderam providenciar uma resposta inequívoca para a eficácia do tratamento com LLLT e nem mesmo justificar a realização de estudos clínicos em grande escala de pacientes, já que não ocorreram grandes diferenças entre os resultados destes experimentos e os estudos clínicos.

Damante (2003) avaliou a efetividade da terapia laser em baixa intensidade (GaAlAs – 670nm) na cicatrização de gengivoplastias realizadas na região dos dentes anteriores de maxila ou mandíbula em humanos. Clínica e

histomorfometricamente, o processo cicatricial não diferiu entre as áreas irradiadas e não irradiadas.

Enwemeka et al. (2004) realizaram estudo de metanálise com o intuito de obter respostas com fortes evidências científicas em relação à influência de lasers em baixa intensidade no reparo tecidual e controle da dor. Foram selecionadas 34 pesquisas que estudaram o reparo tecidual em animais e humanos e nove pesquisas que estudaram o controle da dor em humanos. Os resultados mostraram que a laserterapia é uma modalidade altamente eficaz para melhorar o reparo tecidual e controle da dor, sendo que o comprimento de onda do aparelho pode influenciar os resultados do tratamento. Estes resultados estão de acordo com o estudo de metanálise realizado por Woodruff et al. (2004), o qual se ateve à análise de reparo de feridas auxiliado pela laserterapia.

Bayat et al. (2005) estudaram a influência do laser He-Ne (contínuo, 632,8 nm, 10 mW) na cicatrização de feridas dorsais ($3,8\text{cm}^2$) em 78 ratos submetidos a queimaduras de terceiro grau. Os animais foram divididos em quatro grupos: dois grupos, 20 animais em cada, que receberam tratamento diário com LLLT em contato com o tecido, um com densidade de energia igual a $1,2\text{ J/cm}^2$ (120s) e o outro com densidade de energia igual a $2,4\text{ J/cm}^2$ (240s); um grupo controle ($n=19$), o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento; um grupo tratado com aplicação tópica de nitrofurazona 0,2%, creme. Os resultados histológicos do tratamento foram avaliados 7, 16 e 30 dias após as queimaduras. Além disso, no 15º dia após a produção das lesões foram avaliados os efeitos microbiológicos da LLLT através da contagem das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o laser He-Ne ($2,4\text{ J/cm}^2$) induziu a destruição das bactérias estudadas. Além disso, a LLLT ($1,2\text{ J/cm}^2$) causou um significativo aumento na

média de secção de vasos sanguíneos na área da lâmina estudada no sétimo dia após as queimaduras.

Corazza (2005) estudou os efeitos de um laser em baixa intensidade no processo de angiogênese durante a cicatrização de feridas, produzidas de forma circular (15 mm de diâmetro) no quadríceps de 120 ratos, os quais foram divididos em cinco grupos: LASER5 (tratamento com laser GaAlAs, 5 J/cm²), LED5 (tratamento com LED, 5 J/cm²), LASER20 (tratamento com laser GaAlAs, 20 J/cm²), LED20 (tratamento com LED, 20 J/cm²) e controle. Os grupos irradiados receberam aplicação pontual de contato a cada 24 horas. Os resultados foram analisados 3, 7, 14 e 21 dias após a confecção das feridas cirúrgicas. Os tratamentos por irradiação não influenciaram a redução da ferida de forma significativa. O grupo LED5 apresentou maior vascularização em relação aos outros grupos. Além disso, pode-se perceber que os estímulos fotônicos nos três primeiros dias foram fundamentais para a evolução da densidade de volume dos vasos sanguíneos. Portanto, ambas as fontes de luz ajustadas a 5 J/cm² podem demonstrar resultados expressivos no estímulo angiogênico em pele lesada.

Com o objetivo de determinar os efeitos dinâmicos do laser He-Ne (632,8 nm; 4,8 J/cm²) na cicatrização de feridas em ratos diabéticos, Maiya, Kumar e Rao (2005) confeccionaram feridas circulares de 4 cm² no dorso de 48 animais que foram divididos em dois grupos. Ambos os grupos, teste e controle, tiveram suas feridas irradiadas durante cinco dias. Porém, o grupo controle foi irradiado com o laser desligado, denotando-se num estudo cego. As análises bioquímicas e histopatológicas das feridas mostraram que o grupo tratado com laserterapia teve o processo de reparo melhorado e acelerado, sendo concluído no 18º dia no grupo teste e no 59º dia no grupo controle.

Mohammed Ihsan (2005) avaliou a eficácia da irradiação com laser diodo arsenieto de gálio e alumínio (10 mW, 904 nm) na promoção da circulação colateral e aumento da microcirculação em artérias femurais de 34 coelhos, obstruídas cirurgicamente. A irradiação laser foi realizada durante 10 minutos logo após o procedimento operatório e nos três dias subseqüentes. Amostras de sangue e tecido foram coletadas 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 e 72 horas após a cirurgia, através do prévio sacrifício de dois animais em cada tempo estipulado. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo de fatores angiogênicos (adenosina, hormônio do crescimento e fator de crescimento fibroblástico). Além disso, numerosos vasos sangüíneos colaterais proliferaram nas áreas teciduais analisadas, com marcante crescimento no diâmetro dos vasos originais. Portanto, a laserterapia em baixa intensidade foi capaz de acelerar a circulação colateral e melhorar a microcirculação.

Salate et al. (2005) estudaram a influência do laser em baixa intensidade no processo de angiogênese ocorrido durante o reparo tecidual. Para tanto, foram realizadas rupturas parciais do tendão calcâneo direito de 96 ratos Wistar. Os animais receberam tratamento com uma luz laser contínua (InGaAlP, 660 nm, MMOptics®) em um ponto simples, durante 10 segundos. O primeiro grupo de animais (n=24) foi subdividido e irradiado com uma dose igual a 2,5 J/cm² durante 3, 5 e 7 dias. O segundo grupo (n=24) foi irradiado com uma dose igual a 10 J/cm² da mesma forma que o primeiro. Um terceiro grupo de animais (n=24) recebeu tratamento laser com o equipamento desligado enquanto o quarto grupo (n=24) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Após os períodos estipulados, os animais foram sacrificados, produzindo-se lâminas da região tendinosa, as quais foram coradas com HE. Os vasos sangüíneos foram contados utilizando-se um sistema de vídeo (Sony). Os resultados deste estudo indicaram que o número de vasos sangüíneos

aumentou notavelmente nos ratos tratados com laser quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, pôde-se perceber que quanto maior a dose utilizada, mais acentuada foi a resposta angiogênica, demonstrando que o laser em baixa intensidade pode apresentar importante efeito na promoção da neovascularização durante o reparo tendinoso.

Aimbire et al. (2006) estudaram a capacidade biomoduladora de um laser em baixa intensidade (GaAlAs, 650 nm) sobre a inflamação aguda e o fator de crescimento de necrose tumoral (TNF- α) após traumatismo pulmonar induzido por complexo imune em ratos Wistar. Os animais foram irradiados utilizando-se três diferentes densidades de potência (12,5; 31,25 e 62,5 mW/ cm²) durante 42 segundos, cinco minutos após a indução da reação imune. Após 4 horas do início do procedimento, os animais foram sacrificados. Os níveis liberados de TNF- α foram reduzidos, sendo altamente dependentes da densidade de potência utilizada. A redução da liberação do fator de crescimento foi mais evidente quando a densidade de potência igual a 31,25 mW/cm² e a dose total de energia de 0,11 J foram utilizadas. Yu et al. (1994) também puderam concluir que a liberação de TGF- β_2 e PDGF foi modulada em fibroblastos irradiados com luz laser utilizada em diversos comprimentos de onda (630, 640, 650 e 660nm) e em duas dosimetrias diferentes (2,4 e 4,8 J/cm²). Almeida-Lopes et al. (2001) observaram melhores resultados de proliferação celular quando potências mais altas e tempos de irradiação menores foram utilizados.

Gál et al. (2006) realizaram duas incisões paralelas na porção dorsal da pele de 49 ratos Sprague-Dawley para avaliarem os efeitos histopatológicos da irradiação com uso de luz laser (AlGaInP, contínuo, 670 nm, dose diária de 30 J/cm²) durante o processo de reparo tecidual. A ferida lateral foi utilizada como controle e

não recebeu nenhum tipo de tratamento. Nos respectivos períodos de tempo de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a cirurgia, sete animais foram sacrificados e os sítios das feridas foram removidos para posterior produção de lâminas. Quando comparada com o processo de cicatrização das feridas não irradiadas, o grupo teste apresentou uma fase inflamatória de duração mais curta, bem como aceleração das fases proliferativa e de maturação, influenciando positivamente durante todas as fases do processo cicatricial ocorrido em pele de ratos.

Portanto, pode-se perceber que os resultados benéficos na utilização da laserterapia em baixa intensidade durante o processo de reparo tecidual, especialmente na angiogênese, são controversos. Pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de verificar a relevância deste procedimento clínico e o melhor entendimento dos seus mecanismos de ação e interação biológica.

3 Proposição

---

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar a correlação entre a cinética de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ durante o processo de reparo tecidual de ferida cirúrgica em língua de ratos Wistar, sob irradiação e não irradiação com o laser diodo arsenieto de gálio e alumínio (GaAlAs).

4 Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e caracterização dos grupos experimentais

Foram utilizados 45 ratos Wistar, machos, com peso entre 240 g e 340 g (aproximadamente 60 dias de vida), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo (FOB/USP). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos:

GRUPO GI – Animais não operados (grupo controle);

GRUPO GII – Animais operados e não irradiados com o laser diodo Arsenieto de Gálio e Alumínio;

GRUPO GIII – Animais operados e posteriormente irradiados com o laser diodo Arsenieto de Gálio e Alumínio.

Após a marcação numérica aleatória de todos os animais, realizou-se a pesagem dos ratos visando à observação dos seus padrões de crescimento e desenvolvimento.

4.2 Excisão cirúrgica lingual

A manipulação animal seguiu o protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da FOB/USP (processo nº.02/2005, Anexos A, B e C). Os animais de todos os grupos foram mantidos no Biotério Central da FOB/USP e alimentados com ração normal e água *ad libitum*. No momento do procedimento operatório, os animais foram anestesiados com tiopental sódico

(Thiopentax®, 60 mg/kg, via intra-peritoneal) e posteriormente pesados (Figuras 3A e 3B).

Através de excisão cirúrgica, uma ferida foi confeccionada na porção lateral direita da língua de todos os animais envolvidos na pesquisa (Figura 3C). Para tanto, foi utilizada uma lâmina de bisturi 15-C para o procedimento, enquanto uma pinça hemostática reta foi responsável por padronizar a área de todas as feridas, as quais se estendiam da superfície dorsal até a superfície ventral, com área aproximada de 12,4 mm² (Figura 2). O sangramento produzido foi controlado pela utilização de compressão local com gaze estéril, não sendo realizada sutura.

Figura 2 – Esquema representativo do procedimento de excisão cirúrgica em língua de rato. Medidas realizadas em milímetros (mm).

4.3 Utilização do laser diodo arsenieto de gálio e alumínio

Para a realização do procedimento terapêutico de irradiação laser em baixa intensidade, foi utilizado o aparelho Twin Laser®, MMOptics, São Carlos, Brasil (Figura 3D), previamente calibrado pelo fabricante. Este equipamento possui dois comprimentos de onda, um no espectro vermelho visível e outro no infravermelho. O aparelho adotado neste estudo opera com os seguintes parâmetros:

- Meio ativo: Arsenieto de Gálio e Alumínio (GaAlAs);
- Alimentação: 127 – 220 V ~ / 50 – 60 Hz;
- Comprimentos de onda da luz: 660 nm (vermelho visível) e 780 nm (infravermelho);
- Potência óptica útil: 40 mW (660 nm); 70 mW (780 nm);
- Área do feixe de saída: 0,04 cm²;
- Temporizador ajustável.

Este protocolo foi baseado no relatado por Lizarelli (2005). Com o objetivo de promover cicatrização de feridas em tecidos moles, duas sessões de irradiação laser foram realizadas: primeira sessão, imediatamente após o procedimento cirúrgico (laser infravermelho, 35 J/cm² por ponto de aplicação); segunda sessão, dois dias após a cirurgia (laser vermelho visível, 5 J/cm² por ponto de aplicação). Os animais foram imobilizados e anestesiados de maneira similar ao procedimento cirúrgico durante a segunda sessão terapêutica com o laser diodo GaAlAs. Neste estudo, optou-se pela supressão da terceira sessão de irradiação sugerida por Lizarelli (2005) em função do risco de morte produzido pela anestesia.

Em cada sessão, a irradiação laser foi realizada em dois pontos distintos, no centro da área operada, tanto pela face dorsal como pela ventral (Figura 3E). A ponta ativa do equipamento foi posicionada perpendicularmente ao tecido lingual a uma distância aproximada de 1mm (DAMANTE, 2003). A duração da irradiação laser em cada ponto da ferida obedeceu a seguinte relação: $t \text{ (s)} = DE \text{ (J/cm}^2\text{)} \times S \text{ (cm}^2\text{)} / P \text{ (W)}$, ou seja, 20 s quando utilizado o laser infravermelho e 10 s quando foi utilizado o laser vermelho visível (ALMEIDA-LOPES, 2004).

4.4 Critérios de exclusão da amostra

Animais que apresentassem condições pós-operatórias que poderiam retardar o processo de reparo tecidual (PETERSON et al., 1998), como infecção, presença de lacerações acidentais ocorridas durante o trans-operatório e problemas de ordem sistêmica, seriam excluídos da amostra. Porém tais situações não foram observadas em nenhum dos animais durante o transcorrer do estudo.

4.5 Obtenção de espécimes para execução dos experimentos e número de animais

Os animais foram sacrificados 1, 3, 5 e 7 dias após a realização da excisão cirúrgica lingual, por meio de dose excessiva de anestésico. Para cada um dos dias estipulados, foram utilizados 5 animais de cada grupo (GII e GIII). Por meio de biópsia tecidual, a porção anterior da língua foi removida imediatamente após o sacrifício dos animais. Em seguida foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga contendo Trizol (0,1 g de tecido/1,0 mL de Trizol), previamente pesados em balança de precisão (Figura 3F). Posteriormente foram congelados na temperatura de -80°C , com o intuito de realizar os experimentos envolvendo a técnica de RT-PCR.

Tabela 1 – Distribuição do número de animais por grupos e tempos de sacrifício em dias

Grupos	Dia de Sacrifício				Total
	1	3	5	7	
GI	0	0	0	5	5
GII	5	5	5	5	20
GIII	5	5	5	5	20
Total	10	10	10	15	45

4.6 Extração de RNA total das biópsias de tecido lingual

A realização destes experimentos seguiu o protocolo para extração de RNA estabelecido por Santos et al. (2002) e Santos et al. (2003), disciplina de Farmacologia da FOB - USP. No momento da extração de RNA total pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio, os tubos foram descongelados e novamente pesados em balança de precisão. Então, os tecidos foram homogenizados (Figura 4A). Depois, os tubos foram incubados por 5 min a 4°C, sendo logo em seguida adicionado um volume de 20% de clorofórmio em cada amostra. Após este processo, os tubos foram vigorosamente agitados em vórtex e deixados em repouso a 4°C por 5 min, procedendo-se a centrifugação (12.000 g, 25 min) das soluções contidas nos tubos (Figura 4B). A fase aquosa superior foi recuperada em alíquotas de 500 µL (Figura 4C) e posteriormente colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol. Os tubos foram mais uma vez agitados vigorosamente e deixados em repouso a 4°C por 15 min. Após nova centrifugação (15.000 g, 20 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 1 mL de etanol 70% em solução com água com dietil pirocarbonato (DEPC) 0,1%, agitando-se vigorosamente (Figura 4D). Mais dois procedimentos de centrifugação (15.000 g, 10 min, 4°C) com 1 mL de etanol 70% foram realizados, descartando-se o sobrenadante após cada etapa. Então, os tubos foram deixados abertos em temperatura ambiente por 5 min dentro de uma capela de fluxo laminar vertical, permitindo a secagem das amostras. Para nova dissolução do RNA total precipitado, foi utilizado um volume de 50 µL de água tratada com DEPC 0,1% em cada tubo de microcentrífuga, os quais foram incubados a 65°C por 30 min.

Figura 3 – Sequência de procedimentos operatórios. A) animal anestesiado; B) animal posicionado na mesa cirúrgica; C) confecção de ferida cirúrgica lingual; D) aparelho laser utilizado (Twin Laser, MM Optics); E) irradiação laser em baixa intensidade; F) biópsia lingual em tubo de microcentrífuga contendo trizol.

4.7 Quantificação do RNA total

A concentração de RNA total nas amostras foi determinada por diluição do RNA (fator de diluição conhecido, igual a 0,25) e leitura da absorbância da amostra em cubetas de quartzo em espectrofotômetro (Figura 4E) no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). A fórmula para calcular a concentração de RNA total foi a seguinte: $[RNA] = A_{260} \times 40 \times \text{fator de diluição conhecido}$, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g/mL}$. Essa metodologia foi utilizada previamente por Santos et al., (2002) e Santos et al. (2003).

4.8 Avaliação da qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total nas amostras foi determinada pela diluição do RNA em Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) e leitura da absorbância da amostra em cubetas de quartzo em espectrofotômetro (Figura 4E) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (A_{260} e A_{280}). A relação A_{260}/A_{280} foi calculada, sendo considerados aceitáveis apenas os valores que estivessem entre 1,9 e 2,1, indicando ausência de DNA na amostra analisada.

4.9 Tratamento do RNA total com DNase

Para evitar a possibilidade de contaminação do RNA total extraído de diferentes tecidos e células por DNA genômico, foi realizado tratamento de todas as amostras com DNase (RQ1 RNase – Free DNase®, Promega Corporation). Aliquotas volumétricas diferentes foram utilizadas para a obtenção de uma

quantidade padronizada de 2 µg de RNA total em cada amostra do estudo (tabela 4). A quantidade final de 2 µg de RNA total foi tratada com 2 µL de DNase. Em cada tubo de microcentrífuga também foi adicionado mais 1 µL do tampão específico para este tipo de reação (RQ1 RNase-Free 10X Reaction Buffer®, Promega Corporation). Todos os tubos foram incubados a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, com o objetivo de cessar a reação, foi adicionado um volume de 1 µL de RQ1 DNase Stop Solution® (Promega Corporation) em cada amostra, de acordo com as instruções do fabricante. Para finalizar o procedimento de tratamento com DNase, cada tubo foi incubado a 65°C por 10 minutos. As amostras de RNA total tratadas com DNase foram mantidas a -80°C até o momento oportuno de uso.

4.10 Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A realização destes experimentos também seguiu as descrições realizadas em trabalhos da disciplina de Farmacologia da FOB-USP (SANTOS et al., 2002; SANTOS et al., 2003). Todo o RNA total tratado com DNase foi utilizado para a síntese de cDNA, realizada em um volume de reação total de 33 µL, utilizando-se 2 µg de RNA total, 0,2 µg de hexadeoxinucleotídeos, tampão para RT (concentrações finais: Tris-HCl 45 mM pH 8,3; KCl 68 mM e MgCl₂ 9 mM), soroalbumina bovina 0,08 mg/mL, DTT 15 mM, dNTPs 1,8 mM e 150 U de transcriptase reversa. Todos os reagentes citados fazem parte do First-strand cDNA synthesis kit® (Amersham Bioscience, E.U.A.). O cDNA foi sintetizado pelo uso de um termociclador (Figura 4F) após um período de 60 min de incubação a 37°C. A reação foi paralisada pelo aquecimento a 90°C por 5 min. Os produtos da RT (3 µL) serviram de molde para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas

num volume de 50 μ L em tubos “Hot start” com os seguintes reagentes: 20 pmol (0,4 μ M) de cada “primer” (“sense” e “anti-sense” para cada alvo, Tabela 2), tampão para PCR (concentrações finais: Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM e $MgCl_2$ 1,5 mM), dNTPs (0,2 mM) e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Go Taq® DNA Polymerase, Promega). O processo de ciclagem térmica consistiu de desnaturação inicial (2 min/94°C, VEGF-A₁₆₅; 2 min/95°C, GAPDH) seguida de 45 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu das fases de desnaturação, anelamento e extensão, sendo as temperaturas e tempos de cada fase padronizados de acordo com os “primers” utilizados: VEGF, 94°C, 1 min, desnaturação; 65°C, 30 s, anelamento; 72°C, 1 min, extensão; GAPDH, 95°C, 30 s, desnaturação; 60°C, 30 s, anelamento; 72°C, 1 min 30 s, extensão. Os “primers” para o GAPDH foram utilizados como controle positivo (SANTOS et al., 2002; SANTOS et al., 2003). Todas as amostras foram incubadas por um período adicional de 10 min a 72°C após o término do último ciclo (extensão final). Para cada par de “primers” foi realizada PCR em água estéril para avaliação de possível contaminação dos primers (controle negativo água). Um novo controle negativo foi realizado para cada amostra de tecido, utilizando-se RNA como molde de PCR para avaliação de possível contaminação por DNA genômico (no-RT). Uma alíquota de 10 μ L de cada amostra foi analisada por meio de eletroforese horizontal (Figura 4G), em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (0,64 μ g/mL). O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador com intervalos de peso molecular igual a 100 pb. O cDNA foi visualizado sob luz ultra-violeta para a detecção da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados (Figura 4H). Nesse momento foram realizadas fotografias do gel (fotodocumentação) utilizando uma câmera Sony V1 (zoom óptico de 4X, distância padrão de 21 cm do centro do gel; filtro Kodak UV).

Figura 4 – Sequência de procedimentos laboratoriais. A) homogeneização do tecido lingual; B) tubos posicionados no interior de centrífuga; C) aspecto da solução após centrifugação (observação do precipitado); D) fase sólida representa o RNA total; E) leitura da absorbância em espectrofotômetro; F) termociclador utilizado durante a RT-PCR; G) gel de agarose a 2% carregado para início da eletroforese; H) resultado final da eletroforese revelando os produtos previamente esperados.

Todos os experimentos envolvendo as técnicas de extração de RNA total e RT-PCR foram realizados no laboratório da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

Tabela 2 – Primers utilizados na PCR para os diferentes alvos e tamanhos antecipados dos produtos de amplificação

Alvo	Tamanho antecipado	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
GAPDH	318 pb	GAAGGGTGG GGCCAAAAG	GGATGCAGGG ATGATGTTCT
VEGF-A₁₆₅	80 pb	ATCATGCGGAT CAAACCTCACC	GGTCTGCATTCA CATCTGCTATGC

4.11 Estudo da intensidade de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅

Utilizando-se como parâmetro de comparação os valores de intensidade de banda obtidos para o GAPDH, proteína cujo gene é expresso constitutivamente, foi realizada análise semi-quantitativa para cada amostra de tecido lingual. Para tanto, foi empregado o software Scion Image® (Scion Corporation, Frederick, Maryland, E.U.A.), de acordo com as orientações do fabricante. Para estimar o valor do erro intra-examinador sistemático do método, a intensidade das bandas de metade da amostra foi novamente avaliada trinta dias após a análise inicial. Foi obtida uma relação entre a intensidade da banda de GAPDH e da banda de VEGF-A₁₆₅ no gel de agarose para cada amostra. Esta relação foi posteriormente utilizada para os estudos de correlação entre a expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ entre os grupos GI, GII e GIII (Figura 7).

4.12 Análise estatística

Os dados foram coletados e posteriormente analisados, através da utilização do software Statistica 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, E.U.A.). Para observar diferenças entre a expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ entre os grupos GI, GII e GIII, foi utilizada análise de variância a dois critérios seguida pelo teste de Tukey. Para avaliar as diferenças entre os índices de variação dos pesos dos animais dos diversos grupos, procedeu-se o uso da análise de variância a um critério seguida pelo teste de Tukey. Em todos os testes, o nível de significância de 5% foi adotado para que as diferenças fossem consideradas estatisticamente significativas. Além disso, o teste de correlação de Pearson foi utilizado para observar a existência de relação entre concentração de RNA total obtida e o peso do produto da biópsia tecidual proveniente de amostras de língua de ratos. O teste t pareado foi usado para analisar o erro intra-examinador sistemático do método, através da comparação dos valores da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ em duplicata, obtidos em duas análises distintas com intervalo de trinta dias. Valores de $p > 0,05$ foram considerados para estimar a viabilidade de utilização do método proposto.

5 Resultados

---

5 RESULTADOS

Durante todo o estudo foram operados 49 animais, dos quais 4 (8,16%) foram perdidos por óbito, sendo 1 (2,04%) durante o procedimento cirúrgico e 3 (6,12%) durante as primeiras 24 horas do pós-operatório.

Os animais de cada grupo foram pesados em balança própria nos dias 0, 1, 2, 4 e 6, até o momento do sacrifício, com o intuito de realizar a observação da interferência dos procedimentos clínicos no crescimento e desenvolvimento dos ratos durante o transcorrer da pesquisa. Todos os grupos e respectivos subgrupos puderam ser diretamente comparados com os cinco animais pertencentes ao grupo controle (GI), os quais não sofreram nenhum tipo de manipulação (Figura 5, Tabela 3).

Figura 5 – Média da variação percentual de peso dos animais durante o período experimental. **A)** animais sacrificados no 1º dia; **B)** animais sacrificados no 3º dia; **C)** animais sacrificados no 5º dia; **D)** animais sacrificados no 7º dia. As linhas amarelas correspondem aos valores do grupo controle (GI), enquanto as linhas azuis correspondem ao grupo GII e as vermelhas ao grupo GIII.

O peso dos animais variou de 242 g a 336 g (dia 0), 233 g a 339 g (dia 1), 235 g a 340 g (dia 2), 239 g a 357 g (dia 4) e 254 g a 337 g (dia 6). Nos grupos GII e GIII

e em seus subgrupos (1, 3, 5 e 7 dias), foi observada uma tendência de perda de peso até o segundo dia do pós-operatório, principalmente durante o primeiro dia após a cirurgia. A partir do quarto dia, foi verificada uma tendência de recuperação de peso em relação ao segundo dia. Os 20 (100%) animais pertencentes aos subgrupos 5 e 7 dias, de ambos os grupos, ganharam peso entre os dias 2 e 4, sendo que 14 (70%) ultrapassaram ou igualaram os valores de peso iniciais (dia 0).

Os animais do grupo GI não perderam peso de forma significativa em nenhum momento do estudo. Os maiores índices de ganho de peso foram observados durante os dois primeiros dias. A partir de então, os índices tornaram-se mais homogêneos, sendo que durante o intervalo do segundo e quarto dias do experimento, foi observada uma perda média de peso de 0,16%. No sexto dia, porém, estes mesmos animais voltaram a ganhar peso em relação ao dia de controle anterior (dia 4).

A análise de variância a um critério demonstrou haver diferenças estatisticamente significativas entre as médias de variação de peso dos grupos GI, GII e GIII durante os dias 1, 2, 4 ($p < 0,001$) e 6 ($p = 0,029$) após o procedimento operatório. O teste de Tukey determinou as diferenças entre os grupos em cada período do controle de peso. Nos dias 1 e 2, a média de variação de peso do grupo GI (Tabela 3, Apêndice A) foi significativamente maior que as dos grupos GII e GIII ($p < 0,001$), enquanto a média de variação de peso do grupo GII mostrou-se estatisticamente maior que a do grupo GIII ($p < 0,001$). No dia 4, a média de variação de peso entre os grupos GI, GII e GIII apresentou similaridade estatística aos dois primeiros dias de análise, sendo que a média do grupo GI foi maior que a dos grupos GII ($p = 0,004$) e GIII ($p < 0,001$), enquanto que a média do grupo GII foi maior que a do grupo GIII ($p = 0,006$). Durante o sexto dia de análise das médias de

variação de peso entre os grupos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GI e GIII ($p=0,023$), não ocorrendo o mesmo quando foram comparados os grupos GI e GII ($p=0,409$) e GII e GIII ($p=0,220$). No sexto dia de análise, o número de animais avaliados foi sensivelmente reduzido (Tabela 3), o que dificultou a demonstração de diferenças estatisticamente significativas neste período.

Tabela 3 – Média da variação de peso, em porcentagem, dos grupos GI, GII e GIII, seguido dos respectivos valores de desvio-padrão. O número de animais avaliados em cada período de tempo pode ser observado entre parênteses

GRUPOS	Dias de análise do controle de peso			
	1 (45)	2 (35)	4 (25)	6 (15)
GI	$3,88 \pm 0,68$	$7,83 \pm 1,22$	$7,66 \pm 1,10$	$8,44 \pm 1,33$
GI	$-0,49 \pm 0,94$	$-0,50 \pm 1,20$	$3,62 \pm 2,48$	$6,50 \pm 2,77$
GIII	$-1,89 \pm 0,91$	$-2,95 \pm 1,53$	$0,51 \pm 1,81$	$3,89 \pm 2,61$

Com o intuito de verificar o peso das amostras de tecido lingual após biópsia, realizou-se a pesagem prévia dos tubos de microcentrífuga em balança de precisão. No momento oportuno, os tubos e o conteúdo biológico foram descongelados e novamente pesados. Os valores obtidos foram expressos em miligramas (mg), os quais variaram de 106,2 mg a 257,10 mg. Foi observada uma correlação positiva média entre os valores de peso da biópsia de tecido lingual e a concentração final de RNA total obtida após o processo de extração (teste de correlação de Pearson, $r=0,4894$) (Figura 6). Para obtenção de uma quantidade padronizada de RNA (2 μ g), foram coletados volumes diferentes das diversas amostras (Tabela 4).

Figura 6 – Estudo da correlação entre o peso da amostra de tecido proveniente de biópsia lingual e concentração de RNA total.

Após a realização de RT-PCR, foi realizada eletroforese horizontal em gel de agarose a 2%. Os géis foram fotografados, sendo que as intensidades de banda de RNAm para GAPDH e VEGF-A₁₆₅ foram determinadas pela utilização do software Scion Image®, específico para esta finalidade. Para avaliar o erro intra-examinador sistemático do método, procedeu-se a realização do teste t pareado ($p=0,377$). Em acordo com a proposta do trabalho, observou-se a viabilidade de utilização do método de análise. Portanto, através do valor obtido pela relação entre intensidade de banda de RNAm para GAPDH e VEGF-A₁₆₅, pode-se comparar a expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ entre os grupos GI, GII e GIII nos diferentes períodos de tempo do estudo.

Por intermédio da análise de variância a dois critérios, pode-se notar interação entre as variáveis grupo e tempo ($F=8,1505$). Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p<0,05$) entre os diferentes tempos ($p<0,001$) e subgrupos analisados ($p<0,001$), formados a partir da interação grupo e tempo. Porém, quando o tempo não foi levado em consideração, diferenças

significativas entre os grupos GI, GII e GIII não foram observadas ($p=0,1765$).

Portanto, subsídios iniciais foram apresentados para a provável rejeição da hipótese

Tabela 4 – Valores de peso total (mg) do tecido lingual para extração de RNA total, concentração final de RNA total por amostra tecidual e volume (μL) utilizado para padronização da obtenção de 2 μg de RNA de cada amostra para realização de RT-PCR

Amostra	Peso do tecido após biópsia (mg)	[RNA] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Volume de amostra final para 2 μg de RNA (μL)
1	209,70	3,07	0,65
2	182,60	3,74	0,53
3	257,10	6,20	0,32
4	199,30	2,33	0,86
5	143,00	2,30	0,87
6	170,70	3,07	0,65
7	183,70	5,00	0,40
8	158,50	3,96	0,50
9	196,30	1,81	1,10
10	207,30	4,55	0,44
11	143,20	3,68	0,54
12	172,50	2,50	0,80
13	240,10	6,87	0,29
14	133,00	2,68	0,75
15	173,70	4,89	0,41
16	135,80	2,75	0,73
17	169,10	3,64	0,55
18	168,30	4,34	0,46
19	181,50	3,84	0,52
20	184,40	3,95	0,50
21	142,60	2,12	0,94
22	187,20	3,79	0,53
23	134,20	3,88	0,51
24	168,50	3,19	0,66
25	154,20	2,98	0,67
26	166,00	3,82	0,52
27	125,40	2,72	0,73
28	184,90	3,56	0,56
29	170,90	2,42	0,83
30	125,60	3,16	0,63
31	142,30	2,08	0,96
32	170,40	3,72	0,54
33	155,90	4,39	0,45
34	154,80	3,77	0,53
35	145,60	5,18	0,39
36	127,60	3,79	0,53
37	146,90	4,05	0,49
38	130,10	2,25	0,89
39	136,40	4,22	0,47
40	106,20	2,52	0,57
41	152,20	1,93	1,04
42	154,20	2,48	0,80
43	174,70	2,98	0,67
44	178,80	2,65	0,75
45	148,00	2,41	0,83

nula, ou seja, a afirmação de não haver diferenças estatisticamente significativas na comparação da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ entre os diferentes grupos e tempos estudados.

O teste de Tukey determinou onde ocorreram as diferenças estatisticamente significativas na expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ quando foram comparados tempos e subgrupos diversos, adotando-se nível de significância igual a 5%. Quando os grupos GII e GIII, nos diferentes tempos estudados, foram comparados isoladamente ao grupo GI, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao grupo GII, subgrupo 1 dia ($p=0,0285$). Os demais subgrupos dos grupos GII e GIII não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo GI.

Quando os níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ foram comparados nos diferentes tempos de um mesmo grupo, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre: GII, 1 dia e 5 dias ($p<0,001$); GII, 1 dia e 7 dias ($p<0,001$); GII, 3 dias e 5 dias ($p=0,002$); GII, 3 dias e 7 dias ($p=0,0051$); GIII, 3 dias e 5 dias ($p=0,0268$). Portanto, a média de expressão de VEGF-A₁₆₅ variou mais dentro do grupo GII quando comparado com o grupo GIII.

Quando os níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ foram comparados entre os grupos GII e GIII nos mesmos períodos de tempo, foram observadas diferenças estatisticamente significantes apenas no primeiro dia ($p=0,0101$). Portanto, pode-se notar uma interferência da terapêutica utilizada na expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio dos produtos da RT-PCR para detecção e quantificação da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ no tecido lingual dos 45 ratos estudados. As bandas representam os grupos GI, GII (C) e GIII (L) nos diferentes períodos do estudo, além dos controles positivo (GAPDH) e negativo (no-RT).

Figura 8 – Média dos valores obtidos pela razão da intensidade de banda de GAPDH e VEGF-A₁₆₅ nos grupos GI, GII e GIII e respectivos períodos de análise (1, 3, 5 e 7 dias). Em cada subgrupo encontram-se representados os determinados valores de erro padrão. A presença de asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período de análise.

Mesmo não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significativas a partir do 3º dia de análise do presente estudo, a laserterapia em baixa intensidade parece ter influenciado o aumento dos níveis de expressão de

RNA_m para VEGF-A₁₆₅ no grupo GIII em relação ao grupo GII. A comparação entre as médias dos dois grupos nos mesmos períodos de tempo pode elucidar esta observação (Figuras 7 e 8, Tabela 5, Apêndices B e C).

Quando os níveis de expressão de RNA_m para VEGF-A₁₆₅ dos grupos GII e GIII foram comparados durante o terceiro, quinto e sétimo dias de análise, pode-se observar que o grupo GIII apresentou valores 8,68%, 37,43% e 46,82% maiores que os do grupo GII, respectivamente.

Tabela 5 – Resultados da expressão média de VEGF-A₁₆₅ nos grupos GI, GII e GIII. Valores numéricos obtidos através da razão entre a intensidade de banda de GAPDH e VEGF-A₁₆₅ após fotodocumentação e análise no programa Scion Image®. Letras maiúsculas semelhantes indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores comparados na mesma linha, enquanto letras minúsculas semelhantes indicam diferença estatisticamente significativa entre os valores comparados na mesma coluna

PERÍODO DE SACRIFÍCIO (DIAS)	II	III
1	0,770 ± 0,098 ^{Aabc}	0,504 ± 0,069 ^A
3	0,661 ± 0,114 ^{de}	0,699 ± 0,022 ^a
5	0,317 ± 0,083 ^{bd}	0,487 ± 0,053 ^a
7	0,426 ± 0,426 ^{ce}	0,575 ± 0,072
GI (7)	0,523 ± 0,164 ^a	0,523 ± 0,164

6 Discussão

---

6 DISCUSSÃO

6.1 A respeito da metodologia utilizada

Na tentativa de promover maior conforto ao paciente após procedimentos operatórios, as ciências da saúde vêm se preocupando constantemente com o desenvolvimento de mecanismos e técnicas capazes de minimizar os sinais clássicos da inflamação, como dor e edema, e acelerar o processo de reparo tecidual. A utilização de analgésicos e antiinflamatórios tem por objetivos melhorar o resultado clínico do sítio cirúrgico e possibilitar a mínima interferência na rotina de vida do paciente no transcorrer do pós-operatório, contribuindo para a maior qualidade de vida.

A terapia laser em baixa intensidade se utiliza de energia física não invasiva com o intuito de melhorar os processos de cicatrização, reparo ósseo e nervoso, regeneração muscular e controle da dor (TAKEDA, 1988; REDDY, 2003; ALMEIDA-LOPES, 2004; CORAZZA, 2005; LIZARELLI, 2005). Esta técnica emergiu nos últimos anos como uma nova modalidade terapêutica. Porém, ainda não está sendo indicada como tratamento de escolha, mas sim como um auxiliar que pode modular a quantidade e qualidade de processos biológicos relacionados à recuperação da homeostasia durante o reparo tecidual (OSHIRO; CALDERHEAD, 1991).

A qualidade dos trabalhos científicos que estudam os efeitos da laserterapia em baixa intensidade (LLLT) é questionável. Pesquisadores criticam a utilização indiscriminada e empírica da LLLT em humanos (CULLUM et al., 2001), já que os resultados deste tratamento em animais e em cultura de células parecem não

ser conclusivos (LUCAS et al., 2002). A possível biomodulação de processos fisiológicos e patológicos é controversa, principalmente quando baseada em resultados de alguns estudos clínicos aleatorizados duplo-cegos (BEZUUR; HABETS; HANSSON, 1988; HANSEN; THOR, 1990; FERNANDO; HILL; WALKER, 1993). Mesmo assim, os trabalhos de metanálise de Enwemeka et al. (2004) e Woodruff et al. (2004) mostraram que a terapia laser em baixa intensidade é eficaz no controle da dor e reparo tecidual em humanos.

A motivação do presente trabalho surgiu da necessidade de maiores evidências científicas que pudessem contribuir e auxiliar na tomada de decisão para indicar o uso clínico da terapia laser em baixa intensidade de forma a atuar no controle do processo biomodulatório da reparação tecidual. Estudos prévios (LYONS et al., 1987; KAMEYA et al., 1995) referiram a capacidade da LLLT em produzir ácidos nucleicos. Além disso, sabe-se que a neoformação de vasos é preponderante para que ocorra o reparo de tecidos (FOLKMAN; SHING, 1992). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é em grande parte responsável pelo estímulo da proliferação e diferenciação de células endoteliais, e, portanto, pelo aumento de novos vasos sangüíneos (FERRARA, 1996; MCCOURT et al., 1996). Mais especificamente, o VEGF-A é considerada uma molécula chave na indução de angiogênese e vasculogênese (ROY; BHARDWAJ; HERTTUALA, 2006), sendo que o VEGF-A₁₆₅ está entre suas isoformas mais abundantes (NOMI et al., 2002). Portanto, o estudo *in vivo* da modulação do RNAm para VEGF-A₁₆₅ pelo laser em baixa intensidade pode contribuir para a elucidação da interferência de terapias fotônicas durante o processo de cicatrização e reparo, principalmente pela utilização de variáveis objetivas, como a expressão de RNAm e proteínas.

Os motivos que podem justificar a escolha pela confecção de feridas padronizadas em língua de ratos Wistar através de excisão cirúrgica são muitos. O primeiro deles é a facilidade de acesso durante o procedimento operatório e obtenção de biópsias teciduais para o estudo da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅. O segundo motivo foi o interesse em verificar a capacidade de biomodulação do fator de crescimento endotelial vascular promovida pela LLLT em tecidos moles bucais. Além disso, procedimentos de incisão e excisão cirúrgica em língua de ratos já foram bastante utilizados como parte de protocolos metodológicos (LUOMANEN; VIRTANEN, 1991; LUOMANEN; VIRTANEN, 1993; EVRARD; NAMMOUR; DOUROV, 1996; CAREW et al., 1998; ZEINOUN et al., 2001; CAMACHO-ALONSO; LÓPEZ-JORNET; BERMEJO-FENOLL, 2005), os quais não apresentavam os mesmos objetivos de estudo, porém sempre necessitaram do acompanhamento da dinâmica do processo de reparo neste tecido.

A maioria dos trabalhos que se preocupa com a influência da LLLT no reparo tecidual utiliza como modelo a pele de animais (ATABEY et al., 1995; AL-WATBAN; ZHANG, 1999; WALKER et al., 2000; REDDY, 2003; CORAZZA, 2005). Contudo, o interesse pelo entendimento da laserterapia em baixa intensidade no processo de reparo de tecidos bucais motivou o desenvolvimento de um novo protocolo metodológico. A viabilidade deste trabalho foi verificada através de informações obtidas na literatura em relação à anatomia e histologia da língua de ratos. A superfície dorsal da língua é constituída por uma fina camada de epitélio escamoso estratificado queratinizado, rico em papilas gustativas. A lâmina própria, uma pequena banda de tecido conjuntivo fibroso entre o epitélio e uma subcamada de feixes musculares, forma numerosas papilas inter-epiteliais produzindo uma borda de epitélio ondulada e irregular. Os músculos são todos estriados e conectam

o osso hióide, mandíbula e cartilagens da laringe. Os feixes musculares são separados por uma fina camada de fibras elásticas e tecido conjuntivo adiposo, oferecendo suporte para vasos sangüíneos e linfáticos, fibras nervosas e gânglios (HUMMEL; RICHARDSON; FEKETE, 1966). Além disso, Luomanen (1987) observou intensa proliferação capilar em língua de ratos após realização de incisão cirúrgica com uso de lâmina de bisturi, o que comprova a capacidade de neoformação de vasos nesse tecido e a possibilidade do estudo da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ neste órgão.

A ponta ativa de uma pinça hemostática reta serviu como mapa para obtenção de medidas padronizadas da forma e tamanho da ferida cirúrgica. As excisões teciduais sempre foram realizadas entre a linha média e a borda lateral direita da língua com o uso de lâmina de bisturi 15-C. Este tipo de procedimento operatório foi escolhido por oferecer algumas vantagens, como a confecção de um defeito de grande volume, envolvimento de todos os tecidos presentes no órgão e capacidade para realização de análises químicas, histológicas e celulares do local estudado. Além disso, segundo Davidson (1998), o processo de angiogênese pode ser melhor monitorado durante o reparo tecidual deste tipo de ferida cirúrgica.

Os parâmetros técnicos relacionados ao aparelho laser utilizado (Twin Laser, MMOptics®) foram adotados de acordo com suas definições prévias. O protocolo de irradiação laser das feridas linguais utilizado neste estudo foi baseado em informações de Lizarelli (2005). Este autor recomenda a irradiação de toda a extensão da lesão de tecidos moles humanos com laser infravermelho (70 mW, 780 nm, 35 J/cm², 20s) logo após o procedimento operatório, além de mais duas sessões de irradiação da ferida com laser vermelho visível (40 mW, 660 nm, 5 J/cm², 10s), 48h e 72h após a cirurgia. Porém, no presente trabalho, apenas dois pontos do

ferimento, um localizado no dorso e o outro no ventre da língua, foram irradiados pela luz laser, atingindo praticamente toda a extensão da ferida cirúrgica devido ao seu pequeno tamanho. A quantidade de pontos determinados para o procedimento de irradiação laser na ferida pode ser considerado apenas mais um parâmetro determinado pelo desenho metodológico do estudo, já que a proposta não foi comparar a qualidade do processo de reparo tecidual das feridas entre os grupos, mas sim a expressão de um fator de crescimento relacionado a ele. Deve-se salientar, ainda, que o protocolo proposto por Lizarelli (2005) se refere à utilização do laser em humanos e, portanto, as condições deste trabalho foram adaptadas para experimentação animal. Sendo assim, levando-se em consideração limitações como a necessidade de aplicação repetida de anestesia geral, tamanho dos animais, área da ferida cirúrgica e altas dosimetrias utilizadas, optou-se pela supressão da última sessão de irradiação com o laser vermelho visível.

O número de sessões de LLLT e os parâmetros de utilização do laser variam muito nos trabalhos analisados (WEBB; DYSON; LEWIS, 1998; AGAIBY et al., 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KIPSHIDZE et al., 2001; LUCAS et al., 2002; SUTHIN et al., 2003; MEDRADO et al., 2003; PUGLIESE et al., 2003; REDDY, 2003; WOODRUFF et al., 2004; CORAZZA, 2005; POURZARANDIAN et al., 2005; SALATE et al., 2005). Normalmente, os trabalhos até então publicados se utilizam da irradiação laser em apenas um comprimento de onda em cada grupo de animais e/ou células estudados. No presente trabalho, cada animal foi irradiado com dois comprimentos de onda distintos, o que é bastante incomum ou até mesmo inexistente na literatura, porém recomendado por Lizarelli (2005). A dificuldade de desenvolvimento de protocolos clínicos padronizados para aplicação da LLLT em humanos e animais sugere trabalhos que se preocupem com o estudo da interação

de diferentes comprimentos de onda e densidade de energia, com o intuito de entender melhor as influências deste tipo de tratamento nos tecidos biológicos (TAKEDA, 1988; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; KIPSHIDZE et al., 2001; REDDY, 2003; SALATE et al., 2005).

A divisão do número total de animais em dois grupos foi determinada pela simples necessidade de se comparar a diferença entre a expressão do fator de crescimento endotelial vascular após exposição ou não à irradiação laser (GaAIs). Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos determinados pelos tempos de sacrifício dos animais após o procedimento operatório (1, 3, 5 e 7 dias). Estes tempos foram baseados nas sessões de laserterapia, realizadas até 48h depois da cirurgia, permitindo que os efeitos residuais do tratamento pudessem ser observados. Alguns autores que estudaram o reparo tecidual em ratos Wistar se utilizaram do mesmo período de tempo de análise do presente trabalho (TAKEDA, 1988; SALATE et al., 2005). Portanto, o curto espaço de tempo do estudo foi propositado, buscando-se a interferência imediata da terapia fotônica na modulação do RNAm para VEGF-A₁₆₅.

As análises laboratoriais da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ e GAPDH foram conduzidas de acordo com protocolos previamente definidos por estudos realizados pela disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (SANTOS et al., 2002; SANTOS et al., 2003). Após a quantificação do RNA total extraído de todas as amostras teciduais, foi necessária a padronização da quantidade de RNA necessária para a continuação dos procedimentos laboratoriais. Portanto, o resultado da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ não foi influenciado diretamente pelo peso do tecido lingual presente em cada amostra. Sabendo-se que cada micrograma (µg) de RNA total deveria ser tratado com 1 µL de DNase, houve

necessidade de diluir todas as amostras de RNA total para que o volume de DNase utilizado não prejudicasse a qualidade das reações e alteração da resposta da eletroforese. Uma quantidade de 2 µg de RNA total foi utilizada para a continuação dos procedimentos. Para evitar a saturação dos produtos esperados, foram utilizados 45 ciclos de termociclagem, não atingindo a fase tardia da PCR. A expressão dos RNAm de ambos os alvos foi avaliada após fotodocumentação das imagens reveladas pela transiluminação dos géis de agarose provenientes da eletroforese horizontal. Similarmente ao estudo de Kipshidze et al. (2001), as intensidades das bandas foram analisadas por um software, no caso o Scion Image®, específico para esta finalidade. A análise do erro do método sistemático intra-examinador demonstrou a viabilidade de utilização dos dados obtidos.

6.2 Dos resultados obtidos

6.2.1 Em relação à variação de peso dos animais

Com o objetivo de monitorar um parâmetro fisiológico relacionado à qualidade do crescimento e desenvolvimento dos animais, foi realizado o processo de pesagem 0, 1, 2, 4 e 6 dias após o procedimento operatório. Pela análise dos presentes dados, pode-se notar uma tendência de perda de peso dos animais pertencentes aos grupos GII e GIII até dois dias após a cirurgia, enquanto o grupo GI ganhou peso neste período. Esta diferença pode ser explicada pela confecção da ferida cirúrgica na língua dos ratos, o que sugere maior dificuldade de alimentação e presença de dor (CAREW et al., 1998) advindas dos processos inflamatórios iniciais do reparo tecidual (CERTOSIMO et al., 1998; ROBBINS et al., 2000; ALLER et al.,

2006), quadro hemorrágico agudo gerado pelo traumatismo local e tempo necessário para a recuperação dos sentidos após administração de anestesia geral. Além disso, os ratos pertencentes ao grupo GI estabilizaram seus pesos, demonstrando diferença no comportamento da variação destes valores entre os animais operados e não operados. Foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores de variação de peso dos grupos GI, GII e GIII, em todos os dias de avaliação, exceto na comparação dos grupos GII e GIII durante o sexto dia, quando foi verificada uma sensível diminuição do número de animais para a análise dos dados. Mesmo assim, o valor médio de variação de peso do grupo GII foi 67% maior que o do grupo GIII. Durante todos os dias de análise, o grupo GI apresentou os maiores valores médios de variação de peso, enquanto o grupo GIII apresentou os menores valores. O fato de o grupo GIII ter perdido mais peso no decorrer do estudo pode ser explicado por uma simples observação dos pesquisadores, a detecção de maior volume de sangramento no transcorrer do procedimento de irradiação laser das feridas. O processo de perda e ganho de peso dos animais não foram influenciados positivamente pelas propriedades analgésicas e antiinflamatórias da LLLT. Porém, este aspecto não deve ter influenciado os resultados da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ aqui obtidos, já que a partir do quarto dia de avaliação, os animais apresentaram uma nova tendência de ganho de peso, caracterizando um quadro de normalidade sistêmica do desenvolvimento frente a um estímulo agressivo.

6.2.2 Em relação à variação dos níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅

Primeiramente, deve ser levado em consideração que os resultados aqui discutidos representam a expressão de um fator de crescimento estudado *in vivo*. Este fato dificulta a comparação dos presentes dados com outros obtidos por estudos que trabalharam com cultura de células ou tecidos diferentes da língua de ratos. Células cultivadas *in vitro* estão muito mais expostas aos efeitos extrínsecos de modalidades terapêuticas que células organizadas em tecidos animais, sujeitas a um maior número de barreiras físicas, dificultando seu acesso à luz. Além disso, estudos *in vitro* analisam as respostas de um único tipo celular a um determinado estímulo, diferentemente dos estudos *in vivo*. O reparo tecidual em feridas cutâneas foi tantas vezes revisitado durante esta explanação devido ao fato de ser considerado o modelo para a descrição geral deste processo. Porém, torna-se complicado comparar sem ressalvas os resultados aqui descritos com os demais relatados na literatura. Parece ser mais importante, neste momento, observar a verdadeira influência da LLLT na expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ e entender como os presentes resultados foram alcançados.

Após a descoberta do fator de crescimento endotelial vascular (FERRARA; HENZEL, 1989), muitos estudos preocuparam-se em entender suas funções e mecanismos em eventos fisiológicos e patológicos (FOLKMAN; D'AMORE, 1996; JOHNSON; SERIO; DAI, 1999; NÖR et al., 1999; ROBERTS-CLARK; SMITH, 2000; YUAN; JIN; LIN, 2000; FERRARA; GERBER; LE COUTER, 2003; KOHNO et al., 2003; TELLES et al., 2003). Nos últimos anos foram observadas interações importantes deste fator de crescimento com a progressão de tumores sólidos (TAE et al., 2000; CARLILE et al., 2001; ISHIBASHI et al., 2001; KUMAMOTO; OHKI;

OOYA, 2002), o que despertou grandes interesses científicos e comerciais, na tentativa de desenvolvimento de novas terapias voltadas para o tratamento e controle do câncer.

Porém, poucos são os estudos sobre a interação direta da laserterapia em baixa intensidade com a expressão do VEGF (KIPSHIDZE et al., 2001; WHELAN et al., 2001). Além disso, tais pesquisas não foram realizadas em modelos animais, mas sim em cultura de células. O efeito da LLLT durante o processo de angiogênese foi mais bem estudado através da avaliação quantitativa ou qualitativa dos vasos sangüíneos formados durante o reparo tecidual (TAKEDA, 1988; BISHT et al., 1999; YAAKOBI et al., 2001; BAYAT et al., 2005; CORAZZA, 2005; MOHAMMED IHSAN, 2005; SALATE et al., 2005) ou da proliferação de células endoteliais *in vitro* (AGAIBY et al., 2000; SCHINDL et al., 2003) após utilização de terapias fotônicas.

Os mecanismos de ação da terapia laser em baixa intensidade durante o processo de reparo tecidual e angiogênese ainda não estão bem esclarecidos. Durante os últimos anos, buscou-se a explicação da possível influência de um feixe de luz monocromático colimado na biomodulação de eventos fisiológicos e patológicos. A teoria mais aceita para os mecanismos de interação da luz com células e moléculas animais surgiu da observação da produção de oxigênio reativo intracelular (ROS) após irradiação laser *in vitro* (KARU et al., 1989). Moléculas fotossensíveis endógenas, como NADPH, porfirinas, flavinas e citocromos mitocondriais, seriam responsáveis pela absorção do espectro de luz visível e posterior transferência de elétrons para moléculas próximas de oxigênio. As espécies de ROS (H_2O_2 , oxigênio singleto, óxido nítrico e radical hidroxila) aumentariam a ligação da proteína GTP com a GTPase Rac-1, preponderante em múltiplos caminhos de transdução de sinal para síntese protéica. Grandes

concentrações de ROS são letais para célula, enquanto pequenas concentrações podem estimular a proliferação celular, expressão gênica e contração muscular através da maior produção de ATP ocasionada pelo estímulo do mecanismo de respiração mitocondrial. A concentração de íons cálcio, agente celular responsável pelo estímulo de inúmeros processos biológicos, também pode ser aumentada pelas espécies de ROS, o que sugere atuação da fotobiomodulação em reações bioquímicas (LUBART et al., 2005). Além de modular espécies de oxigênio reativo, a LLLT pode aumentar a atividade de certos agentes antioxidantes, os quais competem com a ação dos ROS, diminuindo seus efeitos sobre as reações químicas intracelulares e combatendo o efeito nocivo dos radicais livres sobre a célula (KIM; PAK; LEE, 2000). Os efeitos da laserterapia em baixa intensidade na produção de ROS é dependente do comprimento de onda, dose e intensidade de energia utilizados (LUBART et al., 2005).

Partindo-se dos princípios elucidados acima, os conceitos de saturação e estimulação de processos biológicos pela utilização da LLLT nos tecidos parecem poder ser explicados. Trabalhos envolvendo a laserterapia em baixa intensidade, com diferentes parâmetros de comprimento de onda e dosimetria, obtiveram resultados intrigantes quando objetivaram estudar sua relação com a expressão de fatores de crescimento e eventos biológicos. Normalmente, foram observadas dosimetrias ótimas e limitantes para tipos celulares diferentes. Kipshidze et al. (2001) demonstraram que o pico de secreção de VEGF nas culturas de células de fibroblastos, células musculares lisas e cardiomiócitos foi obtido com o uso de diferentes dosimetrias: $1,05 \text{ J/cm}^2$, $0,5 \text{ J/cm}^2$ e $2,1 \text{ J/cm}^2$, respectivamente. Porém, quando as culturas de células foram irradiadas em dosimetrias maiores ou menores que seus valores ótimos, ou a liberação de VEGF foi diminuída ou foi parcialmente

inibida. Agaiby et al. (2000) verificaram que maiores níveis de proliferação de células endoteliais *in vitro* foram alcançados quando densidades de energia iguais a 1,2 J/cm² e 3,6 J/cm² foram utilizadas, sendo que efeitos inibitórios foram percebidos em densidades maiores (6 e 8,4 J/cm²). Para iniciar a proliferação, necessariamente as células endoteliais devem estar aderidas em uma superfície, impedindo sua descamação e morte por apoptose. A LLLT aumenta a eficácia de adesão das células endoteliais (BOUMA et al., 1994; KIPSHIDZE et al., 1998). O estudo de Corazza (2005) também observou um maior nível de proliferação de vasos sangüíneos durante o reparo de feridas cutâneas de ratos irradiadas com laser (5 J/cm²) quando comparadas ao grupo controle. Quando a dosimetria utilizada foi igual a 20 J/cm², um efeito de saturação celular foi observado após 21 dias de tratamento com a terapia fotônica, sendo verificado pelos números similares de vasos sangüíneos entre os grupos teste e controle. A justificativa do autor para a possível saturação foi baseada em duas hipóteses: inexistência de moléculas suficientes para absorver a energia irradiada durante 21 dias de procedimento ou prejuízo da atividade antioxidante pela utilização de altas doses de energia e conseqüente avanço deletério dos radicais livres sobre o DNA celular. Os resultados apresentados para liberação de fatores de crescimento e proliferação celular, de vasos sangüíneos ou fibras colágenas em relação à dependência da dosimetria são similares aos trabalhos de Yu et al. (1994), Medrado et al. (2003), Pugliese et al. (2003) e Pourzarandian et al. (2005).

No presente trabalho, a utilização do laser infravermelho em baixa intensidade (35 J/cm²) resultou em menores níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ no grupo GIII quando comparado aos valores do grupo GII, no primeiro dia de análise. Além disso, os valores do grupo GIII foram similares àqueles

observados no grupo GI. Uma das hipóteses que pode explicar este fenômeno é a teoria da saturação celular, limitante para a liberação de fatores de crescimento e inibidora de funções antioxidantes adequadas. Além disso, Kipshidze et al. (1998) demonstraram que a irradiação laser utilizando altas dosimetrias foram citotóxicas para células vasculares. Entretanto, os níveis mais baixos da expressão de VEGF nesta fase do reparo tecidual podem não ter interferido negativamente na evolução do processo de reparo, já que o VEGF também é responsável por induzir o aumento da permeabilidade vascular pela desorganização de proteínas juncionais endoteliais (DVORAK et al., 1995) e, portanto, sua alta expressão durante o período de inflamação aguda contribui para a formação de edema e conseqüente dor pós-operatória. O laser parece ter biomodulado a expressão do RNAm para o fator de crescimento endotelial vascular, tornando seus níveis mais próximos aos de um tecido em homeostasia e minimizando os desequilíbrios biológicos advindos da inflamação aguda.

Durante o início da fase inflamatória do processo de reparo tecidual, as células se tornam hipometabólicas em resposta às injúrias traumáticas. Através de mecanismos tróficos primitivos, como a glicólise anaeróbica e queda da temperatura, conseguem diminuir seu gasto de energia (ALLER et al., 2006). Além disso, os edemas celular e intersticial podem representar um mecanismo de nutrição por difusão, requerendo baixos níveis de energia. Nesta fase, a presença de concentrações suficientes de glicose pode sustentar a produção de ATP, embora a glicólise seja menos eficiente que a fosforilação oxidativa para este fim. O aumento da atividade de enzimas glicolíticas pode ocorrer devido ao fator induzido por hipóxia (HIF-1), permitindo melhoria da expressão de genes e dos índices de sobrevivência celular em condições de limitação de oxigênio (HADDAD, 2004). O uso incorreto do

oxigênio persiste durante a fase imune da inflamação. Os monócitos e granulócitos produzem a quantidade de ATP necessária para suas atividades através da glicólise anaeróbica, sendo que o HIF-1 α é essencial para aumentar a regulação de enzimas da via glicolítica e, portanto, o suprimento suficiente de ATP para estas células. O correto uso do oxigênio durante o metabolismo oxidativo é retomado com o restabelecimento da função capilar durante a fase endócrina da inflamação. Este metabolismo é caracterizado pela grande produção de ATP, usado para dirigir múltiplos processos especializados celulares com limitada geração de calor (ALLER et al., 2004a; ALLER et al., 2004b). A expressão do RNAm para VEGF pode sofrer interferência direta da hipóxia tecidual (ISHIBASHI et al., 2001), pois a necessidade metabólica do oxigênio para a produção de ATP exerce pressão para formação de vasos sangüíneos durante o reparo. Não foram encontrados trabalhos que estudaram a influência da LLLT na expressão de HIF-1 α . Kipshidze et al. (2001) especularam a possibilidade do laser em baixa intensidade gerar hipóxia, o que seria um estímulo importante para a expressão gênica de VEGF. Portanto, faz-se necessária a melhor compreensão dos processos de oxigenação dos tecidos após irradiação laser, bem como a influência da LLLT na expressão de HIF-1 α .

Concentrações fisiológicas de outros fatores de crescimento como o TGF- β (fator de crescimento transformador – β), EGF (fator de crescimento epidérmico) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) induzem a expressão de RNAm para VEGF-A. O fator de crescimento de necrose tumoral – α (TNF- α) também possui a capacidade de aumentar a transcrição do gene VEGFR-2 nas células endoteliais, aumentando sua migração e, conseqüentemente, estimulando a cicatrização (HOEBEN et al., 2004). O estudo de Aimbire et al. (2006) demonstrou a capacidade da LLLT em biomodular a expressão de TNF- α após traumatismo

pulmonar induzido por complexo imune em ratos. A terapia laser em baixa intensidade foi capaz de induzir a liberação de TGF- β e PDGF em fibroblastos (YU et al., 1994) e TGF- β em cardiomiócitos (KIPSHIDZE et al., 2001). Diferentes densidades de energia podem promover efeitos diversos na modulação da produção dos fatores de crescimento, sendo que a regulação de citocinas celulares de via autócrina podem estar associadas com o fenômeno da biomodulação (YU et al., 1994). Portanto, a LLLT pode apresentar uma influência indireta na expressão de RNAm para VEGF, através da modulação das concentrações de outros fatores de crescimento que estimulam a produção de VEGF.

A literatura sugere que a terapia laser em baixa intensidade reduz o número de células inflamatórias durante o processo de reparo tecidual (MEDRADO et al., 2003). Porém, é observada uma contraposição quando são utilizadas baixas densidades de energia. Ao mesmo tempo em que o número de células é diminuído, ocorre o aumento da sua atividade funcional (YOUNG et al., 1989; AGAIBY et al., 2000; KIPSHIDZE et al., 2001), com provável elevação na liberação de citocinas e fatores de crescimento, o que caracteriza as terapias fotônicas como biomoduladoras. Baseado em resultados prévios, permitimo-nos propor que a utilização de altas densidades de energia pode diminuir o número de células inflamatórias, ao mesmo tempo que contribui para a queda da atividade metabólica dos tecidos. Esta teoria pode ser considerada mais uma explicação plausível para a menor expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ no grupo GIII durante o primeiro dia de análise do presente estudo.

A expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ apresentou uma tendência de aumento à partir do terceiro dia de análise do presente trabalho, quando as feridas cirúrgicas em língua de ratos foram irradiadas com a luz laser em baixa intensidade.

Porém, os valores da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ não foram considerados estatisticamente diferentes entre os grupos GI, GII e GIII. Este fato pode ser explicado por alguns fatores, como o número reduzido de animais utilizados em cada grupo, a grande variabilidade dos resultados obtidos em cada subgrupo, observado pelos altos valores de desvio e erro padrão, e a utilização de uma sessão única de irradiação com o laser vermelho visível, não permitindo a avaliação do efeito cumulativo desta terapia.

A tendência de aumento da expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅ pode ser explicada baseada em argumentos previamente explicitados. Baseado nos resultados de Young et al. (1989), Agaiby et al. (2000) e Kipshidze et al. (2001), que demonstraram que baixas doses de energia podem aumentar a liberação de fatores de crescimento, pode ser deduzido que a densidade de energia utilizada (5 J/cm²) contribuiu para a maior expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅. Provavelmente isso ocorre devido à produção de espécies de oxigênio reativo em concentrações baixas, benéficas para a promoção de efeitos estimulatórios celulares (KARU et al., 1989; LUBART et al., 2005). Em relação ao comprimento de onda utilizado, a literatura não é unânime em afirmar se as reações celulares e teciduais são mais estimuladas pelo laser vermelho visível ou infravermelho (YOUNG et al., 1989; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; REDDY, 2003). Alguns tipos celulares, entre eles fibroblastos, cardiomiócitos, células musculares lisas, queratinócitos e células endoteliais liberam VEGF em condições fisiológicas ou quando estimuladas por fatores diversos (FRANK et al., 1995; KIPSHIDZE et al., 2001; SEN et al., 2002; SUTHIN et al., 2003). Estudos mostraram a interferência da irradiação laser nestes tipos celulares, favorecendo proliferação, migração, adesão e sobrevivência (YOUNG et al., 1989; WEBB; DYSON; LEWIS, 1998; AGAIBY et al. 2000; ALMEIDA-LOPES et al., 2001;

KIPSHIDZE et al., 2001; MEDRADO et al., 2003; POURZARANDIAN et al., 2005), o que pode corroborar com os resultados obtidos após a utilização do laser vermelho visível no presente trabalho. Outro fator que deve ser levado em consideração na interpretação dos dados obtidos é a possibilidade de promoção de hipóxia tecidual após irradiação com LLLT, gerada pela produção de calor após choque molecular (KIPSHIDZE et al., 2001). Caso isso tenha ocorrido, mais uma explicação plausível poderia ser sugerida na explicação para a tendência de maiores expressões de RNAm para VEGF-A₁₆₅ observadas no grupo GIII quando comparadas com o grupo GII.

Pode-se notar, ainda, que após a utilização do laser vermelho visível, os valores médios da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ foram sempre maiores no grupo GIII quando comparados com os do grupo GII. Portanto, os níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ obtidos 3, 5 e 7 dias após a cirurgia parecem ser dependentes da influência da LLLT. Através da análise estatística, pode-se observar que os níveis de expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ no grupo GIII foram mais homogêneos que no grupo GII, o que também pode caracterizar uma relação de dependência dos resultados obtidos com a terapia fotônica. Esta maior homogeneidade pode ser interpretada como uma tendência à manutenção dos níveis de expressão próximos aos de um tecido em homeostasia.

Caso fossem estipuladas determinações precisas e singulares a respeito da compreensão dos mecanismos de ação da laserterapia em baixa intensidade sobre a expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅ durante o processo de reparo tecidual em feridas cirúrgicas linguais, esta análise poderia ser considerada especulativa. É fato que os resultados clínicos e laboratoriais obtidos através do uso da LLLT podem ser explicados pelo entendimento isolado e/ou simultâneo das diversas teorias

elucidadas anteriormente, o que justifica ainda mais a realização de estudos complementares sobre os processos de fotobiomodulação.

O estudo da expressão dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, bem como da expressão de VEGF-A₁₆₅ são preponderantes para a interpretação mais detalhada dos dados obtidos. O fato de o laser em baixa intensidade ter modulado a expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅ não significa que as expressões finais de VEGF-A₁₆₅ no tecido estudado serão alteradas da mesma forma. Algumas hipóteses podem ser utilizadas para exemplificar os possíveis acontecimentos. A primeira delas é considerar um aumento ou diminuição da expressão dos receptores tipo tirosinoquinase. Mesmo com grandes quantidades de RNAm para VEGF-A₁₆₅, caso ocorresse uma diminuição da expressão dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, a expressão final de VEGF-A₁₆₅ seria também diminuída. O inverso também seria verdadeiro, ou seja, um aumento da expressão de tais receptores poderia aumentar a expressão de VEGF-A₁₆₅ mesmo que a expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ fosse reduzida. Portanto, estudos complementares são importantes para a melhor interpretação dos efeitos dinâmicos biomodulatórios da LLLT no fator de crescimento endotelial vascular em feridas linguais de ratos Wistar.

7 Conclusões

---

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Através da utilização dos parâmetros deste estudo, o laser diodo arsenieto de gálio e alumínio foi capaz de biomodular a expressão do RNAm para VEGF-A₁₆₅ durante o reparo tecidual de feridas em língua de ratos;
- Após a primeira sessão de irradiação com o laser infravermelho, a expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ foi significativamente menor no grupo GIII (animais irradiados) quando comparado com o grupo GII (animais não irradiados);
- Após a segunda sessão de irradiação com utilização do laser vermelho visível, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GII e GIII durante os demais períodos de análise do estudo (3, 5 e 7 dias);
- Quando os grupos GII e GIII foram comparados com o grupo GI, os valores da expressão de RNAm para VEGF-A₁₆₅ foram semelhantes em todos os casos, exceto quando os grupos GI e GII foram comparados durante o primeiro dia de análise;
- Estudos devem ser realizados com o intuito de observar a influência da laserterapia em baixa intensidade durante o processo de neoformação de vasos e suas interações com fatores de crescimento, proteínas e células participantes da angiogênese fisiológica e patológica.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abt E. Biostimulation and photodynamic therapy. In: Misenderino LJ, Pick RM. Lasers in dentistry. Chicago: Quintessence Books; 1995. p. 247-57.

Agaiby AD, Ghali LR, Wilson R, Dyson M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-Lymphocytes. *Lasers Surg Med*. 2000; 26: 357-63.

Aimbire F, Albertini R, Pacheco MTT, Castro-Faria-Neto HC, Leonardo PSLM, Iversen VV, et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of $\text{tnf } \alpha$ levels in acute inflammation. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24: 33-7.

Aller MA, Arias JL, Arias JL. Post-traumatic inflammatory response: perhaps a succession of phases with a nutritional purpose. *Med Hypotheses*. 2004; 63: 42-46.

Aller MA, Arias JL, Nava MP, Arias JL. Evolutive trophic phases of the systemic acute inflammatory response, oxygen use mechanisms and metamorphosis. *Psicotherma*. 2004b; 16: 369-72.

Aller MA, Arias JL, Nava MP, Arias JL. Post-traumatic inflammation is a complex response based on the pathological expression of the nervous, immune and endocrine functional systems. *Exp Biol Med*. 2004a; 229: 170-81.

Aller MA, Arias JL, Sanchez-Patán F, Arias J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit*. 2006; 12: 225-34.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro 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.

Almeida-Lopes L. Laserterapia na odontologia. *Biodonto*. 2004; 1: 1-87.

Al-Watban FAH, Zhang XY. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Ther.* 1999; 11: 6-10.

Atabey A, Karademir S, Atabey N, Barutcu A. The effects of the helium-neon laser on wound healing in rabbits and on human skin fibroblasts in vitro. *Eur J Plast Surg.* 1995; 18: 99-102.

Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, et al. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 2441-9.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. *Blood.* 1996; 87:3336-43.

Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2003; 2: 107-20.

Baxter GD. *Therapeutic lasers: theory and practice.* New York: Churchill Livingstone; 1994.

Bayat M, Vasheghani MM, Razavi N, Taheri S, Rakhshan M. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: a histological and microbiological study. *J Photochem Photobiol.* 2005; 78: 171-7.

Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas OS, Gartside M, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (VEGF-B) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 2000; 86: 29-35.

Bezuur NJ, Habets LL, Hansson TL. The effect of therapeutic laser treatment in patients with craniomandibular disorders. *J Cranio Dis.* 1988; 2: 83.

Bhardwaj S, Roy H, Gruchala M, Viita H, Kholova I, Kokina I, et al. Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Human Gene Ther.* 2003; 14: 1451-62.

Bisht D, Mehrotran R, Singh PA, Atri SC, Kumar A. Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian J Exper Biol*. 1999; 37: 187-9.

Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Thompson WD, Stirk CM, Lewis, CE. Fibrin fragment stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Angiogenesis*. 2001; 4: 269-75.

Bouma MG, Bwerman WA, Vander Wildenberg FAJM. Lack of effect of low energy laser irradiation on expression of adhesion molecules and cytokine release by endothelial cell in vitro. *Laser Surg Med*. 1994; S6: 7.

Brugnera Júnior A, Santos AECG, Bologna ED, Ladalardo TCCGP. Atlas de laserterapia aplicada à odontologia. São Paulo: Santos; 2003.

Byrne AM, Bouchier-Hayes, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005; 9(4): 777-94.

Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Bermejo-Fenoll A. Effects of scalpel (with and without tissue adhesive) and cryosurgery on wound healing in rat tongues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 100: E 58-63.

Carew JF, Ward RF, LaBruna A, Torzilli PA, Schley WS. Effects of scalpel, electrocautery, and CO₂ and KTP lasers on wound healing in rat tongues. *Laryngoscope*. 1998; 108: 373-80.

Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden GR, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30: 449-57.

Certosimo FJ, Nicoll BK, Nelson RR, Wolfgang M. Wound healing and repair: a review of the art and science. *Gen Dent*. 1998; 61: 362-9.

Clarke RW, Harris J. The organization of motor responses to noxious stimuli. *Brain Res Rev*. 2004; 46: 123-30.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* 2001; 49: 507-21.

Corazza AV. Fotobiomodulação comparativa entre o laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos [Dissertação]. São Carlos (SP): Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2005.

Cullum N, Nelson EA, Flemming K, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: beds; compression; laser therapy, therapeutic ultrasound, electrotherapy and electromagnetic therapy. *Health Tech Assess.* 2001; 5: 137-64.

Damante CA. Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAlAs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2003.

Danhoff G. Biological effects of the laser beam. In: Simunovic Z. *Lasers in medicine and dentistry: basic and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy LLLT*. Croatia: Rijeka; 2000. p. 127-52.

Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: S1-S11.

Donato A, Boraks S. *Laser clínico. Aplicações práticas e odontoestomatologia*. São Paulo: Robe; 1993.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular permeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995; 146: 1029-39.

El Sayed SO, Dyson M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. *Lasers Surg Med.* 1996; 4: 433-7.

Enholm B, Karpanen T, Jeltsch M, Kubo K, Stenback F, Prevo R, et al. Adenoviral expression of vascular endothelial growth factor C induces lymphangiogenesis in the skin. *Circ Res.* 2001; 88: 623-9.

Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997; 14: 2475-83.

Enwemeka C, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff L. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg*. 2004; 22 (4): 323-9.

Evrad L, Nammour S, Dourov N. Scanning electron microscopic and immunocytochemical studies of contraction during secondary CO₂ laser wound healing in rat tongue mucosa. *J Oral Pathol Med*. 1996; 25: 72-7.

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 Maxil Surg*. 1993; 31: 170-2.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature*. 2003; 9: 669-76.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161: 851-8.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 2413-22.

Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is molecular basis? *Cell*. 1996; 87: 1153-5.

Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992; 267: 10931-4.

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270: 12607-13.

Fujimaki Y, Shimoyama T, Liu Q, Umeda T, Nakaji S, Sugowara K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. *J Clin Laser Med Surg*. 2003; 21: 165-70.

Gál P, Vidinsky B, Toporcer T, Mokry M, Mozes T, Longauer FE, et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg*. 2006; 24: 480-8.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Lovise; 2000.

Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*. 2001; 276: 3222-30.

Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J*. 2005; 81: 236-42.

Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Comm*. 2004; 316: 969-77.

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.

Hansen HJ, Thor EU. Low power laser biostimulation of chronic oro-facial pain; a double blind placebo controlled cross-over study in 40 patients. *Pain*. 1990; 43: 169.

Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Investig*. 1994; 93: 2490-96.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosterom ATV, Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004; 56:549-80.

Holdcroft A, Power I. Management of pain. *BMJ*. 2003; 326: 635-9.

Honmura A, Yanase M, Obata J, Haruki E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Lasers Surg Med*. 1992; 12: 441-9.

Hummel KP, Richardson FL, Fekete E. Anatomy. In: *The Jackson Laboratory. Biology of the laboratory mouse*. 2 ed. New York: McGraw-Hill; 1966. p. 272-3.

Hupp JR. Reparação das feridas. In: Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 57-67.

Ishibashi H, Shiratuchi T, Nakagawa K, Onimaru M, Sugiura T, Sueishi K, et al. Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol*. 2001; 37: 77-83.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessel in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997; 276: 1423-5.

Johnson RB, Serio FG, Dai X. Vascular endothelial growth factor and progression of periodontal diseases. *J Periodontol*. 1999; 70: 848-52.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen, Fang GH, Dumont D, Breitman M, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 3566-70.

Kameya T, Ide S, Acorda JA, Yamada H, Taguchi K, Abe N. Effect of different wavelength of low-level laser therapy on wound healing in mice. *Laser Ther*. 1995; 7:33-6.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessel from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004; 5: 74-80.

Karu TI, Ryabykh TP, Fedoseyeva GE, Puchkova. Helium-Neon laser-induced respiratory burst of phagocytic cells. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 585-8.

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989; 246: 1309-12.

Kert J, Rose L. Clinical laser therapy. *Scan Med Tech.* 1989; 1482: 29.

Kim YG, Pak SC, Lee SR. Hairless mouse epidermal antioxidants and lipid peroxidation assessed by He-Ne laser. *Lasers Surg Med.* 2000; 27: 420-6.

Kipshidze N, Keelan MH, Horn JB, Nikolaychik V. Biomodulation of vascular cells with low-power laser light in vitro. *Int J Cardiovasc Med Surg.* 1998; 1: 241-5.

Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, et al. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 2001; 28: 355-64.

Kirchner LM, Meerbaum SO, Gruber BS, Knoll AK, Bulgrin J, Taylor RA, Schimidt SP. Effects of vascular endothelial growth factor on wound closure rates in the genetically diabetic mouse model. *Wound Repair Regen.* 2003; 11: 127-31.

Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 259-70.

Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Ohtani J, Tenjo K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. *J Dent Res.* 2003; 82: 177-82.

Krawczyk WS. Wound healing in the oral cavity. In: Shaw JH, Sweeney EA, Cappuccino CC. Textbook of oral biology. Philadelphia: WB Saunders; 1978. p. 937-54.

Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. J Oral Pathol Med. 2002; 31: 28-34.

Le Gouill S, Podar K, Amiot M, Hideshima T, Chauhan D, Ishitsuka K, et al. VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. Blood. 2004; 104: 2886-92.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science. 1989; 246: 1306-9.

Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. Arch Pathol Lab Med. 2001; 125: 67-71.

Lizarelli RFZ. Protocolos clínicos odontológicos: uso do laser de baixa intensidade. 2 ed. São Carlos: Bons Negócios. 2005.

Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. Photomed Laser Surg. 2005; 23: 3-9.

Lucas C, Criens-Poublon LJ, Cockrell CT, Haan RJ. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified? A systematic review. Lasers Med Sci. 2002; 17: 110-34.

Luomanen M, Virtanen I. Distribution of tenascin in healing incision, excision and laser wounds. J Oral Pathol Med. 1993; 22: 41-5.

Luomanen M, Virtanen I. Fibronectins in healing incision, excision and laser wounds. J Oral Pathol Med. 1991; 20: 133-8.

Luomanen M. A comparative study of healing of laser and scalpel incision wounds rat oral mucosa. *Scand J Dent Res*. 1987; 95: 65-73.

Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plast Surg*. 1987; 18: 47-50.

Lytle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*. 1994; 68:84-92.

Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23: 187-90.

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276:75-81.

McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg*. 1999; 134: 1325-32.

Medrado ARAP, Pugliese LS, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2003; 32: 239-44.

Mello JB, Mello GPS. *Laser em odontologia*. São Paulo: Santos; 2001.

Mohammed Ihsan FR. Low-level laser therapy accelerates collateral circulation and enhances microcirculation. *Photomed Laser Surg*. 2005; 23: 289-94.

Monaco JL, Lawrence WT. Acute wound healing. An overview. *Clin Plastic Surg*. 2003; 30: 1-12.

Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, et al. VEGF-B gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both

antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 2660-9.

Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther.* 2005; 19:61-9.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovith S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9-22.

Nomi M, Atala A, De Coppi P, Soker S. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspect Med.* 2002; 23: 463-83.

Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999; 154: 375-84.

Oshiro T, Calderhead RG. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. *J Clin Laser Med Surg.* 1991; 9: 267-75.

Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor potential of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to F1k-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994; 269:2546-54.

Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6:230-47.

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: 187-93.

Pugliese LS, Medrado AP, Reis RSA, Andrade ZA. A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. *Pesq Odontol Bras.* 2003; 17(4): 307-13.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 281-7.

Reddy GK. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 344-51.

Reed BV. Wound healing and the use of thermal agents. In: Michlovitz SL. *Thermal agents in rehabilitation.* 3 ed. Philadelphia: F.A. Davis; 1996.

Riedel F, Gotte K, Goessler U, Sadick H, Hormann K. Targeting chemotherapy-induced VEGF up-regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines. *Anticancer Res.* 2004; 24: 2179-83.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 1995; 11: 73-91.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386: 671-4.

Rissanen TT, Rutanen J, Yla-Herttuala S. Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia. *Adv Genet.* 2004; 52:117-64.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia Estrutural e Funcional.* 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000:79-100.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 1013-6.

Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS L.* 2006; 580:2879-87.

Salate ACB, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, et al. Effect of In-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of achilles tendon in rats. *Photomed Lasers Surg.* 2005; 23(5): 470-5.

Santos CF, Caprio MA, Oliveira EB, Salgado MC, Schippers DN, Munzenmaier DH, et al. Functional role, cellular source and tissue distribution of rat elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285:H775-83.

Santos CF, Oliveira EB, Salgado MC, Greene AS. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39: 628-35.

Sasaki K, Oshiro T. Role of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the treatment of acquired and cicatricial vitiligo. *Laser Ther.* 1989; 1: 141-4.

Schaffer CJ, Nanney LB. Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol.* 1996; 169:151-81.

Scharffetter-Kochanek K, Klein P, Krieg T. Cellular and molecular mechanisms of tissue repair. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93: 1-3.

Schindl A, Merwald H, Schindl L, Kaun C, Wojta J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Brit J Dermatol.* 2003; 148: 334-6.

Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem.* 2002; 277(36): 33284-90.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983; 219: 983-5.

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anesthesiol.* 2004; 18: 385-405.

Shibuya M, Yamaguchi S, Yamame Ak, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (FLT) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990; 5: 519-24.

Silveira PCL, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol*. In press 2007.

Suthin K, Matsushita K, Machigashira M, Tatsuyama S, Imamura T, Torii M, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor by periodontal pathogens in gingival fibroblasts. *J Periodont Res*. 2003; 38: 90-6.

Suto K, Yamasaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. *J Biol Chem*. 2005; 280: 2126-31.

Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee J, Hong WK, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 2821-8.

Takeda Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988; 17: 388-91.

Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005; 65: 550-63.

Telles PDS, Hanks CT, Machado MAAM, Nör JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res*. 2003; 82: 466-70.

Terman B, Carrion M, Kovacs E, Rasmussen B, Eddy R, Shows T. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991; 6: 1677-83.

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

Webb C, Dyson M, Lewis WHP. Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblast: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg Med.* 1998; 22: 294-301.

Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2001; 19: 305-14.

Woodruff PT, Bounkeo J, Brannon W, Dawes K, Barham, Waddell DL, et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomed Laser Surg.* 2004; 22: 241-7.

Yaakobi T, Shoshany Y, Levkovitz S, Rubin O, Ben Haim SA, Oron U. Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion in the rat heart. *J Applied Physiol.* 2001; 90: 2411-9.

Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry.* 2005; 44: 8858-64.

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989; 9: 497-505.

Yu W, Naim JO, Lanzafan RJ. The effects of photo-irradiation on the secretion of TGF- β & PDGF from fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med.* 1994; S6: 8.

Yuan K, Jin YT, Lin MT. The detection and comparison of angiogenesis-associated factors in pyogenic granuloma by immunohistochemistry. *J Periodontol.* 2000; 71: 701-9.

Zeinoun T, Nammour S, Dourov N, Aftimos G, Luomanen M. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. *Lasers Surg Med.* 2001; 28: 74-9.

Apêndices

APÊNDICE A – Média dos valores de peso dos grupos GI, GII e GIII e seus respectivos subgrupos. Entre parênteses podem ser notados os índices de variação de peso, positivos ou negativos, expressos em porcentagem

GRUPOS	DIAS				
	0	1	2	4	6
GI (1)	310,80	309,8 (-0,30%)			
GII (1)	296,40	290,8 (-1,87%)			
GIII (3)	291,20	289,2 (-0,64%)	288,4 (-0,96%)		
GIII (3)	271,80	267,0 (-1,75%)	263,8 (-2,63%)		
GII (5)	310,40	309,6 (-0,21%)	309,4 (-0,32%)	322,4 (3,86%)	
GIII (5)	297,80	289,8 (-2,65%)	286,0 (-3,97%)	296,4 (-0,47%)	
GII (7)	286,20	284,6 (-0,66%)	286,0 (-0,07%)	296,4 (3,56%)	304,8 (6,50%)
GIII (7)	289,20	285,6 (-1,20%)	284,0 (-1,80%)	293,2 (1,38%)	300,0 (3,73%)
GI (7)	260,00	270,0 (3,84%)	280,2 (7,77%)	279,8 (7,61%)	281,8 (8,38%)

APÊNDICE B – Resultados da expressão de VEGF-A₁₆₅ no grupo GII (animais não tratados). Valores numéricos obtidos através da razão entre a intensidade da banda de GAPDH e VEGF-A₁₆₅ após fotodocumentação e análise no programa Scion Image®. Os grupos comparados com letras semelhantes possuem diferenças estatisticamente significativas

Animais	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	Grupo Controle Peso
1	0,841	0,628	0,193	0,281	0,278
2	0,791	0,822	0,354	0,554	0,609
3	0,822	0,641	0,367	0,420	0,611
4	0,627	0,553	0,354	0,448	0,595
5	0,519	0,561	0,502	0,256	0,330
Média	0,770 ^{ABC}	0,661 ^{DE}	0,317 ^{AD}	0,426 ^{BE}	0,523 ^C
DP	0,098	0,114	0,083	0,112	0,164
EP	0,044	0,051	0,037	0,050	0,073

APÊNDICE C – Resultados da expressão de VEGF-A₁₆₅ no grupo GIII (animais tratados com laser). Valores numéricos obtidos através da razão entre a intensidade de banda de GAPDH e VEGF-A₁₆₅ após fotodocumentação e análise no programa Scion Image®. Os grupos comparados com letras semelhantes possuem diferenças estatisticamente significativas

Animais	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	Grupo Controle Peso
1	0,604	0,718	0,514	0,509	0,278
2	0,469	0,712	0,408	0,540	0,609
3	0,494	0,696	0,515	0,576	0,611
4	0,450	0,669	0,512	0,675	0,595
5	0,565	0,687	0,482	0,575	0,330
Média	0,504	0,699 ^A	0,487 ^A	0,575	0,523
DP	0,069	0,022	0,053	0,072	0,164
EP	0,031	0,010	0,024	0,032	0,073

Anexos

ANEXO A

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 02/2005

Bauru, 04 de abril de 2005.

Senhora Professora,

Informamos que após nova análise do projeto de pesquisa “**Estudo dos efeitos do laser diodo arseneto de gálio e alumínio no fator de crescimento endotelial vascular após exodontia em ratos**”, de autoria do CD. Thiago Cruvinel da Silva e Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, desenvolvido sob sua orientação, esta Comissão considerou o projeto **APROVADO**, “*ad referendum*” na data de 30 de março de 2005.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no
Ensino e Pesquisa em Animais

Ilmª Srª Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
DD. Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO B

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. N° 02/2005

Bauru, 23 de fevereiro de 2006.

Senhora Professora,

Em atenção a solicitação de V.Sª para alteração do número de animais (*150 ratos Wistar machos de aproximadamente 60 dias*) a serem utilizados no projeto de pesquisa **“Estudo dos efeitos do laser diodo arseneto de gálio e alumínio no fator de crescimento endotelial vascular após exodontia em ratos”** de autoria de Thiago Cruvinel da Silva e Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, esta Comissão emitiu **parecer favorável**, *“ad referendum”*, ao referido pedido, considerando não haver infrações éticas.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Ilmª Srª Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
DD. Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO C

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 02/2005

Bauru, 16 de março de 2007.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração do título do trabalho de pesquisa "Estudo dos efeitos do laser diodo arseneto de gálio e alumínio no fator de crescimento endotelial vascular após exodontia em ratos" de autoria de Thiago Cruvinel da Silva e Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, sob sua orientação, para "Estudo in vivo dos efeitos biomoduladores de um laser em baixa intensidade no fator de crescimento endotelial vascular" esta Comissão emitiu **parecer favorável**, "ad referendum", nesta data, considerando não haver infrações éticas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado
Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva