UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Análise *in vitro* da Proliferação Celular de
Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com
Laser de Baixa Intensidade Utilizando Diferentes
Parâmetros de Irradiação**

Luciana Almeida-Lopes

São Carlos, SP

2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de
Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Intensidade
Utilizando Diferentes Parâmetros de Irradiação**

LUCIANA ALMEIDA-LOPES

Dissertação apresentada à Área de
Interunidades em Ciências e Engenharia de
Materiais, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para a obtenção
do
Título de Doutora em Ciência e Engenharia
de
Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

São Carlos, SP
2003

“Fim de caminhada
A estrada foi só flores
Porque os espinhos do caminho
Vocês os retiraram
Obrigada amigos!...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato pela ousadia e desafio de permitir integrar-me em seu grupo de pesquisadores, ainda que seus principais colaboradores dissessem que não.

A Prof.a. Dra. Márcia Martins Marques por me ter recebido no laboratório de sua responsabilidade com sua eterna boa vontade e pelos profundos conhecimentos de cultivo celular.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, que me recebeu e sempre acreditou em meus protocolos, e em cujo laboratório (Laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Endodontia da FOU SP) pude desenvolver a maior parte dos experimentos relatados nessa tese.

Ao Prof. Dr. Mariano Vélez González, que cedeu a maior parte das referências bibliográficas compulsadas nessa tese, sempre disposto a enviá-las, discuti-las e analisá-las junto a mim.

A Joatan Rodrigues e Lino Nisoguchi (Laboratório de Óptica Não-Linear (IFUSP – São Carlos), pelo experimento de espectroscopia.

Ao Marcelo Manuel de Oliveira (Laboratório de Óptica Biomédia (IFUSP – São Carlos), pela ajuda nos experimentos de Mapeamento Térmico.

Ao Prof. Dr. Romeu Magnani, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelo estudo estatístico dessa tese.

Ao Prof. Kléber Mendes de Figueiredo, pelas aulas particulares em Ciências de Matérias I.

Ao físico Luís Humberto da Cunha Andrade, pelas aulas particulares em Ciências de Materiais II.

Ao físico Lauro Queiroz Maia, pela grande disposição em ajudar os alunos de Biomedicina.

Ao aluno de iniciação científica Lucas Ferreira Supino que confeccionou o aparelho de laser utilizado nos meus experimentos, e que o calibrou e preparou-o de maneira criteriosa e adequada.

Ao estagiário do laboratório, Clóvis Grecco, que sempre nos ajudou com grande boa vontade e presteza.

A Maurício Pasque Caravantes, pela ajuda com meu XP na configuração dessa tese.

A Clóvis Biscegli Neto, pelos scanners das fotos aqui utilizadas.

A René Barrera Orozco, pelos desenhos didáticos e tratamento de imagens das fotos aqui utilizadas.

A Rogério Pereira Leal, pela medida da configuração do raio emitido pelo laser utilizado nessa tese.

A Oswaldo Amauri Erlo, pelas madrugadas que gastou me levando a São Paulo, sempre de muito bom humor e prontidão.

A meu pai, C.D. Attilio Lopes, pelos desenhos de cicatrização (Fig. 2.8 e 2.9).

À secretária Wladerez Aparecida Gounella Caiado, cuja boa vontade e sorriso terno me fazia tranquilizar cada vez que faltava algum documento na secretaria da pós-graduação.

A DMC Equipamentos Ltda, por ceder o material de impressão utilizado na confecção dos meus exemplares de tese.

Ao amigo José Emílio Fehr Pereira Lopes pelos estudos em grupo que muito nos enriqueceram e pelas tantas primorosas aventuras pelas quais nos fez passar e a Cláudio José Lopes, seu incansável Sancho Pança.

Ao amigo Augusto César Ribeiro Figueiredo, pelas aulas particulares de reposição daquelas que perdi quando minha filha nasceu, pelos gráficos que me preparou com tanto carinho e competência e pela atenção que me dispensou nas situações de desespero sempre que meu XP não funcionava.

À minha avó, Yolanda Fernandes de Almeida e à minha mãe, Maria Nazareth Almeida Lopes, pelo incentivo e apoio incondicionais.

Aos meus sogros, Maria Sirlei Brumati Massini e Renaldo Massini, por levar minha nenê às salas de aula, cada vez que se aproximava a hora de suas mamadas e pelo eterno apoio e incentivo.

Aos meus familiares, amigos, sobrinhas e afilhadas, cujas horas roubadas de seu convívio souberam transformar em incentivo, apoio e inspiração.

A meus queridos alunos que sempre acreditaram em mim e serviram como incentivo para eu continuar buscando os porquês, apesar de tantas dificuldades pelas quais temos que passar.

“La vida esta hecha de pequeños
detalles que hacen de los recuerdos aquellas llaves mágicas
que te transportan a una sensación vivida y añorada”

Dedicatória

A meu marido, companheiro e grande amor, Renaldo.

À minha pequena Chiara, que me ensinou o grande sentido da vida.

“Que a tudo o amor obriga
E vence tudo”

Camões

“Hay hombres que luchan un día
Y son buenos
Hay otros que luchan un año
Y son mejores
Hay quienes luchan muchos años
Y son muy buenos
Pero hay los que luchan
Toda la vida
Esos son los imprescindibles”.

B. Brecht

Homenagem Especial

Aos Professores Dr. Mariano Vélez González (Espanha) e Dr. Jan Tunér (Suécia), colaboradores e mestres de todos aqueles interessados na incessante busca dos “por quês” da Laser Terapia. Grandes homens e verdadeiros cientistas cuja única ambição é divulgar a Laser Terapia de maneira digna e sóbria e de desvendar os mistérios que a cercam. Homens cujo maior mérito é a simplicidade, humildade e respeito com que tratam todos aqueles preocupados em fazer ciência verdadeira e leal. Senhores que eu tenho a grande honra, prazer e orgulho de chamá-los “Queridos amigos”.

Meu carinho e respeito, e meu muito obrigada...

“Feliz aquele que ensina o que sabe
E aprende o que ensina”

Cora Coralina

SUMÁRIO

	Pág.
Nota	i
Abreviaturas.....	ii
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xii
1.Introdução.....	01
2. Revisão da Literatura.....	05
2.1.Laser.....	06
2.2. Reparação Tecidual	25
2.3. Revisão dos Efeitos do Laser na Cicatrização <i>in vivo</i>	40
2.4. Revisão dos Efeitos do Laser na Cicatrização <i>in vitro</i>	55
2.5. A Importância da Metodologia Estatística na Biomedicina	75
3. Proposição	77
4. Material e Métodos	79
4.1. Cultivo Celular	80
4.2. Parte Instrumental: Laser Utilizado	86
4.3. Experimentos Preliminares	90
4.4. Grupos Experimentais	91
5. Resultados e Discussão	103
5.1. Linhagem LMF	104
5.2. Experimentos Preliminares	109
5.3. Grupos Experimentais (Experimentos com Células LMF)	112
6. Conclusões	129
7. Perspectivas	131
Apêndices	133
Referências Bibliográficas	136

Nota

Esta tese apresenta-se dentro das normas explicitadas pelos Institutos de Física, Química e da Escola de Engenharia de São Carlos para obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais do Curso de Pós-Graduação na área de Interunidades. Para aproximar expressões técnicas às normas lexicográficas, o texto foi adequado segundo os seguintes dicionários:

- Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Instituto Antônio Houaiss, 1ª edição. Rio de Janeiro, 2001. Editora Objetiva.
- Dicionário Latino Português Geraldo de Ulhoa Cintra e José Cretela Júnior. São Paulo, 1944. Editora Anchieta Limitada.

Para as referências bibliográficas, foram adaptadas e simplificadas as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT-NBR6623/1989.

A abreviatura de títulos e periódicos obedecem às listagens do “Index to Dental Literature”.

Abreviaturas

Å: Angström

As-Ga: Arsenieto de gálio

As-Ga-Al: Arsenieto de gálio-alumínio

ATP: Adenosina-trifosfato

ADP: Adenosina-difosfato

C: Centígrado

cél: Célula

cels: Células

cm: Centímetro

cm²: Centímetro quadrado

λ : Comprimento de onda

CO₂: Dióxido de carbono

DE: Densidade de Energia

DP: Densidade de Potência

DME: Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Di-metil sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EDTA: *Ethylenediamine-tetraacetic acid* = Ácido etilenodiamino tetraacético

EGF: *Epidermal Growth Factor* = Fator de crescimento epidérmico

EGF-R: Receptor de EGF

f: Frequência

FAF: *Fibroblast Activating Factor* = Fator ativador de fibroblasto

aFGF: *Acid Fibroblast Growth Factor* = Fator de crescimento ácido do fibroblasto

bFGF: *Basic Fibroblast Growth Factor* = Fator de crescimento básico do fibroblasto

FGF-R: Receptor de FGF

Φ : Diâmetro do feixe laser

g: Grama

gl: Glândula

Ga: Gálio

h: Horas

He-Cd: Hélio Cádmio

HeLa: Células de linhagem HeLa

He-Ne: Hélio Neônio

Hz: Hertz

IGF I: *Insulin-like Growth Factor* = Fator de crescimento semelhante à insulina I

IGF II: *Insulin-like Growth Factor* = Fator de crescimento semelhante à insulina II

IL-1: *Interleukin-1* = Interleucina-1

IL-6: *Interleukin-6* = Interleucina-6

IL-8: *Interleukin-8* = Interleucina-8

J: Joules

Kg: Kilograma

m: Metro

M: Mol

mg: Miligrama

min: Minutos

mks: Sistema metro-kilograma-segundo

ml: Mililitro

μl: Microlitros

mm: Milímetro

mM: Milimol

m/s: Minutos por segundo

mrاد: Miliradiano

mW: Miliwatts

μm: Micrômetro

N₂: Nitrogênio

nm: Nanômetros

O₂: Oxigênio

P: Potência

PBSA: *Phosphate Buffer Saline* = Solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio

pH: Potencial hidrogeniônico

PM: Peso molecular

RNA: Ácido ribonucléico

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

s: Segundo

SFB: Soro fetal bovino

TEM: *Transversal Eletromagnetic Mode* = Modo eletromagnético transversal

TEMoo: *Gaussian Laser Beam* = Raio laser gaussiano

TGF α : *Transforming Growth Factor alfa* = Fator de crescimento transformante alfa

TGF β : *Transforming Growth Factor beta* = Fator de crescimento transformante beta

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor-alfa* = Fator de necrose tumoral-alfa

W: Watts

°C: Graus Celsius

x 100 = Aumento de 100 vezes

x 200 = Aumento de 200 vezes

$\leq$: Menor e igual

$\geq$: Maior e igual

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 2.1: Mensuração de um comprimento de onda eletromagnética	07
Figura 2.2: Espectro de oscilações eletromagnéticas.	08
Figura 2.3: Diagrama de um laser.	10
Figura 2.4: Diferentes tipos de emissão de um diodo laser.	10
Figura 2.5.a: Configuração básica de um diodo laser.	12
Figura 2.5.b: Configuração básica de um diodo laser de heterojunção dupla.	13
Figura 2.6: Coeficientes de absorção para diferentes cromóforos em função do comprimento de onda, proposto por JACQUES em 1995.	19
Figura 2.7: Modelo de KARU modificado por SMITH. Ação foto-química do laser visível na cadeia redox da mitocôndria. Ação foto-física do laser infravermelho na membrana celular. Ambos desencadeiam respostas celulares, que geram uma cascata bioquímica de reações.	21
Figura 2.8: Quadro de uma cicatrização por primeira intenção numa ferida fechada, não infectada, como uma ferida cirúrgica incisional. As margens estão próximas e o processo de cicatrização evolui diretamente à produção de uma cicatriz (ALMEIDA-LOPES, 1999).	26
Figura 2.9: Quadro de uma cicatrização por segunda intenção. Acima: cicatrização por segunda intenção numa ferida aberta não infectada. A fenda é primeiramente preenchida por tecido de granulação, o qual se contrai e torna-se uma cicatriz. Abaixo: cicatrização por segunda intenção em uma ferida infectada (as setas	

vermelhas representam as bactérias). A ferida é preenchida com tecido de granulação, o qual produz pus até as bactérias serem eliminadas. Depois disso o tecido de granulação contrai e produz uma cicatriz (ALMEIDA-LOPES, 1999). 27

Figura 4.1: Frasco de cultivo com 25 cm² de área cultivável contendo as células em meio DME. A coloração alaranjada do meio de cultura demonstra a alteração do pH de 7,2 a 7,4 (pelo vermelho de fenol). 81

Figura 4.2: Placas de cultivo com 35 x 10 mm de área cultivável contendo as células que foram semeadas e divididas em três grupos e nove subgrupos. Em cada contagem três placas de cada subgrupo foram paradas e a contagem foi feita em triplicata. 84

Figura 4.3: Fotografia do aparelho confeccionado para o experimento. 85

Figura 4.4: Esquema didático ilustrando o ângulo de divergência do laser, bem como seu *spot* (área transversal do feixe na posição focal). 86

Figura 4.5.a: Perfil de emissão do feixe de laser ilustrado tridimensionalmente (gráfico do tipo *Scatter*). 87

Figura 4.5.b: Perfil de emissão do feixe de laser ilustrado tridimensionalmente (gráfico do tipo *Trajectory*). 87

Figura 4.6: Detalhe do esquema de aplicação dentro do fluxo laminar. 90

Figura 4.7: A caixa contendo as placas serviu para garantir condição de obscuridade parcial. 91

Figura 4.8: A irradiação foi feita em um único ponto, sempre no centro da placa. 92

Figura 4.9: A placa estava distante 1 cm da saída da sonda do laser. 93

Figura 4.10: Esquema de aplicação montado dentro do fluxo laminar em condições de esterilidade. Todas as placas, incluindo os grupos controle, foram submetidas às mesmas condições. Os grupos controle permaneceram o mesmo tempo que os demais fora da estufa.	94
Figura 4.11: Fotografia da Câmara de Neubauer utilizada para contagem de células.	99
Figura 5.1: Crescimento celular das células LMF em meio DME com diferentes concentrações de soro fetal bovino.	104
Figura 5.2: Microscopia de contraste de fase onde podemos observar o aspecto de um cultivo controle em meio DME com 10% de soro fetal bovino. Células estão dispersas em pequeno número. Células em divisão são observadas (x 100).	105
Figura 5.3: Grupo com DME e 5% de soro fetal bovino irradiado aos quatro dias apresentando várias células em divisão celular (x 100).	106
Figura 5.4: Grupo com DME e 10% de soro fetal bovino irradiado aos seis dias. Observa-se grande tendência à formação de feixes paralelos (x 100).	106
Figura 5.5: Curvas de absorção para a placa e para o meio + placa.	107
Figura 5.6: Curva de variação de temperatura para o laser L1, com 1 minuto de aplicação <i>in vitro</i>	109
Figura 5.7: Curva de variação de temperatura para o laser L1, com 2 minutos de aplicação <i>in vitro</i>	109
Figura 5.8: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 1, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a dose aplicada.	114

Figura 5.9: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 1, de acordo com o dia de observação e a dose aplicada.	114
Figura 5.10: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 2, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a irradiância.	118
Figura 5.11: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 2, de acordo com o dia de observação e a irradiância.	118
Figura 5.12: Taxa de multiplicação celular, de acordo com a taxa de variação da potência por dia e a potência utilizada.	120
Figura 5.13: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 3, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a emissão.	123
Figura 5.14: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 3, de acordo com o dia de observação e o tipo de emissão.	124

Índice de Tabelas

	Pág.
Tabela 2.1: Fatores de crescimento implicados na reparação de feridas cutâneas. ...	35
Tabela 2.2: Atividade biológica dos fatores de crescimento implicados na reparação cutânea.	36
Tabela 4.1: Parâmetros de irradiação de L1.	95
Tabela 4.2: Parâmetros de irradiação de L2.	96
Tabela 4.3: Parâmetros de irradiação de L3.	97
Tabela 5.1: Média da contagem celular para os diferentes grupos controles.	103
Tabela 5.2: Diferença entre médias do número de células viáveis ($\times 10^3$) obtidas nos dias dois, quatro e seis que não receberam irradiação, pelo teste de KRUSKAL-WALLIS.	103
Tabela 5.3: Números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 1 em triplicata, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da dose. Média e desvio padrão (DP) da triplicata.	113
Tabela 5.4: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 1.	113
Tabela 5.5: Números de células viáveis divididos por 1000 para o experimento 2 em triplicata, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da irradiância com fluência fixa de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Média e desvio padrão (DP) da triplicata. Média celular e valor normalizado.....	117

Tabela 5.6: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 2.	117
Tabela 5.7: Números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 3, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da emissão (pulsada: 10 a 180 Hz ou contínua: CW), com fluência de 2 J/cm ² e potência de 56 mW. Média e desvio padrão (DP) da triplicata.	122
Tabela 5.8: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 3.	123
Tabela 5.9: Comparação das médias de células viáveis (divididas por mil), em cada tempo após a irradiação, pelo teste de Tukey no experimento 3 (letras iguais em uma mesma coluna indicam que as médias não são significativamente diferentes ao nível de 5%).	123
Tabela 5.10: Coeficiente de correlação e coeficiente de regressão (dividido por 1000) para interpretação da variação das médias dos tratamentos nos três experimentos em relação ao tempo.	125

Resumo

O laser operando em baixa intensidade tem sido utilizado em tratamentos odontológicos visando melhorar a regeneração e cicatrização de tecidos. Com o objetivo de analisar o efeito desse laser na proliferação de fibroblastos gengivais “in vitro”, desenvolvemos uma linhagem primária a partir de fragmentos de gengiva. Trabalhamos em um modelo de estudo “in vitro” no qual cultivamos os fibroblastos em condição de déficit nutricional parcial (meio de cultivo DME com 5% de soro fetal bovino), simulando uma situação de estresse celular.

Foram feitos 3 experimentos distintos, para todos utilizamos um diodo-laser de 664 nm. Para o experimento 1, células LMF foram plaqueadas em placas de Petri e após 24 horas as placas foram divididas em 4 grupos, irradiados com potência fixa de 56 mW, mas variando a fluência: 2 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² e 15 J/cm². Para o experimento 2, células LMF foram plaqueadas em placas de Petri e após 24 horas as placas foram divididas em 2 grupos, irradiados com fluência fixa de 2 J/cm², mas variando a potência: 28 mW e 56 mW. Para o experimento 3, células LMF foram plaqueadas em placas de Petri e após 24 horas as placas foram divididas em 5 grupos, irradiados com potência fixa de 56 mW, fluência fixa de 2 J/cm², mas variando o tipo de emissão: contínua, ou intermitente com frequências de: 10 Hz, 60 Hz, 120 Hz e 180 Hz. Foram feitas 4 irradiações, a cada 12 horas.

Células que estavam em concentração de 5% de SFB e irradiadas mostraram crescimento mais acelerado em todos os grupos estudados. No experimento 1 obtivemos: células irradiadas com diferentes doses apresentaram proliferação semelhante; sendo melhores resultados para os grupos irradiados com fluência de 2 J/cm². No experimento 2: células irradiadas com irradiância diferentes apresentaram melhores resultados para potências maiores. No experimento 3: células irradiadas com emissão contínua apresentaram maior proliferação que aquelas irradiadas com laser intermitente, sendo que quanto maior a frequência, maior a proliferação celular.

Menores doses de laser aumentaram mais a proliferação de fibroblastos; menor tempo de exposição resultou em mais alta proliferação celular; o laser emitido no modo contínuo apresentou melhores resultados em termos de proliferação que o laser

intermitente, sendo que para o laser pulsado, quanto maior a frequência, melhores resultados que frequências menores.

Abstract

The low level laser therapy (LLLT) has been used to improve wound healing. In order to verify the effect of LLLT on the in vitro proliferation of gingival fibroblasts we worked with primary culture of human gingival fibroblasts. The cell line used was LMF which grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DME) with 5% (nutritional deficit) of fetal bovine serum (fbs) in order to simulate a cellular stress condition.

Laser irradiation was carried out with diode laser with wavelength at 664 nm in three conditions. At first, we kept the output power stable at 56 mW, and set the total energy applied at 2, 5, 10 and 15 Joules. Then, the energy was set at 2 Joules and we worked with power output at 56 mW and 28 mW. At last, with the energy set at 2 Joules and the power output at 56 mW, we worked with the laser emitting in CW and pulsed modes (setting the frequencies at 10, 60, 120 and 180 Hz).

We found that in the first part of the experiment (stable output power and different energy applied), the best results were achieved for the total deposited energy of 2 Joules. The conclusion for the second part (energy set at 2 Joules and different output power) was that the best results were achieved when using the highest output power. The conclusion for the last part (energy set at 2 Joules, output power set at 56mW and CW or Pulsed modes at different frequencies) was that CW mode presented the best results, and for the Pulsed mode, the highest frequency presented the best results.

A lower energy rate improves in vitro fibroblasts proliferation, a lower laser exposure time results in higher proliferation and laser emitting on CW mode present best results in terms of proliferation than pulsed laser, and when pulsed lasers are being used high frequencies are better than low frequencies.

“Antes de tocar Mozart,
É preciso aprender as notas”

Gerard Zwang

1. Introdução

1. Introdução

A palavra laser é um acrônimo (do grego, acro significa ponta; extremidade; nomos significa lei). Acrônimo por definição significa: palavra formada pela inicial ou por mais de uma letra de cada um dos segmentos sucessivos de uma locução, HOUAISSI, 2001. É um acrônimo com origem na língua inglesa que significa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, cuja tradução seria: amplificação de luz por emissão estimulada de radiação. Esta radiação é eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características bastante específicas.

A radiação laser é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda. É uma radiação com coerência espacial e temporal, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo. Sua direcionalidade permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos. Com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada.

São justamente as características especiais desse tipo de luz que a faz ter propriedades terapêuticas importantes e a permite ser utilizada em cirurgias com vantagens muito superiores ao uso do bisturi convencional. As radiações ópticas produzidas pelos lasers têm basicamente as mesmas características, pois são gerados da mesma forma, entretanto pode-se trabalhar com o laser buscando resultados clínicos bastante específicos, posto que, o que determina sua interação com o tecido é a densidade de potência do laser, bem como seu comprimento de onda.

A célula tem um limiar de sobrevivência, segundo o tecido onde ela está localizada e segundo seu estado fisiológico. Quando trabalhamos com o laser respeitando esse limiar celular, lhe oferecemos uma baixa intensidade de energia, e trabalhamos com o laser operando em baixa densidade de potência. Por isso os clínicos conhecem esse laser como “laser de baixa potência” ou “laser de baixa intensidade de energia”. Com ele, ainda se pode trabalhar de duas formas distintas, buscando-se

interações bastante específicas. A primeira delas é quando oferecemos uma densidade de energia baixa, mas suficientemente alta para que a célula alvo utilize essa energia de maneira a estimular sua membrana, ou suas mitocôndrias. Dessa forma estaremos induzindo essa célula a biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada. A partir de 1998, OHSHIRO e CALDERHEAD, passaram a chamar esse tipo de terapia com laser de Laserterapia, e o laser empregado para tanto, que é o laser de baixa intensidade, passou a ser conhecido como laser terapêutico. Sua principal indicação são todos os quadros patológicos onde se gostaria de lograr melhor qualidade e maior rapidez do processo reparacional (quadros de pós-operatório, reparação de tecido mole, ósseo e nervoso), quadros de edema instalado (onde se busca uma mediação do processo inflamatório), ou nos quadros de dor (crônica e aguda).

Podemos ainda trabalhar com o laser operando em baixa intensidade de energia, mas com uma energia tão desprezivelmente baixa, que nem esse estímulo em organelas ou membranas celulares, ele é capaz de fazer. A sua potência emitida seria comparada a de uma ponteira laser, utilizada em salas de aula. Sua finalidade clínica seria a utilização em diagnóstico de cáries incipientes e células tumorais, entre outras lesões. Esse laser não é capaz de fazer terapia, nem alterar o tecido macroscopicamente, então o conhecemos simplesmente como Laser de Diagnóstico.

Quando, ao contrário, se oferece uma densidade de energia tão alta a ponto de essa energia transformar-se em dano térmico e ultrapassar o limiar de sobrevivência dessa célula, estaremos utilizando o laser com finalidade cirúrgica, já que esse laser está operando em alta intensidade de energia ou em alta potência de energia. Com o laser operando assim, ele é capaz de destruir o tecido, removendo cáries, fazendo incisões, excisões ou vaporizações. A isso denominamos Laser Cirurgia e para tanto utilizamos o Laser Cirúrgico.

A utilização do laser operando em baixa intensidade tem sido estudada desde os anos 60, sendo MESTER (1966) um dos pioneiros em demonstrar seus efeitos na reparação tecidual.

Os efeitos terapêuticos dos lasers sobre os diferentes tecidos biológicos são muito amplos, ao induzir efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, os quais se têm demonstrado em estudos tanto *in vitro* como *in vivo*; destacando-se os trabalhos que demonstram um aumento na microcirculação local (MIRÓ et al., 1984;

MAIER et al., 1990; MAEGAWA et al., 2000), ativação do sistema linfático (LIEVENS, 1986; 1988; 1990; 1991), proliferação de células epiteliais (STEINLECHNER e DYSON, 1993) e fibroblastos (LUBART et al., 1995; WEBB et al., 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 1998b) assim como aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos (ENWEMEKA et al., 1990; SKINNER et al., 1996). Muitos estudos clínicos têm sido publicados confirmando esses efeitos observados em laboratório (TRELLES et al., 1989a; BIHARI e MESTER, 1989; ROCHKIND et al., 1989; BAXTER, 1994; KAMEYA et al., 1995; TANG et al., 1997; REDDY et al., 1998).

Os estudos *in vitro* sobre fibroblastos descrevem um efeito proliferativo ou ativador da síntese protéica, dependendo das características e parâmetros do laser utilizado, tais como: comprimento de onda, forma de emissão, densidade de potência e densidade de energia utilizada, número e frequência de sessões de aplicação do laser. Autores como ABERGEL et al., 1986; 1988; KARU, 1990; AL-WATBAN e ZHANG, 1994, entre outros (BALBONI et al., 1985; HALLMAN et al., 1988; SOUNDRIY et al., 1988; MESTER e MESTER, 1989; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; 1990; LOEVSCALL et al., 1994; NOGUEROL et al., 1994; HALEVY et al., 1997; ALMEIDA-LOPES et al., 2001) trabalharam *in vitro* com fibroblastos. Estes estudos se correlacionam com outros *in vivo* que mostraram efeitos tal como a redução do tempo de cicatrização de feridas dentro do estrato cutâneo e de mucosas (ABERGEL, et al., 1988; TRELLES et al., 1989; TERRIBILE et al., 1992; BIHARI E MESTER, 1989; ROCHKIND et al., 1989; AL-WATBAN e ZHANG, 1994; HALEVY et al., 1997).

Também no que se refere à reparação óssea o laser mostra-se efetivo, seja em trabalhos *in vitro*, nos quais se observa aumento da atividade osteoblástica (FREITAS et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2001; GUZZARDELLA et al., 2002), seja em trabalhos *in vivo* nos quais se observa ganho ósseo, tanto em trabalhos com animais (LUGER et al., 1998) como em humanos (HERNANDEZ et al., 1997).

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, sendo os fibroblastos uma das células diretamente envolvidas nesse complexo processo.

A ação dos diferentes comprimentos de onda no metabolismo celular vem sendo estudada por diferentes autores. Já se sabe que a ação desses lasers varia segundo a posição que ocupam no espectro de radiações eletromagnéticas, e que sua ação sobre as células é diferente para os comprimentos de onda infravermelhos e para os visíveis

(KARU, 1988). Entretanto, a resposta clínica não varia intensamente. Também se sabe que os parâmetros de irradiação, tais como: irradiância, fluência e intermitência do laser, assim como número total e frequência de aplicações, são de fundamental importância para a obtenção dos resultados.

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito, *in vitro*, de um diodo laser visível operando em 664 nm sobre a proliferação de fibroblastos de gengiva humana, buscando estabelecer os melhores parâmetros de irradiação.

“Assim que você pensar que sabe
como são realmente as coisas,
descubra outra maneira de olhar para elas”

Robin Williams

2. Revisão da Literatura

2.1. Laser

2.1.1. Luz e seus Princípios Básicos

A luz pode ser descrita como uma oscilação eletromagnética, e como tal tem algumas características que a identificam plenamente.

Essas oscilações também são conhecidas por radiações ou ondas eletromagnéticas, e dentro dessa classe de ondas, genericamente, existem as que não podemos ver, tais como as ondas sonoras emitidas por alguém que fala ou canta, as ondas de rádio AM e FM, e existem aquelas que podemos ver: as luminosas, compostas por fótons, tais como a luz emitida pelas lâmpadas dos lustres das casas. Estas emissões estão organizadas segundo o que se chama de espectro de radiações eletromagnéticas, e estão classificadas segundo uma característica particular: o seu Comprimento de Onda. Esse espectro é composto por radiações infravermelhas, radiações visíveis, radiações ultravioletas, radiações ionizantes (raios x e raios gama), além de outros tipos de radiação que não dizem respeito a este trabalho. Os lasers utilizados para tratamento médico, odontológico e veterinário emitem radiações que estão situadas na faixa das radiações visíveis, infravermelhas e ultravioleta próximo, não ionizantes.

Para podermos identificar em que parte do espectro está classificada uma determinada radiação, precisamos conhecer seu comprimento de onda, que nada mais é do que a distância medida entre dois picos consecutivos desta trajetória (figura 2.1). A unidade utilizada para expressar essa grandeza é uma fração do metro, normalmente o nanômetro, que é equivalente a 0,000000001 metros (ou 10^{-9}).

Uma maneira simples de entender o conceito de espectro é observando um arco-íris (figura 2.2). Este fenômeno natural é formado pela decomposição da luz branca em sete cores básicas. Estas sete cores, que podemos enxergar, fazem parte do espectro de radiações eletromagnéticas e são definidas por seus comprimentos de onda. Cada luz tem um comprimento de onda próprio, e isso acontece com todas as cores básicas. Existem, porém, outras “cores” que não conseguimos enxergar, mas que podemos sentir seus efeitos.

Figura 2.1. Mensuração de um comprimento de onda eletromagnética.

Na escala de comprimento de onda, abaixo da faixa de luz que chamamos de visível, temos o ultravioleta, que por sua vez é também uma faixa de luz bem ampla em termos de comprimento de onda. A luz ultravioleta é responsável pelo escurecimento de nossa pele quando nos expomos ao sol.

Acima da faixa de luz que chamamos de visível, temos o infravermelho, que é também uma faixa de luz muito mais ampla do que a faixa que conseguimos enxergar. Esta luz é responsável pelo aquecimento que observamos na luz gerada pelos aparelhos foto-polimerizadores de luz halógena, e que é comumente chamada de “calor”.

Figura 2.2. Espectro de oscilações eletromagnéticas.

O laser nada mais é do que luz, e portanto tem o comportamento de luz, ou seja, pode ser refletido, absorvido, transmitido ou sofrer espalhamento. Entretanto é uma luz com características muito especiais: paralelismo, coerência e monocromaticidade.

O laser é um tipo de luz cujos fótons se propagam sobre trajetórias paralelas, diferentemente da luz comum, onde fótons de comprimentos de onda diversos são emitidos e se propagam de forma caótica, em todas as direções. O laser é uma luz coerente, onde os picos e vales de todas as trajetórias em forma de ondas dos diferentes fótons que a compõem coincidem em termos de direção, amplitude, comprimento e fase. Difere da luz comum, onde não existe sincronia entre os fótons emitidos. Todos os fótons emitidos se propagam segundo trajetórias idênticas, sendo assim, são dispositivos capazes de emitir luz com comprimento de onda único e definido. De forma simplista, fótons de cor pura.

Para a produção de um laser, são necessárias algumas condições especiais. Primeiramente necessita-se de um “Meio Ativo”, composto por substâncias (gasosas, líquidas, sólidas, ou ainda por suas associações), que geram luz quando excitadas por uma fonte de energia externa. Esse processo de excitação é denominado de

Bombeamento e sua função é transformar o meio ativo em meio amplificador de radiação, já que o bombeamento promove no meio ativo, o fenômeno denominado Inversão de População, ou seja, os elétrons da camada de valência do meio absorvem a energia bombeada e saltam para um nível atômico mais externo. Esse segundo nível está mais distante da influência do núcleo, portanto a energia dele é maior. Quando o primeiro elétron decai, retorna ao primeiro nível com menor energia, liberando um “pacotinho” de energia altamente concentrado que se chama fóton, esse fóton acaba por excitar o decaimento nos demais átomos, que já estavam no estado excitado. Isso gera um processo em cascata e com crescimento em progressão geométrica que resulta na emissão estimulada de radiação (BAGNATO, 2001).

O meio ativo deve estar contido por uma Cavidade Ressonante. Nas extremidades internas dela devem existir espelhos, sendo um totalmente refletor (ou refletivo) e outro parcialmente refletor, isso assegurará que esse sistema composto por reação óptica e meio ativo seja a sede de uma oscilação laser. Como a cavidade do laser é composta por espelhos em suas extremidades, essa radiação é amplificada, ou seja, os fótons emitidos por estimulação entram em fase (todos os fótons assumem uma mesma direção) e permitem que ocorra um incremento a cada “viagem” completada dentro da cavidade.

Existem muitos tipos de laser, porém, o princípio básico para produzir um feixe de laser é o mesmo para todos eles (figura 2.3).

Para a identificação do laser precisamos conhecer sua fonte geradora (caracterizada pelo meio ativo que vai gerar a luz laser) e sua intensidade (caracterizada pela potência do laser): do mesmo modo que as lâmpadas residenciais são identificadas por sua potência, normalmente expressa em Watts, também utilizamos esta unidade (ou fração dela), para identificar a potência dos lasers ($\text{mW} = \text{miliWatt} = 0,001 \text{ Watt}$).

A última característica relevante dos lasers é referente ao seu regime de funcionamento, isto é, existem aqueles que quando acionados, permanecem ligados continuamente até serem desligados (lasers contínuos). Existem outros tipos que funcionam de forma pulsada ou chaveada (figura 2.4), ou seja, estão parte do tempo ligados e parte do tempo desligados. Nesta categoria encontramos a maioria dos lasers de alta intensidade.

Figura 2.3. Diagrama de um laser.

Figura 2.4. Diferentes tipos de emissão de um diodo laser.

2.1.1.1. Laser de Semicondutor

Os lasers de semicondutor são os emissores de menores dimensões existentes e podem ser produzidos em grande escala. Graças à sua eficiência e pequeno tamanho são especialmente adequados para utilização em clínica médica-odontológica.

O meio ativo mais simples está constituído por um diodo (junção P-N) com elevada concentração de impurezas (dopantes) doadoras na zona N e receptoras na zona P, e para o qual o material base é o mesmo para ambas zonas (por exemplo GaAs ou InP). Esse tipo de arranjo é conhecido com o nome de homojunção. A configuração básica deste tipo de diodo está indicado na figura 2.5.a.

Quando se aplica uma tensão elétrica V , polarizando diretamente essa união, é criada uma estreita região em torno da mesma, onde se produz uma inversão de população. Esta acontece quando existe uma maior probabilidade de que os elétrons estejam na banda de condução, do que na banda de valência. A polarização direta produz uma corrente elétrica que se traduz na passagem de elétrons à zona P e de lacunas à zona N. A radiação luminosa se produz por uma recombinação de elétrons e lacunas na zona de junção.

O comprimento de onda da transição depende do salto energético entre a banda de valência e a de condução. A energia potencial necessária para que um elétron salte da banda de valência à banda de condução é igual à energia do fóton que se produz depois da sua recombinação.

Normalmente os diodos lasers comerciais são do tipo de heterojunção (figura 2.5.b), ou seja, formados pela união de dois materiais distintos (por exemplo GaAs e AlGaAs). Este tipo de estrutura apresenta certas vantagens em relação à homojunção, que são:

- Maior ganho óptico por unidade de volume.
- A radiação laser fica confinada na região onde se produz o ganho óptico, produzindo-se um efeito de guia de onda por diferença de índices de refração.

Para se obter a ação laser, duas faces do elemento semicondutor são cortadas paralelamente e polidas, sendo que nas outras duas é necessário que o acabamento seja rugoso, a fim de evitar que se produza o fenómeno laser entre as mesmas. Frequentemente as duas superfícies polidas não são recobertas com revestimentos anti-reflexivos, já que o índice de refração de um semicondutor é grande, e existe suficiente refletividade (cerca de 35 por 100) na superfície entre o semicondutor e o ar para produzir uma realimentação óptica aceitável.

A região ativa por onde circula a energia laser tem secção retangular, com dimensões típicas de $0,5\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ nos lasers de heterounião. O raio laser de saída tem secção elíptica, com divergências diferentes no plano paralelo à união e no perpendicular. Com adequados sistemas ópticos, esta secção pode ser convertida em circular, mais conveniente para sua posterior focalização.

É interessante analisar os diagramas potência-intensidade para um diodo laser convencional. Observam-se dois aspectos relevantes:

- A presença de uma corrente limite, abaixo da qual não se produz o fenómeno laser.
- A forte correlação entre a resposta do diodo e a temperatura de trabalho.

Com a presente tecnologia de diodos laser, são habituais patamares de densidade de corrente de ordem de $50\ \text{A}/\text{cm}^2$ e as potências ópticas máximas estão próximas dos 2000 mW.

As aplicações dos diodos laser são muito variadas, mas se destacam sobretudo aquelas no campo das comunicações por fibra óptica.

Outras aplicações de interesse são: reconhecimento dimensional, leitura de código de barras, leitura de *compact disk*, impressoras de escritório, sistemas de ponteira, aplicações médicas, entre outras.

Figura 2.5.a. Configuração básica de um diodo laser.

Figura 2.5.b. Configuração básica de um diodo laser de heterojunção dupla.

2.1.2. Aspectos Históricos do Laser

A aplicação da luz como tratamento foto-terapêutico é bastante antigo. Em 1903, Finsen recebeu o Prêmio Nobel pelo avanço no tratamento do Lupus Vulgar utilizando fonte de luz ultravioleta. Por essa razão, alguns autores como AGGERBO em 1960 (*apud* RIGAU, 1996), consideraram Finsen como pai da Foto-medicina moderna.

Einstein postulou as bases teóricas sobre a manipulação controlada de ondas de luz, e publicou suas idéias em 1917. Esta teoria foi verificada por Landberg em 1928, mas somente entre 1933 e 1934 Townes e Weber falaram pela primeira vez em amplificação de microondas. Nessa mesma época houve um grande avanço no desenvolvimento de fibras ópticas e material óptico de uma maneira geral. A teoria da amplificação da emissão estimulada foi patenteada em 1951 por Fabrikant (um físico russo) e sua equipe, mas permaneceram sem publicá-la até 1959 e por isso não pode influenciar os trabalhos que se desenvolviam nos Estados Unidos.

O primeiro aparelho em que se usou emissão estimulada foi chamado de MASER (outro acrônimo inglês formado a partir de *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), construído por Townes em 1952. Weber propôs no mesmo ano a amplificação do MASER, e essa teoria foi publicada por ele em 1953. Em 1954, Basov e Prokhorov desenvolveram os emissores de microondas que acabaram sendo utilizados com finalidade diagnóstica. Em 1956, Bloembergen propôs uma massa sólida aos MASER e em 1958 Schawlow e Townes publicaram princípios da amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação e foi então quando se falou pela primeira vez de luz monocromática e coerente.

O primeiro laser da história foi construído em 1960, por um cientista americano, Theodore Maiman, nos Estados Unidos (MAIMAN, 1960). Este primeiro laser foi desenvolvido a partir de uma barra de rubi sintético, que produzia uma luz curta e de alta densidade de energia, operando em 694,3 nm quando uma luz comum intensa incidia sobre a mesma. Foi desenvolvido no *Hugles Aircraft Research Laboratory* em Malibu, e nessa data apresentada à imprensa.

Em 1961 Gould obteve a patente de aplicação, feito que deu lugar a uma grande confusão à cerca de quem foi seu inventor. Ele publicou as indicações biomédicas da luz laser de alta densidade de energia. A primeira aplicação foi realizada no campo da Oftalmologia e também foi onde se observou a primeira complicação clínica: em 1962 Dulberger publicou um trabalho sobre lesões retiniais produzidas pela focalização da luz e com conseqüente perda de visão.

Em 1961 foi fundado por Leon Goldman, na Universidade de Cincinnati, o primeiro laboratório de laser para aplicações médicas (GOLDMAN, 1981), onde as primeiras experiências em animais foram realizadas.

Em 1962 Patel desenvolveu o primeiro laser, que posteriormente seria usado com finalidade terapêutica, um hélio-neônio (He-Ne) com comprimento de onda de 632,8 nm (PÖNTINEN, 1992).

Na antiga União Soviética, diferentes cientistas trabalhavam simultaneamente no desenvolvimento do laser. Basov e Prokhorov fizeram grandes progressos nessa tecnologia e junto com Townes ganharam o Premio Nobel de 1964.

Em 1966, as primeiras aplicações clínicas com laser operando em baixa potência foram relatadas por Endre Mester de Budapeste, Hungria, que apresentou os primeiros relatos de casos clínicos sobre “Bioestimulação com Laser” de úlceras crônicas de membros inferiores usando lasers de rubi e de argônio, tendo publicado seus primeiros artigos em 1966 (MESTER, 1966). Ele produziu um grande volume de trabalhos científicos, clínicos e experimentais, tendo o laser de He-Ne como tema central.

Os lasers terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de He-Ne com emissão na região do vermelho. Nesta região do espectro eletromagnético, a radiação laser apresenta pequena penetração nos tecidos biológicos, o que limitava a sua utilização. Para a aplicação desse tipo de laser em lesões mais profundas, era necessária uma fibra óptica para guiar a radiação para o interior do corpo do paciente, limitando e contra-indicando muitas vezes esse tipo de terapia, por ser uma técnica invasiva. Outra limitação dos lasers de He-Ne era sua grande dimensão e também o fato de seu meio ativo estar contido por ampolas de vidro que poderiam romper-se facilmente, além do gás hélio permear rapidamente a parede da ampola, reduzindo drasticamente o tempo de vida destes aparelhos.

Em 1973, seguindo a mesma linha de Mester, Heinrich Plogg de Fort Coulombe, Canadá, apresentou um trabalho sobre “O uso do laser em acupuntura sem agulhas”, para atenuação de dores (BAXTER, 1994). A partir do final dessa década começaram a ser desenvolvidos diodos lasers semicondutores, dando origem ao primeiro diodo operando na região do infravermelho próximo ($\lambda = 904$ nm), constituído de um cristal de arseneto de gálio (As-Ga). As vantagens dele sobre o He-Ne é que, além da menor dimensão, apresenta maior penetração no tecido biológico. Outra vantagem é que este dispositivo pode operar de forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só opera em modo contínuo. O efeito da foto-bioestimulação com laser pulsado foi tema de diferentes trabalhos, sendo que MORRONE et al., em 1998, demonstraram que para aplicações *in vivo* a radiação contínua apresenta melhores resultados que a radiação pulsada.

Em 1981, apareceu pela primeira vez o relato da aplicação clínica de um diodo laser de As-Ga-Al, publicado por Glen Calderhead, do Japão, que comparava a atenuação de dor promovida por um diodo laser

e o laser de Nd:YAG, (Ytrio e Alumínio, dopado com Neodímio), operando em 1064 nm (CALDERHEAD, 1981).

No mesmo ano, se concedeu o Prêmio Nobel a Schawlow, Bloemberger e Siegmahn, por seus estudos em espectroscopia aplicada a tecnologia laser (GOLDMAN, 1991).

A partir dos anos 90, diferentes dopantes foram introduzidos na tecnologia para obtenção de diodos laser gerando uma larga faixa de comprimentos de onda. Com estes dispositivos hoje se podem ter aparelhos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com alta durabilidade e baixa frequência de manutenção, além de baixo custo.

2.1.3. Aspectos Teóricos

2.1.3.1. Laseres Terapêuticos

Os laseres terapêuticos ou laseres de baixa intensidade, são talvez os mais estudados mundialmente e já fazem parte da rotina de uma grande quantidade de consultórios em países como a Espanha, Rússia e Japão. Uma das razões da popularidade deste tipo de laser está relacionada ao baixo custo do equipamento além da objetividade e simplicidade dos procedimentos clínicos terapêuticos a que se destina.

Os primeiros laseres terapêuticos estudados foram os laseres em que o meio ativo era uma mistura gasosa de Hélio e Neônio (He-Ne), com potência variando entre 5 e 30 mW, e comprimento de onda de 632,8 nm, que está situado dentro da faixa visível do espectro de luz, mais precisamente na região da cor vermelha.

Consistia de um reservatório (tubo) de vidro preenchido com o referido gás, que era acionado por uma fonte de alimentação elétrica geradora de alta tensão. A condução da luz até o ponto de aplicação se dava através de cabo de fibra óptica flexível, tipo feixe de fibras (similar aos cabos utilizados nos fotopolimerizadores de primeira geração), o que conferia um baixo rendimento óptico ao sistema, isto é, pouca luz chegava ao ponto de aplicação.

Aliado à característica de baixo rendimento óptico, existe ainda o fato de que este comprimento de onda é altamente absorvido por tecido mole, o que compromete muito a penetrabilidade da luz.

Estas limitações técnicas impuseram a necessidade de se buscar laseres de baixo custo, com níveis de potência superiores e com comprimentos de onda que pudessem atravessar o tecido mole, sem contudo comprometer a integridade destes tecidos. Isso

foi possível com o surgimento dos lasers de diodo, que são dispositivos eletrônicos relativamente simples e de baixo custo.

Os lasers de diodo mais utilizados em Biomedicina têm como meio ativo o composto de GaAlAs, com comprimento de onda variando entre 760 e 850 nm (o mais utilizado atualmente é o de 830 nm), que está situado fora da faixa visível do espectro de luz, mais precisamente na faixa do infravermelho próximo, com potência variando entre 20 e 400 mW.

Outro tipo de meio ativo utilizado é o composto de InGaAlP, que produz luz com comprimento de onda variando entre 635 e 690 nm, que está situado dentro da faixa visível do espectro de luz, mais precisamente na região da cor vermelha, com potência variando entre 1 e 50 mW. A luz gerada por este tipo de emissor tem as mesmas características descritas para o emissor de gás He-Ne e, portanto, as mesmas limitações em termos de penetrabilidade.

2.1.3.2. Conceito de Irradiância e Fluência

Irradiância é o termo que os foto-biologistas usam como sinônimo para densidade de potência (DP), que é definida como sendo a potência óptica útil do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm^2 . É através do controle da irradiância que o cirurgião pode cortar, vaporizar, coagular ou “soldar” o tecido, quando da utilização de lasers cirúrgicos. A densidade de potência apropriada pode também gerar foto-ativação com o laser de baixa intensidade de energia.

O outro fator sobre o qual o clínico tem controle é o tempo de exposição. Ao multiplicar-se a irradiância pelo tempo de exposição (dado em segundos), pode-se obter a fluência ou densidade de energia, ou ainda dose de energia (DE), em joules/cm^2 .

Para uma dada potência, a irradiância e fluência podem produzir efeitos sobre o tecido biológico que são nitidamente diferenciados. Por exemplo, um laser com potência de saída de 10 W, irradiando uma área 10 cm^2 ($\Phi = 3,5 \text{ cm}$), terá uma irradiância de 1 W/cm^2 . Se o tempo de exposição for igual a 10 minutos, a fluência será de 600 J/cm^2 , o que pode ser considerado como alta energia, causando inclusive dano no tecido alvo. Se o mesmo laser for focalizado sobre uma área de 8 cm^2 , ($\Phi = 0,4 \text{ mm}$), a irradiância será aumentada em 8 vezes, possivelmente gerando dano térmico ao tecido. Se neste segundo caso, o tempo de exposição for reduzido a 1 milissegundo (0,001 s), então a fluência decresce drasticamente atingindo valores da ordem de 8 J/cm^2 , valores tipicamente utilizados em terapia com laser de baixa intensidade.

A fluência é um conceito fundamental na biomedicina. O jargão da medicina é a dose. Em antibioticoterapia, por exemplo, para que se obtenha determinado efeito medicamentoso, a dose terapêutica administrada é fundamental, ou seja, se é prescrita uma dose muito baixa de determinado medicamento por quilograma peso do paciente, não se obtém o resultado esperado. Se ao contrário, prescreve-se uma dose muito alta do mesmo medicamento, pode-se levar o paciente a uma intoxicação, ou mesmo a um choque

anafilático. Da mesma forma é feita a prescrição em terapia com laser de baixa intensidade: doses muito baixas não causam efeitos satisfatórios nos tecidos, enquanto que doses muito altas em tecido mole, podem levar a uma inibição do processo cicatricial.

A fluência equivaleria, então, à quantidade de energia necessária para ativar um determinado número de moléculas suficientes para levar o tecido a reagir de alguma maneira. Essa quantidade de energia vai estimular o tecido cada vez que o excitam com laser.

2.1.3.3. Comprimento de Onda

O comprimento de onda é extremamente importante, pois é ele quem define a profundidade de penetração no tecido alvo (BOURGELAISE, 1983; FULLER, 1983). Diferentes comprimentos de onda apresentam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido. Na figura 2.2., JACQUES (1995) resume os diferentes coeficientes de absorção para diferentes tecidos em função do comprimento de onda. Como podemos observar, as radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do infravermelho médio apresentam alto coeficiente de absorção pela pele, fazendo com que a radiação seja absorvida na superfície, enquanto que na região no infravermelho próximo (820 nm e 840 nm) constata-se baixo coeficiente de absorção, implicando em máxima penetração no tecido (KARU, 1985; 1987).

Os tecidos são heterogêneos do ponto de vista óptico e portanto absorvem e refletem energia de maneira distinta. A importância da absorção acontecer de maneira diversificada segundo o tecido no qual a energia do laser é depositada, está no fato de que segundo o comprimento de onda, o tecido absorverá essa energia mais superficialmente ou deixará a luz passar e ir agir em um alvo instalado na intimidade tecidual (geralmente a membrana celular). A isso denominamos “seletividade” do laser. Uma vez absorvida a energia por parte de uma célula, a energia se converterá em outro tipo de energia. Quando utilizamos os lasers operando em alta intensidade de energia, na maioria das vezes, essa energia se converterá em calor. Quando utilizamos os lasers operando em baixa intensidade de energia, os comprimentos de onda baixos são capazes de excitar eletronicamente as moléculas, enquanto que para os comprimentos de onda maiores haverá uma vibração celular através da excitação da membrana celular.

Figura 2.6: Coeficientes de absorção para diferentes cromóforos em função do comprimento de onda, proposto por JACQUES em 1995.

2.1.3.4. Conceito de Foto-bioativação

O laser operando em baixa intensidade de energia foi considerado por MESTER, em 1969, um Bioestimulador, e por isso, por um determinado período de tempo, encontramos na literatura essa terminologia utilizada como sinônimo para designar esse tipo de laser, que também era chamado de laser de bioestimulação. Ainda não se conhecia muito bem seu mecanismo de ação nessa época, e o que se observava era que os terapeutas tinham excelentes resultados no tratamento de feridas e úlceras abertas, estimulando seu processo de cicatrização. Porém, com o passar do tempo, essa terapia começou a ser utilizada não só para estimular e acelerar processos, mas também para detê-los. MESTER (1969) escolheu a terminologia “Bioestimulação” porque ele basicamente utilizava essa terapia para acelerar o processo de cicatrização em úlceras varicosas e de decúbito. Entretanto, essa terapia passou a ser utilizada muitas vezes buscando-se efeitos antagônicos no tecido biológico: foi utilizada para remover excessos de pigmento, mas também para restaurar a falta deles (SASAKI e OHSHIRO, 1989); para tratar cicatrizes deprimidas, mas também cicatrizes hipertróficas (STRONG, 1997); para aliviar a dor, mas também para fazer com que a sensibilidade voltasse a instalar-se em áreas de parestesia ou paralisia (ROCHKIND et al., 1989); para controlar hipotensão, mas também para tratar hipertensões (ASAGAI et al., 1998). A partir de estudos clínicos e laboratoriais pôde-se concluir que essa terapia não somente acelerava determinados processos, mas também retardava outros, ou simplesmente modulava outros tantos. Os autores começaram então a entender que nesse tipo de terapia o laser desempenhava um papel de normalizador das funções celulares e OSHIRO e CALDERHEAD em 1991, propuseram o nome de “Balanceador e Normalizador de funções”.

2.1.3.5. Diferença da Ação entre a Luz Laser Visível e Infravermelha

A energia dos fótons de uma radiação laser absorvida por uma célula será transformada em energia bioquímica e utilizada em sua cadeia respiratória. TINA KARU, em 1988, descreveu um mecanismo de ação diferente para os lasers emitindo radiação no visível e no infravermelho próximo (Fig. 2.1).

A luz laser visível induz uma reação foto-química, ou seja, há uma direta ativação da indução de síntese de enzimas (BOLOGNANI et al., 1993; OSTUNI et al., 1994; BOLTON et al., 1995), e essa luz tem como primeiro alvo os lisossomos e as mitocôndrias das células.

As organelas não absorvem luz infravermelha, apenas as membranas apresentam resposta a este estímulo. As alterações no potencial de membrana causadas pela energia de fótons no infravermelho próximo (PASSARELA et al., 1984) induzem efeitos foto-físico e foto-elétrico, causando excitação de elétrons, vibração e rotação de moléculas ou rotação de partes delas como um todo, que se traduzem intracelularmente com um incremento na síntese de ATP (COLLS, 1986).

O mecanismo de interação do laser em nível molecular foi descrito primeiramente por KARU (1988). Os incrementos de ATP mitocondrial (PASSARELA et al., 1984; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; FRIEDMANN et al., 1991) que se produzem após a irradiação com laser, favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular (Fig. 2.1). Em estados patológicos, o laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (KARU et al., 1991a; YOUNG et al., 1990; LUBART, et al., 1992b; LOEVSCHALL E ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LUBART et al., 1996; LUBART et al., 1997).

Figura 2.7: Modelo de KARU modificado por SMITH. Ação foto-química do laser visível na cadeia redox da mitocôndria. Ação foto-física do laser infravermelho na membrana celular. Ambos desencadeiam respostas celulares, que geram uma cascata bioquímica de reações.

2.1.3.6. Atuação da Terapia com Laser de Baixa Intensidade

Os lasers utilizados nesse tipo de terapia estão situados na porção visível do espectro das radiações eletromagnéticas, bem como no infravermelho próximo. Os comprimentos de onda mais utilizados estão entre 600 e 1000 nm, estes comprimentos de onda são relativamente pouco absorvidos e consequentemente apresentam uma boa transmissão na pele e nas mucosas (RIGAU, 1996).

O significado biológico e clínico da coerência ainda não está bem definido. Alguns autores como KARU em 1987, baseados em achados em cultura de células e de bactérias, demonstraram que a coerência não é importante. Outros autores como YOUNG et al., 1990, da equipe de MARY DYSON, trabalharam com cultura de células utilizando linhagem de macrófagos e fibroblastos e demonstraram efeitos foto-bioestimulativos significativos utilizando igualmente fontes de luz não-coerente. Também SVAASAND, em 1990, demonstrou que a absorção de fótons advindos das radiações de laser de baixa intensidade por parte de um sistema biológico, em condições de homeostase, são de natureza não-coerente. A coerência da luz perde-se nos primeiros estratos da pele, devido ao fenômeno de dispersão da luz, antes que se produza a absorção dos fótons por cromóforos como a melanina, hemoglobina, porfirinas, citocromo oxidase, entre outros, e não é essencial *in vivo*, como demonstraram PARRISH, 1980; JORI, 1980; ANDERSON e PARRISH, 1982; MCKINLEY et al., 1988; HAZEKI e TAMURA 1989; YOUNG et al., 1990; TERRIBILE et al., 1992 e LUBART et al., 1995. Dessa forma conclui-se que os efeitos biológicos dos lasers de baixa intensidade dependem principalmente de sua monocromaticidade (MESTER et al., 1978; BERKI et al., 1988; KARU 1987; KUBOTA et al. 1989; BIHARI e MESTER, 1989) e da fluência (SHIROTO et al., 1989; LUBART et al., 1992a; AL-WATBAN e ZHANG, 1994; WEI YU et al., 1994; KARU, et al., 1996), assim como da fase de crescimento celular em que as células receberam a irradiação (KARU et al., 1995).

Os diodos lasers e o laser de He-Ne rotineiramente utilizados em aplicações clínicas com finalidade bioestimulativa, e não inibitória, operam bem abaixo de 1 W, o miliwatt ($mW = 0,001 W$) é mais comumente utilizado para especificar a irradiância nesses sistemas. A irradiância média situa-se entre 0,01 e 100 mW/cm^2 , enquanto que a fluência entre 0,1 e 10 J/cm^2 (TRELLES et al., 1989a ; 1989b; MESTER e MESTER, 1989; ROCHKIND et al., 1989; TERRIBILE et al., 1992; WEI YU et al., 1994; BOLTON et al., 1995; ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Para os lasers com emissão intermitente (pulsados e chaveados), alguns autores (DYSON et al., 1991; KARU et al., 1997) especificaram que diferentes frequências produzem diferentes efeitos biológicos. Em 1996, EL SAYED e DYSON apresentaram um estudo *in vitro* sobre o efeito da média de pulso e pulso de duração sobre o número de mastócitos e sua degranulação. Os autores observaram que o aumento do número de mastócitos não foi dependente da frequência de pulso, enquanto que sua degranulação foi.

Quando os experimentos são feitos *in vitro*, por exemplo em cultura de células cujos cultivos apresentem-se em monocamadas, a luz laser incide e conserva sua polarização e coerência. Ali sim, esses fatores podem ser determinantes nos resultados biológicos gerados.

A absorção de fótons por parte da célula, seja diretamente por captação pelos crômofores mitocondriais ou por ação em sua membrana celular, produz estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações foto-químicas. Estas ações determinam alterações foto-dinâmicas em cascatas de reações e em processos fisiológicos com conotações terapêuticas (FUNK et al., 1992; LOEVSCALL e ARENHOLT-BINDSLEV et al., 1994; LUBART et al., 1997).

Esses processos podem manifestar-se clinicamente de três modos. Primeiramente vão agir diretamente na célula, produzindo um efeito primário ou imediato, aumentando o metabolismo celular (KARU et al., 1989; ROCHKIND, et al., 1989; BOLTON et al. 1995), ou, por exemplo, aumentando a síntese de endorfinas e diminuindo a liberação de transmissores nociceptivos, como a bradicinina e a serotonina (ATAKA et al., 1989). Também terá ação na estabilização da membrana celular (PALMGREN, 1992; IJIMA et al., 1991). Clinicamente observaremos uma ação estimulativa e analgésica dessa terapia. Haverá, além disso, um efeito secundário ou indireto, aumentando o fluxo sanguíneo (SCHENK, 1985; KUBOTA e OHSHIRO, 1989; MAEGAWA et al., 2000) e a drenagem linfática (LIEVENS, 1986; 1988; 1990; 1991; ALMEIDA-LOPES et al., 2002). Dessa forma, clinicamente observaremos uma ação mediadora do laser na inflamação. Por fim, haverá a instalação de efeitos terapêuticos gerais ou efeitos tardios, e clinicamente observaremos, por exemplo, a ativação do sistema imunológico (MESTER et al., 1977; TRELLES, 1986; SKOBELKIN et al., 1991; VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., 1994; TUNÉR e HODE, 2002).

2.1.4. Aplicações Clínicas

Devido às suas características de aliviar a dor, estimular a reparação tecidual, reduzir edema e hiperemia nos processos antiinflamatórios, prevenir infecções, além de agir em parestesias e paralisias, o laser de baixa intensidade tem sido empregado freqüentemente em múltiplas especialidades médicas e odontológicas.

Na clínica odontológica existe grande número de aplicações e o uso dessa terapia já se faz rotineira para bioestimulação óssea, em casos de implantes e cirurgia oral menor; para diminuir a dor e edema nos casos de pós-operatórios diversos, úlcera aftosa recorrente, herpes, nevralgias e hipersensibilidades dentinárias; além de ativar a recuperação em quadros de paralisias e parestesias (ALMEIDA-LOPES, 1997; 1998a).

Existe ainda sua indicação no tratamento de doenças sistêmicas com manifestação bucal, como o Líquen-Plano e as Mucosites de modo geral, bem como as auto-imunes como o Lupus Eritematoso e o Pênfigo Vulgar (ALMEIDA-LOPES, 2002; ALMEIDA-LOPES & MASSINI, 2002). A manifestação bucal dessas doenças são lesões ulceradas, com exposição do conjuntivo e, portanto, extremamente dolorosas. Essas doenças não têm cura e causam grande desconforto ao paciente quando os mesmos estão em surto. Elas aparecem ciclicamente e, por ocasião do surto, o paciente sente muita dor e desconforto: é necessária a

utilização de medicação analgésica potente para o paciente poder deglutir e alimentar-se. Além disso, essas lesões comprometem esteticamente o paciente, daí a grande indicação do laser de baixa intensidade para o tratamento durante sua cicatrização. Pelas mesmas razões, existe hoje uma grande indicação para o tratamento de pacientes imunodeprimidos com Mucosites, causadas pós-radioterapia ou pós-infusão medular. Seu uso está tão amplamente difundido que já tratamos dessas lesões preventivamente (BENSADOUN et al., 1999), imediatamente antes da infusão medular, para minimizar as reações adversas em mucosa, pós tratamento quimioterápico.

Em medicina utiliza-se essa terapia para melhorar a cicatrização no tratamento de queimados e de pacientes que receberam algum tipo de enxerto ou retalho, ativando a vascularização dessas regiões. Também é utilizada para o tratamento de dores agudas e crônicas de diversos tipos (KERT e ROSE, 1989) e aquelas causadas por herpes genitais e em pós-operatórios diversos em ginecologia, dermatologia e cirurgia plástica. Também é freqüente sua utilização em medicina do esporte e em fisioterapia em pacientes que sofreram trauma esportivo, devido ao seu emprego com sucesso em quadros de distensões, contraturas musculares, lesões por esforços repetitivos (LER), artrites, artroses entre outros (TUNÉR e HODE, 2002).

2.2. Reparação Tecidual

2.2.1. Introdução

Com a finalidade de produzir um trabalho que sirva de base para posterior consulta e referência em termos de cicatrização estimulada com laserterapia, e como esse trabalho foi produzido em um departamento que é uma fâscia entre a Física e Biomedicina, abordaremos no próximo capítulo o tema reparação de maneira sucinta e didática. O intuito dessa retrospectiva é que o leitor tenha um breve panorama desse complexo processo e dessa forma possa inferir melhor a relação dos experimentos aqui apresentados e sua importância na reparação fisiológica *in vivo*.

O processo de reparação não é um simples processo linear no qual fatores de crescimento disparam a proliferação celular e sim uma integração de processos interativos dinâmicos, que envolve mediadores solúveis, elementos figurados do sangue, produção de matriz extracelular e células parenquimatosas. Desencadeados, esses processos seguem-se em uma sequência e tempo específicos. Devem ser separadas, na reparação, a regeneração e a cicatrização. Regeneração é quando a reposição tecidual é realizada por células do mesmo tipo das que foram perdidas. Assim, quando possível, os parênquimas regeneram. Por outro lado, entende-se por cicatrização quando a reposição tecidual é feita de modo inespecífico, com produção de um tecido conjuntivo próprio: a cicatriz. Ambos os processos estão entremeados, ocorrendo conjuntamente, mas conceitualmente acontecem de maneira diversa. Foge ao escopo deste trabalho estudarmos o fenômeno da regeneração, que tem identidade própria. Daremos ênfase ao estudo da cicatrização, por estar nele envolvido o fibroblasto.

Os eventos da cicatrização tecidual podem ser classicamente divididos em três fases: a fase da inflamação, fase de formação de tecido de granulação com depósito de matriz extracelular e a remodelação tecidual (CLARK, 1993). Essas fases não são mutuamente exclusivas e sim sobrepostas no tempo.

Para MCKINNEY, 1989, os fatores que influenciam o processo também influenciam na aparência final da dita cicatriz. Haverá um processo específico de cura segundo o grau de isquemia, oxigenação e aporte de fatores angiogênicos de crescimento, que aparecem desde o momento em que se estabelece uma ferida até o momento final de sua remodelação, passando pelo seu processo de reposição de tecidos.

O grande cenário para a reparação combina três eventos: hemostasia (porque os vasos estão abertos), inflamação (porque houve uma injúria), e reparação propriamente dita, pois se estruturas foram lesadas ou destruídas, deverá ocorrer reposição de tecidos por regeneração ou por cicatrização.

O plano básico do processo de cicatrização, de uma maneira geral, é sempre o mesmo: preencher aquele espaço e selá-lo com uma cicatriz. Os detalhes de que forma isso irá evoluir, entretanto, variam segundo a presença ou ausência de bactérias, a natureza da ferida (se é fechada ou aberta), o grau de suprimento sangüíneo, a quantidade de tecido morto para ser eliminado, o tipo de tecido lesado e muitos outros fatores (MAJNO e JORIS, 1996).

A situação mais favorável para a cicatrização é quando a ferida está fechada, suturada e não infectada; isto é conhecido como ferida incisional, como oposição a ferida excisional, por meio da qual um pedaço de tecido é removido.

Aqui a cicatrização pode começar imediatamente, porque não há população bacteriana significativa e virtualmente não há tecido morto para ser eliminado. Um termo cirúrgico para esta situação é “cicatrização por primeira intenção” (Fig. 2.8). Em contra partida, a reposição é alongada se há sinal de infecção ou se a ferida permanece aberta devido a uma perda tecidual. Estas duas condições são obstáculos que devem ser superados antes que a ferida se feche; este tipo de cicatrização que ocorre é conhecida por “cicatrização por segunda intenção” (Fig. 2.9).

Figura 2.8: Quadro de uma cicatrização por primeira intenção numa ferida fechada, não infectada, como uma ferida cirúrgica incisional. As margens estão próximas e o processo de cicatrização evolui diretamente à produção de uma cicatriz (ALMEIDA-LOPES, 1999).

Figura 2.9: Quadro de uma cicatrização por segunda intenção. Acima: cicatrização por segunda intenção numa ferida aberta não infectada. A fenda é primeiramente preenchida por tecido de granulação, o qual se contrai e torna-se uma cicatriz. Abaixo: cicatrização por segunda intenção em uma ferida infectada (as setas vermelhas representam as bactérias). A ferida é preenchida com tecido de granulação, o qual produz pus até as bactérias serem eliminadas. Depois disso o tecido de granulação contrai e produz uma cicatriz (ALMEIDA-LOPES, 1999).

2.2.2. Cicatrização por Primeira Intenção: Fechamento de Feridas Assépticas

Descreveremos a seguir a cicatrização de uma ferida incisional suturada não infectada. Tecnicamente todas as feridas são infectadas em menor ou maior grau; entretanto na cirurgia asséptica o número de bactérias é tão pequeno que o processo de reparação tecidual não é perturbado. A sequência de eventos é razoavelmente constante, mas a regulação descrita abaixo é meramente indicativa, pois conforme as condições, esses eventos podem ser antecipados e acontecerem na metade desse tempo ou serem postergados, e terem seu tempo de evolução dobrado.

2.2.2.1. Hemostasia: dentro de segundos a minutos

A primeira prioridade do organismo é a hemostasia, ou seja, parar o sangramento. As arteríolas lesadas contraem-se e o derramamento de sangue cessa. Além disso mecanismos de coagulação do sangue são desencadeados. O sangue poderá coagular-se por meio de dois mecanismos: intrínseco e extrínseco. No mecanismo extrínseco o processo de coagulação é desencadeado pelo contato com colágeno. No intrínseco inicia-se pela influência da ação de fatores de crescimento liberados por células lesadas e por plaquetas e fatores sangüíneos. Ambos mecanismos são disparados na ferida, e então o coágulo sangüíneo forma-se, ajudando a cessar o sangramento.

Uma injúria provoca ruptura de vasos sangüíneos com concomitante extravasamento de seus elementos. A ativação de plaquetas inicia a hemostasia, com sua respectiva adesão à parede endotelial dos vasos lesados e conseqüente aglutinação. A agregação plaquetária iniciará a formação do coágulo por via intrínseca. Atividades do endotélio intacto do vaso sangüíneo limitarão o coágulo às áreas vasculares lesadas. Enquanto o coágulo sangüíneo no interior do lúmen do vaso mantém a hemostasia, o coágulo presente no espaço da ferida provê uma matriz provisória para a migração celular. Por exemplo, fibrina e fibronectina exsudados atuam como uma matriz provisória para a diapedese de monócitos e a orientação de fibroblastos (GRINNELL et al., 1980).

Enquanto estes eventos passam-se na luz dos vasos, fibrinogênio exsudado para o interstício transforma-se em fibrina e forma uma tênue rede que conecta os dois lados da ferida no chamado leito da ferida. Os próprios produtos do coágulo ajudam a iniciar o processo de reparação. Trombina, a enzima que catalisa a formação de fibrina, atrai

macrófagos e causa a replicação de fibroblastos; e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) liberado por degranulação de plaquetas é também um mitógeno e um quimiotático para fibroblastos (COLVIN, 1986).

As plaquetas têm dupla função: além de facilitarem a formação do tampão hemostático, também secretam citocinas incluindo fatores de crescimento como o PDGF, fator de crescimento transformante α (TGF α), fator de crescimento transformante β (TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de outros mediadores com uma multiplicidade de ações. As plaquetas liberam ainda muitas substâncias biologicamente ativas incluindo moléculas da matriz extracelular (MEC), como a fibronectina, a trombospondina e o fator de Von Willebrand.

2.2.2.2. Inflamação: dentro de minutos a horas

A inflamação é disparada imediatamente, independente da presença de bactérias na região. Esse é provavelmente um procedimento preventivo que o organismo encontra para não haver uma importante perda de tempo, caso haja contaminação dessa ferida. Após uma agressão, seguem-se fenômenos iniciais da cicatrização, conhecidos como “fase de demolição”. Levam a uma limpeza ou demolição dos tecidos lesados, restos de agentes, entre outras coisas; o processo não é senão uma inflamação asséptica, caso não haja agentes contaminantes. Assim sendo, uma multidão de mediadores da inflamação são gerados, um exsudado de células e fluido começa a extravasar das vênulas, as arteríolas dilatam-se e leucócitos movem-se lentamente, atraídos por agentes quimiotáticos, como substâncias químicas endógenas ou algum microorganismo. Caso eles encontrem algum, a batalha começa e mais leucócitos são recrutados. Entretanto, numa ferida estéril, o número de leucócitos no exsudato não é suficiente para chamá-lo de pus. A limpeza do debridamento, incluindo os neutrófilos remanescentes, começa imediatamente. Os tecidos próximos à ferida entumescem um pouco devido ao edema inflamatório. Nos espaços de tecido conectivo distendidos, os exsudatos coagulam e formam uma fina rede de fibrina; isto, juntamente com a fibronectina, oferece aos leucócitos uma superfície extra contra a qual eles podem capturar as bactérias (fagocitose de superfície).

2.2.2.3. Formação da Crosta

A crosta começa a ser formada com o exsudato filtrado da ferida suturada e aparece na superfície da pele: isso coagula e eventualmente resseca. Este processo continua e forma uma crosta, que tem a importante função de isolar a ferida do meio ambiente, prevenir a penetração de bactérias e impedir a dessecação. GRILLO apud MAJNO e JORIS, 1996, é da opinião que a crosta é um curativo natural da ferida.

2.2.2.4. Migração de Células Fixas: dentro de 24 horas

Às 24 horas algumas células estacionárias como os fibroblastos, células epidérmicas e endoteliais (GROTENDORST e MARTIN, 1986), começam a mover-se. Os leucócitos atraídos à ferida agora incluem mais monócitos, que colonizam o espaço da ferida ao seu redor; eles fagocitam os restos de neutrófilos, os quais continuam a chegar e a morrer horas depois de sua chegada. Conforme os macrófagos limpam, eles tornam-se ativados; eles secretam citocinas que direcionam a atividade de todas as outras células.

A rede de fibrina continua a crescer pelo fibrinogênio fornecido pelo exsudato inflamatório. Mecanicamente ele não é muito forte, porém desempenha outro importante papel: filamentos de fibrina coagulados com a proteína plasmática fibronectina são adequadas como ponto de apoio para as células epidérmicas e fibroblastos migratórios. Às 24 horas, os fibroblastos alargam-se e começam a migrar em direção ao leito da ferida, arrastando-se ao longo dos filamentos de fibrina coagulados. Um desses fatores chamados de quimiotáticos é o PDGF, liberado pelas plaquetas no processo da hemostasia.

As células epidérmicas são mobilizadas dentro de horas. Células basais ao lado do corte, ativadas pela repentina ausência de vizinhança (MONTESANO e ORCI em 1988 chamaram esse fenômeno de “efeito de vizinhança-livre”), deprimem-se e arrastam-se à área desnudada; as primeiras células ativadas são as fagocitárias, as quais devem ajudá-las a digerir a região abaixo e ao longo da crosta em formação.

A angiogênese, que é a regeneração de vasos sanguíneos, é difícil de ser observada às 24 horas através de microscopia de luz, mas eles já estão se desenvolvendo em ambas faces da ferida, em resposta a fatores angiogênicos, e crescem junto ao leito da ferida. A anoxia (falta de oxigênio) é o principal fator determinante do estímulo

interno vascular. No leito da ferida a tensão de oxigênio está próxima do zero: se isso é aumentado artificialmente, a angiogênese cessa (KNIGHTON et al., 1981). Essa fase de angiogênese também se deve aos macrófagos. Eles migraram ao interior do leito da ferida tornando-se anóxicos, e a anoxia incentivou-os a secretar um fator que estimula o crescimento capilar (KNIGHTON et al., 1983), provavelmente o $\text{TNF}\alpha$ (LEIBOVICH e WISEMAN, 1988). Este fator também é secretado quando há altas concentrações de lactato, situação essa ocorrida no leito de feridas (JENSEN et al., 1986).

Devido à grande variedade de fatores quimiotáticos presentes na área da injúria, haverá a atração de determinadas células, por exemplo, após as primeiras horas depois da agressão, neutrófilos infiltrarão na área na tentativa de limpá-la de partículas e bactérias. Após uma variação de 24 a 48 horas, também se observará uma presença maciça de monócitos. Se uma excessiva contaminação ocorrer ou se houver a presença de partículas não passíveis de sofrerem fagocitose nessa região, a presença de neutrófilos, cuja principal função é liberar o tecido de fragmentos teciduais mortos e de microorganismos contaminantes, poderá causar ainda mais dano ao tecido devido à produção de enzimas e produtos citotóxicos. Os monócitos serão ativados a estado de macrófago.

Os macrófagos têm varias funções. Eles debridam o tecido através da fagocitose e digestão de microorganismos patogênicos, limpando a área de tecido lesado e de neutrófilos efetores, desempenhando um papel crítico para o início da reparação tecidual. Esses neutrófilos poderão ainda ser fagocitados por fibroblastos (NEWMAN et al., 1992).

Quando o neutrófilo infiltra, o acúmulo de monócitos continua, estimulado pelos fatores quimiotáticos seletivos de monócitos. Esses fatores incluem fragmentos de colágeno, elastina e fibronectina; trombina enzimaticamente ativa e $\text{TGF-}\beta$. Similar ao recrutamento de neutrófilos, fatores quimiotáticos ativam monócitos circulantes a aderir à parede endotelial do vaso sanguíneo em direção ao interstício da matriz extracelular. Os macrófagos também controlam a síntese e liberação de enzimas como a colagenase, por parte do fibroblasto (HUYBRECHTS-GODIN et al., 1979) que facilitam esse debridamento (CAMPBELL et al., 1987). Além disso, quando os macrófagos são ativados por endotoxinas bacterianas, substâncias como a proteína neutrófilo-ativadora (NAP) são liberadas e facilitam o recrutamento de mais células inflamatórias ao local. Os macrófagos além de promover fagocitose e debridamento, aderência para matriz

extracelular, também estimulam o monócito a sofrer uma metamorfose a macrófago inflamatório/reparativo.

Dessa forma, os macrófagos desempenham um papel de suma importância na transição entre a inflamação e a segunda fase da reparação das feridas, que é a formação do tecido de granulação.

2.2.2.5. Cicatrização: 3 dias

Em relação às células inflamatórias, aos 2 ou 3 dias, os monócitos começam a exceder o número de neutrófilos (SIMPSON e ROSS, 1972). A regeneração, que havia começado já às 24 horas da injúria, agora domina o panorama. O avanço de células epidérmicas faz-se entre a crosta sero-hemática e o derma, por secreção de colagenase. Células basais normais não tem receptores para fibronectina enquanto que células em regeneração tem. A regulação depende, em grande parte, da extensão da crosta. Onde a epiderme estiver perfurada por uma linha de sutura, as células epidérmicas crescem para dentro da linha da sutura como um tubo circundando o fio. Isto deveria ser esperado, já que a tendência de crescimento do epitélio é sobre as superfícies teciduais expostas.

Os fibroblastos ativados estão em plena diferenciação. Em resposta aos fatores de crescimento eles multiplicam-se e produzem fibras colágenas, primeiramente colágeno do tipo III (McPHERSON e PIEZ, 1988). Eles também secretam proteoglicans e fibras elásticas.

A angiogênese progride suficientemente para que aos 2 ou 3 dias, alguns brotos comecem a aparecer de ponta a ponta. A isso se conhece por *inosculation* (em latim ósculo significa beijo, RUDOLPH e BALLANTYNE, 1990). Os novos fibroblastos acumulados misturam-se a novos capilares para formar o começo do tecido de granulação. O tecido de granulação começa a ser formado por volta do quarto dia após a injúria (GUIDUGLI-NETO, 1987). Os vasos têm células endoteliais com características de forte ativação (GUIDUGLI-NETO, 1992).

O tecido de granulação consiste em um denso leito de macrófagos, fibroblastos e neovasos suportados por uma matriz de fibronectina, colágeno tipo I e tipo III e ácido hialurônico. Os fibroblastos movem-se dentro do leito da ferida e ostentam diferentes fenótipos. Primeiro os fibroblastos assumem um fenótipo migrante, depois um fenótipo produtor de colágeno e finalmente um fenótipo contrátil, o miofibroblasto. Este é o responsável pelo fenômeno importante de contração da cicatriz.

2.2.2.6. Cicatrização Precoce: entre 7 e 10 dias

Dentro de uma semana o leito da ferida teve tempo suficiente para ser preenchido com tecido de granulação (GUIDUGLI-NETO, 1987). Muito pouco dele é requerido devido ao fato de que os dois lados da ferida estão muito próximos. Uma rede de capilares atravessa o leito da ferida. A rede linfática começa a ser regenerada com algum atraso em relação a rede vascular: eles avançam de ponta a ponta assim como os vasos sanguíneos. Lentamente o tecido de granulação adquire mais e mais fibras colágenas e começa adquirir a aparência da massa fibrosa denominada “cicatriz”.

De uma extremidade à outra, a limpeza efetuada pelos macrófagos continua e eventualmente a fibrina também é removida. O colágeno do tipo I começa a aparecer nessa fase (CLARK e HENSON, 1988).

Embora a epiderme tenha sido regenerada, os anexos da pele, como pêlos e glândulas, ainda não se desenvolveram. As cicatrizes em humanos geralmente são imberbes além de pálidas, devido a regeneração dos melanócitos ocorrer pobremente.

2.2.2.7. Maturação da Cicatriz: entre 1 mês e 2 anos

Finalmente a cicatriz será uma massa de tecido fibroso com muitas fibras colágenas, algumas células e alguns vasos, porém o processo de maturação é lento. Conforme o tempo passa, a maioria das células desaparecem: observa-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais (DARBY et al., 1990). Eosinófilos às vezes aparecem nas últimas fases da reparação tecidual; talvez eles contribuam com fatores de crescimento (TODD et al., 1991). O colágeno tem cada vez mais pontes entre as fibras. Permanecem algumas fibras elásticas. Muitos capilares desaparecem e por isso as cicatrizes antigas têm aparência esbranquiçada, sendo hipo-vascularizadas.

A fase final da reparação de uma ferida é a remodelação da matriz, que se solapa em parte com as fases predecessoras. Ou seja, a produção de matriz e sua remodelação produz-se simultaneamente com a formação do tecido de granulação. Entretanto, nos meses seguintes após a reepitelização, há uma redução e alteração contínua da matriz. A fibronectina é rapidamente eliminada da matriz e as fibras de colágeno tipo I aumentam lentamente ao longo da neomatriz para aportar resistência à pele e à cicatriz.

Todavia, tardam muitos meses, até mesmo um ano ou dois, para que uma cicatriz cirúrgica mude de cor rosa para branca. A troca local de colágeno permanece alta durante anos.

A resistência ao estiramento é alterada na cicatriz. Até mesmo uma cicatriz madura nunca é tão forte como a pele normal. A força de tensão permanece abaixo do normal, nunca atingindo, na pele, a original. Em tecidos frouxos podemos, contudo, atingir níveis superiores.

2.2.2.8. Mediadores Químicos da Reparação Tecidual

Nas primeiras horas após o estabelecimento de uma injúria, os mediadores são aqueles pertinentes à inflamação aguda. Por exemplo, mastócitos lesados liberam histamina que causa hiperemia, e uma variedade de células libera prostaglandinas. Plaquetas do tampão hemostático prontamente liberam serotonina (um vasoconstritor) e uma infinidade de outros mediadores. O aumento da permeabilidade de vênulas pode resultar da liberação de leucotrienos, liberado pelas plaquetas. Essas reações ocorrem em cadeia: a coagulação é acompanhada da ativação de caliceínas de origem plasmática, as quais produzem bradicinina; a bradicinina induz produção de prostaglandinas (WILLIAMS, 1988). Leucócitos são atraídos pelo leucotrieno B₄ e por muitos produtos da proteólise. Enzimas proteolíticas produzidas de diversas fontes (lisossomas de células e plaquetas lisadas, grânulos de mastócitos, plasmina do sistema fibrinolítico ativado), e elas atuam numa variedade de proteínas para produzir mediadores (substratos incluindo moléculas do complemento C3, C4, C5, cininogênio e fibrina). Complementos, de qualquer forma, ajudam a atrair neutrófilos ainda que não sejam essenciais para a reparação tecidual (WAHL apud MAJNO e JORIS, 1996). Dentro de horas, os mediadores da inflamação aguda desaparecem e o papel principal é desempenhado por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, especialmente o PDGF e o TGF α , secretado por macrófagos. Alguns desses fatores são liberados pelas plaquetas, especialmente nas primeiras horas, entretanto os mastócitos também os fornecem. Dentro de 2 ou 3 dias os macrófagos assumem a “vigilância” do processo reparacional, parecendo ser a anóxia um dos indutores principais.

Os fatores de crescimento implicados na reparação de feridas são inúmeros, têm complexa ação e inter-relação uns com os outros, e ainda há controvérsia e falta de elucidação em relação a eles.

O termo “fatores de crescimento” deriva de seus efeitos estimuladores sobre a proliferação celular e a síntese de DNA *in vitro*. Eles constituem uma família de peptídeos reguladores com múltiplas e variadas funções. SPORN e ROBERTS, em 1988, afirmaram que os fatores de crescimento formam parte de uma complexa linguagem de sinais celulares em que os peptídeos individuais são o equivalente às letras de um alfabeto ou código. ROTHE e FALANGA (1989) consideram que esses peptídeos e proteínas desempenham um importante papel em muitos processos biológicos *in vivo*, incluindo a embriogênese, a oncogênese e a reparação de feridas.

Os fatores de crescimento implicados diretamente na reparação tecidual e sua atividade biológica estão resumidos nas tabelas 2.1 e 2.2, segundo RIGAU, 1996.

Tabela 2.1: Fatores de crescimento implicados na reparação de feridas cutâneas.

FATOR DE CRESCIMENTO	ORIGEM	ALVO	RECEPTOR
PDGF PM:30.000	plaquetas cél. endotelial macrófagos	fibroblastos cél. musc. lisa cels. gliais	tirosina quinase
EGF PM:6.045	gl. Brunner gl. submaxilar	queratinócitos cél. endotelial fibroblastos	tirosina quinase
IGF-I PM:7.800	fibroblastos hepatócitos	fibroblastos queratinócitos hepatócitos	tirosina quinase
IGF-II PM:7.471	fibroblastos hepatócitos	queratinócitos fibroblastos hepatócitos adipócitos	tirosina quinase
TGF α PM:5.700	cél. epitelial cels. tumorais macrófagos	queratinócitos hepatócitos fibroblastos osteoblastos cels. Schwann	Tirosina quinase
TGF β PM:25.000	Plaquetas	queratinócitos hepatócitos fibroblastos osteoblastos	3 receptores alta afinidade
aFGF PM:15.600	cérebro retina	cél. endotelial fibroblastos condrócitos cels. gliais cels. epiteliais osteoblastos queratinócitos	PM:150.000
bGF PM:16.400	cérebro retina corpo lúteo macrófago rim próstata tireóide	cels. endoteliais fibroblastos condrócitos cels. gliais cél. epitelial osteoblastos queratinócitos	alta afinidade sem endocitose do complexo FGF-FGF-R

Tabela 2.2: Atividade biológica dos fatores de crescimento implicados na reparação cutânea.

FATOR de CRESCIMENTO	Atividade Biológica
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ vasoconstrição ⇒ modulador da síntese de componentes de matriz extracelular ⇒ aumenta a proliferação de fibroblastos, células da musculatura lisa e células gliais ⇒ ativação de fosfolipases
EGF	<p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ aumenta a proliferação de queratinócitos e cels. endoteliais ⇒ aumenta a síntese de GAGs ⇒ favorece a união EGF - EGF-R ⇒ aumenta a produção de IGH <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ favorece a hiperplasia e hipertrofia
IGF	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ modula a proliferação de queratinócitos ⇒ aumenta a síntese de fosfatidilcolina ⇒ diminui o catabolismo protéico ⇒ inibe a glicogênese em adipócitos
TGF	<ul style="list-style-type: none"> ⇒ regula a proliferação cél. e síntese de componentes de matriz extra celular ⇒ diminui o crescimento de queratinócitos e fibroblastos ⇒ favorece a formação de queratina ⇒ aumenta a proliferação de fibroblastos e osteoblastos ⇒ imunossupressor de linfócitos T
FGF	<p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ atua como um fator de concorrência ⇒ intervém na morfologia, proliferação e diferenciação celular ⇒ potente mitógeno para mesoderma e cels. derivadas ⇒ modula a proporção relativa dos tipos de colágeno sintetizado pelo endotélio vascular ⇒ substituto da matriz extra celular na regulação da diferenciação das cels. mesodérmicas

2.2.3. Cicatrização por Segunda Intenção

A reparação tecidual pode ser retardada em duas circunstâncias: se a ferida for contaminada ou se a ferida for aberta.

2.2.3.1. Cicatrização de Feridas Infectadas

Na superfície exposta de uma ferida infectada, ocorrem ondas de neutrófilos. Mesmo se a ferida estiver suturada, as superfícies justapostas não podem se aderir umas às outras, devido ao fato de elas estarem separadas por pus. Eventualmente, as duas superfícies são cobertas por uma camada de tecido de granulação similar à membrana piogênica de um abscesso, produzindo pus. De fato, uma ferida infectada comporta-se muito mais como um abscesso bem delimitado. A reparação não pode começar até que a infecção tenha sido superada; naquele ponto da ferida, preenchido parcialmente por tecido de granulação, se tornará uma ferida aberta. Dessa forma o processo de cura dessa ferida evoluirá de maneira especial. A presença de neutrófilos, trazendo grande quantidade de enzimas líticas, e a alteração do pH, comprometem o adequado crescimento celular.

2.2.3.2. Cicatrização de Feridas Abertas

A reparação de uma ferida aberta, cirúrgica (excisional) ou acidental, apresenta um problema especial devido à sua abertura, que de alguma forma deve ser preenchida. O organismo é capaz de sintetizar algum preenchimento, como o tecido de granulação, porém tem um mecanismo coadjuvante mais rápido. Após um período que varia entre 5 e 9 dias, as margens da ferida movem-se uma contra a outra, como se houvesse uma força invisível de tração (PEACOCK, 1984). Este fenômeno é conhecido por “contração da ferida”. Embora presente em qualquer cicatrização, a maior quantidade de tecido de granulação fará com que o fenômeno ocorra de maneira quantitativamente mais exuberante.

Essa contração de feridas abertas é feita por pelo menos dois mecanismos distintos. Durante os primeiros dias, numa ferida aberta não coberta com um curativo úmido, é a crosta que contrai. A crosta consiste principalmente de fibrina seca. Quando ela seca ela se contrai, e estando firmemente ancorada no tecido de baixo, ela pode reduzir a superfície de uma ferida pequena aberta.

Outro mecanismo de contração começa a acontecer após cerca de uma semana, é um estirão mecânico muito forte. Isso ocorre porque as feridas, abertas ou não, contém células capazes de contrair-se. Essas células são conhecidas por miofibroblastos.

2.2.3.3. Participação dos Miofibroblastos

Os miofibroblastos são fibroblastos que se diferenciam para agir na contração da ferida assumindo um fenótipo contrátil. Uma vez executado seu papel, eles se desdiferenciam e voltam a ser fibroblastos.

Se fibroblastos isolados tornam-se mais curtos, o tecido circundante não irá contrair de todo. Então, na diferenciação a miofibroblasto, eles desenvolvem estruturas peculiares que seriam esperadas de células desenhadas para contrair (GABBIANI apud MAJNO e JORIS, 1996). São elas: fibrilas intracelulares com densidade corpórea semelhante à músculos lisos; microtendões, nome que MAJNO e JORIS preconizam para feixes fibrosos que emergem das células, em continuidade a direção de fibrilas intracelulares (“*fibronexus*” é o nome oficial para esse arranjo); junções intracelulares de vários tipos, especialmente junções do tipo *gap* que não são vistas habitualmente entre os fibroblastos ordinários. De fato, fibroblastos normais não estão em contato uns com os outros. Todas essas modificações levam o miofibroblasto a assemelhar-se, mas não se tornar, uma célula muscular lisa.

Os miofibroblastos são células intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, porém o mecanismo de utilização de seu “maquinário contrátil” ainda não está inteiramente esclarecido. Eles parecem exercer esse estirão de duas diferentes maneiras (MAJNO e JORIS, 1996):

- Por encurtamento, como fazem as células musculares. Como os fibroblastos estão conectados tanto uns aos outros como ao estroma, se cada um tornar-se menor, o resultado em toda a extensão será similar àquele do músculo contraindo.
- Por um mecanismo estacionário (HARRIS et al., 1980). Este mecanismo, ainda hipotético, pode ser entendido se imaginarmos um marinheiro puxando uma âncora. O marinheiro faz tração, entretanto não tem como se mover nesse processo. Este conceito foi sugerido devido ao fato de que fibroblastos em cultura (miofibroblastos), cultivados em um gel de colágeno, são capazes de contrair esse gel.

Pouco se sabe dos mensageiros que induzem a diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos. Seguramente há algo nas feridas abertas que induzem essa modulação.

Os miofibroblastos alinham-se ao longo de novos depósitos de matriz extracelular no eixo axial da ferida, formando uniões de célula à célula e de célula à matriz para gerar posteriormente forças de tensão da ferida produzindo a contração desta.

A reparação de mucosas é mais rápida que a de pele, mostrando que muitos dos relatos experimentais que foram realizados em pele devem ser extrapolados para outros locais com cuidado.

Observamos que a reparação tecidual envolve mecanismos complexos que abrangem eventos locais e sistêmicos; mecânicos, químicos e bioquímicos; onde interferem vários fatores como tipo de ferida, sua extensão, tipo e quantidade de células lesadas além de condições sistêmicas do paciente, bem como seu estado nutricional e imunológico. O laser de baixa intensidade, portanto, têm diferentes ações segundo o momento da reparação e o tipo de paciente em que o estamos utilizando como terapia. Para analisarmos seus efeitos planejamos isolar parcialmente esses eventos, fazendo a revisão da ação do laser *in vivo* e *in vitro*, e buscando dessa forma contribuir na elucidação dos efeitos dessa terapia na clínica da cicatrização tecidual, que se manifesta por melhorar o tempo reparacional e melhorar a qualidade da cicatriz formada nos pacientes submetidos a essa terapia.

2.3. Revisão dos Efeitos do Laser na Cicatrização *in vivo*

2.3.1. Introdução

Os estudos *in vivo* em animais de laboratório bem como estudos clínicos em pacientes apóiam a teoria de que a regeneração tissular e a cicatrização de feridas são favorecidas quando tratadas com laser de baixa intensidade. Desde que MESTER (1966), nos anos 60, publicou seus primeiros resultados no tratamento de úlceras crônicas com laser de Rubi operando em baixa intensidade de energia, foram publicados estudos e efeitos desse tipo de terapia com laser tanto em clínica humana como em animais, além de inúmeros trabalhos *in vitro*.

Ao princípio refletiam casos isolados relatando a experiência de alguns poucos clínicos cuja casuística apresentada era pouco significativa. Além disso, a metodologia empregada nesses estudos era de pouca qualidade científica e contestável em termos de metodologia reproduzível, havendo uma variedade enorme de parâmetros de irradiação e modelos de trabalho. Pouco a pouco foram aparecendo trabalhos seguindo uma metodologia mais adequada e homogênea além de parâmetros mais padronizados e menos passíveis de contestação. Estudos a duplo cego e seguimentos de longo prazo começaram a dar mais qualidade e subsídio aos resultados obtidos nesses experimentos.

A maioria das publicações *in vivo* apresentava estudos em animais e humanos tratados com laser de baixa intensidade demonstrando sua ação sobre a síntese e remodelação de colágeno, o número de fibroblastos, o diâmetro e força de tração das feridas tratadas, a viabilidade dos enxertos tratados, a vascularização, a vasodilatação, o sistema linfático, o possível efeito antibacteriano e imunológico, seus efeitos sistêmicos, e apenas alguns poucos estudos acerca da ação dessa terapia sobre o tecido periodontal (RIGAU, 1996), ou sobre sua ação diretamente em enfermidades associadas à prática odontológica.

MESTER produziu uma série de trabalhos desde meados da década de 60 (1966, 1969, 1971^a, 1971b, 1971c, 1972, 1973a, 1973b, 1973c, 1974, 1975, 1977, 1978, 1980, 1982, 1984) até sua morte, em 1984 e concluiu que o laser de baixa intensidade acelerava a divisão celular. Observou em seus trabalhos feitos ao longo desses anos, um significativo aumento dos leucócitos que participavam na fagocitose e maior síntese de colágeno por parte dos fibroblastos tratados. Além disso, observou que havia uma regeneração mais precoce de vasos linfáticos nos grupos tratados, o que o levou a concluir que facilitava o desenvolvimento do tecido de granulação.

O mais importante efeito do laser de baixa intensidade sobre a cicatrização de feridas foi o aumento da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos, demonstrado nos experimentos onde se monitorou essa síntese utilizando microscópio eletrônico para o controle da captação de prolina e glicina tritiada (RIGAU, 1996). Os efeitos observados fora da área tratada foram atribuídos por MESTER (1974) e TRELLES (1983) a fatores humorais. Mediante esse importante postulado os autores preconizaram que no tratamento não seria necessário irradiar toda a área lesada para obter-se um efeito uniforme em toda a zona. Baseados nessa teoria, RODRIGO et al., em 1985, publicaram um estudo sobre o efeito do laser de He-Ne no tratamento de fístulas osteomielíticas múltiplas de ratos fêmeas, onde obtiveram a cura de todas elas no corpo, irradiando apenas uma única pata do animal.

Essa foi uma importante descoberta já que dessa forma surgiu uma possível resposta às dúvidas que apareceram quando equipes como as de KANA (1981), HUNTER (1984), BASFORD (1986) e SAPERIA (1986), em diferentes tipos de experimentos, não conseguiram resultados positivos na cicatrização de feridas padronizadas em animais de experimentação. Em todos esses experimentos, porém, os autores utilizaram o mesmo animal para estudar feridas irradiadas e não irradiadas. Ou seja, no mesmo animal utilizaram uma área com feridas não irradiadas como grupo controle e em outra área do mesmo animal, eram produzidas feridas que recebiam o tratamento e, portanto, eram irradiadas. Mesmo usando o mesmo animal como grupo controle e grupo tratado, autores da equipe de SILVEIRA, pioneiro em pesquisas na área do laser de baixa intensidade no Brasil, em 1991, estudaram alguns aspectos do comportamento de mastócitos quando se irradiava cobaias com um diodo laser operando em 904 nm utilizando como modelo de estudo feridas em cobaias (sendo a ferida controle e a ferida irradiada no mesmo animal) e observaram que havia maior degranulação de mastócitos, além de maior proliferação fibroblástica e aumento da substância fundamental do tecido conjuntivo nas feridas irradiadas em relação as controle, mesmo ambas sendo no mesmo animal.

Outro grande pesquisador nessa área foi ABERGEL e em 1988 ele e sua equipe fizeram um estudo sobre feridas padronizadas usando como modelo pele de porcos onde compararam o efeito do laser de He-Ne e de uma lâmpada de tungstênio sobre a cicatrização tecidual. Realizaram um seguimento fotográfico para verificação da força de tensão e da evolução do diâmetro da área da ferida tratada. Concluíram que houve resultado positivo de até 94% nas feridas tratadas com laser de baixa intensidade. Ainda assim, STRUBE et al. (1988), no mesmo ano, publicaram um artigo onde fizeram um experimento similar a esse e obtiveram resultados negativos. Outros autores como HALL et al., em 1994, e CHELYSHEV e KUBITSKY, em 1995, também não conseguiram observar nenhum tipo de efeito dessa terapia sobre a cicatrização tecidual, muito embora o primeiro autor trabalhasse com fluências extremamente inferiores àquelas preconizadas na literatura, e os segundos trabalhassem com regeneração de axônios mielinizados, modelo de estudo de natureza muito diferente daqueles preconizados e utilizados na literatura, desde a década de 60.

2.3.2. Estudos *in vivo*

2.3.2.1. Efeitos Sistêmicos

Vários autores como MARTINEZ et al. (1984), LEUNG et al. (1985), RODRIGO et al. (1985), SMITH-AGREDA et al. (1985; 1986), SARTI et al. (1995) e VILLAPLANA et al. (1995) têm estudado os efeitos do laser de baixa intensidade sobre as funções endócrinas, principalmente sobre células em cultivo e em tecidos de pequenos roedores. Esses estudos utilizavam lasers emitindo na região do visível, como o He-Ne, e lasers emitindo na região do infravermelho próximo, com diferentes comprimentos de onda, e em todos eles, nos grupos irradiados foram estimuladas as funções endócrinas e a divisão celular. Nos grupos irradiados, as células tireoideanas e hipofisárias mostraram incremento de sua atividade após irradiação da adenohipófise. Esses resultados nos levam a deduzir os possíveis efeitos sobre glândulas secretoras. Esses autores recomendavam evitar a irradiação clínica em humanos diretamente sobre zonas

glandulares, ainda que não houvesse nenhuma evidência clínica de que esse tipo de laser pudesse produzir hiperfunção glandular. Por isso, nos primeiros livros referentes à terapia com laser de baixa intensidade, autores como CISNEROS e TRELLES em 1987, sugeriam como contra-indicação, a irradiação clínica direta de glândulas.

Outro grande autor que vem contribuindo muito em esclarecer os mecanismos básicos de ação desse tipo de laser é ROCHKIND que com outros autores, em 1989, publicou um estudo sobre os efeitos sistêmicos do laser de He-Ne comparando três diferentes tipos de modelos experimentais em rato. Observaram a evolução de feridas cutâneas provocadas por queimaduras padronizadas, por injúria do sistema nervoso periférico e por injúria do sistema nervoso central nesses animais. Dividiram esses três modelos em dois grupos. Os animais receberam duas feridas, uma de cada lado da espinha dorsal. Um grupo foi o controle e não recebeu irradiação laser e o outro grupo recebeu irradiação apenas em uma das feridas. Ambas feridas, irradiada e não irradiada, foram curadas em tempo significativamente inferior quando comparadas ao grupo controle não irradiado e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Os mesmos autores descreveram os efeitos positivos e sua persistência em longo prazo. Também demonstraram efeitos negativos quando se utilizou alta irradiância (200 mW/cm^2).

Nessa mesma época, TRELLES et al. (1988) publicaram um estudo feito em sangue e línguas trituras de rato, que haviam sido irradiadas com fluência de $2,4 \text{ J/cm}^2$. Eles analisaram os níveis de histamina detectados em ambos modelos. Utilizaram dois protocolos: no primeiro trabalharam com um laser de 4 mW de potência óptica de saída e no segundo com um laser de 50 mW. Em sangue não observaram alterações significativas entre os grupos irradiados e controle. Em língua, entretanto, o grupo irradiado com laser de 50 mW de potência de saída apresentou aumento de 30% de histamina em relação ao grupo controle, e no grupo irradiado com laser de 4 mW obteve-se aumento de 100% no nível de histamina em relação ao grupo controle.

Com base nesses resultados, os mesmos autores (TRELLES, 1989a e 1989b) realizaram um seguimento microscópico, com cortes semifinos e em nível ultraestrutural de línguas de rato irradiadas, e observaram degranulação de mastócitos significativamente aumentada nos grupos irradiados.

Em 1990, EL SAYED e DYSON realizaram um estudo em pele sã e lesada utilizando lasers emitindo seis diferentes comprimentos de onda com fluência de $10,8 \text{ J/cm}^2$. Fizeram um seguimento observando a degranulação e o número de mastócitos nesses grupos. Demonstraram que em pele sã e irradiada, produziu-se um aumento do número de mastócitos porém sem sua degranulação. Em pele lesada, produziu-se um aumento do número de mastócitos bem como sua respectiva degranulação.

Os parâmetros de trabalho dos grupos foram diferentes. A equipe de EL SAYED utilizou fluência quatro vezes maior que a equipe de TRELLES e ambos utilizaram diferentes técnicas para análise dos mastócitos. O modelo também influenciou bastante, já que o primeiro foi em mucosa enquanto que o segundo foi em pele, e ambos são muito heterogêneos do ponto de vista óptico. Também utilizou irradiâncias diferentes, fato esse que foi significativo inclusive entre os diferentes grupos irradiados no primeiro experimento do grupo de TRELLES. Em 1996, RIGAU, observou a respeito desses experimentos, que os mastócitos e os mediadores biologicamente ativos que são liberados durante a degranulação, são elementos chave durante a primeira fase inflamatória da cicatrização de feridas, tanto no papel que desempenham na permeabilidade vascular como na liberação de substâncias que

influenciam na regulação da migração linfocitária e na adesão molecular das células endoteliais a partir dos capilares venosos. Também observou sua importância nos processos imunológicos em nível cutâneo, como demonstrado nos experimentos de KAMINER et al., 1991; REICH et al., 1991 e VAN NESTE, 1991.

Em 1997, SASAKI e OHSHIRO fizeram um estudo sobre os efeitos de um diodo laser operando em 830nm na reparação tecidual utilizando modelo em pele de ratos. Utilizaram 20 animais onde fizeram feridas padronizadas e irradiaram com laser de 60 mW de potência óptica de saída com fluência de 24 J/cm², diariamente, durante sete dias. Avaliaram alterações de citocinas, particularmente a interleucina-6 (IL-6), por ser a mais típica e a de mais fácil detecção. Os autores observaram que houve diferença significativamente maior na quantidade de citocinas no grupo irradiado, sobretudo no pós-operatório de dois dias, além de histologicamente haver um melhor controle inflamatório. Também observaram que nos grupos irradiados houve grande número de neutrófilos e que apareceram mais cedo nos tecidos subcutâneos em relação ao grupo controle, e que igualmente desapareceram mais rapidamente. Os autores concluíram que o laser de baixa intensidade induziu mais rapidamente à fase proliferativa e aumentou os níveis de IL-6.

Em 1999, STADLER et al., estudaram os efeitos sobre linfócitos de um laser de corante emitindo na região do visível e operando em 660 nm e de um diodo laser emitindo na região do infravermelho próximo operando em 830 nm. Os autores irradiaram linfócitos em suspensão com fluências diferentes, variando entre 0,1 e 5 J/cm², na presença e ausência de eritrócitos. A irradiação com o primeiro laser, na presença de eritrócitos, aumentou significativamente a resposta de proliferação dos linfócitos, sendo a resposta máxima detectada com fluência de 3 J/cm². Para o diodo laser, o máximo de interação ocorreu com fluência de 1,5 J/cm². Os autores observaram que na ausência de eritrócitos, o efeito da irradiação mostrou uma fraca relação dose-resposta.

2.3.2.2. Efeitos Locais

Em 1982, DYSON e YOUNG demonstraram que um diodo laser emitindo na região do infravermelho próximo e com radiação pulsada e frequência de 700 Hz acelerou a formação de tecido cicatricial enquanto que o mesmo diodo laser, com frequência de 1200 Hz, não demonstrou ser efetivo quando não houve alteração em nenhum outro parâmetro de irradiação.

Em 1984, TRELLES e MESTER, publicaram um estudo clínico em pacientes portadores de úlceras vasculares de membros inferiores, onde as irradiaram com laser de He-Ne com fluência de 4 J/cm². Os autores realizaram um seguimento fotográfico e em nível microscópico da evolução dessas feridas, observando melhor evolução do tecido de granulação, bem como da neo-vascularização e da epitelização dos grupos tratados com laser em relação aos grupos controles.

Em 1987, ABERGEL et al. publicaram um estudo dos níveis intracelulares de RNAm-procolágeno tipo I e tipo III presentes em feridas irradiadas com laser de He-Ne, comparando um grupo controle e um grupo irradiado com uma luz de Tungstênio. Após 10 dias de tratamento não foram observadas alterações significativas. Aos 17 dias observou-se uma diferença no RNAm-procolágeno tipo

I que aos 28 dias foi estatisticamente significativa. O RNAm-procolágeno tipo III aumentou aos 10 dias e foi significativo aos 17 e 18 dias.

Em 1988, TERRIBILE et al. fizeram um estudo utilizando um laser de He-Ne e um diodo laser emitindo no infravermelho próximo onde apresentaram um seguimento analisando o diâmetro das feridas, o material depositado no fundo e na superfície delas, seu grau de contração e de repitelização, a presença de fibras reticulares, de colágeno e elastina, além de material PAS positivo (presença de glicosaminoglicans) que foi produzido. Concluíram que tanto o laser de He-Ne como o diodo laser causaram a uma diminuição no tempo de epitelização e houve aparecimento mais precoce de material PAS positivo, favorecendo a cicatrização.

Em 1989, YEW et al. estudaram, por meio de microscopia de transmissão, a cicatrização em anastomoses intestinais tratadas com laser de He-Ne. Concluíram que houve maior síntese de colágeno nas suturas dos animais nos grupos tratados com laser.

Em 1989, BIHARI e MESTER apresentaram um estudo clínico em pacientes portadores de úlceras. Os autores trabalharam com três grupos. Um grupo foi irradiado com laser de He-Ne, outro com a associação de laser de He-Ne e um diodo laser emitindo na região do infravermelho próximo e outro com uma luz não-coerente, com comprimento de onda de 632 nm. Em todos os grupos a fluência utilizada foi de 4 J/cm². Os autores demonstraram a eficácia terapêutica da associação dos diferentes tipos de lasers, evidenciando melhores resultados quando comparados aos demais grupos.

Em 1989, MESTER e MESTER publicaram um seguimento clínico de 2167 pacientes portadores de úlceras cutâneas ou de mucosas, confirmando que a fluência ideal para a terapia desse tipo de úlcera foi de 4 J/cm², fluência essa já preconizada como ideal por MESTER em 1966.

Em 1990, ENWEMEKA et al. realizaram um seguimento da cicatrização de tendões de Aquiles após incisão cirúrgica. A irradiação realizou-se transcutaneamente, com laser de He-Ne. Os autores observaram o número de fibroblastos e de fibras colágenas e concluíram que foram mais abundantes e seguiram um bom alinhamento no eixo longitudinal nos tendões irradiados em relação aos controles não irradiados.

Em 1991, TSUCHIDA et al. trataram feridas cirúrgicas de ratos normais e diabético-induzidos com laser de He-Ne com *scanner* e com fluência de 4 J/cm². Fizeram um estudo do seguimento da velocidade de fechamento dessa feridas e observaram que as feridas tratadas com laser fecharam antes, tanto nos animais normais como nos diabéticos, quando comparados a seus respectivos grupos controles.

Em 1991, outro grande pesquisador dos mecanismos básicos da ação desses tipos de lasers, LIEVENS, publicou um de seus belos experimentos onde estudou o seguimento da cicatrização de feridas, avaliando o nível de adesão a planos inferiores, o grau de edema local, bem como a regeneração do sistema venoso e linfático. Após a análise detalhada dos resultados concluiu que a adesão após quatro dias da implantação da ferida foi de 100% nos grupos controle não irradiados, enquanto que nos grupos irradiados não foi significativo. Após oito dias o edema havia desaparecido nesses grupos, persistindo naqueles. Seis meses depois, a permeabilidade dos vasos sanguíneos e linfáticos foi de 50% à mais nos irradiados em relação aos controle. RIGAU, em 1996, sugeriu que a explicação disso seria pela resposta diferenciada dos mastócitos presentes nos tecidos irradiados com laser de baixa intensidade.

Em 1991, IN DE BRAEKT et al. provocaram feridas em palato de cães da raça *beagle* e tatuaram pontos de ambos os lados das feridas para observar seu grau de contração durante a cicatrização. Usaram um diodo laser emitindo no infravermelho próximo com fluência de 1 J/cm^2 . Fizeram a irradiação três vezes por semana, durante três semanas, e não observaram alterações significativas em relação ao grupo controle não irradiado.

Em 1992, TERRIBILE et al. estudaram a evolução de feridas padronizadas em dorso de ratos fêmeas tratados com um laser de He-Ne e uma luz halógena não coerente, que foi filtrada para obter o comprimento de onda de 633 nm. Utilizaram fluência de $3,6 \text{ J/cm}^2$. Observaram que a velocidade de fechamento da ferida foi muito maior e estatisticamente significativa nos grupos irradiados com luz coerente (laser de He-Ne) em relação aos grupos controle e irradiados com luz não coerente.

Em 1992, SMITH et al. fizeram um estudo em pequenos roedores onde controlaram a sobrevivência de retalhos, comparando a utilização de um diodo laser e uma luz não coerente. A irradiação foi feita sobre a área receptora, cinco dias antes de receber o retalho e cinco dias após a intervenção cirúrgica. Não observaram alterações significativas.

Ainda em 1992, KUSAKARI et al., estudaram os efeitos do laser de baixa intensidade em cicatrização de gengiva e na reparação óssea. Pela primeira vez foi publicado um artigo *in vivo* específico em Odontologia. Os autores fizeram o estudo em duas partes. Na primeira fizeram um seguimento *in vivo* e outro *in vitro*. Trabalharam com cães adultos, onde fizeram perfurações mandibulares e as irradiaram. *In vitro* trabalharam com osteoblastos da linhagem UMR 106 em cultivo e incorporaram timidina tritiada, após a irradiação. Para ambos experimentos utilizaram um diodo laser operando em 780 nm e com potência óptica de saída de 30 mW. Na segunda parte do estudo, removeram dentes de cães adultos e implantaram cilindros de titânio, irradiaram a região operada dos animais com um diodo laser operando em 810 nm e com potência óptica de saída de 60 mW. Observaram que o laser estimulou a síntese de DNA e a expressão de ALP-atividade nas células osteoblásticas *in vitro*. *In vivo* observaram que os grupos irradiados tiveram maior recobrimento na perda óssea na região trabalhada, além de melhor cicatrização gengival.

Em 1993, LEE e KIM induziram feridas em ratos e injetaram *Staphylococcus aureus* para contaminá-las. Um grupo recebeu tratamento dessas feridas que foram irradiadas com um diodo laser emitindo na região do infravermelho, enquanto que o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os autores observaram uma boa evolução das feridas tratadas em comparação às dos grupos controles.

Em 1994, NOGUEROL et al. estudaram as alterações ultraestruturais periodontais em ratos após sua irradiação com um laser de He-Ne, por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os animais foram divididos em três grupos: um irradiado com fluência de $10,5 \text{ J/cm}^2$, outro irradiado com fluência de $51,5 \text{ J/cm}^2$, e outro controle não irradiado. Os animais foram sacrificados imediatamente e aos 10 dias após a irradiação. Os autores observaram que nos grupos irradiados com fluências mais altas, houve maiores alterações celulares no epitélio, duas diferentes populações de fibroblastos presentes no tecido conjuntivo bucal, além de duas diferentes subpopulações de osteócitos.

Em 1994, ZHANG e AL-WATBAN publicaram um estudo em ratos onde provocaram feridas padronizadas para comparar a cicatrização de feridas tratadas com laser de He-Ne e de He-Cd ($\lambda = 442$

nm), utilizando fluências variáveis de 1, 4, 7 e 11 J/cm², irradiando três vezes por semana. A cicatrização foi mais rápida e de melhor qualidade para os grupos tratados com o laser de He-Ne. Os autores observaram que esse comprimento de onda apresentou maior penetração e transmissão e menor absorção e espalhamento (*scattering*) que o comprimento de onda emitido pelo laser de He-Cd. No mesmo ano (AL-WATBAN e ZHANG, 1994) os autores trabalharam com esse mesmo modelo animal, e utilizaram um laser de He-Ne, porém com diferentes parâmetros de irradiação para os grupos tratados. As irradiações variaram entre três e cinco tratamentos por semana, a fluência utilizada foi de 25 J/cm² para um grupo e de 7 J/cm² para outro grupo. Observaram que variando a irradiância (de 3,7 a 15,9 mW/cm²) enquanto mantinham a fluência constante, não havia alteração significativa. Os resultados mostraram ser dependente da fluência e frequência do tratamento. Quando o tratamento foi aplicado por mais de cinco dias numa mesma semana, obteve-se um efeito inibitório sobre a cicatrização. No ano seguinte, em 1995, os autores publicaram um estudo baseado num protocolo parecido ao anteriormente relatado, porém utilizaram um laser de Argônio, operando de baixa dose de energia. Observaram um efeito inibitório desse laser quando utilizaram alta fluência (de 130 a 150 J/cm²) na irradiação (AL-WATBAN e ZHANG, 1995). Um ano depois, ainda seguindo essa linha de pesquisa, AL-WATBAN e ZHANG (1996) fizeram um estudo com o mesmo modelo animal utilizando lasers emitindo diferentes comprimentos de onda. Usaram diferentes lasers: laser de He-Cd ($\lambda = 442$ nm), Argônio ($\lambda = 488$ e $\lambda = 514$ nm), He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) e dois diferentes diodos lasers de As-Ga-Al ($\lambda = 780$ nm e $\lambda = 830$ nm). Para todos eles trabalharam com uma fluência de 20 J/cm². Observaram que houve diferença significativa entre os grupos controle não irradiados e os irradiados. Entre os lasers utilizados, o laser de He-Ne foi o mais efetivo. Ainda em complementação, os autores fizeram a monitoração da temperatura durante a irradiação com os diferentes tipos de laser, porém não houve alteração significativa dela em nenhum grupo irradiado quando comparado ao controle.

Em 1995, KAMEYA et al. apresentaram um estudo em ratos onde irradiaram feridas padronizadas nesses animais com diodos lasers emitindo diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 632,8$; 680; 830 nm). Observaram diferenças macroscópicas significativas nos grupos irradiados em relação aos controles, embora não fossem estatisticamente significante entre os diferentes grupos irradiados. Histologicamente observaram que os três grupos irradiados apresentaram maior proliferação de tecido conjuntivo e maior presença de vasos sanguíneos quando comparados aos grupos controles.

Em 1995, GÓMEZ-VILLAMANDOS et al. apresentaram um bonito estudo feito em equinos, onde trataram lesões ulcerosas na mucosa respiratória desses animais com um laser de He-Ne, por via fibroendoscópica. Observaram que a cicatrização aconteceu mais rapidamente nos animais tratados com laser e que, histologicamente, o tecido estava melhor vascularizado, com menos edema e com tecido conectivo mais ativo quando comparados aos grupos controle.

Em 1996, EL SAYED e DYSON estudaram os efeitos do pulso de repetição e a importância do seu tempo de duração, com um diodo laser operando em 820 nm, sobre mastócitos de ratos. Os autores queriam determinar os parâmetros ideais de uso desse tipo de laser para aumentar o número de mastócitos locais bem como sua degranulação. Para isso usaram um mesmo comprimento de onda com diferentes frequências de pulso, em modelo de feridas padronizadas em pele de rato. Verificaram que o aumento do número de mastócitos não dependeu da frequência de pulso, porém a degranulação sim.

Em 1997, GÓMEZ-VILLAMANDOS et al., seguindo sua linha de pesquisa em eqüinos, fizeram um estudo sobre os efeitos do laser de He-Ne e de um diodo laser de As-Ga operando em 904 nm na cicatrização de lesões superficiais em mucosa de cavalos. Os autores produziram feridas padronizadas e as irradiaram com aplicações diárias, durante 15 dias, com fluência de 8 J/cm². Os resultados micro e macroscópicos mostraram que nos grupos irradiados, além dos animais apresentarem cicatrização mais rápida, nenhum animal desenvolveu infecção, fato esse evidenciável em 70% dos animais dos grupos controle.

Em 1997a, WEI YU et al., utilizaram um laser de Argônio operando em 630 nm sobre feridas padronizadas em ratos geneticamente diabéticos para verificação de seus efeitos na cicatrização. Os autores dividiram os animais em quatro grupos. O grupo 1 foi utilizado como controle negativo, o grupo 2 como controle positivo (foi aplicado topicamente fator de crescimento fibroblástico local - bFGF sobre a ferida), o grupo 3 foi irradiado com laser e no grupo 4 foi utilizada a associação laser de baixa intensidade e aplicação tópica de bFGF. Para a análise dos resultados foram utilizadas a evolução histológica e a velocidade de fechamento da ferida. Os autores observaram que clinicamente os grupos que tiveram as feridas fechadas mais rapidamente foram aqueles que receberam apenas irradiação laser, e histologicamente os animais desses grupos tiveram melhor e mais rápida epitelização, bem como formação de tecido de granulação e deposição de colágeno.

No mesmo ano, TANG et al. estudaram as alterações morfológicas que ocorreram em fibras de colágeno de ratos tratados com diodo laser operando em 830 nm. Trabalharam com fluência variável, de 400 a 550 J/cm² e irradiância fixada em 250 W/cm². Os autores observaram, por meio de microscopia óptica e de elétrons, alterações morfológicas nas fibras de colágeno dos animais irradiados. Os autores concluíram que essa alteração da morfologia espacial das fibras poderia explicar parcialmente a ação do laser de baixa intensidade na cicatrização tecidual.

Em 1998, REDDY et al., fizeram um estudo sobre os efeitos da foto-estimulação laser sobre a produção de colágeno em tendão de Aquiles de coelhos. Os autores lesaram esses tendões e imobilizaram as patas dos animais com talas de poliuretano. O tratamento foi feito com laser de He-Ne, com aplicações diárias, usando fluência de 1 J/cm² durante 14 dias consecutivos. As análises bioquímicas dos tendões revelaram 26% de aumento na concentração de colágeno, indicando um processo de cicatrização mais rápido dos tendões dos animais irradiados, quando comparados aos do grupo controle não irradiado.

Em 1998, MORRONE et al., publicaram um estudo sobre a ação de um diodo laser de Ga-Al-As sobre trauma muscular. Os autores prensaram músculos de pata posterior de coelhos adultos e irradiaram com um diodo laser operando em 780 nm, com diferentes parâmetros de irradiação. Os animais foram divididos em quatro grupos. O grupo 1 foi usado como controle, o grupo 2 foi tratado com fluência de 150 J/cm² e frequência de 50 Hz, o grupo 3 foi tratado com fluência de 250 J/cm² e frequência de 100 Hz e o grupo 4 foi tratado com fluência de 800 J/cm² com radiação contínua. A avaliação histológica e histomorfométrica do dano muscular e da cicatrização tecidual demonstraram melhor qualidade e quantidade do processo reparacional nos animais dos grupos irradiados. O grupo onde se obteve os melhores resultados foi aquele irradiado com 800 J/cm² e com radiação contínua.

Em 1998, LOWE et al. estudaram a ação de um diodo laser operando em 890 nm sobre a cicatrização de feridas padronizadas em dorso de rato. Os autores trabalharam com fluências de 0,18, 0,54

e $1,45 \text{ J/cm}^2$. As áreas foram analisadas por sistema de imagem por meio de vídeo e os autores não observaram efeitos estimulativos nos animais irradiados em relação aos do grupo controle, sendo que no grupo irradiado com fluência de $1,45 \text{ J/cm}^2$ houve significativa inibição do processo cicatricial aos 16 dias da primeira irradiação.

Em 1999, ALMEIDA-LOPES et al. apresentaram um estudo clínico em pós-operatório de 150 pacientes submetidos a cirurgia oral menor, repetindo o mesmo protocolo de um estudo *in vitro* que haviam publicado anteriormente (ALMEIDA-LOPES et al., 1998b). Os pacientes foram divididos em três grupos: um controle não irradiado, um irradiado com um diodo laser operando em 635 nm e outro com um diodo laser operando em 780 nm. As irradiações foram feitas no pós-operatório imediato, aos sete dias e 14 dias após intervenção cirúrgica, quando necessário. A fluência utilizada foi de 2 J/cm^2 . Os grupos irradiados apresentaram cicatrização significativamente mais rápida, além de qualidade estética superior, quando comparados aos grupos controles. Não houve diferença significativa entre os grupos irradiados com diferentes comprimentos de onda.

2.3.2.3. Efeitos Vasculares

Microcirculação

Foi demonstrado que o laser de baixa intensidade aumentava o grau de vascularização do tecido neoformado, quando se irradiava feridas em processo de cicatrização.

Em 1982, BENEDICENTI demonstrou que o fluxo de sangue em capilares mesentéricos aumentou após a irradiação com um diodo laser operando em 904 nm, fenômeno esse confirmado em 1984 por MIRÓ et al. que utilizaram como modelo de estudo o leito de unha e irradiaram com um diodo laser de As-Ga, observando que a circulação da região aumentou após a irradiação. O incremento do fluxo sanguíneo continuou durante 20 minutos após cessar a irradiação com laser, inclusive quando a área alvo foi esfriada. Em 1983, TRELLES et al. publicaram um experimento realizado em olho de coelho onde novamente foi confirmado esse fenômeno. Resultados similares foram obtidos em 1984 por MAYAYO e TRELLES, quando irradiaram mucosa anal de ratos. Nesses experimentos o esfíncter final dos capilares foi o primeiro a responder e a resposta dependeu da severidade da lesão na microcirculação.

Em 1984, MIRÓ concluiu que a vasodilatação e o aumento da microcirculação eram resultados de um aumento do metabolismo tecidual e da normalização da homeostase.

Em 2000, SCHAFFER et al., estudaram a ação de um laser de 780 nm na microcirculação. Seis voluntários tiveram suas plantas dos pés irradiadas com fluência de 5 J/cm^2 , e foi feita a análise da microcirculação por imagem, usando-se ressonância magnética, após aplicação de contraste intravenoso. Observou-se importante incremento da microcirculação local após a aplicação do laser.

Em 2002, KUBOTA estudou os efeitos de um laser de 830 nm sobre retalhos em dorso de rato, usando fluência de 185 J/cm^2 . Dividiu os animais em quatro grupos: irradiados de três maneiras distintas e um controle. Concluiu que, em todos os grupos irradiados o laser ativou a corrente sanguínea e aumentou a perfusão dos retalhos.

Fluxo Linfático

LIEVENS foi um autor que trabalhou bastante no tema de efeitos do laser de baixa intensidade na atividade do sistema linfático. Publicou vários trabalhos bastante elucidativos nessa área (1986, 1988, 1990). Em 1991, o autor publicou um estudo com 50 animais, onde fez incisões na região abdominal de ratos e os irradiou com um laser de He-Ne e um diodo laser de As-Ga operando em 904 nm. Avaliou a adesão pós-cirúrgica, o edema local e a regeneração de veias e de vasos linfáticos da região mesentérica. Observou que ao irradiar essa região com laser, o fluxo linfático instalou-se rapidamente. A regeneração dos vasos linfáticos nos animais tratados com laser foi mais rápida que nos do grupo controle não irradiado. No primeiro grupo estava completa aos nove dias, enquanto que o grupo controle apresentou regeneração incompleta ainda aos 55 dias após a cirurgia. O autor também observou uma neovascularização formada significativamente mais rápida nos animais tratados, que se deu em menos da metade do tempo que nos animais do grupo controle. A adesão peritoneal foi escassa no primeiro grupo, enquanto que foi comum no segundo grupo.

Em 1986, LABAJOS observou que após a irradiação do intestino de ratos com um diodo laser de As-Ga emitindo no infravermelho próximo, com fluência de 1 J/cm^2 , o fluxo de água e eletrólitos através da parede do intestino dos animais do grupo irradiado foi retardado simultaneamente com um incremento do potássio intracelular.

Imunidade

MESTER et al., em 1977 num estudo sobre cicatrização de feridas e TRELLES em 1986, num estudo sobre ação do laser de He-Ne sobre herpes genital, especularam que esse tipo de laser poderia agir sobre a função imunológica, envolvendo principalmente os leucócitos que incrementariam a fagocitose.

As publicações que analisam estudos com esse tipo de laser envolvendo vírus e bactérias ainda causam controvérsia e são pouco esclarecedoras. O laser de baixa intensidade atua como tratamento efetivo na prevenção dessas infecções *in vivo* como demonstrou TRELLES em 1986 em tratamento de pacientes com surto de herpes genital que foram irradiados com laser de He-Ne, ou desse tipo de tratamento associado com acyclovir em herpes labial e facial, como demonstrou VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., em 1994, em um estudo clínico feito em 60 pacientes, onde trataram um grupo com laser de He-Ne, outro com associação de laser de He-Ne e acyclovir e outro somente com acyclovir. Os autores obtiveram melhores resultados nos grupos tratados com a associação de laser de He-Ne e acyclovir. Também outros autores demonstraram a efetividade desse tratamento na prevenção de nevralgias pós-herpéticas, como IJIMA, que em 1991 apresentou um estudo com 18 pacientes portadores desse tipo de alteração, e tratou-os com laser de He-Ne, obtendo resultados favoráveis.

Entretanto quando observamos estudos *in vitro*, verificamos que o laser de baixa intensidade pode estimular o crescimento ou virulência de bactérias e vírus em cultivo ou cultura. GILIOLI et al., em 1985 estudaram os efeitos de um diodo laser de As-Ga em HSV1 e HSV2 *in vitro* e observaram que esses vírus foram estimulados pela ação desse laser. Em 1987, RUBENSTEIN publicou um trabalho com 57

pacientes portadores de lesões ulcerativas vulvares induzidas por papiloma vírus (HPV). Ele fez sua remoção com laser cirúrgico de CO₂ e irradiou o leito cirúrgico com um diodo laser emitindo na região do infravermelho próximo, com potência de saída de 25 mW, duas vezes por semana, com irradiância de 22 mW/cm². Obteve resultados benéficos significativos, em cerca de 45%, nos casos assim tratados.

Esse assunto ainda é muito polêmico, porém autores como TRELLES, 1986; VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., 1994 e TÚNER e HODE, 2002, entre outros, atribuem esse efeito “antiviral” do laser de baixa intensidade, que se demonstra *in vivo*, presumidamente ao efeito estimulativo do sistema imunológico local e sistêmico.

Em 1985, RUFFOLO, publicou um trabalho onde utilizou o laser de baixa intensidade em tratamento de leucoplasias para alívio de sintomas daqueles pacientes que os apresentavam. O autor obteve bons resultados comentando que essa condição de normalização da área afetada seria devido a estimulação da imunidade local desses pacientes.

MAYAYO e TRELLES, em 1986 publicaram um artigo sobre laser de baixa intensidade e imunidade, onde trabalharam com ratos portadores de aplasia tímica e os induziram à septicemia. Irradiaram os animais a cada dois dias, com fluência entre 2 e 4 J/cm². Os animais que receberam irradiação sobreviveram mais tempo que os do grupo controle que não receberam irradiação. No mesmo ano, COBO PLANA et al. (1986) apresentaram um estudo sobre o uso do laser de baixa intensidade na profilaxia da osteorradionecrose manipular. Os autores mostraram que utilizando um diodo laser operando em 904 nm, com fluência de 2 J/placa, diminuiu o crescimento de bactérias *in vitro*. Com um laser de He-Ne, com a mesma fluência, não houve alterações nessas placas. Em 1987, CARRILLO et al., fizeram um estudo *in vitro* sobre o crescimento de uma cepa de *Stafilococcus aureus*, onde utilizaram um laser de He-Ne com fluências de 0,3 J/cm² e 0,6 J/cm². Os autores não observaram nenhum crescimento significativo.

Em 1991, SKOBELKIN et al. apresentaram um estudo clínico de pacientes oncológicos, que visava a ativação do seu sistema auto-imune como preparo pré-operatório. Foi um estudo envolvendo 60 pacientes onde os autores propuseram que essa terapia poderia ser utilizada como coadjuvante em pacientes portadores de imunodeficiências. Os pacientes foram divididos em quatro grupos e irradiados no pré-operatório imediato. Um grupo foi controle, outro irradiado transcutaneamente (sobre linfonodos) com um diodo laser operando em 890 nm, outro irradiado internamente sobre as lesões com laser de He-Ne, e outro com uma associação de ambos métodos de irradiação. Os estudos avaliaram componentes de células brancas do sangue, ensaios de atividade imunoglobulínica (IgA, IgM e IgG) além de determinação do comportamento de frações de linfócitos T. Essa avaliação foi feita antes e depois das irradiações. Os autores observaram que a resposta imunológica dos pacientes irradiados foi significativamente aumentada em relação aos do grupo controle.

Em 1995, FILONENKO estudou os efeitos do laser de baixa intensidade na defesa imunológica específica e não específica. Utilizaram esse tratamento como prevenção de complicações pós-cirúrgicas em alterações de joelho e em pós-operatórios de *lifting* facial cirúrgico.

Em 1997b, WEI YU et al., estudaram a ação de um laser de corante operando em 630 nm em ratos portadores de septicemia crônica. Os autores queriam verificar se o laser de baixa intensidade tinha efeito estimulativo na resposta autoimune em septicemia, usando modelo animal. Os autores abriram a

cavidade abdominal dos ratos e os submeteram à cirurgia. A irradiação foi feita no pós-operatório imediato com fluência de 5 J/cm^2 . Num experimento a parte, linfócitos de ratos normais *in vitro* foram utilizados para verificação dos efeitos bioestimulativos do laser. Os autores observaram *in vivo* que o laser de baixa intensidade aumentou significativamente a proliferação de linfócitos nos ratos com septicemia bem como o tempo de sobrevivência desses animais quando comparados aos do grupo controle não irradiado. Os autores verificaram *in vitro* que o laser de baixa intensidade estimulou significativamente a proliferação de linfócitos na presença de estímulo mitogênico e aumentou a síntese de ATP linfocitária. Concluíram que a irradiação laser aumentou a resposta imunológica e a sobrevivência dos ratos com septicemia.

Pelos trabalhos até aqui revisados observamos que a ação do laser de baixa intensidade na cicatrização tecidual *in vivo* depende de mecanismos complexos envolvendo eventos celulares e humorais. Para analisar esses eventos individualmente, fizemos a revisão da ação do laser de baixa intensidade *in vitro*, sobre as principais células envolvidas no processo de cicatrização.

2.4. Revisão dos Efeitos do Laser na Cicatrização *in vitro*

2.4.1. Cultura de Células

O estudo *in vitro* utilizando cultura de células tem sido muito usado devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ podem ser obtidos de maneira precisa, além de conseguir-se amostras totalmente homogêneas. As desvantagens desse método de estudo são, por exemplo, a necessidade de trabalhar-se em ambiente estéril e asséptico, o que limita algumas vezes seus protocolos. Além disso, exige uma certa prática por parte do pesquisador. Outro problema é a quantidade de material obtido em cultura, que é bastante pequena; ainda assim o custo de um experimento feito com célula em cultura é muito maior que o mesmo feito em animais (FRESHNEY, 2000).

MENEGAUX et al. (1934) *apud* KAWAHARA et al. (1968), relatam que o primeiro estudo *in vitro* sobre materiais implantados foi realizado em Medicina na área de ortopedia. Em Odontologia foram realizados estudos *in vitro* utilizando cultura de células por KAWAHARA et al. (1955) e GRANT (1955) *apud* KAWAHARA et al. (1968) para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários.

Através da observação da morfologia celular, efeitos na membrana, atividade celular e índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular. Em 1959, BERGMAN *apud* SPANGBERG (1969) introduziu o método de contagem celular e de número de mitoses para avaliação do dano celular, onde se mistura a suspensão celular e a solução teste em uma câmara de cultura apropriada. Esta consiste de um anel de vidro fixada a uma lâmina. Após a fixação e coloração da cultura as células e mitoses são contadas.

Outros métodos de avaliação do dano celular foram propostos. Em 1965, GUESS et al. *apud* SCHMALZ (1994) relataram que efeitos de membrana poderiam ser demonstrados pelo vermelho neutro, que é armazenado em células viáveis e liberado no meio circundante após dano celular. Esse método porém é considerado subjetivo.

SPANGBERG, em 1973, para avaliação da citotoxicidade do material, introduziu o método da mensuração da liberação de um isótopo radioativo incorporado no interior das células (cromo radioativo - ⁵¹Cr), baseado no dano celular após contato direto material-célula. Para avaliação quantitativa do dano celular, é usada a liberação de

marcadores radioativos de células alvos. Após a exposição a materiais tóxicos, ocorrerá dano celular e a liberação de DNA marcado pode ser medida para indicar o dano celular. Esse método tem sido amplamente utilizado como teste de avaliação para muitos materiais dentários, cujas vantagens são: método rápido, altamente sensível, que possibilita adequado contato material-célula e permite quantificação objetiva do dano celular com boa precisão.

Em 1980, a Federação Dentária Internacional recomendou que a avaliação da toxicidade de materiais dentários fosse feita segundo níveis biológicos, ou seja, testes iniciais, testes secundários e, finalmente, testes de uso.

De acordo com SCHMALZ (1994), outros métodos basearam-se na exclusão do corante Azul de Trypan, o qual penetra nas células mortas, com lesão da membrana celular, enquanto isso não ocorre nas células vivas, que apresentam membrana íntegra.

Em 1990, POLLARD sugeriu que a determinação do número celular fosse realizada usando-se um contador eletrônico de partículas ou através de um hemocítômetro. O primeiro método é mais preciso e pode ser usado para contar baixas concentrações celulares. O segundo requer maior densidade celular e é mais propenso a erro de amostragem. Entretanto permite uma estimativa visual do estado das células e pode ser usado para estimar a viabilidade celular quando combinado com a exclusão do corante azul de Trypan. Para a contagem, as células são ressuspensas e diluídas em azul de Trypan. Uma gota de suspensão celular é adicionada aos dois lados do hemocítômetro; isso é feito para determinar a viabilidade celular, já que o número de células que não se coram são aquelas que apresentam a membrana intacta.

No mesmo ano, BASERGA relatou que células em cultura podiam crescer por aumento no tamanho da célula ou por aumento de seu número. A contagem de células em uma placa de Petri nos diz quanto a população celular cresceu, porém não informa se as células estão ou não proliferando. Quando desejamos determinar o efeito de qualquer alteração da proliferação celular no meio de cultura, ou seja, sua capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método mais indicado é contar o número de células antes e após o tratamento, de preferência a cada 24 horas. Para indicar se uma população celular está crescendo ou não, o melhor parâmetro é contar o número de células por placa de cultura.

Em 1996, CIAPETTI et al. afirmaram que os métodos que empregam a incorporação de nucleotídeos, ainda que sejam sensíveis, apresentam desvantagens

como uso de equipamentos e sala específicos, perigo de manuseio dos marcadores radioativos, bem como geração de resíduos radioativos.

A citotoxicidade de materiais dentários *in vitro*, segundo MJÖR et al. (1985) foi avaliada por meio de medidas de crescimento celular, alterações na permeabilidade da membrana, alterações metabólicas ou alterações citopáticas. Alguns métodos avaliam a citotoxicidade por dois ou mais desses parâmetros associados.

Em 1998, DANIEL esclareceu que três testes utilizados para avaliar a citotoxicidade são baseados em alterações na permeabilidade da membrana (teste do revestimento com ágar; teste da liberação de ^{51}Cr) e em alterações metabólicas combinadas com um corante celular e microscópio (teste do filtro Millipore). O método da liberação do ^{51}Cr , além de uma área de trabalho estéril e incubadora com controle de ar, umidade e temperatura, requer um espectômetro gama ou um contador de cintilação líquida e um sistema de distribuição de resíduos radioativos. Se a substância teste tem a capacidade de precipitar proteínas, esse método pode indicar um resultado falso, dando uma baixa liberação de ^{51}Cr . No método do revestimento com ágar o material é colocado em contato direto com o ágar que reveste uma monocamada celular, a qual é corada com vermelho neutro vital. Ao ocorrer lise celular, registra-se um “índice de resposta” baseado no tamanho da difusão pela zona descolorida e a porcentagem das células lisadas dentro das zonas. O método do filtro Millipore registra de acordo com um escore baseado na intensidade da coloração da zona e o diâmetro ou extensão das áreas afetadas, classificando o material como não tóxico, levemente tóxico, moderadamente tóxico e severamente tóxico.

Em 2000, FRESHNEY revendo os ensaios em cultura de células, descreveu que podem ser divididos em duas classes: (1) Resposta imediata ou de curto prazo, tal como alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica; e (2) Sobrevivência em longo prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto-renovação ou sobrevivência em estado alterado, como por exemplo, transformação maligna. Os ensaios de curta duração são usados para medir a proporção de células viáveis após um determinado procedimento traumático. Segundo DANIEL (1998) a maioria dos testes de viabilidade baseia-se no rompimento da integridade da membrana, determinado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (azul de Trypan, eritrosina, nigrosina), ou a liberação de um corante ou isótopo normalmente retido pelas células viáveis (diacetato de fluoresceína ou cromo radioativo). Os ensaios em longo prazo são usados para demonstrar a capacidade

metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo é medir a sobrevivência.

BROWNE e TIAS em 1979 revisaram o tema da dependência celular sobre o resultado da citotoxicidade *in vitro*. Segundo eles, com relação ao tipo celular a ser utilizado no experimento, muitos aspectos destes testes são relevantes para a simulação do uso clínico de materiais dentários como o tipo de célula usado, método de contato dela com o material, estado físico do material e o método de avaliação da citotoxicidade. Concluíram porém que o tipo de linhagem celular experimental empregada no experimento não era um fator decisivo na determinação da toxicidade de um material.

SCHMALZ (1994) afirmou que podem ser usados dois tipos de células: (1) linhagens de células permanentes derivadas de coleções tipo cultura (ou de fontes comerciais) e (2) linhagem de células primárias, derivadas de *explants* e estabelecidas em cada laboratório individualmente. O autor afirma que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação que se deseja. Primeiramente o autor preconiza o uso de métodos mais simples, baseados nos efeitos de membrana ou no índice de proliferação celular. Caso haja necessidade de informações mais detalhadas, deverão ser usados métodos mais sofisticados, baseados na atividade celular. Esse autor acredita que o uso do índice de proliferação para registrar o dano celular é um dos métodos mais antigos e mais comumente utilizados. As vantagens da contagem celular direta é que a mesma é fácil de realizar e pode ser combinada com um corante vital a fim de excluir as células mortas.

Sabemos que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos nas mesmas condições. Apesar disso, a maioria dos trabalhos *in vitro* utilizam fibroblastos obtidos à partir de amostras de pele humana, ou ainda de animais, pela praticidade de se trabalhar com fibroblastos de linhagens já estabelecidas, menos sensíveis a variações e que se podem adquirir no mercado.

Linhagens celulares obtidas de cultivos primários são mais delicadas e exigem um certo tempo de trabalho e grande dedicação antes de se começar o experimento propriamente dito. Por isso, poucos autores demonstram a atividade dos lasers de baixa intensidade sobre fibroblastos de mucosa humana, sobretudo em linhagem primária.

2.4.2. Estudos *in vitro*

2.4.2.1. Angiogênese

Em 1988, TRELLES et al. fizeram um estudo em língua de ratos para observação de níveis de histamina local e sistêmica, após tratamento com laser emitindo na região do visível, operando em 632,8 nm, utilizando potências ópticas de saída de 4 mW e de 50 mW com fluência de $2,4 \text{ J/cm}^2$. Com a potência óptica de saída de 4 mW observavam localmente nos grupos irradiados, aumento de 100% de histamina e nos grupos irradiados com potência óptica de saída de 50 mW, um aumento de 30%. Os autores também observaram diferença significativa na liberação de histamina em nível sistêmico em relação aos grupos controle.

Em 1989, os mesmos autores (TRELLES et al., 1989a) repetiram o experimento com o mesmo modelo, mesmo comprimento de onda e mesma fluência, variando apenas as potências ópticas de saída dos aparelhos, que foram de 4 mW e 15 mW, variando portanto a irradiância. A análise de liberação de histamina local foi feita através de radioimunoanálise e foi feito estudo da morfologia da língua por meio de microscópio eletrônico de transmissão. Nos grupos irradiados foram observadas marcada vasodilatação e degranulação ativa de mastócitos quando comparados aos dos grupos controle. Os níveis de histamina foram mais altos nos grupos irradiados com o laser de potência óptica de saída de 15 mW.

Em 1990, EL SAYAD e DYSON utilizaram diodos lasers emitindo em diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 660, 820, 870, 880, 940, 950 \text{ nm}$) sobre modelo animal. No grupo controle a irradiação foi feita com uma luz comum. Quando irradiaram pele normal com qualquer um dos comprimentos de onda do laser, houve maior número de mastócitos, embora sem degranulação, enquanto que os grupos irradiados com luz comum apresentaram resultados nulos. Quando irradiaram pele lesada, observaram aumento tanto no número como na degranulação de mastócitos em comparação com os grupos controle irradiados com luz comum. Os autores relataram que controlaram a temperatura durante a irradiação e que observaram uma elevação máxima na temperatura local dos animais de $1,8^\circ\text{C}$, que se normalizou aos quatro minutos, e não atribuíram os resultados obtidos no experimento a esse fato.

2.4.2.2. Sistema Imunológico

Linhas Hematológicas

Em 1989, VISCOR et al. usaram um laser de He-Ne com irradiância de $0,5 \text{ mW/cm}^2$ para estudar a curva de fragilidade osmótica de eritrócitos. Observaram que nos grupos irradiados com laser, houve alteração da viscoelasticidade da membrana eritrocitária sem evidências de alteração em sua estrutura.

Em 1989, SHIROTO et al. estudaram os efeitos de dois diodos lasers de As-Ga-Al sobre a atividade de neutrófilos de amostras de sangue humano de adultos saudáveis. Dividiram as amostras em quatro grupos. Os grupos 1 e 2 foram irradiados com um diodo laser operando em 830 nm, o grupo 3 com um diodo laser operando em 904 nm, e o grupo 4 foi utilizado como controle e não foi irradiado. Utilizaram fluência e irradiância diferentes para todos os grupos. Os autores observaram que todos os grupos irradiados apresentaram maior atividade fagocitária dos neutrófilos, sendo que os resultados mostraram que essa atividade dependeu da fluência, já que os melhores resultados foram obtidos no grupo irradiado com o diodo laser operando em 830 nm com potência óptica de saída de 60mW.

Em 1991, VINCENT et al. estudaram a ação de um laser de corante sobre células sangüíneas, irradiando sangue de coelhos e humanos. Observaram que o comprimento de onda emitido em 630 nm foi fortemente absorvido pelo sangue. Com um hematócrito entre 42 e 50 e uma espessura de fluxo de sangue de 0,15 mm, absorveu 42% da luz e quando a espessura do fluxo foi de 1 mm, absorveu 80% da energia laser, com uma transmissão de 20%.

Em 1994, O'KANE et al. utilizaram um diodo laser operando em 660 nm para estudar a incorporação de timidina tritiada em linhagem celular hematopoiética (pré-monócitos e linha mielóide). Com fluência maior ou igual a $5,8 \text{ J/cm}^2$ produziu-se uma redução significativa da incorporação de timidina tritiada na linha mielóide. Com fluência de 5,8; 7,2 e $11,5 \text{ J/cm}^2$, o mesmo ocorreu na linha pré-monocítica. Para nenhuma fluência houve aumento da incorporação de timidina tritiada em nenhuma das linhas e a viabilidade celular foi de 95%. Os autores observaram que a causa poderia ser por mudanças na proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular ou por indução da diferenciação celular.

Em 1996, CALLAGHAN et al. estudaram a ação de um diodo laser emitindo na região do visível operando em 660 nm sobre uma linhagem de células hematopoiéticas

U937. Usaram fluências que variaram de 1,0 a 11,5 J/cm². A síntese de DNA foi significativamente aumentada quando utilizadas fluências de 2,9 e de 8,6 J/m².

Em 2000, SIPOSAN e LUKACS estudaram os efeitos do laser de baixa intensidade em eritrócitos. Irradiaram amostras de sangue fresco de voluntários, usando fluência entre 0,207 J.cm⁻³ e 9,346 J.cm⁻³. Observaram um efeito de bioestimulação que justificaram pela alteração sobre a membrana celular dessas células.

Linfócitos

Em 1987, OHTA et al. estudaram os efeitos de um diodo laser de As-Ga sobre linfócitos, com diferentes fluências. Observaram que quando irradiaram linfócitos com fluência de 10,8 mJ/cm² produziu-se uma inibição da proliferação celular.

Em 1988, FEDOSEYEVA et al., da equipe de KARU, estudaram a ação do laser de He-Ne sobre linfócitos. Observaram que com uma fluência de 56 J/cm² obtiveram os mesmos resultados de quando utilizaram uma determinada substância de ação mitógena (a fitohemaglutinina). Observaram a união de DNA com acridina-orange.

Em 1989, INOUE et al. estudaram o efeito mitógeno de um diodo laser de As-Ga-Al sobre linfócitos. Com fluências variando de 14,2 a 28,3 mJ/cm² produziu-se inibição na replicação celular. Com fluência de 849 mJ/cm² produziu-se um aumento da replicação celular.

Em 1990, CHIO et al. estudaram os efeitos de três diferentes lasers (He-Ne, As-Ga-Al e Argônio) sobre linfócitos *in vitro*. Observaram que o índice mitótico foi inversamente proporcional a fluência de irradiação e que as rupturas cromossômicas aumentaram proporcionalmente com a fluência. Com o laser de He-Ne e com o diodo laser de As-Ga-Al não observaram nenhuma alteração significativa em relação ao grupo controle, tanto no índice mitótico como nas rupturas cromossômicas.

Em 1991, NARA et al. estudaram os efeitos do He-Ne sobre suspensão de linfócitos da circulação sanguínea periférica de humanos. Utilizaram fluências que variaram de 5 a 20 J/cm² sobre esses linfócitos *in vitro*, mantidos em meio pobre em nutrientes e os resultados foram comparados aos grupos tratados com um mitógeno de origem vegetal (Concanavalina A). Observaram que em meio pobre em nutrientes, a irradiação com laser provocou um aumento significativo no índice mitótico, efeito que

não se produziu quando o meio de cultivo foi o adequado para os linfócitos. O número de células viáveis não se alterou com a irradiação laser. Nessa época os autores fizeram uma importante afirmação, considerando que o efeito bioestimulador do laser dependia do estado fisiológico em que se encontravam as células antes da irradiação.

Durante o ano de 1991, KARU et al. (1991a, 1991b) publicaram uma série de artigos onde estudaram a incorporação de timidina tritiada em suspensão de linfócitos em meio livre de mitógenos, em comparação a grupos controle de cultivos estimulados com fitoaglutininas. Não houve diferença significativa entre os grupos. Após a irradiação dos cultivos acrescentaram fitoaglutininas ao meio, e observaram aumento na síntese de DNA, em comparação com a presença do mitógeno isolado. Em outro artigo da série, os autores comunicaram os resultados obtidos com o mesmo protocolo observando a expressão do receptor para Interleucina-2 em linfócitos irradiados, sem obterem resultados significativos (1991c).

KARU (1991d) concluiu que o laser de He-Ne, com fluência de 56 J/cm^2 , produziu um aumento no fluxo de íons de cálcio a curto prazo (alguns minutos) e um aumento da síntese de DNA a longo prazo.

Em 1992, HERBERT et al. estudaram a concentração de AMP, ADP e ATP em linfócitos em suspensão após sua irradiação com diodo laser operando em 820 nm com diferentes fluências. Com fluência de $1,2 \text{ J/cm}^2$ produziu-se um aumento de ATP e diminuição de ADP, não se verificando alterações na concentração de AMP.

Em 1992, FUNK et al. estudaram a produção de citocinas após irradiação com laser de He-Ne sobre cultivos de células mononucleares de sangue periférico humano. Os autores irradiaram essas células em diferentes intervalos de tempo e utilizando diferentes fluências. Os autores verificaram que a média de incorporação de timidina tritiada ao DNA das células irradiadas decresceu de acordo com o aumento da fluência. Os níveis de interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferón- γ (IFN- γ) foram quantificados no sobrenadante, antes e depois da irradiação. Observaram que as linfocinas aumentaram aos 30 minutos depois da irradiação, diminuindo porém aos 60 minutos. A incorporação de timidina tritiada diminuiu à medida que se aumentou a fluência.

Em 1995, VOLPI et al. usaram um laser de He-Ne para estudar a ação do laser de baixa intensidade sobre granulócitos e linfócitos. Observaram que aos 30 minutos após a irradiação, produziu-se nos linfócitos um aumento estatisticamente significativo

de ATP e aos 60 minutos produziu-se nos granulócitos, sem modificação no total de adenilato da célula.

Em 1997, MANTEIFEL et al. estudaram as alterações ultraestruturais em mitocôndrias de linfócitos humanos após irradiação com laser de He-Ne. Após a irradiação dessas células com fluência de 56 J/cm^2 , foram feitos cortes ultra-finos para análise em microscopia eletrônica. Os autores observaram que nas células irradiadas houve um aumento de 20% no número de perfis mitocondriais na secção celular sem aumento em sua área total e que o número de mitocôndrias foi reduzido.

Em 2000, TONG et al. estudaram os efeitos da irradiação com diferentes comprimentos de onda em linfócitos humanos. Irradiaram com laser de 532 nm, 632,8 nm, 650 nm, 810 nm e 1300 nm, com fluência de $7,5 \text{ J/cm}^2$. Com os três primeiros comprimentos de onda, houve aumento da produção de Ca^{2+} , com os últimos dois comprimentos de onda, não houve aumento significativo dessa produção.

Macrófagos e Granulócitos

Em 1985, HUBACEK et al. estudaram os efeitos do laser de He-Ne sobre a atividade fagocitária de neutrófilos cultivados com cristais de cádmio. Trabalharam com fluências variáveis de 0,3, 0,7 e 1,5 J. Quando trabalharam com a primeira, não observaram efeito significativo sobre a fagocitose. A segunda estimulou a atividade fagocitária e a terceira produziu inibição desse fenômeno.

Em 1989, KARU et al. estudaram os efeitos do laser de He-Ne sobre a atividade fagocitária de neutrófilos, verificando que houve um incremento dessa atividade nos grupos irradiados em relação aos controle não irradiados.

Em 1989, RICEVUTI et al. estudaram a ação do laser de He-Ne sobre granulócitos em diferentes meios de cultivo. Avaliaram sua migração *in vitro*, seu metabolismo oxidativo, sua agregação granulocítica e a liberação de ATP dessas células. Em todos os cultivos produziu-se marcada inibição na migração celular comparado com os grupos controle, quando irradiados com fluência de 2 J. Quando irradiaram esses cultivos com fluência de 4 J, essa inibição foi máxima. Para nenhuma das fluências utilizadas houve modificação no metabolismo oxidativo. Os autores observaram a diminuição da liberação de ATP porém, após um estímulo mitógeno, houve um aumento na produção de ATP, somente nos grupos irradiados com fluência de 4 J. Esses mesmos autores trabalharam em humanos, irradiando pacientes a cada 12

horas com fluência de 2 J. Observaram uma diminuição significativa da celularidade global no sangue periférico. Estudaram também a presença de uma glicoproteína de membrana envolvida na quimiotaxia e agregação (CD 11a, b, c e CD 18). Observaram que seus níveis séricos não se modificaram após a irradiação.

Em 1990, OSANAI et al. estudaram a ação fagocitária de neutrófilos utilizando um diodo laser de As-Ga-Al. Não observaram nenhuma alteração significativa nos grupos irradiados em relação aos controle não-irradiados.

Em 1990, YOUNG et al. estudaram a ação de um diodo laser de As-Ga-Al emitindo em diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 660, 820$ e 870 nm) sobre granulócitos. Observaram que a máxima ativação da bomba de sódio e potássio aconteceu quando se utilizou fluências que variaram de 4 a 8 J/cm^2 . Quando utilizaram fluências maiores que isso, aconteceu inibição desse mecanismo. Trabalharam ainda com diferentes frequências de onda e observaram que a frequência mais ativa para a bomba de cálcio foi a de 16 Hz, ainda que com frequências de 4,56, 700 e 5000 Hz, também observaram aumento de sua atividade. Não houve diferença significativa nos resultados encontrados para os diferentes comprimentos de onda utilizados.

Em 1991, OSTUNI et al. utilizaram um laser de He-Ne para estudar as alterações na fluorescência intrínseca emitida por granulócitos, monócitos e linfócitos na vascularização periférica, antes e depois da irradiação. Não houve alterações significativas em linfócitos e em monócitos, porém houve em granulócitos quando irradiados com um diodo laser operando em 280 nm.

Em 1991 e 1992, BOLTON et al. estudaram a ação de um diodo laser operando em 820 nm sobre cultivo de macrófagos. Irradiaram os cultivos, aspiraram seu meio e o colocaram em cultivo de fibroblastos, estudando a replicação destas células. Quando utilizaram irradiância de 400 mW/cm^2 e fluências variando de 2,4 a $7,2 \text{ J/cm}^2$, verificaram aumento significativo na população de fibroblastos. Seguindo o mesmo protocolo, estudaram se a luz polarizada podia afetar a proliferação dessas culturas. Compararam lasers com polarização de 95% e de 14%. Observaram que a primeira polarização foi mais eficiente que a segunda.

Em 1994, RAJARATNAM, utilizou o mesmo protocolo dos trabalhos publicados anteriormente trabalhando com diferentes frequências de emissão (2,28; 18,24; 292,3 e 1000 Hz) com fluência fixada em $7,2 \text{ J/cm}^2$. Todas as frequências produziram aumento significativo no número de fibroblastos em comparação aos grupos irradiados com luz comum.

2.4.2.3. Queratinócitos e Células Epiteliais

Em 1988, SCHNEEDE et al. utilizaram um laser de He-Ne em linhagem de células epiteliais controlando a incorporação de timidina tritiada, o consumo de glicose e a produção de lactato, assim como a síntese de prostaglandina E_2 . Com fluências de 142 e 569 J/cm² não houve alteração no número de mitoses. Uma hora depois da irradiação, a incorporação de timidina tritiada diminuiu transitoriamente durante seis e nove horas. O autor também observou diminuição no consumo de glicose e um ligeiro aumento de LDH. A síntese de PgE_2 diminuiu significativamente depois da irradiação.

Em 1990, MESTER e SNOW estudaram o efeito do laser de He-Ne sobre a maturação e regeneração de *explants* neuroepiteliais olfatórios embrionários. Para uma fluência de 0,5 J/cm², observaram diferença significativa em relação aos grupos controle.

Em 1990, GROSS e JELKMANN utilizaram o laser de He-Ne para irradiar células epiteliais de rim em cultivo. Com fluência de 4,7; 11,9 e 35,4 J/cm² não houve alterações significativas. Quando utilizaram fluência de 71,1 J/cm² observaram aumento no índice mitótico e para fluência de 142,2 J/cm² observaram inibição do fenômeno. Os pesquisadores controlaram a temperatura nos cultivos observando um aumento de menos de 0,065°C, que não consideraram significativo.

Em 1990, HAAS et al. controlaram através de câmara de vídeo, durante seis horas, a migração (por quimiotaxia) de queratinócitos ao longo de uma franja de 0,1 mm, no centro de placas de cultivos confluentes de queratinócito humano. A distância em micrometros nos cultivos irradiados foi de 12 µm/hora, em comparação com os controle que foi de 4 µm/hora. O estudo da incorporação de bromodeoxiuridina sobre o mesmo modelo não foi conclusivo.

Em 1993, STEINLECHNER e DYSON, concluíram que tanto o laser de He-Ne como o diodo laser operando em 904 nm estimularam a proliferação de queratinócitos e que esta proliferação reduziu-se quando o cultivo estava confluyente. Observaram ainda que o efeito foi muito importante quando as células cresceram em meio de cultivo pobre em soro (1%) e que o efeito bioestimulativo do laser produziu-se com fluência muito baixa (0,25 J/cm²).

Em 1996, HSIN-SU et al. estudaram a ação do laser de He-Ne em queratinócitos humanos em cultivo para avaliar os níveis de Interleucina-1 α (IL-1 α) e Interleucina-8 (IL-8). Utilizaram fluência de 1,5 J/cm². Os resultados revelaram que houve aumento significativo na produção de IL-1 α e IL-8 e suas respectivas expressões no RNAm nos grupos irradiados com laser em relação aos controle. Os autores observaram ainda que esse efeito estimulativo dependeu da concentração de células em cultura.

Em 1998, GROSSMAN et al. estudaram os efeitos de diferentes fluências sobre queratinócitos em cultivo, buscando os parâmetros mais adequados de irradiação para que um diodo laser operando em 780 nm produzisse efeito proliferativo sobre essas células. Obtiveram os melhores resultados nos grupos irradiados com fluências entre 0,45 a 0,95 J/cm². As demais fluências utilizadas foram consideradas menos efetivas.

2.4.2.4. Enzimas

Durante o ano de 1991, várias equipes publicaram estudos sobre os efeitos do laser de baixa intensidade na modulação, ativação e síntese enzimática. Nesse ano HUG e HUNTER escreveram um artigo sobre foto-modulação enzimática e dedicaram uma parte somente à bioestimulação laser. Eles utilizaram os trabalhos de KARU e de sua equipe sobre bactérias, leveduras e cultivos celulares, e concluíram que com alta fluência, quando se usava diodo lasers emitindo na região do visível e na região do infravermelho próximo, produzia-se atraso no crescimento dos microorganismos e inibição de suas cadeias respiratórias. Também concluíram que a ação bioestimuladora do laser de baixa intensidade dependia do estado fisiológico em que a célula se encontrava no momento da irradiação.

BOLOGNANI et al.(1991a e 1991b) trabalharam em sistemas enzimáticos. Inativaram LDH incrementando o CO₂ do meio. Após irradiá-las com laser de He-Ne com fluência de 7,42 J/cm², estas enzimas foram reativadas parcialmente (cerca de 60% delas) sem chegar a recuperação total (aos 100%). Observaram que a irradiação laser foi ineficaz na estimulação ou inibição da atividade de enzimas ativas, porém se as enzimas como Na-ATPase, K-ATPase eram inativadas parcialmente (3M-uréia e/ou choque térmico), eram reativadas novamente pela ação de um diodo laser de As-Ga com radiação pulsada, utilizando frequência de 4,5 KHz. A inativação de miosina-ATPase

por um aumento na perfusão de CO₂ foi recuperada a 20% pela ação de um laser de He-Ne. Em 1993, o mesmo autor e sua equipe (BOLOGNANI) seguindo a mesma linha de pesquisa, estudaram a atividade da ATPase e ATPsintetase na miosina exposta à irradiação laser e ao tratamento com campos eletromagnéticos emitindo radiações pulsadas. Os autores verificaram que a recuperação parcial da atividade da miosina ATPase inativada podia ser obtida por sua exposição ao laser. Os autores concluíram que a atividade enzimática foi aumentada pela sua exposição à radiação laser ou aos campos eletromagnéticos emitindo radiações pulsadas.

Em 1994, OSTUNI et al. estudaram a atividade da enzima desidrogenase glutamato. Os autores usaram um laser de He-Ne com diferentes fluências e irradiâncias. Para uma fluência de 4 J/cm² e uma irradiância de 1,7 mW/cm², houve aumento da atividade enzimática; com 10 mW/cm² houve diminuição na atividade enzimática e com 24 J/cm² para ambas irradiâncias utilizadas (7 e 10 mW/cm²) houve aumento na atividade enzimática.

Em 1995, BOLTON et al. publicaram um estudo dos efeitos de um diodo laser operando em 860 nm, utilizando fluências de 2 e 16 J/cm², na proliferação celular de fibroblastos humanos de pele em linhagem primária e na atividade da succinato desidrogenase (enzima diretamente unida à cadeia de transporte eletrônico). Os autores observaram que com fluência de 2 J/cm², os níveis dessa enzima aumentaram com a proliferação celular, efeitos esses que foram inibidos quando as células foram irradiadas com fluência de 16 J/cm².

2.4.2.5. Fibroblastos

Em 1982, RYHANEN et al. estudaram a atividade das enzimas collagenase e gelatinase, que intervêm na degradação do colágeno. Os autores cultivaram fibroblastos em meio isento de soro. Irradiaram essas culturas com dois diferentes tipos de lasers: He-Ne e um diodo laser de As-Ga, e observaram o comportamento dessas enzimas. Não houve alteração em sua atividade, nem na atividade da elastase. Concluíram que o aumento na formação de colágeno descrita neste estudo não foi devido à diminuição em sua degradação e sim a um aumento de sua síntese. O estudo de viabilidade celular com a incubação de fibroblastos com azul de Trypan, não demonstrou alterações. A atividade da LDH, e das enzimas intercelulares (que se liberam do citoplasma quando há alteração da integridade da membrana celular), não apresentou alterações após a irradiação.

Em 1983, CASTRO et al. (1983a, 1983b) estudaram a síntese de DNA após irradiação com laser de Nd:YAG usando fluência de $1,7 \times 10^3 \text{ J/cm}^2$ e incorporando timidina tritiada nos cultivos após irradiação. Mostraram uma significativa redução dessa síntese sem comprometimento da viabilidade celular. A incorporação de hidroxiprolina tritiada, quando se utilizou mesma fluência, mostrou-se significativamente reduzida. Por meio de uma fonte de calor de uma luz halógena de Tungstênio, com um aumento de temperatura entre 30 e 50°C não se observou nenhuma diminuição na produção de colágeno. Portanto, os resultados indicaram que os efeitos observados com o laser de Nd:YAG não se podiam explicar unicamente devido à sua ação térmica. Baseados nesses resultados ABERGEL et al., em 1984, relataram que os lasers de alta intensidade como o Nd:YAG, podiam inibir de forma seletiva a produção de colágeno em situações experimentais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Em 1986, ABERGEL et al. monitoraram a síntese de colágeno com a incorporação de hidroxiprolina tritiada em cultivo de fibroblastos de pele humana. A proporção de hidroxiprolina a prolina no colágeno do tipo I purificado, sintetizado nesses cultivos, foi de aproximadamente 0,7. Os resultados indicaram que mais de 20% da ^3H -radioativa incorporada estava no procolágeno recém sintetizado. Os autores observaram aumento de 3,3 vezes na produção de procolágeno em uma das linhagens de fibroblastos com hidroxilação de prolina de 3,5%, enquanto que um aumento de até 36 vezes na produção foi detectado dentro de outra linhagem, com um grau inicial de hidroxilação de prolina de 0,4%. O aumento máximo na produção de procolágeno foi obtido com os lasers de He-Ne e o diodo laser de As-Ga utilizando fluências de 0,16 e 0,57 J/cm^2 . A hidroxilase de prolina é uma enzima intracelular chave que catalisa a formação de hidroxiprolina a partir dos polipeptídeos de procolágeno recém sintetizado. Não foi observada alteração na atividade desta enzima quando utilizadas fluências de até 1,6 J/cm^2 para o laser de He-Ne e de 1,94 J/cm^2 para o diodo laser de As-Ga. Os autores também estudaram a replicação de DNA pela incorporação de timidina tritiada. Nos grupos irradiados com o laser de He-Ne não foi observada nenhuma alteração, entretanto nos grupos irradiados com o diodo laser de As-Ga, os autores observaram que essa replicação foi significativamente inibida. Também foi comprovada a estimulação com o laser de He-Ne na incorporação de leucina tritiada no colágeno. Foi feita a monitoração da temperatura das culturas durante a irradiação e não foi observada nenhuma alteração significativa destas, nas culturas celulares.

Em 1985, GIMENEZ e CASADO fizeram um estudo sobre respiração tissular e observaram que a irradiação sobre células *in vitro* teve um efeito bioestimulador, resultando num aumento do consumo celular de oxigênio e glicose. Quando a fluência excedeu 1 J/mg de tecido, a resposta foi inibitória, com diminuição da respiração celular.

Em 1986, LAM et al. continuaram sua linha de trabalho utilizando prolina, leucina e timidina tritiada, para estudo da ativação de proteases. Os autores fizeram a monitoração de temperatura, o estudo ultraestrutural e de viabilidade celular, em diferentes linhagens de fibroblastos. Concluíram que o laser de He-Ne provocou um aumento do procolágeno porém não em todas as linhagens, assim como ausência de alterações à nível de DNA. Nos grupos irradiados com o diodo laser de As-Ga observaram diminuição na síntese de DNA. Nos demais parâmetros não houve alterações significativas. A partir desses trabalhos, vários pesquisadores seguiram essa mesma metodologia.

Em 1988, LABBE et al. realizaram um estudo verificando número de células, sua viabilidade, morfologia, índice mitótico e totalidade de DNA, após a irradiação com um diodo laser, sem observarem alterações significativas. Demonstraram que houve um aumento nos níveis de absorção de hidroxiprolina e nos níveis de ácido ascórbico e que ao subcultivar essas células irradiadas, os níveis anteriormente alterados se normalizaram. Propuseram assim, que o laser teria um efeito transitório.

Em 1988, GLASSBERG et al. utilizaram eritrócitos, células endoteliais e fibroblastos para estudar a viabilidade celular e incorporação de timidina e leucina tritiada após a irradiação com um diodo laser operando em 577 nm. Nos cultivos de células endoteliais ambas incorporações foram inibidas quando utilizaram fluências variando de 5 a 12 J/cm². Nos cultivos de fibroblastos, foi preciso fluência acima de 12 J/cm² para a inibição da síntese de proteínas. As fluências de 5 a 8,5 J/cm² não afetaram a viabilidade celular. Ao colocar eritrócitos em cultivo não foram observadas alterações significativas nas células endoteliais. Concluíram que esse comprimento de onda foi mais absorvido pelos eritrócitos presentes em cultivo.

Em 1988, HALLMAN et al. fizeram um estudo com laser de He-Ne para verificar a proliferação celular de fibroblastos humanos em cultivo. Irradiaram essas células em diferentes passagens: entre a terceira e quarta e entre a décima terceira e décima quarta. Não observaram nenhum efeito significativo estimulativo ou inibitório do laser.

Em 1989, COLVER et al. obtiveram resultados negativos ao estudar os efeitos proliferativos, síntese de colágeno, migração e síntese de glicosaminoglicans em fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, utilizando um laser de He-Ne.

Em 1989, POURREAU-SCHNEIDER et al. estudaram a proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana irradiados com um laser de He-Ne. Após uma ou duas irradiações, não observaram um aumento significativo no número de células, porém a partir da terceira irradiação houve um aumento estatisticamente significativo. Observaram ultra-estruturalmente: hipertrofia e hiperplasia mitocondrial com microfilamentos próximos à membrana plasmática e abundância de matriz fibrilar nas regiões pericelulares. Em 1990, a mesma equipe (POURREAU-SCHNEIDER et al.) fizeram um estudo *in vitro* com fibroblastos de linhagem primária e um estudo *in vivo*, irradiando feridas pós-cirúrgicas de dentes com indicação de exodontia. Os autores demonstraram que o laser de He-Ne ativou a transformação de fibroblastos de gengiva humana em miofibroblastos. Concluíram que a indução de um fenótipo com propriedades contráteis deveria influenciar clinicamente na aceleração do processo de cicatrização.

Em 1990, WIEGAND-STEUBING et al. estudaram a incorporação de timidina tritiada em linhagem de células HeLa irradiadas com diodos lasers operando em três diferentes comprimentos de onda: 405, 633 e 675 nm. Também estudaram a produção de TNF em linha de monócitos. Não observaram alterações significativas nos grupos irradiados em relação aos grupos controle não irradiados. Embora outros autores como KARU et al., em 1996, tenham utilizado essas mesmas células para verificação de parâmetros ideais de irradiação, obtendo bons resultados. Os autores utilizaram lâmpadas filtradas monocromáticas operando entre 580 e 860 nm e um laser de He-Ne, com fluência de 100 J/cm^2 . Observaram que a adesão célula-célula e célula-frasco foi estimulada pelo laser de He-Ne, fato que não ocorreu com os grupos irradiados com as lâmpadas filtradas monocromáticas.

Em 1990, LABBE et al. estudaram a incorporação de hidroxiprolina tritiada em linhagem de fibroblastos irradiados com um diodo laser de As-Ga-Al, tendo obtido aumento na absorção de hidroxiprolina tritiada nas culturas irradiadas.

Em 1992, VAN BREUGEL e BÄR estudaram a ação do laser de He-Ne sobre fibroblastos humanos em cultura. Os resultados mostraram que com irradiância abaixo de $2,9 \text{ mW/cm}^2$ houve aumento na replicação celular enquanto que com $5,9 \text{ mW/cm}^2$ não se produziram efeitos. Os autores afirmaram que, quando se buscava um efeito foto-

biomodulador, a irradiância e o tempo de exposição a que submeteram essas células foi mais importante que a fluência total. Também observaram que a produção de colágeno do tipo I foi proporcional à proliferação celular.

Em 1992, NOBLE et al. estudaram a migração de fibroblastos embrionários em uma matriz de colágeno polimerizado. Observaram que os fibroblastos realizaram mais paradas e de maior duração, nas matrizes irradiadas e portanto, sua velocidade de deslocamento foi menor. As matrizes irradiadas apresentaram maior retração. Os autores concluíram que a turgidez do gel de colágeno poderia produzir um aumento do espalhamento (*scattering*) do laser, com conseqüente diminuição de sua transmissão e absorção, devido a fenômenos como a vibração do gel que poderia haver detido o avanço dos fibroblastos.

Em 1992, HEIN et al. estudaram os efeitos do laser de He-Ne e de Kriptônio ($\lambda = 647 \text{ nm}$) na síntese de colágeno e na atividade quimiotática de fibroblastos. Utilizaram fluências de 0,05 a 32 J/cm^2 . Os autores não observaram resultados significativos entre os grupos irradiados com os dois tipos de laser em relação aos grupos controle não irradiados.

Em 1992a, LUBART et al. estudaram os efeitos de diodos lasers operando em diferentes comprimentos de onda: $\lambda = 360, 632, 780 \text{ nm}$ em linhagens de fibroblastos. Avaliaram o índice mitótico e a morfologia dessas células por meio de microscopia eletrônica de varredura. Observaram que o número de mitoses nos cultivos irradiados aumentou significativamente em relação aos controles quando foi utilizada fluência de até 15 J/cm^2 . Quando utilizada fluência de 60 J/cm^2 , o número de mitoses diminuiu. Em 1993, os mesmos autores (LUBART et al.) estudaram o efeito proliferativo do laser de baixa intensidade sobre cultura de fibroblastos. Os comprimentos de onda emitidos em 540 nm e entre 600 e 900nm produziram aumento significativo do número de mitoses. Os autores concluíram que esses efeitos dependeram do comprimento de onda bem como da fluência utilizada.

Em 1992, NARA et al. estudaram os efeitos de lasers emitindo em diferentes comprimentos de onda em fibroblastos de polpa dental humana. Trabalharam com um laser de He-Ne e dois diodos lasers emitindo na região do infravermelho próximo ($\lambda = 790 \text{ nm}$ e $\lambda = 830 \text{ nm}$). As fluências variaram de 0,05 a 2 J/cm^2 . Os autores verificaram que os grupos irradiados com laser de He-Ne com baixa fluência ($0,1 \text{ J/cm}^2$) mostraram

proliferação não significativa em relação aos controle não irradiados, e os grupos irradiados com os diodos lasers não apresentaram qualquer efeito estimulativo.

Em 1994, WEI YU et al. estudaram o efeito de um diodo laser operando em 660 nm na produção de bFGF em cultura de fibroblastos 3T3 (linhagem preestabelecida). Os autores trabalharam com duas diferentes fluências: $3,2 \text{ J/cm}^2$ e $2,1 \text{ J/cm}^2$. Verificaram que fibroblastos irradiados com menores fluências demonstraram aumento na proliferação celular e na produção de bFGF, enquanto que aqueles submetidos a fluências maiores, não demonstraram aumento na proliferação celular nem nos níveis de bFGF quando comparados aos do grupo controle não irradiados.

Em 1994, LOEVSCHELL e ARENHOLT-BINDSLEV, estudaram os efeitos de um diodo laser de comprimento de onda de 812 nm sobre fibroblastos de gengiva humana. Utilizaram no protocolo irradiância fixada em $4,5 \pm 0,5 \text{ mW/cm}^2$ para todos os grupos variando as fluências de 4,5 a 4500 mJ/cm^2 . Os autores controlaram a incorporação de timidina tritiada após incubação de 16 horas. A incorporação demonstrou-se aumentada em todos os grupos irradiados, sendo a incorporação máxima observada nos grupos irradiados com fluência de 450 mJ/cm^2 . Os autores concluíram que o laser aumentou a síntese de DNA das células irradiadas.

Em 1995, LUBART et al. foto-sensibilizaram fibroblastos e queratinócitos com derivados hematoporfíricos e posteriormente os irradiaram com diferentes diodos lasers ($\lambda = 540, 633, 660, 780, 940 \text{ nm}$). Observaram que com ou sem hematoporfirinas, os grupos irradiados demonstraram aumento significativo na proliferação celular. Nos grupos irradiados com comprimentos de onda emitidos na região do visível, com a presença de corante, o efeito foi muito maior em relação aos grupos irradiados com comprimentos de onda emitidos na região do infravermelho próximo. Os autores ainda observaram que os resultados obtidos com o laser de He-Ne (633 nm) foram dependentes da presença do pigmento exógeno, enquanto que não foram para o diodo laser de $\lambda = 940 \text{ nm}$.

Em 1996, RIGAU estudou o efeito de um laser de corante operando em 633 nm no comportamento e na morfologia de fibroblastos de linhagem primária em cultivo. Trabalhou com um aparelho com potência óptica de saída de 38mW, com fluência de 2 J/cm^2 e irradiância de 4 mW/cm^2 . A autora verificou que esse tipo de laser induziu vários efeitos biológicos nos fibroblastos dos grupos irradiados como: formação de colônias, movimento de quimiotaxia e quimiocinética.

Em 1996, SKINNER et al. estudaram a ação de um diodo laser de As-Ga sobre fibroblastos de embrião humano em cultivo. As fluências entre 0,1 e 1 J/cm² durante períodos entre um e quatro dias. A produção de procolágeno foi monitorada pela incorporação de hidroxiprolina tritiada e a replicação de DNA, por incorporação de timidina tritiada. Os autores verificaram que o máximo de aumento na produção de colágeno e na bioestimulação celular ocorreu após quatro aplicações com intervalos de 24 horas entre elas. Fluências de 0,09 a 0,52 J/cm² tiveram efeitos estimulativos mais significativos na função fibroblástica. Os autores concluíram que os efeitos clínicos do laser de As-Ga poderiam ser resultado do aumento do tecido conectivo de reparação.

Em 1997, POGREL et al. estudaram o efeito do diodo laser de As-Ga-Al em fibroblastos e queratinócitos em cultura. Os cultivos foram irradiados com fluências variadas e irradiâncias variando de 5 a 100 mW. Os autores avaliaram a proliferação celular por absorção espectrofotométrica, a adesão celular por microcolorimetria, e observaram a migração celular. Não houve diferenças significativas entre os grupos irradiados e controle para ambos tipos de células cultivadas.

Em 1997, LUBART et al. estudaram os efeitos do laser de He-Ne nas concentrações de Ca²⁺ em fibroblastos. Irradiaram cultivos com diferentes fluências (1, 3 e 5 J/cm²) e observaram que com fluências apropriadas para aumentar a proliferação celular, houve produção transitória aumentada na concentração intracelular de cálcio nas células alvos. Os autores concluíram que essas observações poderiam inclusive explicar a foto-bioestimulação em importantes processos biológicos como a proliferação celular e a exocitose. Essa mesma autora, trabalhando com diferentes equipes, já havia anotado essa observação em um estudo que havia feito em 1992b (LUBART) com células de esperma de boi. Os autores irradiaram essas células com um laser de He-Ne e com um diodo laser operando em 780 nm, utilizando diferentes fluências, e observaram que o transporte de Ca²⁺ nas células irradiadas foi acelerado, o que significou que a radiação laser estimulou mudanças de Ca²⁺ através da membrana celular. Os autores concluíram que esse fato podia explicar as alterações transitórias na motilidade dessas células, e em outras, o fato de disparar a mitose. Em 1996, LUBART et al. avaliaram o papel da oscilação intracelular de cálcio na foto-bioestimulação, irradiando fibroblastos e queratinócitos com diodos lasers operando em diferentes comprimentos de onda, sendo alguns emitidos na região do visível (540 nm e 630 nm) e outros na região do infravermelho próximo (780 nm e 940 nm). Observaram que quando utilizaram baixa fluência houve um aumento significativo da proliferação celular em todos os grupos

irradiados, porém apenas os grupos irradiados com laser de He-Ne e com diodo laser de $\lambda = 780 \text{ nm}$, tiveram alteração significativa na concentração de Ca^{2+} nos fibroblastos irradiados.

Em 1998, WEBB et al. estudaram os efeitos de um diodo laser operando em 660 nm sobre duas linhagens primárias de fibroblastos humanos, uma originada de tecido normal e outra de cicatriz hipertrófica. Utilizaram fluências de 2,4 e 4 J/cm². Ambos os grupos tiveram um aumento significativo na proliferação celular em relação aos controles não irradiados.

Em 1998b, ALMEIDA-LOPES et al. fizeram um estudo piloto em fibroblastos de gengiva humana onde utilizaram dois diferentes diodos lasers operando em 635 nm e 780 nm. Irradiaram os fibroblastos previamente divididos em grupos com diferentes concentrações de soro fetal bovino. Os autores observaram que houve proliferação significativa para os fibroblastos cultivados em meio com déficit nutricional e irradiados quando comparados com os grupos controle cultivados com o mesmo meio e não irradiados. Não houve diferença significativa para os grupos irradiados e controle que foram cultivados em condição nutricional ideal. Não houve diferença significativa nos resultados obtidos para os diferentes comprimentos de onda.

Em 2001, AL-WATBAN e ANDRÉS estudaram a ação do laser de He-Ne em associação com Solcoseryl sobre fibroblastos de pele humana, cultivados em 5% de SFB. Fizeram vários grupos de trabalho, variando a fluência entre 60 mJ/cm² e 600 mJ/cm² e a concentração da droga, de 6 a 12 µg/ml da droga. Fluências até 360 mJ/cm² apresentaram efeito de bioestimulação nas células, fluências entre 360 mJ/cm² e 540 mJ/cm² não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controle, fluência de 600 mJ/cm² apresentou efeito inibitório em relação ao grupo controle. Os melhores resultados foram para os grupos onde utilizaram fluência de 180mJ/cm² e 12 µg/ml de Solcoseryl.

Em 2001, ALMEIDA-LOPES et al. fizeram um estudo em fibroblastos de gengiva humana onde utilizaram dois diferentes diodos lasers, um emitindo no espectro visível e outro no infravermelho próximo. Cultivaram os fibroblastos previamente divididos em grupos com diferentes concentrações de soro fetal bovino. Observaram que houve proliferação significativa para os fibroblastos cultivados em meio com déficit nutricional e irradiados quando comparados com os grupos controle cultivados com o mesmo meio e não irradiados.

Nos grupos irradiados, os melhores resultados foram obtidos nos grupos irradiados com o laser visível, com parâmetros idênticos de irradiação. Também houve diferença significativa entre os grupos irradiados quando se utilizou mesma fluência, porém irradiância diferente.

“Faça as coisas o mais simples que você puder,
porém não as mais simples”

Einstein

3. Proposição

3. Proposição

Na literatura encontramos vários trabalhos que demonstram que, em condições de homeostase (normalidade tecidual), não se observa nenhum efeito após a irradiação de laser nesses tecidos, porém, esse efeito é freqüentemente observado quando o tecido está submetido à alguma condição de estresse.

Na literatura compulsada parece haver controvérsia com relação aos parâmetros de aplicação do laser em seu uso clínico freqüente. Há grande variação de parâmetros, tais como: comprimento de onda, fluência, irradiância, tempo de aplicação, quantidade e freqüência dessas aplicações.

Sabemos também que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos em mesmas condições. Apesar disso, a maioria dos trabalhos *in vitro* utilizaram fibroblastos obtidos à partir de amostras de pele humana, ou de animais, pela praticidade de se trabalhar com fibroblastos de linhagens já estabelecidas, menos sensíveis a variações e que se podem adquirir no mercado. Linhagens celulares obtidas de cultivos primários são mais delicadas e exigem um certo tempo de trabalho e grande dedicação antes de poder-se começar o experimento propriamente dito. Por isso, poucos autores demonstraram a atividade de lasers de baixa intensidade sobre fibroblastos de mucosa humana.

O laser de baixa intensidade emitindo luz visível apresenta efeito bioestimulador sobre fibroblastos de gengiva humana em cultura.

O nosso objetivo é:

1. Trabalhar em um modelo que simule uma condição *in vitro* de estresse celular.
2. Verificar se a cor do meio influi na absorção do laser por parte do fibroblasto.
3. Verificar se o aumento de temperatura no tecido é suficiente para atribuímos a ativação tecidual a ele.
4. Verificar a dose ideal para estimulação da proliferação de fibroblastos *in vitro*.
5. Verificar se existe uma dose de saturação ou mesmo inibitória da proliferação de fibroblastos *in vitro* (entre 0 e 60 mW).
6. Verificar se a intensidade (irradiância) influi nos resultados obtidos na proliferação de fibroblastos *in vitro*.
7. Verificar se a exposição contínua ou seqüência temporal de aplicação influi nos resultados obtidos na proliferação de fibroblastos *in vitro*.

“OS HOMENS SE DISTINGUEM PELO QUE APARENTAM
E SE ASSEMELHAM PELO QUE ESCONDEM
OS ABISMOS SÃO MUITO PARECIDOS:
AS VEGETAÇÕES QUE OS COBREM É QUE SÃO DIFERENTES”

PAUL VALERY

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo Celular

4.1.1. Obtenção da Amostra

O material para o cultivo celular foi obtido de gengiva humana. Foi selecionada uma paciente de 24 anos, do sexo feminino, cuja anamnese revelou estado sistêmico normal. A paciente não relatou uso de qualquer tipo de medicamento sem qualquer tipo de enfermidade sistêmica. A paciente tinha indicação de extração do segundo pré-molar inferior direito, hígido, para tratamento ortodôntico interceptativo. Após a exodontia desse elemento dental, a paciente foi submetida a gengivoplastia com remoção de tecido gengival na altura cervical lingual. A cirurgia foi realizada sob anestesia troncular do nervo alveolar inferior, em condições de assepsia e anti-sepsia compatíveis a ambiente ambulatorial. Antes da realização da cirurgia, a paciente foi informada sobre o projeto e optou por participar do mesmo por livre e espontânea vontade, com consentimento informado (protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - FOUSP, sob o parecer nº 33/99; vide apêndice 1).

A amostra foi coletada, lavada em soro fisiológico por duas vezes, e colocada num frasco de transporte contendo meio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle* (DME)¹ em temperatura ambiente. Após duas horas nesse meio de transporte, a amostra foi processada no Laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

4.1.2. Cultivo Primário

Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos gengivais foram realizados sob capela de fluxo laminar², em temperatura ambiente entre 25 e 28° C.

¹ Sigma - Aldrich CO. Ltda. - Reino Unido

² VECO - Campinas, Brasil

A amostra coletada (que media 2,5 cm x 0,8 cm x 0,2 cm) foi processada em placas de Petri³ (de 60 mm de diâmetro) contendo meio DME. A amostra foi dividida em fragmentos diminutos (média de 0,1 mm² cada fragmento) com a ajuda de duas lâminas 11 de bisturi tipo *Bard-Paker*.

Os fragmentos foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e magnésio (PBSA)¹, com pH 7,2 e posteriormente por solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA para obter individualização celular. Novamente foram lavados com PBSA e o líquido existente na placa de Petri foi aspirado com pipeta tipo Pasteur. Acrescentou-se 2 ml de meio DME sobre os fragmentos. Eles foram semeados, distribuindo-se a suspensão celular em quatro frascos de cultivo de 25 cm² e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂, para favorecer sua adesão à superfície. Após esse tempo foi adicionado meio DME fresco, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica, cerca de 3 ml em cada frasco, o suficiente para recobrir esses fragmentos. Os frascos foram devidamente identificados, datados e levados à estufa de cultivo com as tampas semi-abertas, para entrar CO₂. Esses fragmentos de tecido que foram transplantados de seu sítio original (*explants*), foram mantidos a partir daí em meio artificial e foram incubados em incubadora com controle de temperatura e pressão (Forma Scientific)⁴ em ambiente úmido a 37°C, em fluxo de 95% de ar e 5% de CO₂.

Foram aguardadas 72 horas para a primeira observação dos *explants*. A monitoração do crescimento celular e de sua evolução foi feita a cada 24 horas utilizando-se microscópio de observação direta (Axiovert 25)⁵, para detecção precoce de qualquer anomalia que pudesse fazer com que eles tornassem-se inviáveis.

Após sete dias foi feita a primeira mudança de meio de cultivo dos frascos.

Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos *explants*, o meio de cultivo foi renovado a cada três dias. Para a troca de meio de cultivo todas as substâncias (meio DME, PBSA, solução de Tripsina e EDTA) utilizadas nesse procedimento foram previamente aquecidas em aparelho de Banho-Maria⁶ a 37°C por 15 minutos, antes de começar a manipulação das células. Após esse tempo, as substâncias e as células foram levadas ao fluxo laminar. Todo o meio foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com 2ml de PBSA e meio DME fresco foi colocado

³ Corning Costar Corporation Cambridge - Estados Unidos

⁴ Inc. - Ohio, Estados Unidos

⁵ Carl Zeiss - Alemanha

⁶ Indústria Fanen - São Paulo, Brasil

nos frascos. Foram utilizados frascos plásticos para cultivo de 25 cm² de área cultivável³, onde foram adicionados mais 3 ml de meio DME contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

O meio é uma solução composta de aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais, algumas vezes são suplementados por glicose e outros suplementos orgânicos (PAUL, 1975).

A qualidade do meio é de extrema importância, já que ele irá manter as células em condições nutricionais semelhantes àquelas que tinham quando estavam no organismo.

Sabemos que em cultura de fibroblastos, para que a divisão celular se realize em condições ótimas, é necessário que o meio de cultivo esteja em condições ideais de nutrição, isto é, o meio ideal para essas células é aquele que contenha 10% de soro fetal bovino (SFB), caso contrário essas células entrarão em estresse, e terão seu crescimento alterado de alguma forma. Por isso trabalhamos com meio DME contendo 10% de soro fetal bovino para o estabelecimento dessa linhagem primária.

Quando 70% do fundo do frasco estava coberto por células (a isso chamamos de subconfluência) essa cultura primária foi subcultivada (Fig. 4.1).

A subcultura, ou passagem de células de um frasco para outros, geralmente implica em subdivisão de uma população celular proliferativa capaz de perpetuação através de estabelecimento de uma linhagem celular. O número de passagem significa o número de vezes que uma cultura foi subcultivada.

A primeira subcultura foi feita no vigésimo dia após a semeadura (esse procedimento denomina-se “plaqueamento”) dos *explants*. Nessa fase, a expansão de células epiteliais estabilizou-se enquanto que os fibroblastos colonizaram progressivamente toda a superfície dos frascos, formando uma monocamada celular subconfluente. Para a subcultura os fibroblastos foram suspensos pelo uso de solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA¹. Dessa forma realizou-se a separação dos

fibroblastos dos *explants*, já que os *explants* com as células epiteliais permaneciam mais tempo aderidos ao fundo dos frascos. Assim obteve-se a primeira passagem do cultivo primário de fibroblastos e nesse momento, essa cultura primária deu origem a uma linhagem celular. A partir daí foi estabelecida a linhagem celular denominada de LMF (iniciais da paciente) (ALMEIDA-LOPES, 1999).

Figura 4.1: Frasco de cultivo com 25 cm² de área cultivável contendo as células em meio DME. A coloração alaranjada do meio de cultura demonstra a alteração do pH de 7,2 a 7,4 (pelo vermelho de fenol).

4.1.3. Linhagem Celular

As células passaram a crescer. A mudança de meio de cultivo deu-se entre dois e quatro dias.

A confluência dos cultivos celulares foi verificada em microscópio de observação direta, quando se observou que a superfície do frasco estava recoberta de

uma monocamada contínua de células. A confluência modula a atividade mitótica das células. As células em cultivo sofrem um fenômeno que se conhece por inibição de contato, pois quando uma célula contata ao seu redor com outras células e forma-se uma monocamada, inibe-se o processo mitótico (ALBERTS et al., 1989).

Para perpetuação dessa linhagem celular, essas células foram lavadas duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato pela ação de solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA, durante 1 minuto a 37°C (tripsinização). O conteúdo de cada frasco foi removido, colocado em tubo de ensaio³ e centrifugado a 300g durante cinco minutos à temperatura ambiente em centrífuga (Excelsa Baby, modelo 206)⁶. O sobrenadante dos tubos foi descartado e as células que formavam o precipitado no fundo do tubo de ensaio foram ressuspensas com 4ml de meio fresco (meio DME, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica). Em cada novo frasco foi depositado 1 ml dessa suspensão de células e acrescentado 3 ml de meio DME fresco. Esse procedimento indicou uma nova passagem celular.

Na 6ª passagem amostras das células LMF foram congeladas para estocagem.

4.1.4. Congelamento e Descongelamento Celular

Para o congelamento foi utilizado o método de tripsina EDTA que consiste em reproduzir os mesmos passos descritos para subcultura, com a variação de que, quando da ressuspensão, ao invés de depositá-la no frasco convencional para crescimento, cada 1 ml de suspensão celular foi colocado em um *cryovial* ou cápsula criogênica¹, previamente identificado e datado.

Depois que as cápsulas criogênicas estavam todas completas, foi acrescentado 100 µl de substância crioprotetora di-metil-sulfóxido (DMSO)¹, rapidamente fechadas e colocadas no gelo. Sua temperatura foi diminuída lentamente (a -20°C por 30 minutos, depois em freezer a -70°C *overnight*), até seu congelamento total. Então as células foram armazenadas em freezer de nitrogênio a -170°C.

Cada vez que se ia começar um novo experimento, parte das células estocadas era descongelada.

Para o descongelamento, uma cápsula criogênica contendo células foi descongelada rapidamente em banho-maria a 37°C, agitando-a por 60 segundos. Para desativar a substância crioprotetora (DMSO), o conteúdo do *cryovail* foi transferido rapidamente para um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo e centrifugado a

300g durante cinco minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi ressuspendido em 1 ml de meio DME fresco e transferido para um frasco de plástico de 25 cm² previamente identificado. Foi acrescentado 5 ml de meio DME, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em estufa de cultivo e monitoradas até que se observou seu crescimento utilizando-se microscópio invertido de fase.

4.1.5. Contagem Celular

Antes de começar os experimentos foi necessário fazer a determinação do número de células existentes no frasco original. A finalidade dessa determinação era conhecer o número de células existentes em cada tubo para poder fazer-se a semeadura nas placas de experimento com números exatos de células nas placas, padronizando dessa forma os experimentos, da maneira mais precisa possível.

Para a determinação do número de células existentes nos frascos originais (Contagem Celular), as células foram lavadas duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato utilizando solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA. O conteúdo de cada frasco foi removido, colocado em tubo de ensaio e centrifugado. O sobrenadante dos tubos foi descartado e os precipitados foram ressuspendidos em 1 ml de PBSA e 0,1 ml dessa suspensão celular foi dispensada em um tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de Azul de Trypan¹ a 0,4%. Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada em cada lado da Câmara de Neubauer, que foi levada ao microscópio invertido de fase para realização da contagem do número de células. As células coradas em azul representavam as células mortas, enquanto que as células que não estavam coradas representavam as células viáveis. Foram contados 25 quadrados na parte superior e 25 na parte inferior, perfazendo um total de 50 quadrados contados. O cálculo de contagem foi obtido pela fórmula onde o número total de células contadas (mortas e viáveis) foi multiplicado pela diluição (nesse caso de 10, já que usamos 100 µl de uma suspensão celular de 1000 µl) e multiplicado por 10⁴ (pelo volume contado que é 0,1 mm³ ou 10⁴ ml). Esse valor foi dividido pelo número de

quadrados contados (50). A partir dessa fórmula então obtivemos a quantidade de células presentes em cada frasco.

O número total de células presentes no frasco foi obtido através da equação 4.1.

Equação 4.1:

$$\text{Nº de células} = \frac{\text{Nº total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{Nº de quadrados usados para contagem}}$$

A suspensão restante (0,9 ml) foi centrifugada, o sobrenadante aspirado, e o precipitado ressuspendido em 1 ml de meio DME fresco. De acordo com a quantidade de células existentes, foi adicionado meio DME suficiente a essa suspensão para obter-se $1,8 \times 10^4$ células em cada 100 µl. Essa nova suspensão de células foi novamente subcultivada em placas de 35 x 10 mm (figura 4.2) onde as células aderiram e cresceram. Para a manutenção da viabilidade das células a troca dos meios de cultivo das placas foi feita a cada dois ou três dias. Aguardamos 24 horas após o plaqueamento para começarmos os experimentos.

Figura 4.2: Placas de cultivo com 35 x 10 mm de área cultivável contendo as células que foram semeadas e divididas em três grupos e nove subgrupos. Em cada contagem três placas de cada subgrupo foram tomadas aleatoriamente e a contagem foi feita em triplicata.

4.2. Parte Instrumental: Laser Utilizado

Foi utilizado um único aparelho de laser operando em baixa intensidade de energia (figura 4.3), confeccionado especialmente para este trabalho (SUPINO, 2002). A ponteira utilizada possuía um diodo emitindo radiação no visível, com comprimento de onda de 664 nm, potência óptica útil máxima de 56 mW, área transversal do feixe na posição focal foi fixada em 8,97 cm² e com ângulo de divergência de 34,19° (figura 4.4). Nas figuras 4.5.a e 4.5.b podemos observar o perfil de emissão do feixe de laser ilustrado de duas maneiras diferentes, tridimensionalmente.

- **Laser 1 (L1) - Diodo Laser Visível**

$\lambda = 664 \text{ nm}$, $P = 56 \text{ mW}$, CW, área transversal do feixe na posição focal = 8,97 cm².

- **Laser 2 (L2) - Diodo Laser Visível**

$\lambda = 664 \text{ nm}$, $P = 28 \text{ mW}$, CW, área transversal do feixe na posição focal = $8,97 \text{ cm}^2$.

- **Laser 3 (L3) - Diodo Laser Visível**

$\lambda = 664 \text{ nm}$, $P = 56 \text{ mW}$, chaveado, área transversal do feixe na posição focal = $8,97 \text{ cm}^2$.

Figura 4.3: Fotografia do aparelho confeccionado para o experimento.

Figura 4.4: Esquema didático ilustrando o ângulo de divergência do laser, bem como seu *spot* (área transversal do feixe na posição focal).

Figura 4.5.a: Perfil de emissão do feixe de laser ilustrado tridimensionalmente (gráfico do tipo *Scatter*).

Figura 4.5.b: Perfil de emissão do feixe de laser ilustrado tridimensionalmente (gráfico do tipo *Trajectory*).

4.3. Experimentos Preliminares

4.3.1. Espectroscopia

Com a finalidade de obter o perfil de absorção do meio e da placa utilizados nos experimentos, fizemos um ensaio de espectroscopia. Esse ensaio consiste na emissão e detecção de múltiplos comprimentos de onda passando através da placa e meio isoladamente de modo a verificar especificamente qual a magnitude da interferência atenuadora desses elementos em função do comprimento de onda do laser utilizado (664 nm).

Para esse ensaio foi utilizado um espectrômetro (modelo Cary-17)¹, regulado para fazer a varredura entre os comprimentos de onda variando entre 400 nm e 1100 nm. Primeiro foi feito a espectroscopia da placa de cultivo (amostra 1) e depois da placa de cultivo + meio (amostra 2).

4.3.2. Experimentos de Análise Térmica

Para verificar se existia variação de temperatura na placa, induzida pelo laser de 664 nm, medimos a temperatura da mesma através de um termistor de alta precisão (Modelo 120-202 EAJ)². Este tipo de dispositivo apresentava uma variação de sua resistência com a temperatura, dessa forma, pela medida da tensão no termistor, e posterior calibração, pudemos determinar o aquecimento induzido pelo laser.

Além do termistor foram utilizados um variador de tensão (STP)³ e um termômetro.

Primeiramente foi feita a calibração do termistor em três temperaturas (20°C, 30°C e 40°C).

A partir da leitura da tensão elétrica do termistor pudemos, através de uma curva de calibração, determinar as variações de temperatura (mapeamento térmico) ocorridas durante a irradiação com laser.

⁷ Olis – Estados Unidos

⁸ Fenwal Electronic MA

³ Sociedade Técnica Paulista Ltda. – São Paulo, Brasil

4.3.2.1. Mapeamento Térmico *in vitro*

Foi utilizado o laser L1.

Para tanto introduzimos e fixamos a ponta do termistor dentro da placa contendo meio de cultivo celular. A ponteira do laser foi fixada paralelamente ao termistor, e o mesmo foi aplicado dessa forma. Foi feita uma irradiação durante 1 minuto. Após espera de 5 minutos, foi feita nova irradiação durante 2 minutos.

4.4. Grupos Experimentais

Para todos os experimentos foi utilizada a linhagem LMF.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar, e as células foram incubadas em estufa de cultivo a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

O meio de cultivo utilizado foi meio DME, porém a quantidade de soro fetal bovino variava. Para lavagem das células foi usada a solução tampão de PBSA, pH 7,2 e para seu levantamento foi utilizada solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA.

Para os experimentos foi montado um sistema de irradiação onde o sistema ponteira laser e placa estivesse fixo. A ponteira do aparelho foi colocada junto à placa que recebeu a irradiação de baixo para cima, diretamente sobre a monocamada celular, num ponto único preestabelecido quando da fixação da ponteira no sistema, situado a 1 cm² da parte inferior da placa. Dessa forma, as aplicações foram feitas do lado de fora da placa, sem necessidade de abrir as tampas das mesmas para receberem a irradiação, diminuindo assim os riscos de contaminação das células.

O aparelho laser foi colocado fora do fluxo laminar, mas sua ponteira foi colocada ali dentro, previamente esterilizada em autoclave. Todas as placas foram colocadas dentro do fluxo laminar ao mesmo tempo, inclusive as placas controle, e assim permaneceram até que a última placa do último grupo foi irradiada. Assim sendo, todas as placas foram submetidas às mesmas condições de estresse. Quando chegou o momento da irradiação, as placas foram colocadas uma a uma no sistema e receberam sua irradiação correspondente. As figuras 4.6 e 4.7 ilustram esse esquema de aplicação.

As irradiações foram feitas sempre da mesma forma, variando apenas o tempo de aplicação, em função da dose e da irradiância, segundo o experimento. A dose recebida no centro de cada placa foi previamente fixada em cada placa. A técnica de irradiação utilizada nos experimentos foi a técnica puntual, ou seja, a irradiação foi feita em um único ponto, sempre no centro da placa, com o laser distante 1 cm da saída da ponteira. Na figura 4.8 podemos ver que a irradiação foi feita em um único ponto, sempre no centro da placa, e na figura 4.9 podemos observar um desenho didático ilustrando que a sonda do laser estava distante 1 cm da saída da ponteira.

Para os grupos controle seguiram-se os mesmos processos de manipulação, simulando-se receber irradiação de laser, permanecendo fora da estufa de cultivo, com conseqüente variação de temperatura, e em obscuridade parcial, sempre nas mesmas condições que os grupos irradiados. Na figura 4.10 observamos o esquema de irradiação dentro do fluxo laminar.

Figura 4.6: Detalhe do esquema de aplicação dentro do fluxo laminar.

Figura 4.7: A caixa contendo as placas serviu para garantir condição de obscuridade parcial.

Figura 4.8: A irradiação foi feita em um único ponto, sempre no centro da placa.

Figura 4.9: A placa estava distante 1 cm da saída da sonda do laser.

Figura 4.10: Esquema de aplicação montado dentro do fluxo laminar em condições de esterilidade. Todas as placas, incluindo os grupos controle, foram submetidas às mesmas condições. Os grupos controle permaneceram o mesmo tempo que os demais fora da estufa.

Experimento 1

Entre a 4ª e a 7ª passagem as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio DME com 5% de soro fetal bovino e semeadas em placas (plaqueamento) de 35 x 10 mm. A concentração celular para o seguinte plaqueamento foi de $1,7 \times 10^3$ células/placa. As placas foram posteriormente preenchidas com 2 ml de meio DME + 5% de soro fetal bovino.

A primeira irradiação realizou-se em campo escuro, 12 horas após o plaqueamento, quando havia confluência de 30% na maioria das placas, e posteriormente a cada 12 horas num total de quatro sessões com dose fixa por sessão. Foi utilizado um único diodo laser (L1), e os grupos foram divididos segundo a dose aplicada, dividindo assim o experimento em quatro grupos:

Utilizou-se um total de 36 placas divididas aleatoriamente em quatro grupos de 9 placas, a saber:

Grupo A: 2 J/cm^2

Grupo B: 5 J/cm^2

Grupo C: 10 J/cm^2

Grupo C: 15 J/cm^2

Foi utilizado o laser L1 nos parâmetros demonstrados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Parâmetros de irradiação de L1:

Fluência /sessão (J/cm^2)	2	5	10	15
Área de irradiação (cm^2)	8,97	8,97	8,97	8,97
Tempo da irradiação/sessão (s)	36	90	180	270
Tipo de emissão	CW	CW	CW	CW
Potência óptica útil (mW)	56	56	56	56

A contagem celular, em triplicata, realizou-se às 48, 96 e 144 horas após a 1ª irradiação. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente.

Experimento 2

Entre a 4^a e a 7^a passagem as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio DME com 5% de soro fetal bovino e semeadas em placas (plaqueamento) de 35 x 10 mm. A concentração celular para o seguinte plaqueamento foi de $1,7 \times 10^3$ células/placa. As placas foram posteriormente preenchidas com 2 ml de meio DME + 5% de soro fetal bovino.

A primeira irradiação realizou-se em campo escuro, 12 horas após o plaqueamento, quando havia confluência de 30% na maioria das placas, e posteriormente a cada 12 horas num total de quatro sessões com dose fixa por sessão. Foi utilizado o diodo laser L2 calibrado com potência útil reduzida pela metade (28 mW). Foi fixada uma única dose (2 J/cm^2) e variou-se o tempo de exposição do laser. Os grupos foram divididos segundo a potência utilizada, dividindo assim o experimento em dois grupos:

Utilizou-se um total de 18 placas divididas aleatoriamente em dois grupos de 9 placas, a saber:

Grupo A: 56 mW

Grupo B: 28 mW

Foi utilizado o laser L2 nos parâmetros demonstrados na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros de irradiação de L2:

Fluência /sessão (J/cm^2)	2	2
Área de irradiação (cm^2)	8,97	8,97
Tempo da irradiação/sessão (s)	72	36
Tipo de emissão	CW	CW
Potência óptica útil (mW)	28	56

A contagem celular, em triplicata, realizou-se às 48, 96 e 144 horas após a 1^a irradiação. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente.

Experimento 3

Entre a 4ª e a 7ª passagem as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio DME com 5% de soro fetal bovino e semeadas em placas (plaqueamento) de 35 x 10 mm. A concentração celular para o seguinte plaqueamento foi de $1,7 \times 10^3$ células/placa. As placas foram posteriormente preenchidas com 2 ml de meio DME + 5% de soro fetal bovino.

A primeira irradiação realizou-se em campo escuro, 12 horas após o plaqueamento, quando havia confluência de 30% na maioria das placas, e posteriormente a cada 12 horas num total de quatro sessões com dose fixa por sessão. Foi utilizado o diodo laser L3, e os grupos foram divididos segundo a dose aplicada, dividindo assim o experimento em quatro grupos:

Utilizou-se um total de 36 placas divididas aleatoriamente em quatro grupos de 9 placas, a saber:

Grupo A: 10 Hz

Grupo B: 60 Hz

Grupo C: 120 Hz

Grupo D: 180 Hz

Foi utilizado o laser L3 nos parâmetros demonstrados na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Parâmetros de irradiação de L3:

Fluência /sessão (J/cm^2)	2	2	2	2
Área de irradiação (cm^2)	8,97	8,97	8,97	8,97
Tempo da irradiação/sessão (s)	72	72	72	72
Frequência (Hz)	2	5	10	15
Potência óptica útil (mW)	56	56	56	56

A contagem celular, em triplicata, realizou-se às 48, 96 e 144 horas após a 1ª irradiação. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente.

4.4.1. Curvas de Crescimento e de Viabilidade Celular

A contagem celular foi realizada para a obtenção de curvas de crescimento e de viabilidade celular, com finalidade de análise do efeito do laser sobre os fibroblastos.

Para o levantamento das células, as placas de cultivo foram lavadas duas vezes com PBSA e submetidas a tripsinização individualmente. O conteúdo de cada frasco foi removido, colocado em tubo de ensaio e centrifugado. O sobrenadante dos tubos foi aspirado e os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBSA e 0,1 ml dessa suspensão celular foi dispensada em um tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de Azul de Trypan a 0,4%¹. Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada em cada lado da Câmara de Neubauer (figura 4.11), que foi levada ao microscópio invertido de fase para realização da contagem do número de células. Esse procedimento repetiu-se para cada placa estudada.

O número total de células foi registrado segundo a equação 4.1.

A exclusão das células coradas de azul, células mortas, da contagem geral serviu para a determinação do número de células viáveis (equação 4.2) e da porcentagem de viabilidade celular (equação 4.3).

Equação 4.2:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células viáveis} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas (não coradas)} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados usados para contagem}}$$

O percentual de viabilidade da população celular foi obtido pela equação 4.3, segundo FRESHNEY, 2000:

Equação 4.3:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células viáveis} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células}}$$

As suspensões celulares restantes (0,9 ml de cada placa contada) não utilizadas na contagem foram descartadas com jato de líquido de Dakin.

Figura 4.11: Fotografia da Câmara de Neubauer utilizada para contagem de células.

4.4.2. Metodologia Estatística

Na avaliação dos resultados deste trabalho empregou-se o procedimento estatístico da análise de variância de um fator. Em cada tempo (dias 2, 4 e 6 após a irradiação) foram comparadas médias de células viáveis dos grupos em estudo. Quando necessário, a análise de variância foi complementada pelo teste de TUKEY (SNEDECOR & COCHRAN, 1967). Por este teste são realizadas comparações múltiplas das médias duas a duas.

Essas análises foram realizadas ao nível de 5% de significância.

Comprovou-se que, considerando-se um determinado dia, os erros do modelo estatístico adotado na análise têm distribuição aproximadamente normal com média zero e variâncias equivalentes em relação aos grupos. Esses erros são estimados pela diferença entre cada contagem e a média do grupo a que pertencem.

Quando se consideram as contagens de células de um mesmo grupo, mas em dias diferentes, pelo menos as variabilidades das medidas são diferentes. Entretanto, ficou evidente, tanto pela observação direta dos dados como graficamente, que as médias de células aumentaram neste período. Para avaliar aproximadamente a taxa de aumento diário da média de células com o passar do tempo, foram construídas retas de regressão pelo método dos mínimos quadrados. A conveniência deste procedimento foi julgada pelo coeficiente de correlação linear de Pearson.

“Quando se elimina o impossível,
o que sobra, por improvável que seja,
Deve ser a verdade”

Arthur Conan Doyle

5. Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1. Linhagem LMF

Observamos que a reparação tecidual envolve mecanismos complexos que abrangem eventos locais e sistêmicos; mecânicos, químicos e bioquímicos; onde interferem vários fatores. Esse processo é complexo e envolve atividade local e sistêmica do organismo, sendo os fibroblastos uma das células diretamente envolvidas nesse processo. O laser de baixa intensidade, portanto, têm diferentes ações segundo o momento da reparação e o tipo de paciente em que o estamos utilizando como terapia. Para analisarmos seus efeitos planejamos isolar parcialmente esses eventos.

Sabemos ainda que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos nas mesmas condições. Apesar disso, a maioria dos trabalhos *in vitro* utilizam fibroblastos obtidos a partir de amostras de pele humana, ou de animais, pela praticidade de se trabalhar com fibroblastos de linhagens já estabelecidas. Por isso, poucos autores demonstram a atividade dos lasers de baixa intensidade sobre fibroblastos de mucosa humana, sobretudo em linhagem primária.

Foi desenvolvida a linhagem celular LMF, fibroblastos originados de gengiva humana (ALMEIDA-LOPES, 1999).

A monitoração do crescimento foi feita macroscopicamente observando se havia alteração na coloração e viscosidade do meio de cultivo. A cor do meio, a cada quatro dias tornava-se mais amarelada, significando alto metabolismo celular como consequência do consumo de nutrientes do meio. A troca de meio foi feita em média a cada quatro dias.

Também foi feita monitoração por meio de microscópio de observação direta a cada dois dias de forma rotineira, e observou-se que os cultivos alcançavam 100% de confluência a cada sete dias. O crescimento dos cultivos foi uniforme e não foi verificado nenhum tipo de irregularidade nem contaminação (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Média da contagem celular para os diferentes grupos controles.

Nº células x 10 ³ ± erro da média				
GRUPO	SFB	2 dias	4 dias	6 dias
A	0%	2,7 ± 0,7	0,3 ± 0,3	0 ± 0
B	5%	4,0 ± 1,0	31,0 ± 7,7	35,3 ± 6,3
C	10%	12,7 ± 1,3	21,7 ± 3,0	75,7 ± 6,8

Tabela 5.2: Diferença entre médias do número de células viáveis (x 10³) obtidas nos dias dois, quatro e seis que não receberam irradiação, pelo teste de KRUSKAL-WALLIS.

		2 dias		4 dias		6 dias	
<i>Figura</i>	Período Grupo	Diferença entre médias	p ≤ 0,05	Diferença entre médias	p ≤ 0,05	Diferença entre médias	p ≤ 0,05
Fig. 5.1	A x B	1,3333	NS	18,3333	S	16,5000	S
	A x C	5,5000	S	15,8333	S	23,0000	S
	B x C	4,1667	S	2,5000	NS	6,5000	S

S = estatisticamente significativa

NS = não significativa

A figura 5.1 apresenta as curvas de crescimento de células LMF cultivadas em meio DME com diferentes concentrações de soro fetal bovino e que não receberam radiação (Grupos controles A1, B1 e C1). Nos grupos com SBF a 5%, a diminuição da concentração reduziu significativamente o crescimento celular a partir do quarto dia ($p = 5\%$). Nos grupos com SBF a 0%, a falta de nutrientes levou à morte celular a partir do 2º dia ($p = 5\%$).

Figura 5.1: Crescimento celular das células LMF em meio DME com diferentes concentrações de soro fetal bovino.

Como modelo de estudo foi usado a linhagem primária de fibroblastos de gengiva humana LMF. A morfologia das células obtidas a partir de fragmentos de gengiva foi similar a do fibroblasto, apresentando-se como células fusiformes ou estreladas conforme se observa na figura 5.2.

Figura 5.2: Microscopia de contraste de fase onde podemos observar o aspecto de um cultivo controle em meio DME com 10% de soro fetal bovino. Células estão dispersas em pequeno número. Células em divisão são observadas (x 100).

A figura 5.3 apresenta a morfologia e distribuição de células LMF nos grupos irradiados após 96 horas, depois da primeira irradiação. A figura 5.4 apresenta células com tendência à formação de feixes paralelos.

Figura 5.3: Grupo com DME e 5% de soro fetal bovino irradiado aos quatro dias apresentando várias células em divisão celular (x 100).

Figura 5.4: Grupo com DME e 10% de soro fetal bovino irradiado aos seis dias. Observa-se grande tendência à formação de feixes paralelos (x 100).

5.2. Experimentos Preliminares

5.2.1. Espectroscopia

Sabemos que o laser visível é absorvido por tecidos ricos em pigmento. O meio no qual as células foram cultivadas é avermelhado, devido à concentração de fenolftaleína. Tínhamos dúvida se o meio utilizado no cultivo celular era responsável, em alguma medida, pela absorção do laser, e portanto as células per si, poderiam não absorver o laser de maneira adequada. Parte da absorção poderia ainda ocorrer por parte do plástico constituinte da placa utilizada para o cultivo das células, ainda que o mesmo fosse transparente. Para responder às nossas preocupações, fizemos a espectroscopia da placa, e da placa e o meio de cultivo em conjunto, buscando obter o perfil de absorção do meio e da placa utilizados nos experimentos.

Na figura 5.5 podemos observar os pontos das curvas de absorção para a placa e para o meio + placa.

Figura 5.5: Curvas de absorção para a placa e para o meio + placa.

Observamos que há duas regiões de absorção, a primeira em 500 nm e a segunda em 930 nm. O primeiro é esperado, devido à cor do meio, o segundo pode ser devido à composição do plástico. No comprimento de onda que utilizamos (664 nm), obtivemos

que a transmitância foi diminuída em menos de 5%, o que não interferiu no resultado obtido.

5.2.2. Experimentos de Análise Térmica

Sabemos que os fibroblastos são susceptíveis a estimulação quando submetidos a um aumento de temperatura. Em experimentos anteriores havíamos constatado ação ativadora do laser na proliferação de fibroblastos. Poderia ser que o laser absorvido nas placas irradiadas gerasse calor, e parte do resultado que obtivéssemos fosse atribuído a um possível aumento de temperatura do meio. Dessa forma fizemos um experimento de análise térmica para verificação se a irradiação com laser não gerava calor no meio.

A partir da leitura da tensão elétrica do termistor (dada em *volts*), pudemos através de uma curva de calibração, determinar as variações de temperatura (dada em °C) ocorridas durante a irradiação com laser (Mapeamento Térmico).

Na figura 5.6 apresentamos os resultados da variação de temperatura induzida pela irradiação com o laser L1, por 1 minuto contínuo de exposição, em função do tempo (equivalendo à energia de 3.36 J/cm^2), expresso no gráfico em segundos.

Houve espera de 5 minutos e foi feita nova irradiação (figura 5.7). O laser foi aplicado durante 2 minutos (equivalendo à energia de 6.72 J/cm^2).

5.2.2.1. Mapeamento Térmico *in vitro*

Foi feita uma irradiação durante 1 minuto diretamente sobre a placa contendo meio de cultura celular. Houve um aumento de temperatura de $0,05^\circ \text{ C}$ (figura 5.6). Houve espera de 5 minutos e foi feita nova irradiação. O laser foi aplicado durante 2 minutos e durante esse tempo houve um acréscimo de temperatura na placa de $0,08^\circ \text{ C}$ (figura 5.7).

Não foram considerados importantes esses aumentos de temperatura no meio de cultura após irradiação com o laser L1, portanto não se atribuiu os efeitos obtidos em termos de proliferação celular nos experimentos a um possível efeito térmico do laser utilizado.

Não houve alteração entre os ciclos quando se esperou algum tempo entre um experimento e outro. O fato de ser cíclico mostrou que não houve alteração desse meio, ou seja, o meio de cultura foi preservado.

Figura 5.6: Curva de variação de temperatura para o laser L1, com 1 minuto de aplicação *in vitro*.

Figura 5.7: Curva de variação de temperatura para o laser L1, com 2 minutos de aplicação *in vitro*.

5.3. Grupos Experimentais (Experimentos com Células LMF)

Estabelecemos uma linhagem a partir de cultivo primário de fibroblastos de gengiva humana, denominada LMF. Para simular condição de estresse celular, propusemos um modelo no qual o cultivo estivesse privado parcialmente de nutrientes, ou seja, estivesse em meio DME com quantidade insatisfatória de fatores de crescimento. Observamos durante o crescimento do cultivo que, em condições ideais de nutrição (DME + 10% de SFB), a divisão celular realizou-se em condições ótimas; então nos grupos irradiados o efeito estimulativo dos lasers utilizados, com a fluência administrada, foi baixo e não significativo. Por outro lado, com os cultivos em condições insuficientes de nutrição (DME + 5% de SFB), a divisão celular ocorreu em condição de estresse, aqui demonstramos que a irradiação com laser produziu um efeito bioestimulativo. Na condição de extrema desnutrição (DME + 0% de SFB) era esperado óbito celular em 48 horas, porém isso aconteceu somente nos grupos controle.

Obtivemos uma linhagem celular através do método de dispersão enzimática de tecido gengival normal. As células cultivadas foram analisadas por meio de métodos morfológicos e funcionais e caracterizados como fibroblásticas diferenciadas, ou fibroblastos.

A formação da linhagem celular, denominada LMF, foi originada a partir de cultivo primário de fragmentos de gengiva humana normal e livre de enfermidade. Podemos afirmar que a linhagem foi obtida uma vez que houve um aumento do número total de células através de diversas gerações e a população celular predominante apresentou grau de uniformidade (FRESHNEY, 2000).

Os fibroblastos crescem e desenvolvem-se otimamente *in vitro* quando estão em condições ideais de temperatura, pressão e fatores nutricionais e de crescimento; o meio de cultivo ideal para fibroblastos é aquele cuja concentração de soro fetal bovino seja de 10% (PAUL, 1993). Tratamos então todos os grupos em condições ideais de temperatura, pressão e umidade e variamos a condição nutricional dos meios de quatro grupos de cultivos. Havia um grupo controle com meio DME com 10% de soro fetal bovino, que seria o grupo em condições ideais. Propusemos um modelo de estudo cujos cultivos estivessem com meio em deficiência nutricional, ou seja, baixa concentração de soro fetal bovino. Os grupos foram tratados com meio DME com 5% de soro fetal bovino, simulando uma condição de estresse. A diminuição da concentração de soro fetal bovino no meio diminuiu significativamente o crescimento celular. Nos grupos

sem soro fetal bovino o controle não apresentou crescimento significativo, por isso descartamos esse modelo de trabalho.

A utilização de meio com concentração de 5% de soro fetal bovino mostrou ser um modelo ideal para a análise da ação do laser de baixa intensidade, já que o crescimento celular diminui proporcionalmente à concentração de soro. A utilização de meio sem soro fetal bovino mostrou ser um modelo não ideal para análise da ação do laser de baixa intensidade, já que em 144 horas todos os cultivos morreram, controles e irradiados.

Tanto a luz visível como a infravermelha, aumentam a proliferação de células *in vitro*, bem como são utilizados em cicatrização de tecido mole *in vivo*. Escolhemos a visível como pressuposto inicial, já que previamente observamos melhores resultados em termos de proliferação celular para esse tipo de comprimento de onda (ALMEIDA-LOPES, 1999).

Na revisão da literatura verificamos claramente a necessidade de padronização de modelos e fixação de parâmetros de trabalho. Os efeitos do laser sobre a proliferação celular são extensamente pesquisados e amplamente conhecidos. Entretanto há controvérsias sobre a melhor potência de trabalho, bem como a fluência e irradiância ideais para se obter o resultado desejado, ou para a maximização desses resultados. Também não se conhece muito a respeito do número ideal de sessões de aplicação para as diferentes enfermidades assim como qual os diferentes parâmetros de tratamento que se deve utilizar durante a evolução de determinada doença. Existe ainda a possibilidade de que haja doses inibitórias, ainda que poucos trabalhos na literatura tenham conseguido provar esse efeito.

Baseados nessas premissas, fixamos um modelo de estudo e um único comprimento de onda (cujos resultados mais efetivos foram obtidos em nossas publicações prévias: ALMEIDA-LOPES et al. 1998b; ALMEIDA-LOPES, 1999; ALMEIDA-LOPES et al., 2001) e variamos apenas os seguintes parâmetros de irradiação: dose, irradiância e modo de emissão do laser.

5.3.1. Experimento 1

O propósito desse experimento foi de encontrar a dose ideal de trabalho para bioestimulação *in vitro*, e confirmar, ou não, a existência de doses inibitórias.

Fixamos a potência e variamos a dose de irradiação. A menor dose foi definida a partir de dados da literatura e a maior foi definida a partir daquilo que nos permitiu o modelo experimental. Utilizamos um laser de 664 nm, com potência óptica útil máxima de 56 mW, e área de irradiação de 8,97 cm². A dose máxima utilizada foi de 15 J/cm², para isso tivemos que irradiar cada placa por 4 min e 30 s. Como queríamos submeter todas as placas às mesmas condições de estresse, mantivemos todos os grupos fora da estufa, dentro do fluxo laminar. Como tínhamos 12 placas em cada grupo, as células ficaram fora da estufa perfazendo um total de 54 min. Foi o máximo de tempo que conseguimos manter as células fora da estufa, sem haver contaminação. Por ocasião do estudo piloto, havíamos trabalhado com doses de 20 J/cm², mas para tanto as células ficavam 72 min fora da estufa. Nas duas ocasiões em que executamos os experimentos tivemos contaminação e atribuímos isso ao fato das células ficarem muito tempo fora da estufa. Assim, definimos nossas doses máximas a partir do tempo máximo de exposição celular, sem comprometimento de sua viabilidade.

De forma a variar a dose de energia aplicada (2 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² e 15 J/cm²) foi fixado o comprimento de onda de 664 nm e a potência útil de 56 mW, e variou-se apenas o tempo de aplicação do laser, respectivamente 36 s, 90 s, 180 s e 270 s.

Para todos os grupos em condições de déficit nutricional com 5% de soro fetal bovino, observamos diferença significativa no número total de células entre os grupos irradiados e controle. Houve maior proliferação celular nos grupos irradiados com laser, mas não houve diferença significativa entre os grupos irradiados. Observou-se que quanto menor a dose, maior a curva de proliferação celular.

Na tabela 5.3 são apresentados os números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 1 (cultivos de células LMF irradiados com o laser de $\lambda = 664$ nm, L1), obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a primeira irradiação, em função da dose administrada: 2 J/cm², 5 J/cm², 10 J/cm² e 15 J/cm². São dados também as médias e desvios padrão (DP) das contagens realizadas em triplicata. Na figura 5.8 estão

representadas as médias e a retas de regressão ajustadas a elas pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 5.3: Números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 1 em triplicata, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da dose. Média e desvio padrão (DP) da triplicata.

Dose (J/cm ²)	Tempo (dias)	Nº. de células viáveis (triplicata)			Média	DP
		1	2	3		
2	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	15,2	16,0	18,0	16,4	1,44
	4	36,0	38,0	42,0	38,7	3,06
	6	60,0	62,0	58,0	60,0	2,00
5	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	14,0	15,2	16,8	15,3	1,40
	4	38,0	34,8	40,0	37,6	2,62
	6	52,8	58,8	56,8	56,1	3,06
10	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	16,8	14,8	18,8	16,8	2,00
	4	40,0	30,0	38,0	36,0	5,29
	6	50,8	58,0	56,8	55,2	3,86
15	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	16,8	18,0	15,2	16,7	1,40
	4	36,0	28,0	36,0	33,3	4,62
	6	50,8	54,0	56,0	53,6	2,62
Controle	0	1,7	1,7	1,7	1,7	0,00
	2	6	4	2	4,0	2,00
	4	14	24	6	14,7	9,02
	6	26	18	22	22,0	4,00

Tabela 5.4: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 1.

Tempo (dias)	Desvio padrão Residual	F	P
2	1,58	0,53	0,674
4	4,05	0,99	0,447
6	2,96	2,53	0,131

Figura 5.8: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 1, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a dose aplicada.

Figura 5.9: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 1, de acordo com o dia de observação e a dose aplicada.

Pelo gráfico da figura 5.8, é evidente que, com a variação do tempo, há um aumento da média de células viáveis em todos os grupos, inclusive no controle. Os coeficientes de correlação de Pearson e os coeficientes da reta de regressão entre as médias de células viáveis em relação ao tempo para as diversas doses são dados na Tabela 5.10. O grau de correlação é maior do que 0,99 em todas as doses, indicando que, pelo menos até o dia 6 a regressão linear é adequada para descrever o comportamento das médias de células em relação ao tempo. Os coeficientes de regressão, por sua vez, indicam que a taxa de aumento do número médio de células por dia pode ser estimado de $8,66 \cdot 1000$ para a dose de 2 J/cm^2 a $9,90 \cdot 1000$ para a dose de 15 J/cm^2 . Para o controle, a taxa de aumento diário é $3,58 \cdot 1000$ células, bem menor que as outras.

A seguir, aplicou-se a análise de variância para a comparação de médias em um mesmo tempo, não incluindo o controle, obtendo-se valores da estatística F e os valores de probabilidade p correspondentes mostrados na Tabela 5.4. Como todos os valores p são maiores do que 0,05, não há evidência de diferença entre médias de contagem de células viáveis em cada tempo. O gráfico da figura 5.9 ilustra bem este resultado. Neste gráfico estão representados todos os valores obtidos de células viáveis e as respectivas médias, ligadas por segmentos de retas para facilitar a comparação. Excluindo o controle, o qual tem média de contagem indiscutivelmente menor, os segmentos são praticamente horizontais, sugerindo que não há diferença significativa entre as médias dos diversos grupos em um mesmo tempo. Por outro lado, esses segmentos estão afastados verticalmente de forma que os conjuntos de contagens de células de um mesmo grupo ficam totalmente separados, evidenciando que de um tempo para o outro há um aumento significativo da média (ou mesmo dos valores individuais) já identificado pela regressão linear. Além disso, considerando o resultado da análise de variância, os coeficientes de regressão não são significativamente diferentes, a não ser quando comparados com o controle.

Há um aumento da média de células viáveis em todos os grupos, inclusive no controle.

Baseados nos dados da literatura (GIMENEZ e CASADO, 1985; BOLTON, 1995; AL-WATBAN e ANDRÉS, 2001) e em nossa experiência clínica, acreditamos que existam doses inibitórias, porém devem estar acima dos 15 J/cm^2 utilizados nesses experimentos.

5.3.2. Experimento 2

O propósito desse experimento foi fixar a melhor dose encontrada e variar a irradiância (potência em mW dividida pela área, também fixa e determinada em cm^2), ou seja, o tempo de exposição a que estavam submetidas as células. Utilizamos o mesmo comprimento de onda (o mesmo diodo laser), variando apenas sua potência óptica útil. Utilizamos potência óptica útil de 56 mW (tempo de aplicação de 36 seg e irradiância de $6,24 \text{ mW/cm}^2$) e potência óptica útil de 28 mW (tempo de aplicação de 72 s e irradiância de $3,12 \text{ mW/cm}^2$). Trabalhamos respectivamente com o máximo de potência óptica útil que o aparelho podia dar e com exatamente sua metade (28 mW).

Tendo em vista não existir evidência de diferença entre o número médio de células viáveis no experimento anterior, escolheu-se a dose de 2 J/cm^2 e variou-se a irradiância na execução do experimento 2.

Na tabela 5.5 são apresentados os números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 2, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da irradiância: 56 mW e 28 mW, com a dose fixada em 2 J/cm^2 . São dados também as médias e desvios padrão (DP) das contagens realizadas em triplicata. Essas médias estão representadas graficamente na figura 5.10 juntamente com as retas de regressão determinadas pelo método dos mínimos quadrados.

Observamos na última coluna os valores normalizados, consideramos o controle com valor = 1, para motivos de comparação quando da confecção da equação 4.4 e da figura 5.12.

Tabela 5.5: Números de células viáveis divididos por 1000 para o experimento 2 em triplicata, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da irradiância com fluência fixa de 2 J/cm^2 . Média e desvio padrão (DP) da triplicata. Média celular e valor normalizado.

Irradiância (mW)	Tempo (dias)	No. de células viáveis (triplicata)			Média	DP	Média Celular	Valor Normalizado
56	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00	$média \div 1,4 =$	1,0
	2	15,2	16,0	18,0	16,4	1,44	$média \div 1,4 =$	11,7
	4	36,0	38,0	42,0	38,7	3,06	$média/1,4 =$	27,6
	6	60,0	62,0	58,0	60,0	2,00	$média \div 1,4 =$	42,9
28	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00	$média \div 1,4 =$	1,0
	2	10,0	8,0	10,8	9,6	1,44	$média \div 1,4 =$	6,9
	4	28,0	26,0	28,0	27,3	1,15	$média \div 1,4 =$	19,5
	6	32,0	31,2	36,8	33,3	3,03	$média \div 1,4 =$	23,8
Controle	0	1,7	1,7	1,7	1,7	0,00	$média \div 1,7 =$	1,0
	2	6	4	2	4,0	2,00	$média \div 1,7 =$	2,4
	4	14	24	6	14,7	9,02	$média \div 1,7 =$	8,6
	6	26	18	22	22,0	4,00	$média/1,7 =$	12,9

Tabela 5.6: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 2.

Tempo (dias)	Desvio padrão Residual	F	P
2	1,44	33,35	0,004
4	2,31	36,13	0,004
6	2,57	161,94	<0,001

Figura 5.10: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 2, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a irradiância.

Figura 5.11: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 2, de acordo com o dia de observação e a irradiância.

Nota-se pelo gráfico da figura 5.10 que, conforme o tempo varia, a média de células viáveis aumenta em todos os grupos (o controle é o mesmo discutido anteriormente). Esse aumento, nas duas irradiâncias, 28 mW e 56 mW, pode ser descrito por uma reta de regressão no intervalo de tempo em estudo. Os coeficientes de correlação e de regressão são dados na tabela 5.10. Prevê-se um aumento diário médio de $5,68 \times 1000$ células para o P 28 e de $9,90 \times 1000$ para o P 56. Como citado acima, para o controle a taxa de aumento diário médio é de $3,58 \times 1000$ células.

Empregou-se a análise de variância para a comparação de médias em um mesmo tempo, desconsiderando o controle, obtendo-se valores da estatística F e os valores de probabilidade p correspondentes dados na tabela 5.6. Em qualquer tempo obteve-se $p < 0,05$ indicando que as médias de contagem de células viáveis são significativamente diferentes. O gráfico da figura 5.11 fornece uma ilustração deste resultado. Neste gráfico estão representados todos os valores obtidos de células viáveis e as respectivas médias, ligadas por um segmento de reta. Fica evidente que o número de células viáveis é maior para P 56 em qualquer tempo.

Para todos os grupos em condições de déficit nutricional com 5% de soro fetal bovino, observamos diferença significativa no número total de células entre os grupos irradiados e controle. Houve maior proliferação celular nos grupos irradiados com laser, sendo que houve diferença significativa entre os grupos irradiados entre si, embora os melhores resultados foram observados quando utilizamos a potência mais alta (de 56 mW).

Isso nos demonstra que não é importante apenas a dose de energia com a qual se faz um tratamento com laser, mas também a densidade de potência (irradiância) que se utiliza, ou seja, a taxa de excitação molecular ou a taxa de transferência de energia é mais importante do que o número total de moléculas excitadas.

Se relacionarmos os dados da tabela 5.5 (valores normalizados) e da figura 5.10 podemos obter as taxas de crescimento celular onde temos que:

$$T_0 = -0,1 + 2,1t \quad \text{onde a taxa é de } 2 \times 10^3 \text{ cel/dia.}$$

$$T_{28} = 0,6 + 4,1t \quad \text{onde a taxa é de } 4 \times 10^3 \text{ cel/dia.}$$

$$T_{56} = -0,4 + 7,1t \quad \text{onde a taxa é de } 7 \times 10^3 \text{ cel/dia.}$$

Onde T é dado em dias.

Naturalmente a célula tem um poder de multiplicação da ordem de 2×10^3 cel/dia. A partir do momento que essas células estavam na presença de 28 mW a taxa de crescimento foi dobrada. Quando adicionado mais 28 mW observou-se que a potência inicial não foi triplicada mas aparentemente foi superior à triplicação. Isso pode ser um possível indicativo de que submetendo as células a um maior número de fótons por unidade de tempo a sua eficiência ou a eficiência de interação da luz que resulta em modificação no metabolismo, aumenta ainda mais.

Obtivemos um gráfico relacionando a taxa de multiplicação celular e as potências utilizadas (figura 5.12):

Figura 5.12: Taxa de multiplicação celular, de acordo com a taxa de variação da potência por dia e a potência utilizada.

A partir desse gráfico pudemos deduzir a seguinte equação (equação 4.4):

Equação 4.4:

$$\text{Taxa} = 2 + 0,09 P \text{ (mW)}$$

Que seguramente é válida para $P < 60$ mW, região de validade do experimento, onde $0,09 =$ equivale a $0,09 \times 10^3$ cel/dia/mW e é determinado como coeficiente luminoso de multiplicação celular.

Temos então que, a cada 1 mW de luz, a taxa de multiplicação celular é acrescida de 90 unidades.

5.3.3. Experimento 3

De posse dos resultados do experimento 1 e 2, fixamos a dose em 2 J/cm^2 e a potência óptica útil em 56 mW. Variamos o tipo de emissão do laser, trabalhando com o laser em emissão contínua e em emissão intermitente (chaveada). Na emissão intermitente variamos a frequência em 10 Hz, 60 Hz, 120 Hz e 180 Hz. A menor frequência (10 Hz) e a maior (180 Hz) foram fixadas a partir do que tecnicamente permitia o aparelho. As frequências intermediárias foram fixadas a partir da definição das frequências dos extremos.

Na tabela 5.7 são apresentados os números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 3, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função do tipo de emissão: pulsada (10, 60, 120, 180 Hz) ou contínua (CW), fixados a irradiância: 56 mW e a dose de 2 J/cm^2 . São dados também as médias e desvios padrão (DP) das contagens realizadas em triplicata. Essas médias estão representadas graficamente na figura 5.13, assim como as retas de regressão ajustadas pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 5.7: Números de células viáveis divididos por 1000 para os grupos do experimento 3, obtidos nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, em função da emissão (pulsada: 10 a 180 Hz ou contínua: CW), com dose de 2 J/cm² e potência de 56 mW. Média e desvio padrão (DP) da triplicata.

Emissão (Hz)	Tempo (dias)	No. de células viáveis (triplicata)			média	DP
		1	2	3		
10	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	14,0	13,2	14,8	14,0	0,80
	4	17,2	18,8	24,0	20,0	3,56
	6	40,0	39,2	44,0	41,1	2,57
60	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	13,2	14,0	12,0	13,1	1,01
	4	26,0	34,0	30,0	30,0	4,00
	6	46,0	42,0	46,8	44,9	2,57
120	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	12,8	15,2	14,0	14,0	1,20
	4	30,0	29,2	32,0	30,4	1,44
	6	44,0	42,8	46,0	44,3	1,62
180	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	14,0	13,2	12,0	13,1	1,01
	4	30,8	31,2	35,2	32,4	2,43
	6	50,8	46,8	45,2	47,6	2,88
CW	0	1,4	1,4	1,4	1,4	0,00
	2	15,2	16,0	18,0	16,4	1,44
	4	36,0	38,0	42,0	38,7	3,06
	6	60,0	62,0	58,0	60,0	2,00
Controle	0	1,7	1,7	1,7	1,7	0,00
	2	6	4	2	4,0	2,00
	4	14	24	6	14,7	9,02
	6	26	18	22	22,0	4,00
Controle	0	1,7	1,7	1,7	1,7	0,00

Tabela 5.8: Estatísticas da análise de variância para a comparação das médias de células viáveis dentro de cada dia no experimento 3.

Tempo (dias)	Desvio padrão Residual	F	P
2	1,11	4,51	0,024
4	3,03	14,73	<0,001
6	2,37	28,59	<0,001

Tabela 5.9: Comparação das médias de células viáveis (divididas por mil), em cada tempo após a irradiação, pelo teste de Tukey no experimento 3 (letras iguais em uma mesma coluna indicam que as médias não são significativamente diferentes ao nível de 5%).

Tempo (dias)		Pulsada	(Hz)		Contínua
	10	60	120	180	CW
2	14,0 ^{ab}	13,1 ^a	14,0 ^{ab}	13,1 ^a	16,4 ^b
4	22,0 ^m	30,0 ⁿ	30,4 ⁿ	32,4 ⁿ	38,7 ^o
6	41,1 ^x	44,9 ^{xy}	44,3 ^{xy}	47,6 ^y	60,0 ^z

Figura 5.13: Médias do número de células viáveis divididas por 1000 para o experimento 3, obtidas nos dias 0, 2, 4 e 6 após a irradiação, de acordo com a emissão.

Figura 5.14: Número de células viáveis dividido por 1000 para o experimento 3, de acordo com o dia de observação e o tipo de emissão.

Pelo gráfico da figura 5.13 verifica-se que as médias de células viáveis aumentam em todos os grupos em função do tempo. Os coeficientes de correlação de Pearson e os coeficientes de regressão linear para descrever esses aumentos são dados na tabela 5.10. Os coeficientes de correlação são maiores do que 0,97 e os coeficientes de regressão estão entre $6,25 \times 1000$ e $7,90 \times 1000$ células para as emissões pulsadas de 10 e 180 Hz, respectivamente, e é igual a $9,90 \times 1000$ células para a emissão contínua. Deve-se lembrar que para o controle a taxa de aumento diário médio de células é $3,58 \times 1000$.

Empregou-se a análise de variância para a comparação de médias em um mesmo tempo, obtendo-se valores da estatística F e os valores de probabilidade p correspondentes dados na Tabela 5.8. Como $p < 0,05$ em todos os tempos analisados, há médias de contagem de células viáveis que são significativamente diferentes entre si. Para identificar as médias diferentes aplicou-se o teste de Tukey. Na tabela 5.9 estão reunidas as médias de células viáveis obtidas no experimento 3, de modo que duas médias em uma mesma coluna com letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Nesta análise, também não se considerou o controle

por ter média de células claramente menor do que os outros e a inclusão do controle poderia mascarar algumas diferenças significativas. O gráfico da figura 5.14 facilita a interpretação das diferenças de médias indicadas pelo teste de Tukey. Com as emissões de 60, 120 e 180 Hz obteve-se número médio de células equivalentes em qualquer tempo. Então, as retas de regressão não são significativamente diferentes para essas três frequências. No tempo de 2 dias há alguma evidência de que a média de células com a emissão contínua é maior do que com as emissões de 60 Hz e 180 Hz, mas não há evidência de seja maior em relação às outras frequências. Entretanto, nos tempos 6 e 4 dias o número médio de células com a irradiação contínua foi significativamente maior do que com qualquer das outras frequências.

Tabela 5.10: Coeficiente de correlação e coeficiente de regressão (dividido por 1000) para interpretação da variação das médias dos tratamentos nos três experimentos em relação ao tempo.

Experimento	Tratamento	Coeficiente de correlação	Coeficiente de regressão
Exp 1	2J/cm ²	0,997	9,90
	5J/cm ²	0,996	9,32
	10J/cm ²	0,999	9,03
	15J/cm ²	0,998	8,66
Exp 2	P 28	0,982	5,68
	P 56	0,997	9,90
Exp 3	10	0,975	6,25
	60	0,998	7,38
	120	0,999	7,25
	180	0,996	7,90
	CW	0,997	9,90
Controle		0,975	3,58

Para todos os grupos em condições de déficit nutricional com 5% de soro fetal bovino, observamos diferença significativa no número total de células entre os grupos irradiados e os controle. Houve maior proliferação celular nos grupos irradiados com laser, sendo que os melhores resultados foram obtidos nos grupos irradiados com emissão contínua. Para os grupos irradiados com emissão chaveada, os melhores resultados foram obtidos nos grupos irradiados com maiores frequências (180 Hz).

Observações genéricas para os experimentos 1, 2 e 3

Quando observamos as curvas de crescimento dos grupos irradiados com concentração de 5% de soro fetal bovino irradiados verificamos que esses grupos atingiram o mesmo número de células que os grupos controle em meio com 10% de soro fetal bovino, sobretudo após 96 horas, que era o crescimento normal. Este aumento pode ter sido induzido pela produção de fatores autócrinos de crescimento, que são fatores que a própria célula sintetiza e que age sobre ela mesma (ALBERTS et al., 1989). O que ratifica que o laser de baixa intensidade atua como potencializador das funções celulares quando em condições adversas.

Pudemos observar uma tendência ao alinhamento dos fibroblastos dos grupos irradiados (Fig. 5.4), já citado na literatura por ENWEMEKA et al. em 1990 e ALMEIDA-LOPES em 1999 e inferido pelo trabalho de TANG et al., em 1997. Poderia ser ainda uma das explicações da qualidade estética superior das cicatrizes formadas clinicamente nos pacientes submetidos a essa terapia.

Discussão Final

Nossos resultados substanciam a ação bioestimuladora do laser de baixa intensidade e sugerem que, em fibroblastos de mucosa oral, a ação se dará da mesma maneira. Por outro lado, levam-nos a inferir que pacientes com algum comprometimento do processo de reparação são os que deverão ter maior benefício quando submetidos a esse tipo de terapia.

O laser de baixa intensidade possibilita um tratamento fácil e de baixo custo, podendo substituir ou complementar diversas terapias tanto na Medicina como na Odontologia.

Apesar de diversos trabalhos corroborarem o efeito bioestimulador do laser de baixa intensidade, são necessárias mais pesquisas e comprovações clínicas com a finalidade de determinar suas ações sobre a particularidade de cada quadro patológico. Faz-se também necessário uma padronização rigorosa quanto à variação de parâmetros de irradiação tais como comprimento de onda, dose, fluência, irradiância, número e

frequência de sessões de aplicação, de forma a obterem-se resultados reproduzíveis e confiáveis.

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades.

Lembraí-vos de que as maiores proezas da história foram conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

6. Conclusões

6. Conclusões

Dentro das condições experimentais, para fibroblastos de gengiva humana em cultura, podemos concluir que:

1. A utilização de concentração de 5% de soro fetal bovino mostrou ser um modelo ideal para a análise da ação dos lasers de baixa intensidade, porque o crescimento celular diminui proporcionalmente à concentração de soro fetal bovino.
2. A cor do meio não influenciou na absorção do laser por parte do fibroblasto.
3. O aumento de temperatura no tecido não foi suficiente para atribuímos a ativação tecidual à ele.
4. As doses administradas estimularam o crescimento celular de cultivos em déficit nutricional. Indicativos de que, quanto menor a fluência aplicada (2 J/cm^2), maior a bioestimulação.
5. Não existe uma dose de saturação ou mesmo inibitória da proliferação de fibroblastos *in vitro* nos parâmetros analisados.
6. Quanto maior a irradiância (para $P = 56 \text{ mW}$), maior a bioestimulação, a exposição da célula à radiação laser pode determinar a resposta celular, sendo que menor tempo de irradiação mostrou ser mais eficaz na indução da proliferação celular.
7. O laser aplicado em emissão contínua mostrou ser mais bioestimulador que quando aplicado em emissão pulsada. Quando o laser é aplicado em emissão pulsada, quanto maior a frequência, maior a bioestimulação.

“É mais fácil viver sem pão,
que sem ilusões”

Danuso

7. Perspectivas

7. Perspectivas

Dentro das condições experimentais queremos:

1. Verificar se existe uma dose, ou doses, de saturação ou mesmo inibitória para a proliferação de fibroblastos *in vitro*.
2. Verificar quanto a irradiância influi nos resultados obtidos na proliferação de fibroblastos *in vitro*, buscando a potência máxima e mínima que se deve utilizar para esse propósito, trabalhando melhor a regressão não linear.
3. Refazer o estudo *in vivo*, seguindo os melhores parâmetros encontrados *in vitro*.
4. Uma vez encontrados os parâmetros ideais para a proliferação de fibroblastos em cultivo, buscar os parâmetros ideais para proliferação de osteoblastos e para osteoblastos e para neurônios em cultivo.

“O CAMINHO DA SABEDORIA É LONGO, ATRAVÉS DE PRECEITOS
E EFICAZ ATRAVÉS DE EXEMPLOS”

SÊNECA

APÊNDICES

APÊNDICES

Apêndice 1: Parecer n.º 33/99.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER nº 33/99

Com base em parecer de relator, foi **APROVADO** nesta data, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), o protocolo de pesquisa ***"Estabelecimento de linhagem primária de fibroblastos de gengiva humana"***, de responsabilidade da pesquisadora **Luciana Almeida Lopes**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia Martins Marques Jaeger**.

São Paulo, 25 de maio de 1999

Prof. Dr. **Dalton Luiz de Paula Ramos**
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo - SP FAX (011) 814.9281 - TELEX (011) 36950 - Tels.: PABX (011) 813.6944 -
Diretoria (011) 814.0062 - Contabilidade/Compras (011) 814.9281
Impresso no S.D.O.

Apêndice 2: Número de células viáveis ($\times 10^3$) para os grupos controles que não receberam irradiação, nos fibroblastos LMF, nos diferentes períodos experimentais. Para obtenção da média os grupos foram contados em triplicata.

N.º células $\times 10^3 \pm$ erro da média

GRUPO	SFB	2 dias	4 dias	6 dias
A	0%	4×10^3	0	0
		2×10^3	0	0
		2×10^3	0	0
			2×10^3	0
			0	0
			0	0
		$2,67 \pm 0,67$	$0,33 \pm 0,33$	0 ± 0
		6×10^3	46×10^3	50×10^3
		4×10^3	44×10^3	46×10^3
		2×10^3	56×10^3	46×10^3
B	5%		26×10^3	14×10^3
			18×10^3	24×10^3
			22×10^3	6×10^3
		$4,00 \pm 1,15$	$31,00 \pm 7,69$	$35,33 \pm 6,28$
		10×10^3	20×10^3	46×10^3
		14×10^3	16×10^3	82×10^3
		14×10^3	12×10^3	90×10^3
C	10%		26×10^3	68×10^3
			24×10^3	90×10^3
			32×10^3	78×10^3
		$12,67 \pm 1,33$	$21,67 \pm 2,94$	$75,67 \pm 6,82$

Apêndice 3: A Importância da Metodologia Estatística na Biomedicina

O emprego da análise estatística na pesquisa biomédica constitui, sem dúvida alguma, um dos fenômenos mais marcantes das últimas décadas. Este aprimoramento da metodologia científica levou não só à maior objetividade na análise dos resultados como também ao aprofundamento do espírito crítico do pesquisador.

É importante salientar que em pesquisa biomédica, nunca temos amostras idênticas, já

que as células, tecidos biológicos e por consequência, os pacientes, nunca são idênticos ou extremamente semelhantes.

Quem busca o conhecimento científico tem pouco interesse em saber que alguns pacientes melhoram quando submetidos a determinado tratamento. O que interessa, sim, é saber qual é o melhor tratamento, para o geral dos pacientes com a mesma doença. No entanto, a informação sobre o melhor tratamento é obtida através de pesquisas, e os pesquisadores trabalham com amostras biológicas ou mesmo com pacientes. Para que o pesquisador possa ter o direito de transferir a informação da sua amostra para toda a população, ele tem que fazer uma inferência. Segundo VIEIRA e HOSSNE (2002), para fazer a inferência, são necessários bons dados e um teste estatístico adequado. Se os dados são bons e as diferenças observadas são grandes, o teste estatístico passa a ser desnecessário. Na maioria dos casos, entretanto, o teste estatístico contribui para a interpretação objetiva dos resultados.

Para entender a lógica de um teste estatístico, comentaremos um exemplo apresentado por VIEIRA e HOSSNE (2002) em seu livro acerca de um experimento *in vivo*: um pesquisador cria dois grupos de ratos de mesma linhagem, com uma única diferença, que é o fato de um dos grupos receber uma substância acrescida à ração. Se depois de algum tempo os ratos forem pesados, o pesquisador provavelmente verificará que os pesos dos ratos de um mesmo grupo variam e as médias de pesos dos dois grupos são diferentes. A variação de peso dentro dos grupos é aleatória porque os ratos do mesmo grupo foram tratados da mesma maneira. Entretanto, a diferença de médias entre grupos tanto pode ser aleatório como pode ter sido causada pelo tratamento.

No caso específico de nossos experimentos trabalhamos *in vitro*, com células em cultivo. Existem alguns problemas quando trabalhamos *in vitro*, que devem ser levados em conta antes de se analisar os resultados finais. Quando cultivamos células, acrescentamos milhares delas em uma placa com meio nutricional (em nossos experimentos colocamos em cada placa $1,7 \times 10^3$ de células). Fomos bastante criteriosos nesse processo, mas é humanamente impossível colocar em todas as placas, a mesma quantidade de células. Isso poderia interferir no resultado final do experimento. Outro problema é o fato de que quando se faz um plaqueamento (acrescenta-se células em placas com meio de cultivo) temos como finalidade que essas células se proliferem, ou seja, cada célula em cultivo vai se dividir e gerar duas células filhas, que crescerão em progressão geométrica. Espera-se nesse fenômeno um comportamento similar ao processo fisiológico, no qual as células filhas serão muito parecidas, mas não absolutamente idênticas.

Essas diferenças do número de células entre as placas, e de tamanho e forma em uma mesma placa, também podem interferir no resultado final dos experimentos. A variação do número, tamanho e forma dentro dos grupos são aleatórias porque as células do mesmo grupo foram tratadas da mesma maneira. Entretanto, a diferença de médias entre grupos tanto pode ser

aleatório como pode ter sido causada pelo tratamento.

Diante dos resultados de um experimento como esses descritos acima, o pesquisador se pergunta se a diferença de médias é suficientemente grande para ser tomada como evidência de que existe diferença real entre os grupos. O julgamento do pesquisador precisa ser objetivo. Então, o pesquisador precisa de um método que permita tomar uma decisão, independentemente de suas idéias pessoais. É para isso que serve um teste estatístico: estabelece se a diferença de médias é “estatisticamente significativa”, ou seja, verifica se uma diferença tão grande ou maior do que a obtida tem baixa probabilidade (p-valor) de ocorrer. Toda vez que o pesquisador informa que um dado valor é estatisticamente significativo, precisa apensar a essa informação um valor de probabilidade, que os estatísticos chamam de p-valor.

O teste estatístico estabelece se o resultado obtido pelo pesquisador é estatisticamente significativo, isto é, se é baixa a probabilidade de ocorrer valores iguais ao obtido por acaso. No entanto, ele não é capaz de mostrar o que causou a diferença.

“O principal da vida não é o conhecimento
Mas o uso que dele se faz”

Talmude

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. ABERGEL, R. P.; MEEKER, C. A.; LAM, T. S.; DWYER, R. M.; LESAVOY, M. A.; UITTO, J. Control of connective tissue metabolism by lasers: Recent development and future prospects. **J Am Acad Dermatol**, v.11, p.1142-1150, 1984.
2. ABERGEL, R. P.; LAM, T. S.; LASK, G.; DWYER, R. M.; CASTEL, J. C.; UITTO, J. Efectos biológicos del láser. **Invest Clin Laser**, v.1, p. 7-14, 1986.
3. ABERGEL, R. P.; LYONS, R. F.; CASTEL, J. C.; DWYER, R. M. UITTO, J. Biostimulation of wound healing by lasers: Experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. **J Dermatol Surg Oncol**, v.13, n.2, p.127-133, 1987.
4. ABERGEL, R. P.; GLASSBERG, E.; UITTO, J. Increased wound-healing rate in pig skin treated by helium-neon laser. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, **Proceedings**, p.6-10, 1988.
5. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. New York: Plenum Press, p.123-156, 1989.
6. ALMEIDA-LOPES, L. Laser. **J Bras Odontol Clin**, v.1, n.4, p.3-5, jul/ago. 1997.
7. ALMEIDA-LOPES, L. Aplicações clínicas do laser não-cirúrgico. In: BRUGNERA, A.Jr.; PINHEIRO, A. L. B. **Laseres na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, p.99-120, 1998a.
8. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU J.; JAEGER M. M. M.; BRUGNERA, A. JR.; VÉLEZ-GONZÁLEZ, M. Acción del láser a baja densidad de potencia en la proliferación in vitro de fibroblastos de encía humana. **Bol SELMQ**, v. 14, n.5, p.14-18, Dic, 1998b.
9. ALMEIDA-LOPES, L.; VÉLEZ-GONZÁLEZ, M.; BRUGNERA, A. Jr.; PINHEIRO, A. B. The use low level laser therapy for wound healing: Clinical study. In: ANNUAL MEETING- LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, **Proceedings...** Florida, EUA, p.16-18, 1999.

10. ALMEIDA-LOPES, L. Análise “in vitro” da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Potência. **Tese** (Mestrado em Engenharia Biomédica), Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.
11. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER M. M. M. Comparison of the Low Level Laser Therapy on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, 29:179-184, 2001.
12. ALMEIDA-LOPES, L; MASSINI, R.J. Laserterapia, Conceitos e Aplicações. **CD-ROM**. DMC, São Carlos, Brasil, 2002a.
13. ALMEIDA-LOPES, A. Present Situation of the Dental Word Regarding to the use of LLT. Fourth World Congress – World Association for Laser Therapy - WALT, **Proceedings...** Tsukuba, Japan, 2002b.
14. ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Intensidade Utilizando Diferentes Parâmetros de Irradiação. **Tese** (Doutorado em Engenharia de Materiais), Interunidades IFSC/IQSC/EESC da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- 15.
16. ANDERSON, R. R; PARRISH, J. A. Optical properties of human skin. In: REGAN, J. D.; PARRISH, J. A. (Ed.). **The Science of Photomedicine**. New York: Plenum, p.147-195, 1982.
17. AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. **Laser Therapy**, p.119-124, 1994.
18. AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, Z. Stimulative and inhibitory effects of low incident levels of Argon laser energy on wound healing. **Laser Therapy**, v.7, p.11-18, 1995.

19. AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, Z. Comparison of the effects of laser therapy on wound healing using different laser wavelengths. **Laser Therapy**, v.8, p.127-135, 1996.
20. AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRÉS, B.L. The effect of He-Ne Laser (632.8 nm) and Solcoseryl In vitro. **Lasers Med Sci**, v.16, p.267-275, 2001.
21. ANNEROTH, G.; HALL, G.; RUDEN, H.; ZETTERQVIST, L. The effects of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.26, p.12-17, 1988.
22. ASAGAI, Y.; UENO, T.; OHSHIRO, T. Application of low reactive-level laser therapy (LLLT) in the Functional Training of Cerebral Palsy Patients. In: 2nd CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY. **Proceedings**, Kansas City, USA, Sep 2-5. p.13, 1998.
23. ATAKA, I. Studies of Nd:YAG low power laser irradiation on stellate ganglion. In: **Lasers in dentistry**. Amsterdam: Elsevier, p. 271, 1989.
24. BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, São Carlos, v.2, n.2, p.4-9, 2001.
25. BALBONI, G. C.; BRANDI, M. L; ZONEFRATI, R.; REPICE, F. Effects of laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts in vitro. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY. **Proceedings**, p.101-103, 1985.
26. BASERGA, R. **Cell growth and division - a practical approach**. Philadelphia: I R L Press, p.1-16, 1990.
27. BASFORD, J. R.; HALLMAN, H. O.; SHEFFIELD, C. G.; MACKEY, G. L. Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser and occlusion in wound healing in a swine model. **Arch Physi Med Rehabil**, v.67, p.151, 1986.
28. BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers - theory and practice**. Singapore: Churchill Livingstone, p.1-21, 1994.
29. BENEDICENTI, A. La valutazione dell' effecto del la luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: BENEDICENTI, A. **Atlate di laser-terapia**. Gênova: Langa Grafica, p.71-83, 1982.

30. BENSADOUN, R. J.; FRANQUIN, J. C.; CIAIS, G.; DAR COURT, V.; SCHUBERT, M. M.; VIOT, M.; DEJOU, J.; TARDIEU, C.; BENEZERY, K.; NGUYEN, T. D.; LAUDOYER, Y.; DASSONVILLE, O.; POISSONNET, G.; VALLICIONI, J.; THYSS, A.; HAMDI, M.; CHAUVEL, P.; DEMARD, F. Low Energy He-Ne Laser in the Prevention of Radiation-Induced Mucositis. **Supp. Care in Cancer: Off. Jour. Multi. Assoc. Support. Care in Canc.**, v.7, n.4, p.244-52, jul, 1999.
31. BERKI, T. Biological effect of low-power helium Neon (HeNe) laser irradiation. **Lasers Med Sci**, v.3, p. 35, 1988.
32. BIHARI, J.; MESTER, A. R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomised double blind comparative study. **Laser Therapy**, v.1, n.2, p.97, 1989.
33. BOLOGNANI, L.; COSTATO, M.; DEL MONTE, V.; IOTTI, L.; VOLPI, N. Effect of laser on enzymatic systems; inactivation of muscle lactate deshydrogenase by CO₂ and its reactivation by laser irradiation. **Laser Technol**, v.1, n.3, p.103-107, 1991a.
34. BOLOGNANI, L. Reactivation of partially inactivated enzymes by low power laser beams (LPL). **Radiol Med**, v.1, n.4, p.81-86, 1991b.
35. BOLOGNANI, L.; MAJNI, G.; COSTATO, M.; MILANI, M. ATPase and ATPsynthetase activity in myosin exposed to low power laser and pulsed electromagnetic fields. **Bioelectrochem Bioenergetics**, v.32, p.155-164, 1993.
36. BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying power and energy densities. **Laser Therapy**, v.2, n.3, p.105-111, 1991.
37. BOLTON, P.; DYSON, M.; YOUNG, S. The effect of polarised light on the release of growth factors from the U937 macrophage-like cell line. **Laser Therapy**, v.4, n.1, p.33-37, 1992.

38. BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human fibroblasts *in vitro*. **Laser Therapy**, v.7, p.55-60, 1995.
39. BOURGELAISE, D. B. C. The physics of lasers. In: ARNDT, K. A. **Cuttaneous laser therapy**. New York: John Wiley & Sons, p.13, 1983.
40. BROWNE, R.; TIAS, M. J. Biological testing of dental restorative materials *in vivo* - a review. **J Oral Rehabil**, v.6, n.4, p.365-374, Oct. 1979.
41. CALDERHEAD, R. G. The Nd:YAG and GaAIAs lasers: a laser comparative analysis in pain therapy. In: ATSUMI, K.; NIMSAKUL, N. **Laser**. Tokyo: Japan Society for Laser Medicine, v.21, n.1, 1981.
42. CALDERHEAD, R. G. Introduction to laser therapy: pathways, mechanisms and dosimetry. In: 2nd CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY. **Proceedings**, Kansas City, USA, Sep 2-5 p.7, 1998.
43. CALLAGHAN, G. A.; RIORDAN, C.; GILMORE, W. S.; McINTYRE, I. A.; ALLEN, J. M.; HANNIGAN, B. M. Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation after DNA synthesis in the haemopoietic cell line V937. **Lasers Surg Med**, v.19, p.201-206, 1996.
44. CAMPBELL, E. J.; CURY, J. D.; LAZARUS, C. J.; WELGUS, H. G. Monocyte procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases: identification, characterisation and regulation of secretion. **J Biol Chem**, v.262, p.158862-15968, 1987.
45. CARRILLO, J. S.; TRAVESI, S. A.; GONZALEZ, J.; SADA, J. M.; CONDE, M. Acción del láser de He-Ne sobre el crecimiento de una cepa de estafilococcus aureus "in vitro". In: CONGRESS INTERNATIONAL LASER, **Anales**, p.26-28, 1987.
46. CASTRO, D. J.; ABERGEL, R. P.; MEEKER, C.; DWYER, R. M.; LESAVOY, M. A.; UITTO, J. Effects of the Nd:YAG laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. **Am Acad Dermatol**, v.11, p.1142-1150, 1983a.
47. CASTRO, D. J.; ABERGEL, R. P.; JOHNSTON, K. J.; ADOMIAN, G. E.; DWYER, R. M.; UITTO, J.; LESAVOY, M. A. Wound healing: biological

effects of Nd:YAG laser on collagen metabolism in pig skin in comparison to thermal burn. **Ann Plast Surg**, v.11, p.131–141, 1983b.

48. CHELYSHEV, Y. A.; KUBITSKY, A. A. Effect of infra-red low-power laser irradiation on regeneration of myelinated axons. **Lasers Med Sci**, v.10, p.273-277, 1995.
49. CHIO, C. H.; LIN, S. H. J.; KAO, M. C. H. Cytogenetic effects of low level laser irradiation of human leukocytes. **Laser Therapy**, v.2, n.3, p. 111-117, 1990.
50. CIAPETTI, G.; GRANCHI, D.; VERRI, E.; SAVARINO, L.; CAVEDAGNA, D. Application of a combination of neutral red and amid black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, v.17, n.13, p.1259-1264, Jul. 1996.
51. CISNEROS, J. L.; TRELLES, M. A. **Laser y terapéutica em medicina y cirugía cutánea**. Barcelona: Centro Documentación Láser, p.21-54, 1987.
52. CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, p.300-34, 1988.
53. CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **J Invest Dermatol**, v.11, n.4, p.647-661, Oct. 1993.
54. COBO-PLANA, J.; HERNANDEZ, J. L.; GARCIA-POLA, M. J.; BLANCO, J. L. El láser en la profilaxis de la osteorradionecrosis mandibular. **Inv Clin Laser**, v.3, p.16-18, 1986.
55. COLLS, J. **La terapia laser, hoy**. Barcelona: Centro Documentación Laser, p. 39-70, 1986.
56. COLVER, G. B.; PRIESTLEY, G. C. Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing “in vitro”. **Br J Dermatol**, v.121, p.179-186, 1989.
57. COLVIN, R. B. Wound healing processes in homeostasis and thrombosis. In: GIMBRONE, M. A. Jr. (Ed.). **Vascular endo-thelium in homeostasis and thrombosis**. Edinburg: Churchill Livingstone, p.220-224, 1986.
58. DANIEL, R. L. A. P. Análise comparativa da citotoxicidade *in vitro* do iodofórmio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes. **Dissertação**

(Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

59. DARBY, I.; SKALLI, O. GABBIANI, G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest**, v.63, p.21-29, 1990.
60. DYSON, M.; YOUNG, S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. **Lasers Med Sci**, v.1, n.2, p.125-130, 1982.
61. DYSON, M. Cellular and subcellular aspects of low level laser therapy. In: OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. **Progress in Laser therapy**. J. Wiley & Sons, p.221, 1991.
62. EL SAYED, S. O; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and each individual diode on Mast cell number and degranulation in intact and injured skin. **Lasers Surg Med**, v.10, p.559-568, 1990.
63. EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg Med**, v.19, p.433-437, 1996.
64. ENWEMEKA, C. S.; RODRIGUEZ, O.; GALL, N.; WALSH, N. Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. **J Clin Laser Med Surg**, p.47-52, Dic. 1990.
65. FEDOSEYEVA, G. E.; SMOLYANINOVA, N. K.; KARU, T. I.; ZELENIN, A. V. Human Lymphocyte chromatin changes following irradiation with a He-Ne laser. **Lasers Life Sci**, v.2, n.3, p.197-205, 1988.
66. FILONENKO, N. Multiparametric dosimetry for low power photon (laser) therapy. **Lasers Surg Med**, s.95, 1995.
67. FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HOFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Applied Surface Science** 154-155, p. 548-554, 2000.
68. FRESHNEY, R. I. Quantification and experimental design. In: **Culture of animal cells. A manual of basic technique**. 4th ed. New York: Wisley-Liss, p.104, 2000.

69. FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v. 11, p. 87-95, 1991.
70. FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Towards an explanation of visible and infrared laser induced stimulation and damage of cell cultures. **Laser Therapy**, v.4, n.1, p. 39-42, 1992.
71. FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Photobiostimulation by light-induced cytosolic calcium oscillations. **Laser Therapy**, v.8, p. 137-142, 1996.
72. FULLER, A. T. Fundamentals of lasers in surgery and medicine. In: DIXON, J. A. (Ed). **Surgical applications of lasers**. Chicago: Year Book Medical Publishers, p.11, 1983.
73. FUNK, O. J.; KRUSE, A.; KIRCHNER, H. Cytokine production after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.16, p.347-355, 1992.
74. GILIOLI, G.; TAPARELLI, F.; FORNACIARI, A.; PALMIERI, B.; CELANI, M. Effecti sperimentali del laser infrarosso: studi in vitro com 1 Herpes virus. **Med Laser Rep**, v.3, p.28-31, 1985.
75. GIMENEZ, R.; CASADO, F. Influencia de extractos biológicos sobre la respiración tisular. **Inv Clin Laser**, v.2, n.2, p. 11-15, 1985.
76. GLASSBERG, E.; LASK, G. P.; TAN, E. M. L.; UITTO, J. Cellular effects of the pulsed tuneable DYE laser at 577 nanometers on human endothelial cells, fibroblasts, and erythrocytes: an in vitro study. **Lasers Surg Med**, v.8, p.567-572, 1988.
77. GOLDMAN, L. **The biomedical laser: technology & clinical applications**. New York: Springer Verlag, p.5-25, 1981.
78. GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. Piracicaba: Editora Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luís de Queirós. Livraria Nobel S. A. Editora e Distribuição, 1990.
79. GÓMEZ-VILLAMANDOS, R. J.; SANTISTEBAN, J. M.; RUIZ, I.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; AVILA, I. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy

in the mucosa of the equine airway. **Lasers Surg Med**, v.16, p.184-188, 1995.

80. GÓMEZ-VILLAMANDOS, R. J.; SANTIESTEBAN, J. M.; VÉLEZ-GONZÁLEZ, M.; RUIZ, I.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; AVILA, I. Efectos de la radiación láser en la cicatrización de lesiones superficiales en la mucosa del caballo. **Bol SELMQ**, n.12, p.5-15, 1997.
81. GRILLO, H. C. Research in wound healing. In: BALLINGER, F. (Ed.). **Research methods in surgery**. The National Cancer Institute, p.235-254, 1964.
82. GRINNELL, F.; FELD, M.; MINTER, D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for col-insoluble globulin (plasma fibronectin). **Cell**, v.19, p.517-525, 1980.
83. GROSS, A. J.; JELKMANN, W. Helium-Neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. **Lasers Surg Med**, v.10, p.40-44, 1990.
84. GROSSMAN, N.; SCHNEIDE, N.; DEUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v.22, p.212-218, 1998.
85. GROTENDORST, G. R.; MARTIN, G. R. Cell movements in wound healing and fibrosis. **Rheumatology**, V.10, p.385-403, 1986.
86. GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.1, p.6-8, 1987.
87. GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue. II. Ultrastructural aspects. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.6, p.66-71, 1992.
88. GUZZARDELLA, G. A.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIAVARESI, G.; GIARDINO, R. Laser Stimulation on Bone Defect Healing: An In Vitro Study. **Lasers Med Sci**, 17:216-220, 2002.

89. HAAS, A. F.; ISSEROTT R. R.; WHEELAND, R. G.; ROOD, P. A.; GRAVES, P. H. I. Low-energy Helium-Neon Laser irradiation increases the motility of cultured human Keratinocytes. **S Invest Dermatol Inc**, v.4, p.822-826, 1990.
90. HALEVY, S.; LUBART, R.; REUVENI, H.; GROSSMAN, N. Infrared (780 nm) low level laser therapy for wound healing: in vivo and in vitro studies. **Laser Therapy**, v.9, p.159-164, 1997.
91. HALL, G.; ANNEROTH, G.; SCHENNINGS, T.; ZETTERQVIST, L.; RYDÉN, H. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experiemental study in rats. **Swed Dent J**, v.18, p.29-34, 1994.
92. HALLMAN, H. O.; BASFORD, J. R; O'BRIEN, J. F; CUMMINS, L. A. Does low-energy Helium-Neon Laser irradiation after in vitro replication of human fibroblasts? **Lasers Surg Med**, v.8, p.125-129, 1988.
93. HANSSON, T. L. Infrared laser in the treatment of craniomandibular disorders, arthrogenous pain. **J Prosth Dent**, v.61, n.5, p.614-617, May. 1989.
94. HARRIS, A. K.; WILD, P.; STOPAK, D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. **Science**, v.208, p.177-179, 1980.
95. HAZEKI, O.; TAMURA, M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of the rat head. **Adv Exper Med Biol**, v. 248, p.63, 1989.
96. HEIN, R.; LANDTHALER, M.; HAINA, D.; KRIEG, T. Laser light of low power density does not influence chemotaxis and collagen synthesis of human dermal fibroblasts. **Lasers Med Sci**, v.7, p.79-83, 1992.
97. HERBERT, K. E.; BHUSATE, L. L.; SCOTT, D. L.; DIAMANTOPOULOS, C.; PERRETT, D. Effect of laser light at 820 nm on Adenosine Nucleotide levels in human Lymphocytes. **Lasers Life Sci**, v.3, n.1, p.37-45, 1992.
98. HERNÁNDEZ, G.S.D.; DIAZ, M.C.R.; CHELALA, J.R.A.; HERNÁNDEZ, R.M.D.; ANDREU, M.I.G.; LLANES, E.L. Tratamiento de defectos óseos horizontals en periodoncia con laser helio-neón. **Rev. Cubana Med Mil**, 26(2):110-115, 1997.
99. HERRERO, C. Los efectos Terapeuticos. **Bol SELMQ**, n.15/16, p.22-26, Ene, 1988.

100. HOUAISS, A.; VILLAR, M. S. Dicionário de Língua Portuguesa. Editora Objetiva, Rio de Janeiro, 2001.
101. HSIN-SU, Y.; KEE-LUNG, C.; CHIA-LI, Y.; JUI-WHEN, C.; GWO-SHING, C. Low energy Helium–Neon laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8. Release from cultured human keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v.107, n.4, Oct. 1996.
102. HUBACEK, J.; MATOUSKOVA, I.; GRIVNOVA, J.; POLACH, A. Changes of the phagocytic activity of neutrophil leukocytes after irradiation with an He-Ne laser. **Cesk Otolaryngol**, v.34, n.3, p.141-146, 1985.
103. HUG, D. H.; HUNTER, J. K. Photomodulation of enzymes. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.10, p.3-22, 1991.
104. HUNTER, J.; LEONARD, L.; WILSON, R.; SNIDER, G.; DIXON, J. Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. **Lasers Surg Med**, v.3, p.285-290, 1984.
105. HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degradation. **Biochem J**, v.184, p.643-650, 1979.
106. IIJIMA, K.; SHIMOYAMA, N.; SHIMOYAMA, M.; MIZUGUCHI, T. Red and green low-powered He-Ne lasers protect human erythrocytes from hypotonic hemolysis. **J Clin Laser Med Surg**, v.9, p.385, 1991.
107. IIJIMA, K. Evaluation of analgesic effect of low power He:Ne laser on postherpetic neuralgia using VAS and midified McGill pain questionnaire. **J Clin Laser Med Surg**, v.2, n.9, p.121, 1991.
108. IN DE BRAEKT, M.; VAN ALPHEN, F.; KUIJPERS, A.; MALTHA, J. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Lasers Surg Med**, v.11, p.462-470, 1991.
109. INOUE, K.; NISHIOKA, J.; HUKUDA, S. Altered Iymphocyte proliferation by low dosage laser irradiation. **Clinical Exper Rheumatol**, v.7, p.521-523, 1989.

110. JACQUES, S. L. **Absorption coefficient to different wavelength.** Tabela interna de consulta do Laser Biology Research Laboratory of Univ. of Texas M. D. Anderson Cancer Center. Houston, Estados Unidos, 1995.
111. JENSEN, J. A.; HUNT, T. K.; SCHEUENSTUHL, H.; BANDA, M. J. Effect of lactate, pyruvate, and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. **Lab Invest**, v.54, p.574-578, 1986.
112. JORI, G. The molecular biology of photodynamicaction. In: R. Prati y C. A. Sacchi. (Eds). **Lasers in photomedicine and photobiology.** Springer Verlag, p.58-60, 1980.
113. KAMEYA, T.; IDE, S. H.; ACORDA, J. A.; YAMADA, H.; TAGUCHI, K.; ABE, N. Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Therapy**, v.7, p.33-36, 1995.
114. KAMINER, M. S.; LAVKER, R. M.; WALSH, L. J.; WHITAKER, D.; ZWEIMAN, B.; MURPHY, G. F. Extracellular localisation of human connective tissue mast cell granule contents. **J Invest Dermatol**, v.96, p.857-863, 1991.
115. KANA, J. Effect of low-power density laser radiation on healing of open wounds in rats. **Arch Surg**, v.116, p.293, 1981.
116. KARU, T. I. Biological action of low intensity visible monochromatic light and some of as medical applications. In: GALLETI, G. (Ed). **Laser.** Bologna, Itália, p.381, 1985.
117. KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE Journal Quantum Electronics QE-23**, v.10, p.1703-1717, 1987.
118. KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.2, n.1, p.53-74, 1988.
119. KARU, T.; RYABYKH, T. P.; FEDOSEYEVA, G. E.; PUCHKAVA, N. I. Helium-Neon laser-induced respiratory burst of phagocyte cells. **Lasers Surg Med**, v.9, p.585-588, 1989.
120. KARU, T. I. Effects of visible radiation on cultured cells. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.52, p.1089, 1990.

121. KARU, T. I.; SMOLYANINOVA, N. K.; ZELENIN, A. V. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.4, n.3, p.167, 1991a.
122. KARU, T. I.; SMOLYANINOVA, N. K.; ZELENIN, A. V. Irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. I: increase the blast-transformation caused by phytohemagglutinin. **Laser Technol**, v.1, n.2, p.51-54, 1991b.
123. KARU, T. I.; SMOLYANINOVA, N. K.; ZELENIN, A. V. Irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. II: absence of expression of interleukin-2 receptors. **Laser Technol**, v.1, n.3, p.99-101, 1991c.
124. KARU, T. I. Depression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. **Laser Therapy**, v.4, n.1, p.5-24, 1991d.
125. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.27, p.219-223, 1995.
126. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; KALENDO, G. S.; ESENALIEV, R. O. Effects of monochromatic low - Intensity light and laser irradiation on adhesion of He La cells in vitro. **Lasers Surg Med**, v.18, p.171-177, 1996.
127. KARU, T. I.; PYATIBRAT, L. V.; RYABYKH, T. P. Nonmonotonic behavior of the dose dependence of the radiation effect on cells in vitro exposed to pulsed laser radiation at $\lambda = 820$ nm. **Lasers Surg Med**, v.21, p. 485-492, 1997.
128. KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA J. R. M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. **Int Dent J**, v.18, n.2, p.443-467, Jun. 1968.
129. KERT, J.; ROSE, L. **Clinical laser therapy: low level laser therapy**. Copenhagen: Scandinavian Medical Laser Technology, p.140-155, 1989.
130. KNIGHTON, D. R.; SILVER, I. A.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis - effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, p.262-270, 1981.
131. KNIGHTON, D. R.; HUNT, T. K. SCHEUENSTUHL, H.; HALLIDAY, B. J.; WERB, Z.; BANDA, M. J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. **Science**, v.221, p.1283-1285, 1983.

132. KUBOTA, J.; OHSHIRO, T. The effects of diode laser low reactive level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.127, 1989.
133. KUBOTA, J. Effects of Diode laser therapy on Blood Flow in Axial Pattern Flaps in the Rat Model. **Lasers Med Sci**, 17:146-153, 2002.
134. KUSAKARI, H.; ORIKASA, N.; TANI, H. Effects of low power laser on wound healing on gingiva and bone. In: WORLD CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY FOR LOW POWER LASER APPLICATION IN MEDICINE. **Annals...** Bologna, Itália. p.49-55, 1992.
135. LABAJOS, M. Effects of the IR radiation of the GaAs diode laser on intestinal absorption in vitro and in vivo studies. **Laser** , v.2, p.21-25, 1986.
136. LABBE, R. F.; RETTMER, R. L.; DAVIS, H. Low power laser stimulation of biochemical processes. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. **Proceedings...** p.155-158, 1988.
137. LABBE, R. F.; SKOGERBOE, K. J.; DAVIS, H. A.; RETTMER, R. L. Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. **Lasers Surg Med**, v.10, p.201, 1990.
138. LAM, T. S.; ABERGEL, R. P.; MEEKER, C.A.; CASTEL, J. C.; DWYER, R. M.; UITTO, J. Laser stimulation of collagen synthesis in human fibroblast cultures. **Lasers Life Sci**, v.1, n.1, p.61, 1986.
139. LAVIE, R.; LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYAKOV, M.; SHEINBERG, A. Low power visible light and hydrogen peroxide changes intracellular calcium concentration in fibroblasts cells. In: ANNUAL MEETING- LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, **Proceedings...** Florida, EUA, p.72, 1999.
140. LEE, P. H.; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wound in rats. **Laser Therapy**, v.5, n.2, p.59-64, 1993.
141. LEIBOVICH, S. J.; WISEMAN, D. M. Macrophages, wound repair and angiogenesis. **Prog Clin Biol Res**, v.266, p.131-145, 1988.

142. LEUNG, C. Y.; MANFREDI, C.; ROCCIA, L. Prime osservazioni sugli effectti collaterali della softlaserterapia. In oltre 500 casi trattati ambulatoriamente. **Minere Riflessoter Laserter II**, v.1, p.35-37, 1985.
143. LIEVENS, P. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY. **Proceedings...** Bologna, Itàlia, p.171-174, 1986.
144. LIEVENS, P. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. **LASER. J Eur Med Laser Ass**, v.1, n. 2, p.12, 1988.
145. LIEVENS, P. C. The effect of a combined He:Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. **Laser News**, v.3, n.3, p.3-9, 1990.
146. LIEVENS, P.C. The effect of I.R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med Sci**, v.6, p.189-191, 1991.
147. LOEVSCALL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblast in vitro. **Lasers Surg Med**, v.14, p.347-354, 1994.
148. LOWE, A. S.; WALKER, M. D.; O'BYRNE, M.; BAXTER, G. D.; HIRST, D. G. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation - Impaired, wound - healing model in murine skin. **Lasers Surg Med**, v.23, p.291-298, 1998.
149. LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.12, p.305-310, 1992a.
150. LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LEVINSHAL, T.; LAVIE, R.; BREITBART, H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v. 15, p.337-341, 1992b.
151. LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; PELED, I.; GROSSMAN, N. Light effect on fibroblast proliferation. **Laser Therapy**, v.5, p.55-57, 1993.

152. LUBART, R.; FRIEDMANN H.; SINYKOV M.; GROSSMAN N. Biostimulation of photosensitised fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v.7, p.101-106, 1995.
153. LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; GROSSMANN, N.; ADAMER, M.; SHAINBERG, A. The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation. **Laser Technol**, v.6, n.3, p.79-84, 1996.
154. LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYAKOV, M.; SHIMAN, A.; GROSSMAN, N.; ADAMEK, M.; SHAINBERG, A. The effect of He:Ne Laser (633 nm) radiation on intracellular Ca^{2+} concentration in fibroblasts. **Laser Therapy**, v.9, p.115-120, 1997.
155. LUGER, E.J.; ROCHKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G.; DEKEL, S. Effect of Low-Power Laser Irradiation on the Mechanical Properties of Bone Fracture Healing in rats. **Lasers Surg Med**, 22:97-102, 1998.
156. MAEGAWA, Y.; ITOH, T.; HOSOKAWA, T.; YAEHASHI, K.; NISHI, M. Effects of Near-Infrared Low-Level Laser Irradiation on Microcirculation. **Lasers Surg Med**, 27:427-437, 2000.
157. MAIER M.; HAINA D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. **Lasers Med Sci**, v.5, p.381-386, 1990.
158. MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, p.493, 1960.
159. MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease. Principles of general pathology**. EUA: Blackwell Science, p.465-482, 1996.
160. MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.38, p.25-30, 1997.
161. MARTINEZ, F.; SMITH AGREDA, V.; FERREZ, E.; CIMAS, M.; MONTESINOS CASTRO, M.; MARTINEZ, A. Variaciones morfológicas del parénquima pineal tras estimulación con luz láser. **Inv Clin Laser I**, v.4, p.21-24, 1984.

162. MAYAYO, E.; TRELLES, M. A. Irradiación láser experimental de la mucosa anal en el ratón de laboratorio. **Inv Clin Laser I**, v.4, p.28, 1984.
163. MAYAYO, E.; TRELLES, M. A. Láser e inmunidad. **Inv Cin Laser III.**, v.2, p.73-74, 1986.
164. McKINLEY, A. F.; HARLEN, F.; WHILLOCK, M. J. Biological interactions of optical radiations. In: HILGER, A. (Ed). **Hazards of optical radiation**, p.12-23, 1988.
165. McKINNEY, P.; CUNNINGHAM, B. L. **Wound Healing - Handbook of plastic surgery**, p.55-70, 1989.
166. McPHERSON, J. M.; PIEZ, K. A. Collagen in dermal wound repair: In: CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. (Eds). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, p.471-496, 1988.
167. MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orv Hetilap**, v.107, p.1012, 1966.
168. MESTER, E. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. **Exper Chirurg**, v.2, p.94, 1969.
169. MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. Effect of laser radiation on the wound healing. **Zeitschrift Exper Chi**, v.8, p.258, 1971a.
170. MESTER, E.; SZENDE, B.; SPIRY, T.; SACHER, A. Effect of the laser in wound healing. **Lyon Chi**, v.67, p.416, 1971b.
171. MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J. G. Effect of laser rays on wound healing. **Am J Surg**, v.122, p.532, 1971c.
172. MESTER, E.; BACSY, E.; SPIRY, T.; SCHER, A. Laser stimulation of wound healing by laser rays. **Acta Chi Acad Sci Hungaricae**, v.13, p.315, 1972.
173. MESTER, E.; KORENYI-BOTH, A.; SPIRY, T.; SCHER, A.; TISZA, S. Stimulation of wound healing by means of laser rays (Clinical and electro microscopical study). **Acta Chi Acad Sci Hungaricae**, v.14, p.347, 1973a.
174. MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B. Effect of laser rays on wound healing. **Bull Soc Int Chir**, v.32, p.169, 1973b.

175. MESTER, E.; JASZSAGI, E. The effects of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. **Studia Biophysica**, v.35, n.3, p.227, 1973c.
176. MESTER, E.; BACSY, E.; KORENYI, A.; KOVACS, I.; SPIRY, T. Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of laser irradiation on wound healing. **Langenbecks Archv Chir Suppl**, v.261, 1974.
177. MESTER, E.; KORENYI-BOTH, A.; SPIRY, T.; TISZA, S. The effect of wound healing. Enzyme-histochemical studies. **Acta Chir Acad Sci Hungicae**, v.15, p.203, 1975.
178. MESTER, E.; NAGYLUSKAY, S.; TISZA, S.; MESTER, A. Wundheilung und regeneration. Neuere untersuchungen über die wirkung der laserstrahlen auf die undheilung - Immunologische effekte. **Z Exper Chirurg**, v.10, p.301, 1977.
179. MESTER, E., NAGYLUSKAY, S.; WAIDELICH, W.; TISZA, S. Auswirkungen direkter laserbestrahlung auf menschliche Lymphocyten. **Arch Dermatol Res**, v.263, p.241, 1978.
180. MESTER, E. Laser application in promoting of wound healing. In: KOEBNER, H. K. (Ed). **Lasers in Medicine**. New York: Koebner, p.83-95, 1980.
181. MESTER, E.; TOTH, N.; MESTER, A. The biostimulative effect of laser beam. **Laser Basic Biomed Res**, v.22, p.4-7, 1982.
182. MESTER, E. Der Biostimulative effekt von laserstrahlen. **Z Exper Chirurg**, v.15, p.67, 1984.
183. MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg Med**, v.5, p.31, 1985.
184. MESTER, A. F.; MESTER, A. Mester's method of laser biostimulation. In: WAIDELICH, W. (Ed). **Laser-Optoelektronik**, p.105-109, 1986.
185. MESTER, A. F.; MESTER, A. Wound healing. **Laser Therapy**, v.1, n.1, p.7, 1989.
186. MESTER, A. F.; SNOW, J. B. Photochemical effects of low-intensity laser irradiation on wound healing and on the maturation and regeneration of

olfactory neuroepithelial explants. **J Clinical Laser Med Surg**, p.31-33, Oct, 1990.

187. MIRÓ, L.; COUPE, M.; CHARRAS, C.; JAMBON, C.; CHEVALIER, J.M. Estudio capilorooscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv Clin Laser**, v.1, n.2, p.9-14, 1984.
188. MJÖR, I. A.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; ORSTAVIK, D. Biological properties. In: MJÖR, I. A. **Dental materials**: biological properties and clinical evaluations. Boca Raton: CRC Press, p.21-68, 1985.
189. MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, p.4894-4897, 1988.
190. MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G. A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L. GIARDINO, R. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In Vivo experimental study. **Lasers Med Sci**, v.13, p.293-298, 1998.
191. NARA, Y.; MATONO, S.; MORIOKA, T. Regulatory action of low intensity laser on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. **Surg Med Lasers**, v.4, n.1, p.17-20, 1991.
192. NARA, Y.; TSUKAMOTO, Y.; FUKUTANI, S.; YAMAGUCHI, N.; MORI, M.; MORIOKA, T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. **Lasers Life Sci**, v.4, n.4, p.249-256, 1992.
193. NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J Exp Med**, v.156, p.430-442, 1992.
194. NOBLE, P. B.; SHIELDS, E. D.; BLECHER, P. D. M.; BENTLEY, K. C. Locomotory characteristics of fibroblasts within a three-dimensional collagen lattice: modulation by a Helium/Neon soft laser. **Lasers Surg Med**, v.12, p.669-674, 1992.
195. NOGUEROL, B. F.; ALÁNDEZ, F. J.; CÑIZAREZ, J.; SICILIA, A.; SANZ, M.; CAMPOS, A.; TRELLES, M. A. Ultrastructural changes of the mouse

periodontum after HeNe laser radiation: a transmission electron microscopic study. **Laser Therapy**, v.6, p.95-100, 1994.

196. OCAÑA-QUERO, J. M.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, R.; MORENO-MILLAN, M.; SANTISTEBAN-VALENZUELA, J. M. Helium-neon (He-Ne) laser irradiation increases the incidence of unreduced bovine oocytes during the first meiotic division in vitro. **Lasers Med Sci**, v.13, p.260-264, 1998.
197. O'KANE, S. H.; SHIELDS, T. D.; GILMORE, W. S.; ALLEN, J. M. Low intensity laser irradiation inhibits tritiated thymidine incorporation in the Hemopoietic cell lines HL-60 and U937. **Lasers Surg Med**, v.14, p.34-39, 1994.
198. OHTA, A.; ABERGEL, R. P.; UITTO, J. Laser modulation of human immune system: Inhibition of lymphocyte proliferation by a Gallium-Arsenide laser at low energy. **Lasers Surg Med**, v.7, p.199-201, 1987.
199. OSANAI, T.; SHIROTO, C.; MIKAMI, Y.; KUDOU, E.; KOMATSU, T.; SUZUKI, K.; NAKAJI, S. H.; KUMNE, T.; SUGAWARU, K.; SAZAKI, M. Measurement of GaAlAs Diode laser action on phagocytic activity of human neutrophils as a possible therapeutic dosimetry determinate. **Laser Therapy**, v.2, n.3, p.123-133, 1990.
200. OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. **Low level laser therapy**. Chichester: J Wiley & Sons, 1988.
201. OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. **J Clin Laser Med and Surg**, v. 9, n.4, p. 267-275, 1991.
202. OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. Laser therapy - a decade further on. **Laser Therapy**, v.10, p.5-6, 1998.
203. OSTUNI, A.; PERLINO, E.; PASSARELLA, S.; MARRA, E.; QUAGLIARIELLO, E. Helium Neon Laser light-human blood cells interaction. **Laser Technol**, v.1, n.3, p.119-125, 1991.
204. OSTUNI, A.; PASSARELLA, S.; QUAGLIARIELLO, E. The energy dose dependence of the activity of glutamate de hydrogenase irradiated with helium neon laser. **Laser Technol**, v.4, n.1/2, p.13-16, 1994.

205. PALMGREN, N. Low-power laser therapy in rheumatoid arthritis. **Lasers Med Sci**, v. 12, p. 441, 1992 .
206. PARRISH, J. A. Photomedicine: potentials for lasers. In: PRATESI, R.; SACCHI, C. A. (Eds). **Lasers in photomedicine and photobiology**. Springer Verlag, p.3-20, 1980.
207. PASSARELLA, S.; CASAMASSIMA, E.; MOLINARI, S.; PASTORE, D.; QUAGLIARIELLO, E.; CATALANO, I. M.; CINGOLANI, A. Increase of proton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon laser. **Febs Letters** , v.175, n. 1, p. 95, 1984.
208. PAUL, J. Behaviour of cells in culture. In: PAUL, J. **Cell and tissue culture**. Great Britain: Churchill Livingstone, p.20-30, 1993.
209. PEACOCK, E. E. Jr. **The wound repair**. Philadelphia: W B Saunders, p76-85, 1984.
210. PEREIRA A.N.; EDUARDO C.P.; MATSON E.; MARQUES, M.M. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 31 (4): 263-267, 2002.
211. POGREL, M. A.; CHEN, J. W.; ZHANG, K. Effects of low-energy Gallium-Aluminum-Arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Lasers Surg Med**, v.20, p.426-432, 1997.
212. POLLARD, J. W. Basic cell culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. **Methods in molecular biology**: animal cell culture. New Jersey: Humana Press, p.1-12, 1990.
213. PÖNTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a Medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, p.13-17, 1992.
214. POURREAU-SCHNEIDER, N.; SOUDRY, M.; REMUSAT, M.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblast. **Quintessence Int**, v.20, n. 12, p.887-893, Sep. 1989.
215. POURREAU-SCHNEIDER, N.; AHMED, A.; SOUDRY, M.; JACQUEMIER, J.; KOPP, F.; FRANQUIN, J. C.; MARTIN, P. M. Helium-neon laser treatment

transforms fibroblasts into myofibroblasts. **Am J Pathol**, v.137, n.1, p.171-178, Jul, 1990.

216. RAJARATNAM, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. **Laser Therapy**, v.6, p.107-112, 1994.
217. REDDY, G. K. STEHNO-BITTEL, L. ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers Surg Med**, v.22, p.281-287, 1998.
218. REICH, J. D.; CAZZANIGA, A. L.; MERTZ, P. M.; KERDEL, F. A.; EAGLSTEIN, W. H. The effect of electrical stimulation on the number of Mast Cells in healing wounds. **J Am Acad Dermatol**, v.25, n.1, p.40-46, 1991.
219. RICEVUTI, G.; MAZZONE, A.; MONAIA, C.; FRATINO, P.; DEGIULIO, R.; DELL'ACQUA, R.; LEONARDI, G.; JUCCI, A.; SACCHI, S. In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte functions. **Inflammation**, v.13, n.5, p.507-527, 1989.
220. RIGAU, J. Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular. **Tese** (Doutorado em Histologia) - Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili, Reus, 1996.
221. ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLAREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.
222. RODRIGUES R. C.; ELGELMANN, E.; BRUGNERA, A.; ALMEIDA-LOPES, L.; DUARTE, D.A.. Clinical study of the lasertherapy antinflammatory action on the tissues reparation after iatrogenics trauma. In: ANNUAL MEETING-LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, **Proceedings...**Florida, EUA, p.13, 1999.
223. RODRIGO, P.; LERMA, E.; ZARAGOZA, J. R. Efectos de la irradiación láser sobre el tiroides. Estudio experimental en la rata blanca. **Inv Clin Laser**, v.11, n.1, p.7-9, 1985.

224. ROTHE, M.; FALANGA, B. Factores de crecimiento. Su biología y expectativas en enfermedades dermatológicas y reparación hística. **Arch Dermatol**, v.1, n.1, p.33-43, 1989.
225. RUBENSTEIN, E. Combined high-power and low power laser treatment for ulcerative vulval lesions induced by human pappilomavirus (HPV). In: CONGRESS INTERNATIONAL ON LASER, **Proceedings...** 1987.
226. RUDOLPH, R.; BALLANTYNE, D. L. Jr. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G.; MAY, J. W. Jr., LITTLER, J. W. **Plastic surgery**. Philadelphia: W B Saunders, v.1. 1990.
227. RUFOLLO, P. Impiego della laser-terapia nelle leucoplachie del cavo orale. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY, **Proceddings...** Bologna, Itália, p.279, 1985.
228. RYHANEN, L.; RANTALA-RYHANEN, S.; TAN, E. M. L. Assay of collagenase activity by a rapid, sensitive, and specific method. **Collagem Rel Res**, v.2, p.117-130, 1982.
229. SAPERIA, D.; GLASSBERG, E.; LYONS, R. F.; ABERGEL, R. P.; BANEAU, P.; CASTEL, J. C.; DWYER, R. M.; UITTO, J. Demonstration of elevated type I and type II procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. Proposed mechanism for enhanced wound healing. **Biochem Biophy Res Communic**, v.138, p.1123, 1986.
230. SARTI, M. A.; VILLAPLANA, L. A.; TRELLES, M. A.; SMITH, V.; FERRES, E.; MONTESINOS, M. Transformations in type II leydig cells in the rat after anterior pituitary irradiation with low incident levels of HeNe Laser Energy. **Laser Therapy**, v.7, p.119-122, 1995.
231. SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Role of Low Reactive-Level Laser Therapy (LLLT) in the treatment of acquired and cicatrical vitiligo. **Laser Therapy**, v.1, n.3, p.141-144, 1989.
232. SASAKI, K. & OHSHIRO, T. Assessment in the rat model of the effects of 830 nm diode laser irradiation in a diachronic wound healing study. **Laser Therapy**, v. 9, p. 25-32, 1997.

233. SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; SCHAFFER, P. M.; BUSCH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photoch. Photobio. B.**, v. 54, n. 1, p.55-60, jan, 2000.
234. SCHENK, P. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von oralen Schleimhautepithelien nach Bestrahlung mit dem Helium-Neon-Laser. **Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir**, v.9, p.278, 1985.
235. SCHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. **J Dent**, v.22, n.2, p.S6-S11, Aug, 1994.
236. SCHNEEDE, P.; JELKMANN, W.; SCHRAMM, U.; FRICKE, H.; STEINMETZ, M.; HAFSTETTER, A. Effects of the Helium-Neon laser on rat kidney epithelial cells in culture. **Lasers Med Sci**, v.3, p.249-257, 1988.
237. SHIROTO, M. C.; SUGAWARA, K.; KUMAE, T.; SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Effect of diode laser radiation in vitro on activity of human neutrophils. **Laser Therapy**, v.1, n. 3, p. 135-140, 1989.
238. SILVEIRA, J. C.; LOPES, E. E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs-904 nm. (Estudo experimental em cobaias - *Cavia Porcellus*). **Arq Cent Estud Curso Odontol**, v.28, n.1/2, p.73-96, jan/dez, 1991.
239. SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum. **J Clin Inv**, v.51, p.2009-2023, 1972.
240. SIPOSAN, D.G.; LUKACS, A. Effect of Low-Level Laser Radiation on Some Rheological Factors in Human Blood: An *in Vitro* Study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.4, p.185-195, 2000.
241. SKINNER, S. M.; GAGE, J. P.; WILCE, P.A.; SHAW, R. M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust Dent J**, v.41, p.3, 1996.
242. SKOBELKIN, O. K.; MICHAILOV, V. A.; ZAKHAROV, S. D. Preoperative activation of the immune system by low reactive level laser therapy (LLLT)

in oncologic patients: A preliminary report. **LLLT Cancer Surg**, p.169-175, 1991.

243. SMITH, R. J.; BIRNDORF, M.; GLUCK, G.; HAMMOND, D.; MOORE, W. D. The effect of low-energy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models. **Plastic Reconstruc Surg**, v.2, n.89, p.306-310, 1992.
244. SMITH-AGREDA, V.; FERRES, E.; RENOVELL, A.; SARTI, M. A.; VILLAPLANA, L.; ZABALETA, M.; APARICI, L.; MONTESINOS, M. Aportaciones al estudio de las interacciones morfoquímicas de las células adenohipofisarias tras la estimulación con láser He/Ne 632,8 nm de baja potencia. **Inv Clin Laser II**, v.2, p.51-62, 1985.
245. SMITH-AGREDA, V.; FERRES, E.; MONTESINO, M.; SMITH-FERRES, E.; PEREZ, J.; ZABALETA, M. Alteraciones de la ciclosis celular adenohipofisaria tras la estimulación con láser He/Ne e IR. **Inv Clin Laser III**, v.3, p.99-105, 1986.
246. SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. Iowa State: University Press, 1967.
247. SOUNDRY, M.; FRANQUIN, J. C.; POURREAU-SCHNEIDER, N.; MARTIN, P. M. Action d'un laser hélium-néon sur la croissance cellulaire: étude in vitro sur fibroblastes gingivaux humains. **J Biol Buccale**, v.16, p.129-135, 1988.
248. SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filing materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water-soluble substances on human cells *in vitro*. **Odontol Rev**, v.20, n.2, p.123-132, 1969.
249. SPANGBERG, L. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity *in vitro*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.35, n.3, p.389-401, Mar, 1973.
250. SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Peptide growth factors are multifuntional. **Nature**, v.332, p.217-219, 1988.
251. STADLER, J.; KOLB, B.; EVANS, R.; NARAYAN, V.; BUEHNER, N.; NAIM, J. O. The effect of low-level laser irradiation on lymphocytes from peripheral blood. In: ANNUAL MEETING OF LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, **Annals...** p.16-18, 1999.

252. STEINLECHNER, C. W. B.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v.5, p.65-73, 1993.
253. SIPOSAN, D.G.; LUKACS, A. Effect of Low-level Laser Radiation on Some Rheological Factors in Human Blood: An in Vitro study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, 4:185-195, 2000.
254. STRONG, L. H.; BERTHIAUME, F.; YARMUSH, M. L. Control of fibroblast populated collagen lattice contraction by antibody targeted photolysis of fibroblasts. **Lasers Surg Med**, v.21, p.235-247, 1997.
255. STRUBE, D.; HAINA, D.; LANDTHALER, M.; BRAUN-FALCO, O.; WAIDELICH, W. Störeffekte bei tierversuchen zur stimulation der wundheilung mit laserlicht. **Lasers Med Surg**, v.4, p.15-20, 1988.
256. SUPINO, L. F. Instrumentação Óptica e Eletrônica para Aplicativos Ópticos em Medicina e Odontologia. **Relatório nº 1 apresentado à FAPESP**, referente ao processo 02/01995-1, 2002.
257. SVAASAND, L. O. Biostimulation with low-intensity lasers - physics or metaphysics? **Nordisk Med**, v.105, p. 72, 1990.
258. TANG, J.; GODLEWSKI, G.; ROVY, S.; DELACRÉTAZ, G. Morphologic changes in collagen fibbers after 830 nm diode laser welding. **Lasers Surg Med**, v.21, p.438-443, 1997.
259. TONG, M.; LIU, Y.F.; ZHAO, X.N.; YAN, C.Z.; HU, Z.R.; ZHANG, Z.X. Effects of Different wavelengths of Low Level Laser Irradition on Murine Immunological Activity and Intracellular Ca²⁺ in Human Lymphocytes and Cultured Cortical Neurogliocytes. **Lasers Med Sci**, 15:201-206, 2000.
260. TERRIBILE W. M. V.; CORTI, L.; VELUSSI, C. A experimental study of the healing effect of the HeNe laser and the infrared laser. **Lasers Med Sci**, v.3, p.151-163, 1988.
261. TERRIBILE W. M. V.; CORTI, L.; VELUSSI, C.; CECCHERELLI, F.; BOSO, C.; BELFONTALI, S. Experimental wound healing with coherent and non-coherent radiation. **Laser Technol**, v.2, n.3, p.121-134, 1992.

262. TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **Am J Pathol**, v.138, p.1307-1313, 1991.
263. TRELLES, M. A.; MAYAYO, E.; IGLESIAS, J. M. Histological study of the effect of the 632 nm HeNe irradiation on the nasal mucous of the rabbit. Its clinical interest. In: INTERNATIONAL CONGRESS OPTOELEKTRONIK **Proceedings...** p.105-109, 1983.
264. TRELLES, M. A.; MESTER, A. Ulceras crónicas en las extremidades inferiores. **Inv Clin Laser I**, v.2, p.32, 1984.
265. TRELLES, M. A. Herpes genital y láser de baja potencia. **Inv Clin Laser II**, v.3, p.120, 1986.
266. TRELLES, M. A.; MAYAYO, E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. **Lasers Surg Med**, v.7, p.36-45, 1987.
267. TRELLES, M. A.; MAYAYO, E.; MIRÓ, L.; RIGAU, J.; BAUDIN, G.; LAPIN, R. Histamine & Low Power Laser. **J Bloodless Med Surg**, v.6, n.1, p.15-16, 1988.
268. TRELLES, M. A.; MAYAYO, E.; MIRÓ, L.; RIGAU, J.; BAUDIN, G.; CALDERHEAD, R. G. The action of low-reactive level laser therapy (LLLT) on Mast Cells: a possible pain relief mechanism examined. **Laser Therapy**, v.1, n.1, p. 27-30, 1989a.
269. TRELLES, M. A.; MESTER, A.; RIGAU, J.; MAYAYO, E.; ROSA, A.; LAPIN, R. Clinical use of He-Ne laser for wound healing. **J Bloodless Med Surg**, v. 7, n. 1, p. 3-7, 1989b.
270. TSUCHIDA, T.; AIZAWA, K.; BABA, J.; FURUKAWA, K.; YAMAMOTO, H.; KAWATE, N.; KONAKA, C. H.; KATO, H.; HAYATA, Y. ISHITSUKI, M. Wound healing in mice using He-Ne scanning laser. **J Clin Laser Med Surg**, p.265-266, Aug, 1991.
271. TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser Therapy – Clinical Practice and Scientific background**. Prima Books AB, Tallinn, Estônia, 2002.
272. VAN BREUGEL, H. H. F. I.; BÄR, P. R. D. Power density and exposure time of HeNe laser irradiation re more important that total energy dose in photo-

- biomodulation of human fibroblasts in vitro. **Lasers Surg Med**, v.12, p.528-537, 1992.
273. VAN NESTE, D. Skin response to histamine. **Acta Dermatol Venereol (Stoch)**, v.71, p.25-28, 1991.
274. VELÉZ-GONZÁLEZ, M.; URREA-ARBELÁEZ, A.; NICOLAS, M.; SERRA-BALDRICH, E.; PEREZ, J. L.; PAVESTI, M. CAMARASA, J. M. G.; TRELLES, M. A. Treatment of relapse in Herpes simplex on labial & facial areas and of primary herpes simplex on genital areas and area pudenda with low power laser (He-Ne) or acyclovir administered orally. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. **Proceedings...** p.43-48, 1994.
275. VICENT, G. M.; FOX, J.; CHARLTON, G.; HILL, J. S.; McCLANE, R.; SPIKES, J. D. Presence of blood significantly decreases transmission of 630 nm laser light. **Lasers Surg Med**, v.11, p.399-403, 1991.
276. VIEIRA, S.; HOSSNE, W. S. **Metodologia Científica para a área de saúde**. Rio de Janeiro: Campus, 2ª tiragem, 2002.
277. VILLAPLANA, L. A.; TRELLES, M. A.; SMITH-AGREDA, V.; RIGAU, J. Changes in albino rat testicle interstitial cells after pituitary stimulation in vivo with HeNe Laser. **Laser Therapy**, v.7, p.19-22, 1995.
278. VISCOR, G.; PALACIOS, L.; PALOMEQUE, J. Effect of He-Ne laser irradiation of blood *in vitro* on erythrocyte microrheological properties. **Lasers Life Sci**, v.3, n.1, p.31-36, 1989.
279. VOLPI, N.; VENTURELLI, T.; ZIRILLI, O.; BOLOGNANI, L. Adenylate pool and energy change in human lymphocytes and granulocytes irradiated at 632 nm (HeNe laser). **Laser Technol**, v.5, n.1/2, p.19-23, 1995.
280. WALKER, J. Relief from chronic pain by low power laser irradiation. **Neurosci Lett**, v.43, p.339-344, 1983.
281. WAN, S.; ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Analytical modeling for the optical properties of the skin with in vivo and in vitro modeling. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v.34, p.493-499, 1981.

282. WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. P. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. **Lasers Surg Med**, v.22, p.294-301, 1998.
283. WEI YU; NAIM, J. O; LANZAFAME, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. **J Photochem Photobiol B: Biol**, v. 59, n. 2, p.167-170, 1994.
284. WEI YU; NAIM, J. O. LANZAFAME, R. J. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers Surg Med**, v.20, p.56-63, 1997a.
285. WEI YU; CHI, L. H.; NAIM, J. O., LANZAFAME, R. J. Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation. **Lasers Surg Med**, v.21, p. 262-268, 1997b.
286. WIEGAND-STEUBING, R.; LOUIE, A. Y.; YAMAMOTO, R. S.; BERNIS, M. W. Low power laser irradiation of HeLa cells and monocytes. **Lasers Life Sci**, v.3, n.4, p.217-227, 1990.
287. WILLIAMS, T. J. Factors that affect vessel reactivity and leukocyte emigration. In: CLARK, R. A. F.; HENSON, P.M. (Eds). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, p.115-147, 1988.
288. YAMAMOTO, M.; TAMURA, K.; HIRATSUKA, K.; ABIKO, Y. Stimulation of MCM3 Gene Expression in Osteoblast by Low Level Laser irradiation. **Lasers Med Sci**, 16:213-217, 2001.
289. YEW, D.; LI, W.; PANG, K.; MOK, Y.; AU, C. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by dose He-He laser. **Scanning Microscopy**, v.3, n.1, p.379-386, 1989.
290. YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg Med**, v. 9, p.497-505, 1989.
291. YOUNG, S. R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. **Laser Therapy**, v.2, n.2, p.53-57, 1990.
292. ZHANG, Z.; AL-WATBAN, F. A. H. The effects of low-power He-Ne and He-Cd laser therapy on wound healing of rats. **J Clin Med Surg**, v.12, n.6, p.327-329, 1994.

“Estudiad como si fuerais vivir siempre
Vivid como si fuerais a morir mañana!”

S. Isidoro de Sevilla