

FERNANDA DE PAULA EDUARDO

**ANÁLISE *IN VITRO* DA FOTOTERAPIA COM LASERS EM BAIXA
INTENSIDADE (660 e 780 nm) SOBRE A AÇÃO DO VIRUS HERPES
SIMPLES TIPO I EM CÉLULAS EPITELIAIS DE MACACOS (VERO)**

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fernanda de Paula Eduardo

Análise *in vitro* da fototerapia com lasers em baixa intensidade (660 nm e 780 nm) sobre a ação do vírus herpes tipo I em células epiteliais de macacos (Vero)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Martins Marques

São Paulo

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduardo FP. Análise *in vitro* da fototerapia com lasers em baixa intensidade (660 nm e 780 nm) sobre a ação do vírus herpes tipo I em células epiteliais de macacos (Vero) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ____/____/ 2006

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Carlos e Sueli** por sempre estarem ao meu lado, me incentivando e acreditando no meu crescimento e amadurecimento tanto profissional quanto pessoal.

Ao meu marido **Daniel**, pelo constante apoio, incentivo e compreensão durante esta etapa. Não permitindo que eu desanimasse em momento algum.

Dedico esta, também aos meus irmãos **Alexandra** e **Caco**, minha afilhada **Sofia**, e **Manuela**.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. **Márcia Martins Marques**, minha orientadora e amiga, pela orientação brilhante, amizade, paciência, competência e constante presença em todos os momentos.

A Profa. Dra. **Dolores Ursula Mehnert**, pela seriedade e ajuda no desenvolvimento de todo trabalho. E principalmente por confiar no meu trabalho, me permitindo trabalhar no seu laboratório.

À Profa. Dra. **Esther Birman**, por ter me recebido no início dessa jornada, no departamento de Diagnóstico Bucal.

A Profa. Dra. **Denise Zezell**, por me ajudar nos primeiros passos da minha carreira acadêmica e continuar presente em todos os momentos.

À Profa. **Telma Monezi**, pela sua ajuda e participação fundamental na execução desse trabalho. Por sempre se mostrar pronta a ajudar e esclarecer minhas inúmeras dúvidas.

A Profa. Dra. **Martha Simões Ribeiro**, pelas importantes sugestões ao projeto.

As colegas do **ICB**, Paty, Karina e Natasha pela ajuda no laboratório.

À **Cida e Nina**, o meu agradecimento por todo apoio.

Aos amigos do LELO, **Aroldo, Jô**, e **Lili** pela colaboração e amizade.

A **Luciane** e **Letícia**, pela disponibilidade e ajuda em todos os momentos desse trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FOUSP, em especial a **Glaucia**.

À **Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pelo auxílio-pesquisa e bolsa concedidos.

Ao **LELO**, ao **ICB** e a **FOUSP** pela infra-estrutura disponibilizada.

À empresa **MMOptics** pelo apoio e incentivo na realização desse trabalho.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na conclusão deste trabalho.

Eduardo FP. Análise *in vitro* da fototerapia com lasers em baixa intensidade (660 nm e 780 nm) sobre a ação do vírus herpes tipo I em células epiteliais de macacos (Vero) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

A fototerapia com lasers em baixa intensidade de lesões de herpes simples tem sido demonstrada clinicamente ora prevenindo a formação de vesículas, ora cicatrizando rapidamente as lesões e até aumentando o espaço de tempo entre o aparecimento dessas manifestações recorrentes. No entanto, os mecanismos básicos de ação dos lasers nessas situações são desconhecidos. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar ensaios *in vitro* utilizando células epiteliais em cultivo e culturas do vírus HSV-1 para estudar a interferência do laser em baixa intensidade na infecção do HSV-1. Material e Métodos: Culturas de vírus HSV-1 e de células epiteliais de macaco (linhagem Vero) infectadas ou não infectadas, crescidas em déficit nutricional (2 % de soro fetal bovino - sfb) foram utilizadas. As irradiações foram realizadas com um laser de GaAlAs (660 e 780 nm, área focal de 3,6 mm²). Uma, duas e três irradiações com intervalos de 6 h foram realizadas. Os grupos experimentais foram: Controle: não-irradiadas; 660 nm/ 3 J/cm² (28 s); 660 nm/ 5 J/cm² (38 s); 780 nm/ 3 J/cm² (19 s) e, 780 nm/ 5 J/cm² (25 s). Os efeitos citopáticos do HSV-1 e a viabilidade celular de culturas irradiadas e controles foram analisadas em 4 condições: 1) irradiação das células epiteliais não infectadas; 2) células epiteliais irradiadas antes da infecção; 3) irradiação dos vírus antes da infecção; 4) irradiação das células previamente infectadas pelo HSV-1. A viabilidade celular foi obtida pelo teste da redução do MTT e os efeitos citopáticos por observação em

microscopia de luz. Resultados: A viabilidade celular de culturas irradiadas crescidas em déficit nutricional, independentemente do número de irradiações, foi sempre significativamente menor que aquela de culturas não-irradiadas e crescidas nas condições ideais de concentração de sfb (10 %). A viabilidade celular de culturas não infectadas foi similar em todos os grupos. O número de irradiações influenciou o crescimento celular positiva e proporcionalmente ao número de irradiações, exceto para o grupo 660 nm/ 3 J/cm². Nenhuma diferença nos efeitos citopáticos foi observada entre os grupos, independentemente do número de irradiações nas 3 condições do estudo. A viabilidade celular de todos os grupos não mudou nem pela irradiação das células nem do vírus antes da inoculação nas células. A viabilidade de células infectadas antes da irradiação foi significativamente maior que o controle quando 2 irradiações foram realizadas. Conclusão: Nas condições deste estudo a radiação laser em baixa intensidade é capaz de aumentar o crescimento de células Vero crescidas em déficit, no entanto, não o suficiente para atingir o crescimento característico dessas células crescidas nas suas condições ideais. O número de irradiações influencia o crescimento das células de forma positiva e proporcional ao número de irradiações, exceto para o parâmetro 660 nm/ 3 J/cm². A radiação laser não altera nem a susceptibilidade das células à infecção, nem a virulência do HSV-1. No entanto, ela prolonga a viabilidade das células infectadas pelo HSV-1. Efeitos positivos da fototerapia que tem sido relatados clinicamente parecem ser devido a efeitos no hospedeiro não relacionados com a replicação viral nas células infectadas

Palavras-Chave: 1 Herpes simples – Radiação laser – Fototerapia 2 – Fototerapia – Células Vero 3 – Diagnóstico bucal

Eduardo FP. *In vitro* effect of phototherapy with low intensity laser (660 and 780 nm) on HSV-1 and monkey epithelial cells (Vero) [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

Purpose: The clinical effects attributed to phototherapy relative to Herpes simplex lesions have included prevention of lesion formation, speeding the healing of lesions, and decreasing the frequency of recurrent lesions. The mechanisms underlying these findings have not been established yet. The aim of this *in vitro* study was to analyze the effect of phototherapy on epithelial cells, on HSV-1, and on infected epithelial cells in culture. **Material and Methods:** Cultures of HSV-1 and infected or non-infected monkey epithelial cells (Vero cell line) grown in deficient media (2 % fetal bovine serum-fbs) were used. The laser irradiation was delivered using a GaAlAs laser (660 and 780 nm, focal spot of 3.6 mm²). One, two and three irradiations with 6 hour-intervals were done. The experimental groups were: Control: non-irradiated; 660 nm/3 J/cm² (28 sec); 660 nm/5 J/cm² (38 sec); 780 nm/3 J/cm² (19 sec), and 780 nm/5 J/cm² (25 sec). The HSV-1 cytopathic effects and the cell viability of irradiated cultures and controls were analyzed in four different conditions: 1) irradiation of non-infected epithelial cells; 2) epithelial cells irradiated prior infection; 3) virus irradiated prior infection; and 4) irradiation of HSV-1 infected cells. The cell viability was assessed by the reduction of the MTT test and the cytopathic effects by the light microscopy observation. **Results:** The cell viability of irradiated cultures grown in nutritional deficit, independently of the irradiation numbers, was always significantly smaller than that of non-irradiated cultures grown at the ideal serum concentration

condition (10 %). The cell viability of non-infected cells was similar amongst the groups. The number of irradiations influenced the cell growth positively and proportionally to the number of irradiations, except for the 660 nm/3J/cm² group. Any variation in cytopathic effects was observed amongst the experimental groups, independently of the irradiation numbers at the 3 conditions analyzed. The cell viability of all experimental groups were not altered either by irradiation of the cells or of the virus prior infection. The viability of infected cells prior irradiation was significantly higher than that of non-irradiated cultures when 2 irradiations were done. Conclusion: The experimental conditions for this study demonstrate that the phototherapy is capable of enhancing the growth of Vero cells grown under nutritional deficit conditions, however, not enough to reach the characteristic cell growth of cells grown at the ideal serum concentration condition. The number of irradiations influences the cell growth positive and proportionally, except when the parameter 660 nm and 3 J/cm² was used. The laser radiation does not change either the susceptibility of the Vero cell to the HSV-1 infection or the HSV-1 virulence; however, prolongs the cell viability of HSV-1 infected cells. Positive benefits of phototherapy that have been reported clinically would appear to be due to host effects unrelated to viral replication in infected cells.

Key words: 1 – Herpes simplex – Laser radiation – Phototherapy 2 – Phototherapy – Vero cells 3 – Oral diagnosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Laser de AlGaAs (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil)32
- Figura 4.2 - Suporte desenvolvido para aplicação padronizada do laser nos poços (Capela de fluxo laminar com suporte para a irradiação do laser e placa pronta para ser irradiada)35
- Figura 4.3 - Placa de 96 poços, para cultivo celular.....39
- Figura 5.1 - Curvas de crescimento de células Vero cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de soro fetal bovino. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas; a, b: significativamente maiores que os demais grupos no mesmo tempo experimental.44
- Figura 5.2 - Curvas de crescimento das células Vero irradiadas uma vez com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias.45
- Figura 5.3 - Curvas de crescimento das células Vero irradiadas duas vezes com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias com intervalo de 6 horas entre as irradiações.46
- Figura 5.4 - Curvas de crescimento das células Vero irradiadas três vezes com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias com intervalo de 6 horas entre as irradiações.46
- Figura 5.5 - Curvas de crescimento de células Vero crescidas em meio contendo 2 % de soro fetal bovino dos experimentos com 1, 2 ou 3 irradiações ou no experimentos das células não tratadas, somente crescidas em diferentes concentrações de soro.48
- Figura 5.6 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 660 nm e na densidade de energia de 3 J/cm² após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %.....49

- Figura 5.7 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 660 nm e na densidade de energia de 5 J/cm² após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %.....50
- Figura 5.8 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 780 nm e na densidade de energia de 3 J/cm² após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os grupos irradiados contra o controle 2 %.51
- Figura 5.9 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 780 nm e na densidade de energia de 5 J/cm² após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %.52
- Figura 5.10 - Placa de 96 poços, para cultivo celular Viabilidade celular das células Vero irradiadas com laser em baixa intensidade antes da inoculação do vírus HSV-1 após 96 h de infecção. a: estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,01$); A: estatisticamente diferente do grupo irradiado somente 1 vez ($p < 0,05$).55
- Figura 5.11 - Viabilidade celular da célula Vero, inoculada com vírus HSV -1 previamente irradiado após 96 h da inoculação.....57
- Figura 5.12 - Viabilidade celular da célula Vero inoculada com o vírus HSV -1 e posteriormente irradiada após 96 h de infecção. A: Significativamente maior que os dados de 1 irradiação do mesmo grupo ($p < 0,01$)......59

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 4.1 - Parâmetros das irradiações | 34 |
| Quadro 5.1 - Dados do ECP a partir da diluição seriada de fator 10 da suspensão do HSV..... | 42 |
| Quadro 5.2 - Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero irradiadas antes da inoculação do HSV..... | 53 |
| Quadro 5.3- Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero inoculadas após a irradiação do vírus HSV | 56 |
| Quadro 5.4 - Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero infectadas com o vírus HSV-1 e irradiadas com os diferentes parâmetros..... | 58 |

SUMÁRIO

| | p. |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 16 |
| 2.1 Laser..... | 16 |
| 2.2 Terapia convencional: antivirais..... | 19 |
| 2.3 Terapia com laser em baixa intensidade..... | 21 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 29 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 4.1 Cultura de célula | 30 |
| 4.2 Vírus-padrão: cultivo e titulação | 31 |
| 4.3 laser | 32 |
| 4.4 Experimentos..... | 33 |
| 4.5 Grupos Experimentais | 35 |
| 4.5.1 Fase 1 | 36 |
| 4.5.1.1 Determinação da concentração de soro fetal bovino | 37 |
| 4.5.1.2 Análise do crescimento celular | 38 |
| 4.5.2 Fase 2 | 39 |
| 4.5.3 Fase 3 | 40 |
| 4.5.4 Fase 4 | 41 |
| 4.6 Análise estatística | 41 |
| 5 RESULTADOS | 42 |
| 5.1 Titulação do HSV | 42 |
| 5.2 Concentração de soro fetal bovino | 43 |
| 5.3 Fase 1 | 44 |
| 5.4 Calibração dos experimentos | 47 |
| 5.5 Fase 2 | 53 |
| 5.6 Fase 3 | 55 |
| 5.7 Fase 4 | 57 |
| 6 DISCUSSÃO | 60 |

| | |
|---------------------------|----|
| 7 CONCLUSÕES | 69 |
| REFERÊNCIAS | 70 |
| ANEXOS | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O vírus do herpes simples (HSV) produz a infecção viral mais comum na cavidade oral. O HSV tipo 1 está associado a mais de 90 % das infecções orais, e o tipo 2 a infecções genitais. Mais de 90 % da população adulta tem anticorpos para o HSV e estima-se que um terço desta população está sujeita a infecções recorrentes, que aparecem como erupções vesiculares em lábios ou intra-orais.

Pacientes com recorrências freqüentes de herpes simples podem ser tratados pela administração profilática de agentes antivirais locais tais como o aciclovir. Outros recebem o tratamento durante os episódios recorrentes para diminuir a duração da lesão e a dor. As preocupações com esses tratamentos residem na baixa eficácia e nos custos. Adicionalmente, vacinas não estão sendo desenvolvidas para essa infecção.

Terapias alternativas para o tratamento de herpes simples têm sido apresentadas e comparadas com as terapias que utilizam drogas anti-virais. Entre elas, destacamos a fototerapia com o laser em baixa intensidade que por suas características influencia a reparação de tecidos, sem apresentar os efeitos colaterais deletérios dos antivirais. No entanto, os autores estão preocupados em entender os mecanismos básicos dessa terapia, uma vez que existe pouca informação sobre o efeito da luz visível e do infravermelho próximo nessa infecção.

Assim, estudos *in vitro* da infecção pelo HSV-1 em células epiteliais em cultura se justificam, podendo fornecer informações relevantes sobre o mecanismo de ação da fototerapia independente de sua ação no sistema imunológico do hospedeiro.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O vírus do Herpes simples

O vírus do herpes simples pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*. A subfamília *Alphaherpesviridae* é caracterizada pela especificidade de hospedeiros infectados, rápido espalhamento em cultura, manifestações predominantemente cutâneas e capacidade de estabelecer infecções primárias latentes não exclusivamente em gânglios sensoriais. O herpes simples é subdividido em dois grupos: HSV-1 e HSV-2 (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990).

O HSV tem como característica estrutural um genoma de DNA de fita dupla, capsídeo icosaédrico, envelope lipoprotéico e entre os tipos 1 e 2 encontra-se homologia entre algumas áreas dos genomas (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990; EPSTEIN; SCULLY, 1991).

O envoltório viral promove a adsorção dos vírus à célula susceptível, liberando o seu nucleocapsídeo dentro do citoplasma da célula hospedeira, onde o DNA será liberado no citoplasma da célula infectada e ocorrerá a formação de novas partículas virais a partir do metabolismo celular do hospedeiro (EPSTEIN; SCULLY, 1991).

A multiplicação do HSV ocorre no núcleo celular, e o período de eclipse é de 5 a 6 horas em cultura de células monoestratificadas, sendo que o título do vírus aumenta exponencialmente até aproximadamente 17 horas após a infecção, tempo

no qual cada célula produz cerca de 60 mil partículas fixas das quais cerca de 200 são infecciosas.

Os vírus são liberados por um processo de brotamento das células infectadas. A replicação viral ocorre com uma síntese seqüencial ordenada do RNA mensageiro induzido pelo vírus, enzimas, DNA viral e proteínas virais estruturais, culminando na reunião das partículas infecciosas virais; ao mesmo tempo, a produção de DNA do hospedeiro declina e cessa (FIELDS; KINPE; CHANOCK, 1990).

Nos indivíduos susceptíveis à infecção com HSV, notadamente sem anticorpos preexistentes, a primeira infecção pelo HSV-1 é definida como infecções primárias (10 % dos casos). Uma vez estabelecida a infecção ocorre a ativação do sistema imunológico e dependendo da competência deste haverá ou não a manifestação clínica da doença. Após a infecção primária, o vírus não é erradicado do hospedeiro permanecendo latente nos gânglios sensoriais, apesar da presença de anticorpos específicos. Quando estimulados, os vírus migram através das fibras nervosas até o epitélio, provocando uma infecção recorrente (90 % dos casos), devido à imunidade adquirida durante a infecção primária (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990). Ocasionalmente ocorre uma viremia, onde os vírus se disseminam pelo sangue e órgãos distantes não bloqueados por anticorpos levando a infecções recorrentes (EPSTEIN; SCULLY, 1991).

A infecção pelo HSV-1 geralmente limita-se à boca e orofaringe, podendo ser transmitida por gotículas de saliva ou através de contato direto de indivíduos susceptíveis com secreções infectadas de vírus (fluido de vesícula labial). Embora os fatores humorais e celulares do hospedeiro combatam a infecção, eles não previnem a latência e não necessariamente são efetivos para inibir subseqüentemente a reativação ou a reinfecção. Anticorpos, em associação com as

células NK (*natural killer*) agem modificando a latência. Um aumento no número de anticorpos é associado com a redução da recorrência do HSV, enquanto a deficiência de anticorpos é associada com o aumento da severidade da doença (EPSTEIN; SCULLY, 1991; ROIZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1990).

A infecção inicial pelo vírus HSV-1 é freqüentemente assintomática, o contato ocorre entre 6 meses a 3 anos de idade em cerca de 50 % dos casos, as vezes pode manifestar-se primariamente como gengivoestomatite herpética ou mais seriamente como conjuntivite, eczema herpético e encefalite esporádica. O quadro clínico associado a gengivoestomatite herpética tem como características, lesões na cavidade bucal acompanhada por febre, mal estar e linfadenopatia (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990; EPSTEIN; SCULLY, 1991).

Nos quadros recorrentes, o primeiro sintoma apresentado é o prurido seguido do aparecimento de pequeno número de vesículas dispostas em grupamentos que se rompem em aproximadamente 24 horas deixando pequenas úlceras de 1 a 3 mm de tamanho, que coalescem e cicatrizam entre 7 a 14 dias. As lesões podem se localizar em toda cavidade bucal. Quando localizadas no lábio, as vesículas se rompem, ulceram e são recobertas por uma crosta acastanhada. Em alguns casos, as lesões podem também envolver narinas, olhos e orelhas. Complicações do herpes labial são raras, mas se a higienização não for adequada, infecções bacterianas podem levar a um quadro de impetigo. Ocasionalmente a recorrência do HSV pode desencadear um quadro de eritema multiforme (ROIZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1990).

O HSV é reativado particularmente por luz ultravioleta, irradiação ionizante, estresse, infecções sistêmicas, traumas, menstruação e em alguns estádios de imunossupressão. É evidente que algumas pessoas infectadas tornam-se imunes e

nunca desencadeiam recorrências; outras estão infectadas, desenvolvem anticorpos, mas tem defesa imunológica restrita, tornando-se estas, presumidamente, mais predispostas à recorrência. A recorrência, que pode ou não estar associada à sintomatologia clínica, usualmente manifesta-se como herpes labial ou herpes intra-oral, podendo desenvolver lesões recorrentes de 2 a 5 vezes ao ano (HAWKE, 1979).

As alterações patológicas induzidas pela replicação do HSV são similares tanto na infecção primária quanto na recorrente, mas variam na extensão dos efeitos citopáticos e clínicos. Estas mudanças representam uma combinação de morte celular mediada pelo vírus associada à resposta inflamatória. As células quando infectadas pelo vírus perdem a sua membrana citoplasmática e formam células gigantes multinucleadas. Quando as células se rompem forma-se uma vesícula contendo uma grande quantidade de vírus acumulados entre as camadas de epiderme e derme; o fluido vesicular também contém células inflamatórias e células gigantes multinucleadas (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990; ROIZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1990).

2.2 Terapia convencional: antivirais

O diagnóstico precoce é fundamental para a eficácia da terapia com antivirais. Isto só foi possível com os avanços nas pesquisas de biologia molecular, que possibilitaram a identificação de enzimas necessárias à replicação viral, conseguindo-se assim diferenciar funções virais e funções celulares do hospedeiro.

Outro problema está relacionado com a resistência do hospedeiro aos agentes antivirais (ROIZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1990).

O idoxuridine, em 1950, foi o primeiro antiviral a ser utilizado no tratamento de queratoconjuntivite (manifestação primária do HSV), e depois testado para outras infecções do HSV como agente terapêutico tópico, pois inibe a replicação do vírus. Efeito alérgico foi relacionado a este medicamento (ROIZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1990; FIELDS; KINPE; CHANOCK, 1990).

Mais tarde, em 1960, o vidarabine foi sintetizado e utilizado como potente agente antineoplásico. Paralelamente, observou-se que essa droga possuía atividade antiviral contra o HSV. Mas somente em 1978, o vidarabine foi aprovado para ser utilizado como agente sistêmico no tratamento da encefalite pelo herpes simples. No entanto, essa substância apresentava efeitos colaterais na maioria dos pacientes. Os efeitos mais comuns eram distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarréias) e neurológicos, incluindo; tremores, alucinações e psicoses (ROIZMAN et al., 1990; FIELDS; KINPE; CHANOCK, 1990; HAWKE, 1979).

Subseqüentemente surgiu uma segunda geração dos antivirais. Entre eles se destaca o aciclovir, que mostrava atividade seletiva pela enzima timidinaquinase (TK - *Thymidine Kinase*). Este deveria ser menos tóxico e mais efetivo do que a vidarabine representando um avanço importante na terapia antiviral, servindo como protótipo para futuras drogas antivirais (FIELDS et al., 1990; HAWKE, 1979). No entanto, apesar do aciclovir ser bem tolerado, ele também causava efeitos colaterais. Dentre eles, o de maior severidade era a alteração renal. Náuseas e vômitos também foram relatados quando da administração de doses orais. O aciclovir, além de atuar nos vírus, também atua sobre a DNA das células do hospedeiro. Porém, estudos realizados avaliando possíveis potenciais carcinogênicos, teratogênico ou

mutacional dessa droga, mostraram não haver evidência significativa destes efeitos no humano (EPSTEIN; SCULLY, 1991; FIELDS et al., 1990; HAWKE, 1979; SHAFER, 1985).

Alguns laboratórios apresentaram a atividade do ganciclovir contra o citomegalovirus (CMV) em cultura de células, mostrando também a eficiência deste antiviral contra diversos tipos de herpes vírus, quando comparado com o aciclovir. Os efeitos colaterais de maior importância são neutropenia e trombocitopenia, outros efeitos foram relatados como: náuseas, vômitos e dores de cabeça severas, o que acabou limitando o uso desse medicamento (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990; SHAFER, 1985).

Embora o aciclovir tenha sido utilizado como agente antiviral mais importante no tratamento de infecções pelo HSV tanto na forma profilática para pacientes com grande risco de reativação do vírus, quanto no tratamento, este quando em pacientes imunocomprometidos tem apenas efeito mínimo (SCULLY; SAMARANAYAKE, 1990).

2.3 Terapia com laser em baixa intensidade

O uso da radiação laser na medicina e na odontologia tem sido pesquisado nas últimas décadas. Recentes estudos têm indicado que a terapia com laser em baixa intensidade pode reduzir a severidade e aumentar a velocidade de reparação de lesões da mucosa bucal associadas à quimioterapia e à radioterapia (BASFOR, 1986; RUBENSTEIN et al., 2004; MIGLIORATI et al., 2001). Os mecanismos

envolvidos nos efeitos observados com este tipo de laser preconizam a fototerapia com lasers em baixa intensidade ou bioestimulação, como terapia coadjuvante das lesões de mucosa bucal. Esses mecanismos não estão completamente elucidados na literatura.

Porção considerável da radiação visível é absorvida pela melanina, no entanto, de acordo com Anderson, existe uma “janela ótica” da epiderme que permite que quantidades consideráveis de radiação visível e infravermelha penetrem na derme. (ANDERSON; PARRISH; 1981). Dados têm demonstrado que radiações em baixa intensidade do visível e infravermelho penetram na pele na profundidade de muitos milímetros (KOLARI, 1985; AL-WATBAN; ZHANG, 1994; KOLAROVA; DITRICHOVA; WAGNER, 1999). Com relação a possíveis foto-receptores, tem sido demonstrado que cromóforos da cadeia respiratória mitocondrial, bem como da membrana celular são capazes de absorver a luz na região do vermelho e do infravermelho próximo (TRIPHLOVA; KARU, 1989; KARU, et al. KARU, 1989; SMITH, 1991). Subseqüente formação de espécies de oxigênio reativo (ROS), alterações do pH intracelular e das concentrações de cálcio podem ser parte dos caminhos da transdução de sinal das respostas biológicas induzidas pela luz (laser) de baixa intensidade (KARU, 1987; FRIEDMANN et al., 1991; LUBART et al., 1992).

Os lasers em baixa intensidade mais utilizados em odontologia são os de arseneto de gálio-alumínio (GaAIs), do tipo de semicondutor de dupla heterojunção, que torna possível sua emissão de forma contínua em temperatura ambiente. O bombeamento dos lasers semicondutores pode ser realizado de várias maneiras, entre elas, por um outro laser. Porém a forma mais usual é a utilização do semicondutor na forma de um diodo, com excitação produzida por uma corrente elétrica. Eles apresentam potências médias de algumas centenas de *miliwatts*, em

sua maioria apresentam emissão contínua ou em alguns casos emitem pulsos curtos e com comprimentos de onda na faixa do vermelho até infravermelho. Além disso, é sabido que estes comprimentos de onda atingem grande profundidade de penetração nos tecidos, pois a água e a hemoglobina oferecem um baixo coeficiente de absorção para este tipo de radiação (RIBEIRO, 2000).

A literatura mostra que não há efeitos colaterais e contra-indicações relacionadas à fototerapia com laser em baixa intensidade, desde que essa terapia seja administrada corretamente. Também não há efeitos prejudiciais relacionados a esta terapia, excetuando-se a incidência do feixe, direta ou indiretamente nos olhos, o que é evitado com a utilização de óculos de proteção apropriados (RIBEIRO, 2000; TUNER; HODE, 1998).

Os lasers estimulam fibroblastos, colaborando na produção de fibras colágenas mais ordenadas, determinando um melhor padrão de cicatrização nas lesões (BASFORD, 1986). Esta modalidade terapêutica pode proporcionar efeitos antiinflamatórios, analgésicos e bioestimulantes, aumentando a microcirculação da área irradiada, promovendo melhores condições de reparação (MESTER; YASZSAGI-NAGI, 1973).

Até hoje, nenhum efeito mutagênico resultante de luz no comprimento de onda visível ou infravermelho foi observado, no limite de dose preconizado para esta terapia. Estudos *in vitro* mostram que células neoplásicas não são estimuladas por luz laser (SENEDA, 2005).

O processo de bioestimulação laser é um fenômeno fotobiológico, não sendo necessário que a luz seja coerente, os fotoaceitadores primários são componentes da cadeia respiratória, que dependendo da dose podem ser estimulados ou inibidos. A radiação laser é apenas uma desencadeadora para a regulação do metabolismo

celular, por esse motivo é que são necessárias apenas baixas doses de energia. O efeito sobre a célula vai depender do estado fisiológico que esta se encontra. Os efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis (KARU, 1989; RIBEIRO, 2000).

A irradiação *in vitro* com um laser de He-Ne em fibroblastos da pele de um humano sadio resulta em mudanças metabólicas. Os resultados da avaliação destas mudanças metabólicas sugerem que o aumento ou modulação da atividade celular poderia ser determinado pela fototerapia com laser em baixa intensidade e, portanto, ser utilizada para propósitos terapêuticos, desde que as densidades de energia e potência apropriadas fossem estabelecidas (MESTER; YASZSAGI-NAGI, 1985).

Em uma análise dos efeitos da fototerapia com laser em baixa intensidade na proliferação de fibroblastos em gengiva *in vitro* proveniente de uma cultura primária de humano, concluiu-se que a ação da fototerapia com laser em baixa intensidade promove uma proliferação celular e a exposição em menor tempo resulta em um aumento da atividade proliferativa (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2002), que demonstraram resposta proliferativa de fibroblastos de gengiva em cultura sem prejuízo de produção de procolagênio como resposta à fototerapia com laser em baixa intensidade.

A fototerapia com laser em baixa intensidade não é baseada em elevação térmica, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim majoritariamente, em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e ou fotobiológicos nas células e nos tecidos. Quando a luz interage com as células ou tecidos, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas.

Este efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem sua função debilitada (KARU, 1989; RIBEIRO, 2000).

Trabalhos encontrados na literatura mostram que a terapia com o laser em baixa intensidade tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúrias ao tecido (RIBEIRO, 2000).

Acredita-se que a energia da luz laser é mais bem aproveitada onde é mais necessária. Isso também tem sido observado em células cultivadas onde o efeito dos lasers em baixa intensidade é mais pronunciado quando aplicados sobre culturas crescidas em déficit nutricional (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; MARQUES et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006).

Células em cultura e no tecido podem ser estimuladas por algumas doses de luz laser (MESTER, MESTER; MESTER, 1985). Da mesma forma, vários lasers apresentam ação na redução dos efeitos da infecção pelo HSV (SCHINDL; NEUMANN; 1999; EDUARDO; CECCHINI; CECCHINI, 1996; OLIVEIRA, 2002; CECCHINI; CECCHINI; EDUARDO, 1995; LIZARELLI, 2005).

Quando lesões do herpes simples recorrente perilabiais foram submetidas a um total de irradiações diárias por 10 dias com laser de 690 nm (80 mW/cm^2 , 48 J/cm^2) houve diminuição significativa da incidência local da infecção recorrente num seguimento dos pacientes por cerca de 1 ano (SCHINDL; NEUMANN; 2000)

Os benefícios do laser em baixa intensidade na cicatrização de tecidos moles bucais têm sido demonstrados em casos clínicos (CECCHINI; CECCHINI; EDUARDO, 1995; OLIVEIRA, 2002). Lesões na cavidade bucal, como herpes e úlceras aftosas, foram irradiadas com laser de GaAIs (790 nm), em doses que dependem da área de irradiação. A fototerapia com laser em baixa intensidade

diminuiu a sintomatologia dolorosa imediatamente e acelerou o processo de reparação dessas lesões. A associação de lasers em alta e baixa intensidade tem sido realizada como complemento em terapias convencionais. A associação dos lasers de Nd:YAG e de GaAlAs provou ser eficaz no tratamento destes tipos de lesão (CECCHINI; CECCHINI; EDUARDO, 1995; EDUARDO; CECCHINI; CECCHINI, 1996).

Pelas características de atuação do laser em baixa intensidade, de melhora da qualidade e velocidade da reparação, seria esperado que os mesmos tivessem atividade na terapia das lesões causadas pelo HSV. Além disso, achados clínicos já mostraram a ação do laser em baixa intensidade tanto na fase prodrômica (OLIVEIRA, 2002) como em lesões já estabelecidas, causados pelo vírus do HSV-1 (SCHINDL; NEUMANN, 1999; CECCHINI; CECCHINI; EDUARDO, 1995; EDUARDO; CECCHINI; CECCHINI, 1996).

A irradiação com laser na fase prodrômica do herpes em humanos é bastante interessante, pois desfavorece a erupção das vesículas (OLIVEIRA, 2002).

Os estudos *in vitro* que analisam a atuação do laser sobre células infectadas pelo HSV são raros (KORNER; BAHMER; WIGARD, 1989; PERRIN et al., 1997). Na verdade, na literatura compulsada somente em um trabalho foi estudado o HSV-1 (KORNER; BAHMER; WIGARD, 1989), enquanto no outro o vírus estudado foi o HSV-2 (PERRIN et al., 1997).

Utilizando células Vero e HSV-1, KORNER et al., (1989) realizaram estudo do efeito da radiação laser na faixa do infravermelho sobre a replicação viral e a influência desta radiação sobre células imunocompetentes. Os autores utilizaram o laser de Nd:YAG, mostrando que não houve inativação do vírus com o laser, nem que o efeito citopático do vírus foi influenciado pela irradiação. No entanto, houve

uma redução de 50 % em vírus nas culturas incubadas com leucócitos irradiados, mostrando um efeito estimulador do sistema imune.

O outro estudo realizado com células epiteliais em cultura (células Vero) e HSV, *in vitro*, também analisou a latência da infecção *in vivo*, utilizando camundongos. Por essa razão, ao invés de utilizar o HSV-1, que é o agente etiológico das lesões bucais e peri-bucais, utilizou o HSV-2 que tem patogenicidade mais fraca em termos de efeito letal nestes animais que o HSV-1. O laser utilizado foi um laser em baixa intensidade com comprimento de onda de 850 nm, porém no estudo *in vitro*, os dados de densidade de energia, modo e tempo de irradiação não foram informados. Como resultados da fase *in vitro* os autores mostraram que o laser não modificou nem o poder infeccioso do HSV-2, nem a capacidade das células Vero, hospedeiras, de suportar a replicação viral. No estudo *in vivo*, os parâmetros utilizados foram: $4\text{J}/\text{mm}^2$ (160 s, 3000 Hz e 20 mW) nos gânglios cervicais dos camundongos durante 15 dias com irradiação feita em dias alternados. Os autores deduziram que a radiação laser realizada nos gânglios na fase aguda da infecção preveniu o estabelecimento da latência do HSV-2. No entanto, o laser não causa efeito quando o gânglio já está com a infecção latente.

Alguns autores estão preocupados com os mecanismos básicos da fototerapia em baixa intensidade uma vez que existe pouca informação sobre o efeito da luz visível e do infravermelho próximo nas reações imunológicas antivirais (RALLIS, SPRUANCE, 2000; SCHINDL, NEUMANN, 2000). De acordo com os dados da literatura, um efeito indireto nos componentes celulares e humorais do sistema imune sendo envolvido nas respostas antivirais, poderia ser considerado mais do que um efeito direto da inativação do vírus (KORNER; BAHMER; WIGARD, 1989),

no entanto, os caminhos exatos certamente precisam ser elucidados (SCHINDL; NEUMANN, 2000).

Dessa forma, muitas questões estão por serem respondidas. Não se sabe se o laser diminui o tempo de cicatrização das lesões causadas pelo HSV-1 por agir diretamente ou indiretamente no vírus ou se age basicamente na imunologia local do paciente aumentando sua defesa contra o vírus.

O objetivo deste trabalho foi tentar responder algumas destas questões lançando mão da técnica do cultivo celular, onde é possível isolar células epiteliais, infectá-las com o vírus HSV-1 e usando a fototerapia com laser em baixa intensidade analisar os efeitos do laser nesse sistema. Irradiando-se culturas epiteliais com baixas intensidades antes da inoculação do HSV-1 será possível analisar se a radiação laser aumenta ou não a resistência dessas células à infecção. Além disto, utilizando o laser em células já infectadas será possível ver se estas intensidades de radiação agem na biologia do vírus durante a infecção. Paralelamente poderemos observar se culturas virais irradiadas alteram seu potencial de causar efeitos citopáticos quando inoculadas em células epiteliais.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivamos nesse trabalho responder aos seguintes questionamentos:

- 1- Os lasers de Arseneto de Gálio-Alumínio (GaAlAs) nos comprimentos de onda de 660 e 780 nm bioestimulam células epiteliais em cultura? (fase 1)
- 2- Esses lasers alteram os efeitos citopáticos causados pelo HSV-1 e a viabilidade das células epiteliais irradiadas antes da inoculação do vírus? (fase 2)
- 3- Esses lasers alteram os efeitos citopáticos causados pelo HSV-1 e a viabilidade das células epiteliais quando suspensões virais são irradiadas antes de serem inoculadas? (fase 3)
- 4- Células epiteliais infectadas pelo HSV-1 apresentam efeitos citopáticos e a viabilidade alterados após a irradiação? (fase 4)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de Células

As células Vero (células de linhagem de rim de macaco, ATCC CRL 1587) foram cultivadas em meio de cultura mínimo de Eagle (MME, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB - Cultilab); e antibióticos (Penicilina G cristalina 100U/ml e Estreptomicina 0,1mg/ml).

O cultivo das células foi realizados em intervalos de 5 a 7 dias. Para a subcultura, o meio de crescimento das células foi decantado e, a seguir, a monocamada celular foi lavada, por 2 a 3 vezes consecutivas, com 10 ml de solução de tripsina (1:250, Difco) a 0,25% em associação com EDTA 0,02% pH 8,0. Quando as células apresentavam-se desprendidas, foram ressuspensas em 3 ml de meio de crescimento, igual ao meio de manutenção, porem com 10% de SFB. A seguir, esta suspensão de células foi ressuspensa em 60 ml de meio Eagle com 10% de SFB e distribuída em novas garrafas e tubos de cultura. As culturas foram, então mantidas em posição estacionaria em estufa a 37°C.

4.2 Vírus-padrão: cultivo e titulação

O herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1) utilizado havia sido previamente cultivado em células VERO e utilizado como vírus padrão em ensaios de padronização da reação de amplificação gênica pela polimerase (PCR).

Monocamadas de células Vero em frascos de cultivo de 75 cm² de área cultivável com aproximadamente 75 % de confluência foram inoculadas com 2 ml de suspensão viral e mantidas à 37 °C por 1 hora. Após este período, acrescentou-se 18 ml de meio de manutenção Eagle MME contendo 2 % de SFB e antibióticos (100 µg/ml de penicilina G e 1.000 µg/ml de estreptomicina). As culturas foram incubadas à 37 °C e observadas diariamente em microscópio de fase invertido.

Uma vez que o efeito citopático atingiu cerca de 80 % da monocamada, essa foi deslocada do fundo do frasco e a suspensão obtida foi coletada em tubos de ensaio de 50 ml e estocada a – 20 °C até o momento do uso.

Células Vero foram cultivadas em tubos e inoculadas com suspensão de HSV - 1, visando a determinação do título viral. Diluições seriadas de fator 10, de 10⁻¹ a 10⁻⁸ da suspensão viral foram preparadas em meio Eagle MME contendo 2% de SFB e alíquotas de 0,1 ml de cada diluição inoculadas em quadruplicata nos respectivos tubos. Após incubação a 37 °C por uma hora foram acrescentados 0,9 ml de meio de manutenção MME contendo 2 % SFB e antibiótico. Culturas sem inóculo viral foram suplementadas com o mesmo meio de cultura e mantidas como controle negativo. As culturas foram incubadas e observadas diariamente em microscópio invertido.

O título viral foi determinado matematicamente pelo método de Reed-Muench (HAWKES, 1979), e a suspensão viral agora com a titulação definida foi novamente congelada e estocada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

4.3 Laser

O equipamento utilizado foi o laser de AlGaAs (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil) (Figura 4.1) com ponteiros de diferentes diodos emitindo no comprimento de onda vermelho visível (660 nm) com até 40 mW de potência e, no infravermelho (780 nm) com até 70 mW de potência. A área de emissão em ambas as ponteiros foi de $0,036\text{ cm}^2$. Antes e após cada irradiação, a emissão laser teve sua potência aferida por um medidor de potência (powermeter da marca Coherent). O valor da emissão foi ajustado para os valores desejados por meio do medidor de potência e não pelo valor apresentado no painel de controle do equipamento.



Figura 4.1- Laser de AlGaAs (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil)

Todos os procedimentos com o laser de GaAIs foram realizados seguindo todas as normas de segurança NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8 (ZEZELL, 2001).

4.4 Experimentos

Os experimentos foram realizados em quatro fases, no sentido de responder os questionamentos da proposição. Assim, a fase 1 foi realizada para verificar a ação da radiação laser em baixa intensidade sobre o crescimento de culturas de células Vero não infectadas pelo HSV-1. Nas fases seguintes foram analisadas os efeitos das radiações em células Vero e/ou em suspensões de HSV-1 em diferentes situações, a saber: na fase 2 as células Vero foram irradiadas antes da inoculação do HSV-1; na fase 3 culturas do HSV-1 foram irradiadas antes da inoculação nas células Vero e finalmente, na fase 4 células previamente infectadas pelo HSV-1 foram irradiadas.

Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada, sabendo-se que a distância entre o laser e a superfície de aplicação é crítica, a distância entre o feixe laser e as células foi constante (Figura 4.2). A aplicação do laser seguiu os parâmetros descritos no Quadro 4.1, e foi feita através da base das placas de cultivo celular, para experimentos de irradiação de células, ou do fundo dos tubos de ensaio tipo Eppendorf, para o experimento de irradiação do vírus, portanto, o feixe laser foi aplicado diretamente na monocamada celular ou na suspensão vírus HSV- 1. As placas e os tubos são compostos por poliestireno transparente e têm menos de 1 mm de espessura. A área cultivável das placas é de 3 mm². A placa foi acomodada

dentro de uma máscara escura, deixando somente a área a ser irradiada exposta. Todos os grupos experimentais foram expostos às mesmas condições de estresse ambiental, tais como: temperatura, umidade e luz. Quando mais de uma irradiação foi realizada, o intervalo entre as irradiações foi de 6 horas (PEREIRA et al., 2002).

| Comprimento de onda (nm) | Potência (W) | Modo de irradiação | Área de irradiação (mm ²) | Tempo de irradiação (s) | Densidade de energia (J/cm ²) |
|--------------------------|--------------|--------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|
| 660 | 40 | Contato e pontual | 3,6 | 28 | 3 |
| | | | | 38 | 5 |
| 780 | 70 | Contato e pontual | 3,6 | 19 | 3 |
| | | | | 25 | 5 |

Quadro 4.1- Parâmetros das irradiações



Figura 4.2 - Suporte desenvolvido para aplicação padronizada do laser nos poços (Capela de fluxo laminar com suporte para a irradiação do laser e placa pronta para ser irradiada)

4.5 Grupos experimentais

- Controle
- 660 nm/3 J/cm²
- 660 nm/5 J/cm²
- 780 nm/3 J/cm²
- 780 nm/5 J/cm²

4.5.1 Fase 1:

Celula Vero foram cultivadas como descrito anteriormente no item 4.1.

Para a obtenção do número de células viáveis para a padronização dos experimentos foi realizada a contagem celular: Para tanto, de suspensões de células Vero originadas de frascos de 75 cm² obtidas como descrito no item 4.1, foram retirados 0,2 ml e transferidos para um novo tubo de ensaio, contendo 0,6 ml de uma solução de 0,4 % de azul de Trypan. Uma das câmaras de um hemocitômetro recebeu essa nova suspensão de células, as quais foram contadas sob microscópio de luz.

Somente as células mortas apareceram coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan, devido a lesões na membrana celular. A exclusão destas células da contagem geral serviu para a determinação do número de células viáveis. O número total de células viáveis originárias dos frascos foi obtido através da mesma sentença matemática, excluindo as células mortas, a saber:

$$\underline{\text{Número total de células não coradas X diluição (4) X } 10^4}.$$

Número de quadrados do hemocitômetro usados para a contagem (4)

4.5.1.1 determinação da concentração de soro fetal bovino

Antes de iniciar as fases propostas desse projeto foi necessário encontrar a porcentagem de soro fetal bovino ideal para realizar os experimentos com irradiação laser. Essa concentração de soro deveria suplementar o meio de cultivo das células de forma que houvesse crescimento significativamente menor que aquele característico das células Vero. Esse crescimento característico é aquele observado quando o meio é suplementado com 10 % de soro. Assim, foram testadas duas concentrações menores buscando colocar as células em déficit nutricional, para que se o laser tivesse efeito, esse pudesse ser observado (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Para esse experimento foram utilizadas 4 placas de 96 poços e, 12 poços de cada placa receberam 1×10^4 células em meio fresco por poço. Esse número de poços (n=48) foi suficiente para analisar em quadruplicata a atividade mitocondrial das células de 3 grupos experimentais (10 %, 5 % e 2 % de soro fetal bovino) em 4 tempos (20, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento).

Após a determinação da concentração ideal de soro, que foi de 2 %, foi realizado o experimento proposto para a Fase 1. Para esse experimento foram utilizadas 12 placas de 96 poços e 15 poços em cada placa recebeu 1×10^4 células em meio fresco por poço. Esse número de poços foi suficiente para analisar em triplicata a atividade mitocondrial das células dos 5 grupos experimentais descritos anteriormente (item 4.5), em 4 tempos (20, 24, 48 e 72 horas após a última irradiação) e em experimentos com 1, 2 e 3 irradiações.

4.5.1.2 análise do crescimento celular

Os dados do crescimento celular foram obtidos através da análise da viabilidade celular. Essa análise se baseou no teste de atividade mitocondrial das células pelo método da redução do MTT (brometo de 3- (dimetiltiazol-2-yl) 2,5-difeniltetrazólio). Esse teste quantifica a conversão do MTT, que é insolúvel em água, em um formazan solúvel. O formazan, de cor azul purpúrea, é solubilizado e então, sua concentração é determinada pela densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de 562 nm. Para a realização do teste foram preparados os reagentes A e B. O reagente A era composto por 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá) em 10 ml de PBSA e o reagente B foi constituído por 1 g de SDS (dodecil sulfato de sódio; QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M de HCl (ácido clorídrico).

Os meios de cultura dos poços foram aspirados e substituídos por 100 µL de meio MME fresco. Adicionou-se 10 µL do reagente A em cada poço, incluindo os poços sem células, que serviram de controle negativo para a leitura no espectrofotômetro, bem como de espaços entre os poços que seriam irradiados ou não (Figura 4.3). Depois de 4 h de incubação com o reagente A, em estufa a 37 °C e protegido da luz com folha de papel alumínio, 100 µL do reagente B foi adicionado a cada poço. Usando pipetador multicanal essa solução foi gentilmente homogeneizada. As culturas retornaram para incubação em estufa a 37 °C *overnight*, também protegida de luz. Decorrido esse período as culturas foram misturadas gentilmente novamente com auxílio de pipetador multicanal e levadas para leitura de sua absorbância em espectrofotômetro ELISA (Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra).

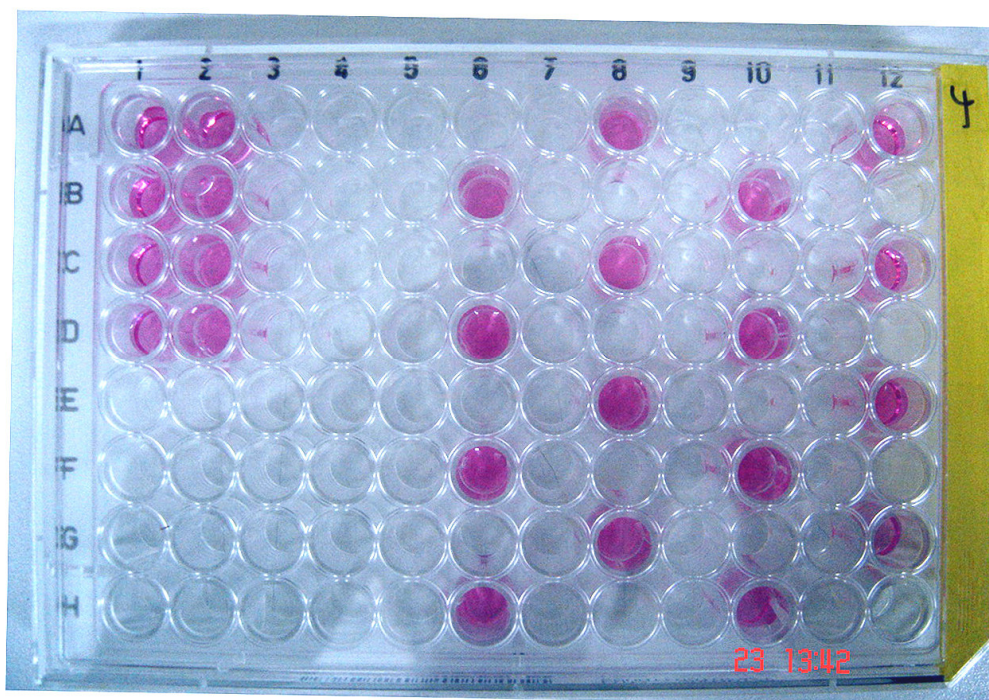


Figura 4.3 - Placa de 96 poços, para cultivo celular

4.5.2 Fase 2:

Para essa fase foram plaqueadas 1×10^4 células por poço de placas de 96 poços. Foram utilizada 3 placas, uma para cada quantidade de irradiações (1, 2 ou 3) e 20 poços por placa, para os 5 grupos e 4 réplicas, ou seja, esses experimentos foram realizados em quadruplicada.

As irradiações foram realizadas da mesma forma descrita para a Fase 1. Logo após a última irradiação, o meio de cultura dos poços foi substituído por 0,1 ml de suspensão viral. Após uma hora de adsorção em estufa a 37 °C, 0,9 ml de meio

fresco foi adicionado a cada poço. As placas foram então novamente incubadas e a cada 24 horas eram analisadas em microscópio invertido de fase para leitura dos efeitos citopáticos. Ao final de 96 horas de observação essas placas foram submetidas à análise de viabilidade celular pelo teste da redução do MTT como descrito para a Fase 1.

4.5.3 Fase 3:

O plaqueamento das células Vero, a inoculação do HSV-1, as leituras do efeito citopático a cada 24 horas e a mensuração da atividade mitocondrial das células ao final do experimento foram realizadas da mesma forma descrita na fase 2 (item 4.5.2). Nesta fase as irradiações foram realizadas na suspensão viral antes da inoculação.

Suspensões virais contendo 1 dose de HSV-1 foram colocadas em tubos de ensaio tipo Eppendorf (500 µl por tubo) e receberam ou não irradiação laser, conforme descrito no item experimentos (item 4.5). Quando mais de uma irradiação era realizada, após cada irradiação os tubos contendo as suspensões virais eram estocados a – 20 °C. Depois de completadas as irradiações nas suspensões virais, estas eram inoculadas nas culturas de células Vero.

4.5.4 Fase 4:

O plaqueamento das células Vero, a inoculação do HSV-1, as irradiações, as leituras do efeito citopático a cada 24 horas e a mensuração da atividade mitocondrial das células ao final do experimento foram realizadas da mesma forma descrita na fase 2 (item 4.5.2). Nesta fase as irradiações foram realizadas em células Vero previamente infectadas.

4.6 Análise estatística

Os dados de densidade óptica, ou seja, de viabilidade celular, de todas as fases experimentais, obtidos em triplicada (Fase 1) ou quadruplicata (Fases 2, 3 e 4) para cada tempo experimental de cada grupo, foram apresentados como média \pm o erro padrão da média (SEM). Os dados foram tratados pelo teste Kolmogorov-Smirnof (Lilliefors) para análise da normalidade, e como todos apresentaram distribuição normal foram comparados pelo teste paramétrico ANOVA. O nível de significância adotado foi o de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Titulação do HSV

A titulação do HSV foi realizada, pelo método de Reed-Muench, a partir de uma cultura de vírus padrão que foi inoculada em tubos contendo monocamada de células Vero, plaqueadas 24 horas antes da inoculação, A suspensão viral foi inoculada em quatro tubos por diluição seriada de fator 10. A seguir a cada 24 horas foram analisados os efeitos citopáticos (ECP) do HSV nas células Vero de cada tubo para a obtenção do índice ECP e da porcentagem de ECP. Com estes dados, apresentados no Quadro 5.1, foi possível se calcular a concentração viral em 1 dose da suspensão que foi a concentração viral ideal para o desenvolvimento dos experimentos propostos.

| Diluição do vírus | | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} |
|--|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Índice ECP (Tubos ECP/Total de Tubos) | | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 1/4 | 0/4 | 0/4 |
| Tubos com ECP | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| Tubos sem ECP | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 4 |
| Totais Acumulados | Tubos com ECP ← | 21 | 17 | 13 | 9 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| | Tubos sem ECP → | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 7 | 11 |
| | Índice ECP | 21/21 | 17/17 | 13/13 | 9/9 | 5/5 | 1/4 | 0/7 | 0/11 |
| | % de ECP | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 25 | 0 | 0 |

Quadros 5.1 - Dados do ECP a partir da diluição seriada de fator 10 da suspensão do HSV

$$\text{Distância proporcional} = \frac{\text{.....\%acima de 50\% -50\%.....}}{\% \text{ acima de 50\%} - \% \text{ abaixo de 50\%}}$$

$$\text{DICT}_{50} = \log \text{ da diluição acima 50\%} - (\text{DP} \times 1)$$

$$10^{-5} - (0,6 \times 1) = -5,6$$

$$10^{5,6} \text{ DICT}_{50} / 100\text{ml} = 1 \text{ dose infectante}$$

$$10^{4,6} = 10 \text{ doses}$$

$$10^{3,6} = 100 \text{ doses}$$

O título viral do HSV-1 padrão obtido e utilizado em todos os ensaios foi de $10^{5,6}$ TCID₅₀, que corresponde a uma dose infectante.

5.2 Concentração de soro fetal bovino

Foram comparados os crescimentos celulares com 2, 5 e 10 % de soro e as curvas de crescimento estão apresentadas na Figura 5.1.

Com 2 e 5 % de soro as culturas de célula apresentaram crescimentos semelhantes e significativamente menores que aqueles das células controle, ou seja crescidas em meio com 10 % de soro (Figura 5.1). Por essa razão optamos por trabalhar nas diversas fases desse projeto com a suplementação do meio de cultivo com apenas 2 % de soro fetal bovino.

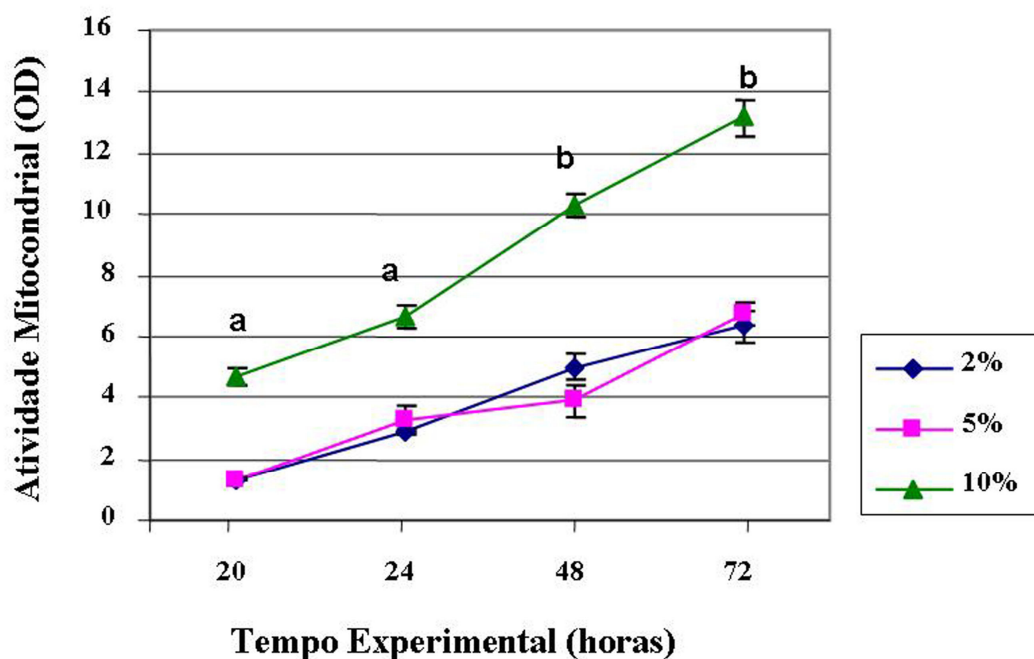


Figura 5.1- Curvas de crescimento de células Vero cultivadas em meio contendo diferentes concentrações de soro fetal bovino. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas; a, b: significativamente maiores que os demais grupos no mesmo tempo experimental

5.3 Fase 1:

Células epiteliais crescidas em meio suplementado com 2 % de soro fetal bovino e sem nenhum outro tratamento foram irradiadas uma, duas ou três vezes com intervalos de 6 h pelo laser de GaAIs nos parâmetros descritos em Materiais e Métodos (item 4). A viabilidade das células epiteliais irradiadas e controle (não irradiadas) está representada nas figuras 5.2, 5.3 e 5.4.

Houve crescimento significativo em todos os grupos experimentais, independente do número de irradiações utilizadas. Houve diferenças significativas

quando foram comparados o 1º tempo (20 horas) e o último tempo (72 horas; $p < 0,01$), dentro dos mesmos grupos.

Não houve diferença no número de células viáveis nem entre os grupos experimentais quando comparados entre si, nem quando comparados com os controles, nas três condições de irradiações (1, 2 ou 3) às quais as células foram submetidas.

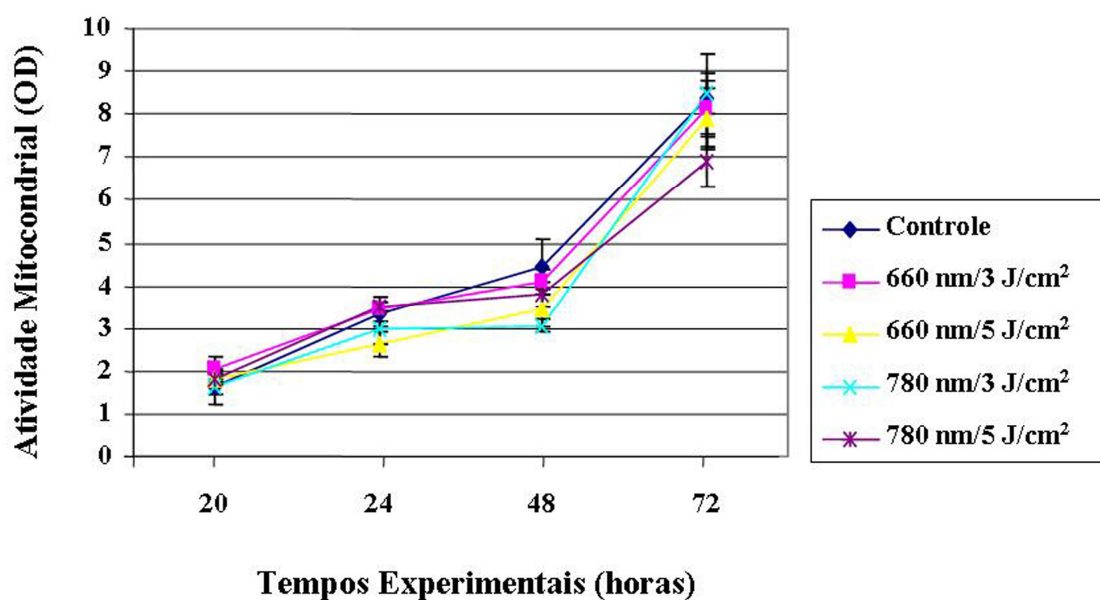


Figura 5.2- Curvas de crescimento das células Vero irradiadas uma vez com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias

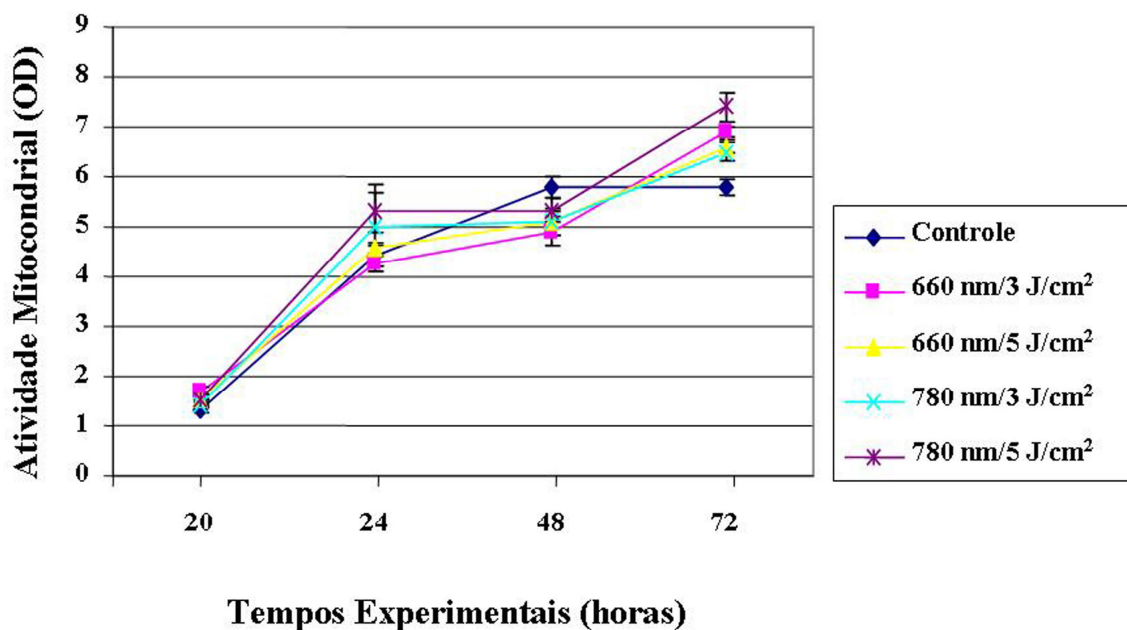


Figura 5.3 - Curvas de crescimento das células Vero irradiadas duas vezes com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias com intervalo de 6 horas entre as irradiações

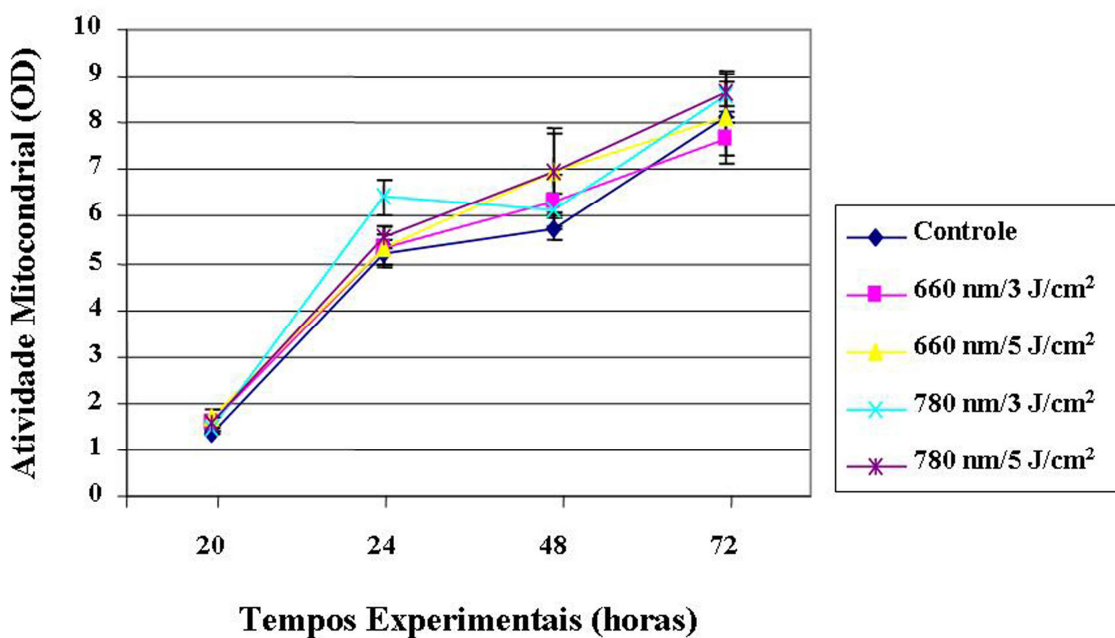


Figura 5.4- Curvas de crescimento das células Vero irradiadas três vezes com o laser de diodo nos diferentes comprimentos de onda e energias com intervalo de 6 horas entre as irradiações

5.4 Calibração dos experimentos

Para verificar a calibração dos nossos experimentos fizemos uma comparação estatística entre os controles dos diversos experimentos feitos até aqui. Ou seja, dos experimentos com 1, 2 e 3 irradiações, bem como daquele feito para testar as concentrações de soro. As curvas de crescimento dos grupos controle dos experimentos feitos com 1, 2 ou 3 irradiações e daquele onde as concentrações de soro foram testadas estão representadas na figura 5.5. O grupo controle foi aquele que não foi irradiado e apresentou o crescimento característico das células Vero crescidas em meio de cultivo contendo 2 % de soro fetal bovino.

Existe diferença estatisticamente significativa em todos os grupos experimentais e controle entre os tempos 20 e 72 horas ($p < 0,05$) mostrando que houve crescimento significativo no período experimental. Entre as curvas não houve diferença estatística.

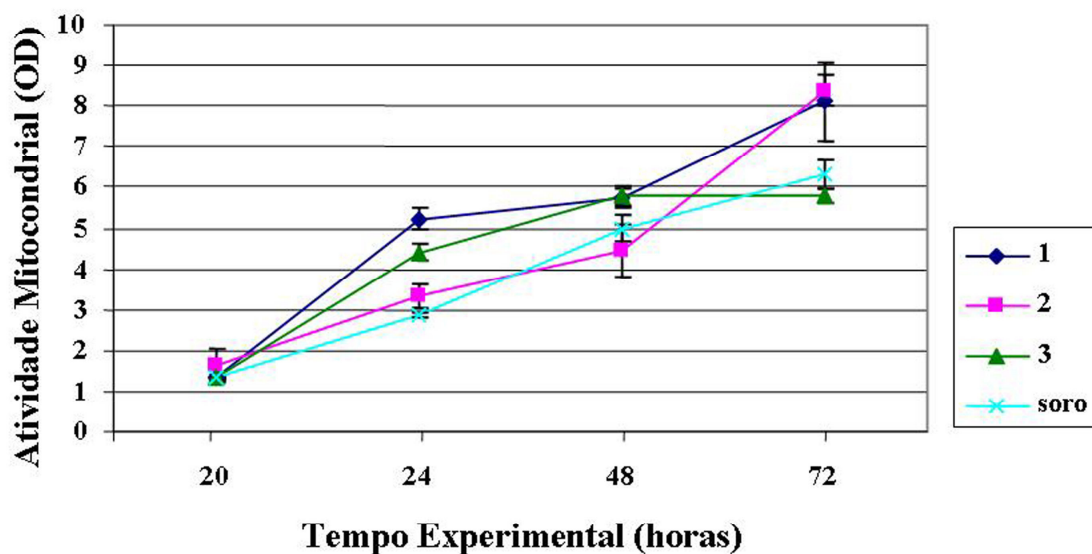


Figura 5.5 - Curvas de crescimento de células Vero crescidas em meio contendo 2 % de soro fetal bovino dos experimentos com 1, 2 ou 3 irradiações ou no experimentos das células não tratadas, somente crescidas em diferentes concentrações de soro

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nas três condições de irradiações as quais as células foram submetidas, vale investigar se o número de irradiações poderia influir no crescimento celular dentro dos mesmos grupos experimentais. Assim, foram feitas análises estatísticas comparando dentro dos mesmos grupos os resultados de 1, 2 e de 3 irradiações. Essa comparação pode ser feita, porque nossos resultados estão calibrados, ou seja, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle dos três experimentos, portanto é válido comparar os demais resultados desses experimentos.

As curvas de crescimento dos grupos irradiados com o laser de diodo de 660 nm na densidade de energia de 3 J/cm^2 estão expressas na Figura 5.6.

Não houve diferenças estatísticas em função do número de irradiações entre os grupos irradiados e o controle com 2 % de soro fetal bovino, exceto por um ponto, no segundo tempo experimental (24 h; $p < 0,01$) quando o grupo irradiado por 3 vezes apresentou crescimento superior aos demais grupos irradiados e ao controle com 2 % de soro fetal bovino (Figura 5.6). Todos os grupos apresentaram número de células viáveis inferiores ($p < 0,01$) ao daquelas do grupo controle crescido nas condições ideais, ou seja, com 10 % de soro fetal bovino (Figura 5.6).

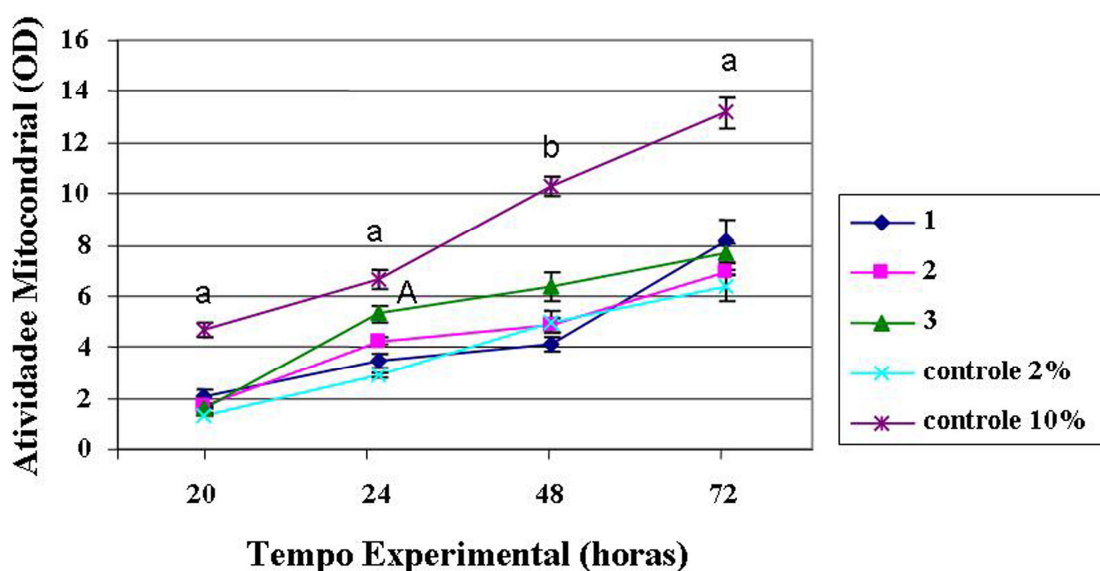


Figura 5.6 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 660 nm e na densidade de energia de 3 J/cm^2 após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %

As curvas de crescimento dos grupos irradiados com o laser de diodo de 660 nm na densidade de energia de 5 J/cm^2 estão expressas na Figura 5.7.

Não houve diferenças experimentais em função do número de irradiações, exceto por dois pontos, no segundo (24 h; $p < 0,01$) e terceiro (48 h; $p < 0,01$) tempos experimentais quando o grupo irradiado por 3 vezes apresentou crescimento superior aos demais grupos irradiados e ao controle com 2 % de soro fetal bovino (Figura 5.7). Todos os grupos apresentaram número de células viáveis inferiores ($p < 0,01$) ao daquelas do grupo controle crescido nas condições ideais, ou seja, com 10 % de soro fetal bovino (Figura 5.7).

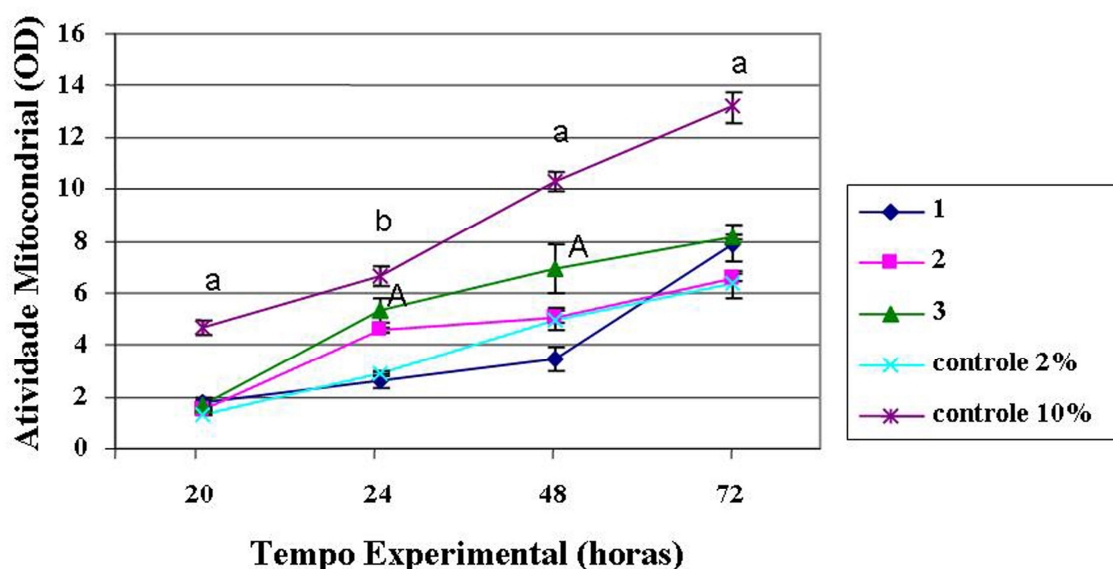


Figura 5.7 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 660 nm e na densidade de energia de 5 J/cm^2 após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %

As curvas de crescimento dos grupos irradiados com o laser de diodo de 780 nm na densidade de energia de 3 J/cm^2 estão expressas na Figura 5.8.

Não houve diferenças experimentais em função do número de irradiações, exceto por dois pontos, no segundo (24 h; $p < 0,05$) e quarto (72 h; $p < 0,01$) tempos

experimentais quando o grupo irradiado por 3 vezes apresentou crescimento superior aos demais grupos irradiados e ao controle com 2 % de soro fetal bovino (Figura 5.8). E no grupo irradiado 2 vezes que foi significativamente maior que o controle com 2 % de soro fetal bovino no segundo tempo experimental (24 h; $p < 0,01$). Todos os grupos apresentaram número de células viáveis inferiores daquelas do grupo controle crescido nas condições ideais, ou seja, com 10 % de soro fetal bovino (Figura 5.8).

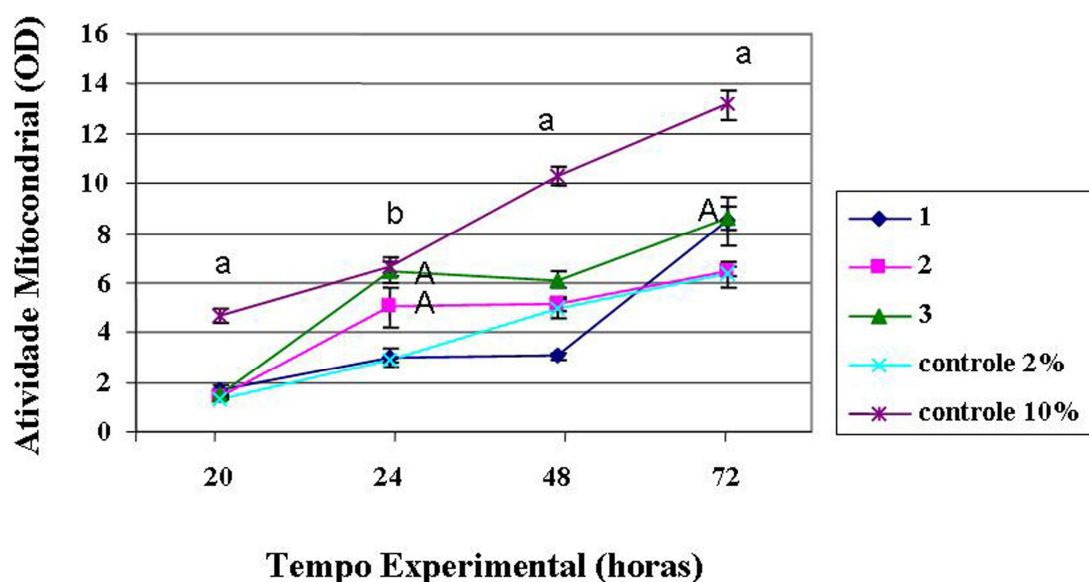


Figura 5.8 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 780 nm e na densidade de energia de 3 J/cm^2 após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os grupos irradiados contra o controle 2 %

As curvas de crescimento dos grupos irradiados com o laser de diodo de 780 nm na densidade de energia de 5 J/cm^2 estão expressas na Figura 5.9.

Houve diferenças estatísticas entre as culturas irradiadas por 3 vezes que apresentaram viabilidade celular superior a do grupo controle com 2 % de soro fetal bovino desde o segundo tempo experimental (24 h; $p < 0,05$) até o final do experimento (72 h; $p < 0,01$) (Figura 5.9). Todos os grupos apresentaram número de células viáveis inferiores ($p < 0,01$) ao daquelas do grupo controle crescido nas condições ideais, ou seja, com 10 % de soro fetal bovino (Figura 5.9).

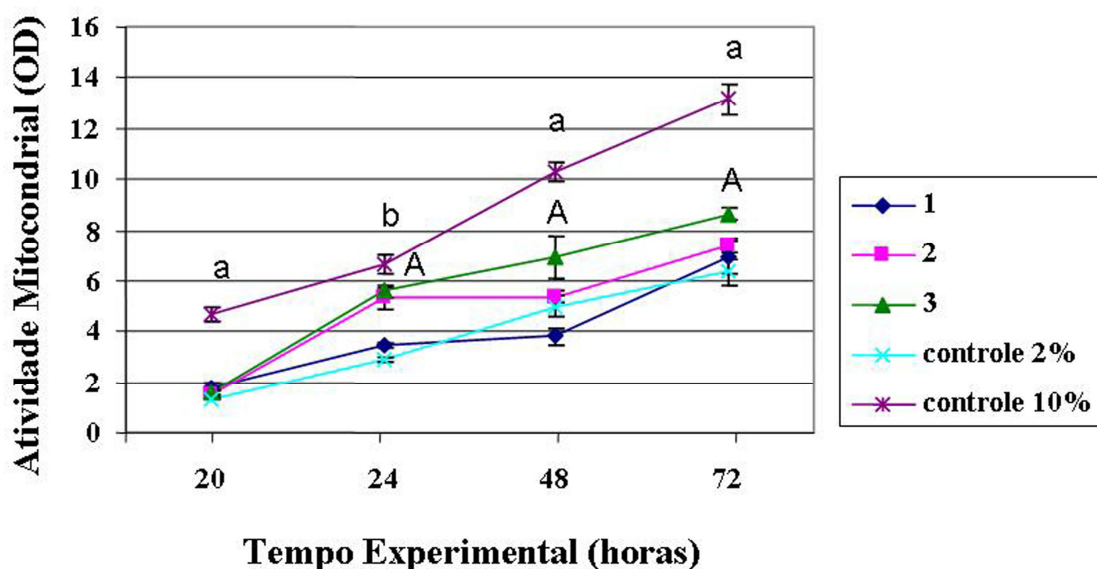


Figura 5.9 - Curvas de crescimento de células Vero irradiadas com o laser de diodo no comprimento de onda de 780 nm e na densidade de energia de 5 J/cm² após 1, 2 ou 3 irradiações, com intervalos de 6 horas. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas. Letras minúsculas indicam diferenças entre o controle 10 % e os demais grupos. Letras maiúsculas indicam diferenças entre o grupo irradiado contra o controle 2 %.

5.5 Fase 2:

Os efeitos citopáticos do HSV sobre células Vero previamente irradiadas com os diferentes parâmetros estão representados no Quadro 5.2.

Células Vero não irradiadas e não infectadas não apresentaram alterações citopáticas durante todo o período experimental

As alterações das células infectadas começaram a ser observadas em 24 horas após a inoculação do HSV e aumentaram no decorrer do período experimental em todos os grupos. Não houve diferença evidente na evolução do aparecimento de efeito citopático nas culturas dos diversos grupos.

| Irradia- ções | 20 horas | | | 24 horas | | | 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | |
|--------------------------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|--------|--------|----------|-------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Controle | +/+++ | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | +++ | ++/++ | ++/++ | +++ | +++ | +++ |
| 660 nm/ 3 J/cm ² | +/+++ | + | + | ++ | ++ | + | ++ | ++/ | ++ | ++/+++ | ++/+++ | ++/+++ | +++ | +++ | +++/ ++++ |
| 660 nm/ 5 J/cm ² | +/+++ | + | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +++ | ++ | ++ | +++/+ | +++ | +++ | +++/+ | +++/+ | +++ |
| 780 nm/ 3 J/cm ² | + | +/+ | + | + | +/+ | + | ++ | ++ | ++ | ++/+++ | ++/+++ | ++/+++ | +++ | +++ | +++/ ++++ |
| 780 nm/ 5 J/cm ² | +/+++ | + | + | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++/ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Quadro 5.2- Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero irradiadas antes da inoculação do HSV. Cada (+) corresponde a 25 % da monocamada celular exibindo células com efeito citopático.

Os resultados das viabilidades celulares obtidas nos experimentos desta fase estão expressos na Figura 5.10.

Quando as células Vero foram submetidas a somente uma e três irradiações não foi observada diferença estatística na atividade mitocondrial em função dos diferentes grupos experimentais.

Nas culturas submetidas a duas irradiações foi possível se observar atividade mitocondrial maior que das células controle, ou seja, não irradiadas, somente no grupo irradiado com 780 nm e 3 J/cm² ($p < 0,05$).

Para os grupos irradiados com 660 nm (3 e 5 J/cm²), o número de irradiações não influenciou na viabilidade celular após 96 horas da inoculação do HSV.

Para o grupo irradiado com 780 nm e 3 J/cm², o número de irradiações influenciou na viabilidade celular após 96 horas da inoculação do HSV. A atividade mitocondrial das culturas Vero após 2 irradiações foi significativamente maior que a de uma irradiação ($p < 0,01$) e foi similar à atividade mitocondrial após 3 irradiações.

Para os grupo irradiado com 780 nm e 5 J/cm², o número de irradiações influenciou na viabilidade celular após 96 horas da inoculação do HSV. A atividade mitocondrial das culturas Vero após 3 irradiações foi significativamente maior que a de uma irradiação ($p < 0,05$) e foi similar à atividade mitocondrial após 2 irradiações.

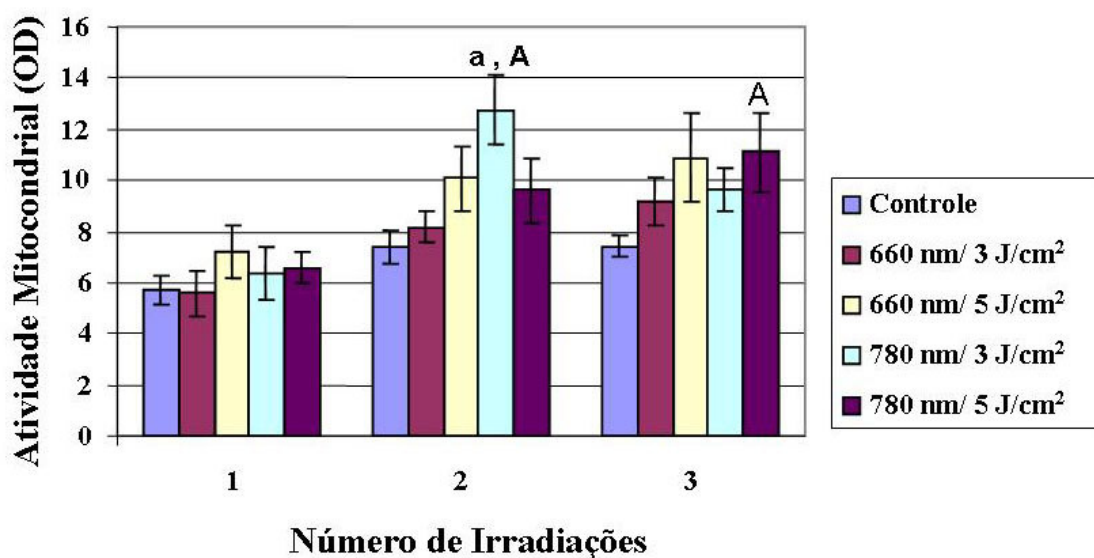


Figura 5.10 - Viabilidade celular das células Vero irradiadas com laser em baixa intensidade antes da inoculação do vírus HSV-1 após 96 h de infecção. a: estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,01$); A: estatisticamente diferente do grupo irradiado somente 1 vez ($p < 0,05$)

5.6 Fase 3

O efeito citopático em células Vero inoculadas com o HSV previamente irradiado com os diferentes parâmetros está representada no Quadro 5.3.

As alterações das células Vero inoculadas com o HSV previamente irradiado começaram a ser observadas em 24 horas após a inoculação do HSV e aumentaram no decorrer do período experimental em todos os grupos. Não houve diferença evidente na evolução do aparecimento de efeito citopático nas culturas dos diversos grupos.

| Irradia- ções | 20 horas | | | 24 horas | | | 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | |
|--------------------------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|----|----|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Controle | + | + | + | + | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++/++ | ++/++ | ++/++ | +++ | +++ | +++/+ |
| | | | | | + | + | + | | | + | + | + | | | +++ |
| 660 nm/ 3 J/cm ² | + | + | +/+ | + | + | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++/++ | +++ | +++ | +++/+ |
| | | | + | | | + | + | | | | | + | | | +++ |
| 660 nm/ 5 J/cm ² | +/+ | +/+ | ++ | ++ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | ++/++ | +++ | ++/++ | +++ | +++/+ | +++ |
| | + | + | | | + | + | | | | + | | + | | +++ | |
| 780 nm/ 3 J/cm ² | + | +/+ | + | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | ++/++ | ++/++ | ++/++ | +++/+ | +++/+ | +++/+ |
| | | + | | + | = | + | | | | + | + | + | +++ | +++ | +++ |
| 780 nm/ 5 J/cm ² | + | + | + | +/+ | + | +/+ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++/++ | ++/++ | +++/+ | +++ | +++/+ |
| | | | | + | | + | | | | | + | + | +++ | | +++ |

Quadro 5.3 - Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero inoculadas após a irradiação do vírus HSV. Cada (+) corresponde a 25 % da monocamada celular exibindo células com efeito citopático.

A irradiação do vírus HSV antes da inoculação não influenciou a viabilidade celular das culturas de células Vero após 96 horas da inoculação, nem em função dos grupos nem em função do número das irradiações como ilustra a figura 5.11.

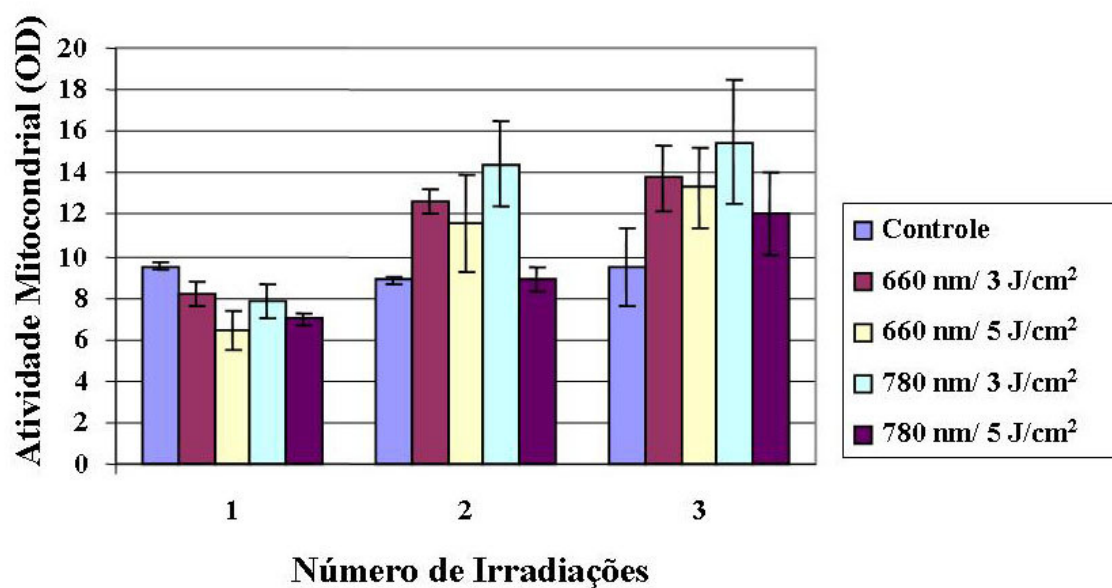


Figura 5.11 – Viabilidade celular da célula Vero, inoculada com vírus HSV –1 previamente irradiado após 96 h da inoculação

5.7 Fase 4

O efeito citopático do HSV sobre células Vero infectadas com o vírus HSV-1 e irradiadas com os diferentes parâmetros está representada no Quadro 5.4.

As alterações das células Vero infectadas com o vírus HSV-1 e irradiadas com os diferentes parâmetros começaram a ser observadas em 24 horas após a inoculação do HSV e aumentaram no decorrer do período experimental em todos os grupos. Não houve diferença evidente na evolução do aparecimento de efeito citopático nas culturas dos diversos grupos.

| | 20 horas | | | 24 horas | | | 48 horas | | | 72 horas | | | 96 horas | | |
|--------------------------------|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-----|-----|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| Irradia- ções | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Controle | +/+ | + | + | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | ++/++ | ++/++ | ++/++ | +++ | +++/+ | +++ |
| | + | | | + | + | + | | | | + | + | + | | +++ | |
| 660 nm/ 3 J/cm ² | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | ++/++ | ++/++ | ++/++ | ++ | +++/+ | +++/+ |
| | + | + | + | + | + | + | | | | + | + | + | | +++ | +++ |
| 660 nm/ 5 J/cm ² | + | + | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++/ | ++ | ++/ | ++/++ | ++/++ | +++ | +++ | +++ | +++/+ |
| | | | + | + | + | | +++ | | +++ | + | + | | | | +++ |
| 780 nm/ 3 J/cm ² | + | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++/ | ++ | ++/++ | ++/++ | ++/++ | +++/+ | +++ | +++ |
| | | + | + | + | + | + | | +++ | | + | + | + | +++ | | |
| 780 nm/ 5 J/cm ² | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | +/+ | ++ | ++ | ++ | +++ | ++/++ | +++ | +++/+ | +++/+ | +++/+ |
| | + | + | + | + | + | + | | | | | + | | +++ | +++ | +++ |

Quadro 5.4- Evolução do aparecimento de efeito citopático em células Vero infectadas com o vírus HSV-1 e irradiadas com os diferentes parâmetros. Cada (+) corresponde a 25 % da monocamada celular exibindo células com efeito citopático.

Quando as células Vero infectadas pelo HSV foram submetidas a somente uma ou três irradiações não foi observada diferença estatística na atividade mitocondrial em função dos diferentes grupos experimentais.

O número de irradiações influenciou a atividade mitocondrial das culturas infectadas e irradiadas. Todos os grupos irradiados apresentaram atividade mitocondrial após 96 horas quando irradiados por 2 vezes maior que quando irradiados somente uma vez ($p < 0,01$) e similares aos grupos irradiados por 3 vezes (Figura 5.12).

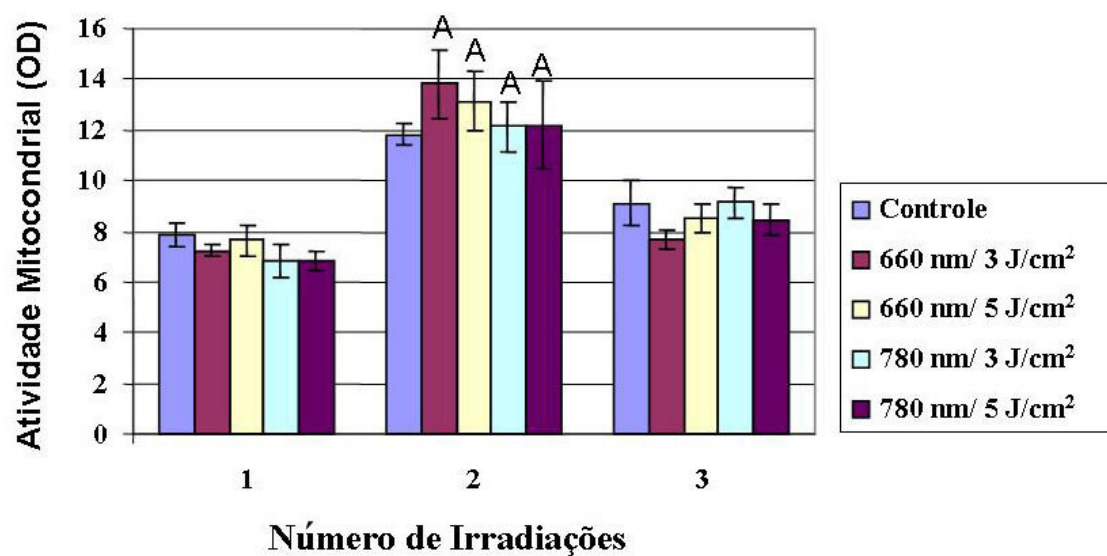


Figura 5.12 - Viabilidade celular da célula Vero inoculada com o vírus HSV -1 e posteriormente irradiada após 96 h de infecção. A: Significativamente maior que os dados de 1 irradiação do mesmo grupo ($p < 0,01$)

6 DISCUSSÃO

A terapia com laser em baixa intensidade é capaz de aumentar o crescimento de células Vero em cultura crescidas em déficit nutricional. No entanto, com os parâmetros utilizados neste estudo não foi possível se obter um crescimento similar àquele dessas células crescidas nas condições ideais de cultivo, ou seja, com 10 % de soro fetal bovino. Por outro lado, observou-se que quanto maior o número de irradiações maior foi o crescimento.

Apesar do laser nos parâmetros utilizados bioestimular células epiteliais em cultura, ele não foi capaz nem de alterar a susceptibilidade de células à infecção e nem de modificar a virulência do HSV-1. Porém, o laser causou um prolongamento da viabilidade de células epiteliais previamente infectadas.

A ação da fototerapia com laser em baixa intensidade sobre células mesenquimais, em especial fibroblastos, está bem estabelecida. Ela tem efeito de estimular o crescimento destas células. Esse efeito é particularmente evidente se a célula estiver com suas funções debilitadas. Em cultivo celular isso é conseguido quando usamos as células em déficit nutricional. Cada linhagem apresenta uma concentração ideal de soro fetal bovino (SFB) para responder à fototerapia com laser em baixa intensidade. Algumas células apresentam crescimento com a metade do SFB que normalmente elas necessitam para seu crescimento característico (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; MARQUES et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; FUJIHARA; HIRAKI; MARQUES, 2006), outras precisam que haja uma diminuição acentuada dessa concentração (PEREIRA et al., 2002). Assim como não existiam dados sobre o crescimento das células Vero em diferentes concentrações de SFB,

foram testadas três concentrações para o seu crescimento, 10 % (concentração ideal), 5 % e 2 %. Buscava-se uma concentração de SFB que não abolisse o crescimento das células Vero, mas que levasse a uma diminuição acentuada desse crescimento. Assim, observou-se que com o crescimento em meio de cultura com 2 % de SFB essa condição de estresse de células foi obtida, ou seja, houve crescimento, no entanto, esse foi significativamente menor que o das células crescidas com 10 % de SFB no meio de cultura. Assim foi estabelecido que nos experimentos subseqüentes a concentração de SFB do meio de cultura seria de 2 %.

Existem controvérsias relacionadas à forma de se realizar a fototerapia com laser em baixa intensidade, no entanto, quando as irradiações são repetidas o efeito benéfico desejado ocorre de maneira mais evidente (PEREIRA et al., 2002). Assim, resolvemos realizar as irradiações 1, 2 e 3 vezes com intervalos de 6 horas. Na verdade, em pacientes, normalmente esse intervalo é de 24 horas. No entanto, células em cultura apresentam um índice de divisão celular muito mais rápido que aquele observado *in vivo* e para simular a repetição das irradiações *in vivo* foi utilizado o tempo de 6 horas que já havia sido estabelecido anteriormente na literatura (PEREIRA et al., 2002).

Comparando as curvas crescidas de células Vero irradiadas nos quatro parâmetros utilizados (660 nm/ 3 J/cm²; 660 nm/ 5 J/cm²; 780 nm/ 3 J/cm²; 780 nm/ 5 J/cm²) não foi possível se observar diferenças nem com o controle nem entre os grupos irradiados entre si quando somente uma irradiação foi realizada. O mesmo ocorreu nas culturas que foram irradiadas 2 e 3 vezes. Esses experimentos foram realizados com um grupo controle, ou seja, sem irradiação e crescidos em 2 % de SFB para cada número de irradiações utilizadas. Assim, para poder se comparar o

crescimento das células nos mesmos grupos experimentais, porém com diferentes números de irradiações, havia a necessidade de se verificar a calibração dos dados. Para tanto, foi realizada a comparação estatística entre as viabilidades celulares dos grupos controles dos quatro experimentos até então realizados, a saber: comparação entre diferentes concentrações de soro, 1, 2 e 3 irradiações. Não houve diferenças entre estes controles, o que permitiu inferir que os demais dados das curvas de crescimento dentro dos mesmos grupos experimentais eram comparáveis.

No parâmetro 660 nm/ 3 J/cm², mesmo após 3 irradiações, o crescimento celular foi similar ao das culturas controle crescidas com 2 % de SFB e foi significativamente menor que o dos grupos crescidos com 10 % de SFB não irradiados. É sabido que esse parâmetro é capaz de bioestimular fibroblasto em cultura (ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Provavelmente, a energia gerada com esse parâmetro não tenha sido suficiente para bioestimular o crescimento das células Vero por se tratar de uma célula epitelial e, portanto, mais diferenciada que os fibroblastos, por exemplo. Isso pode ser verdade, uma vez que aumentando a densidade de energia deste mesmo comprimento de onda já houve diferença no crescimento de células que foram irradiadas 3 vezes.

Embora nos grupos de luz no infravermelho a influência do número de irradiações ficou mais evidente, tanto nos parâmetros 780 nm/ 3 J/cm² quanto 780 nm/ 5 J/cm², o grupo de luz visível (660 nm) com 5 J/cm² também sofreu influência do número de irradiações. Mais de uma irradiação levou a crescimentos significativamente maiores que os observados com 1 irradiação e no controle. De fato, já existem relatos na literatura onde um maior número de irradiações leva a efeito mais pronunciado do laser em baixa intensidade (HERMAN, KHOSLA, 1989; ALBERTINI et al., 2004).

Embora nenhum dos parâmetros das irradiações utilizadas, mesmo quando 3 irradiações foram realizadas, foram capazes de restituir o crescimento característico das células Vero crescidas nas condições ideais, o fato de 3 irradiações, em especial quando a luz infra-vermelha foi utilizada, ter causado crescimento maior que o do controle em déficit nutricional leva a discutir as formas como as lesões bucais e peribucais deveriam ser irradiadas.

O laser na luz visível tem efeito nas mitocôndrias. Assim, quando estimuladas pela fototerapia com laser em baixa intensidade essas mitocôndrias liberam mais ATP para a célula que leva a um aumento da taxa de proliferação. Ai fica a dúvida, essas mitocôndrias precisam ser bioestimuladas mais de uma vez para responderem, ou os efeitos dos lasers em períodos curtos de tempo podem ser somados quando a irradiação ocorre mais de uma vez? O que se sabe é que o efeito é imediato após a irradiação e que com a radiação laser não é ionizante, então não há efeito cumulativo nas células. Na verdade, elas respondem imediatamente e voltam a seu estado original. Por outro lado, Karu (1989) demonstrou que o efeito do laser sobre a mitocôndria não é só fisiológico, mas também morfológico, já que observou a presença de megamitocôndrias nas células irradiadas. Marques et al. (2004) também verificaram alterações morfológicas em mitocôndrias de células irradiadas. Assim fica a dúvida se o efeito do laser pode ser cumulativo já que as mitocôndrias alteradas poderiam se tornar mais susceptíveis a bioestimulação das próximas irradiações a que estas células fossem submetidas. Por outro lado, a repetição das irradiações poderia simplesmente estar estimulando células filhas e por isso células mesenquimais com taxa de proliferação mais alta, ou seja, tempo de divisão celular menor, teriam maior número de células filha que estariam sendo bioestimuladas, o que resultaria em crescimento mais significativo do que aqueles

observados em células epiteliais que crescem mais devagar, ou seja, apresentam tempo de divisão celular maior.

Sabendo pelos resultados até aqui observados que existe uma estimulação discreta das células Vero pela fototerapia com laser em baixa intensidade no que diz respeito ao crescimento celular, passou-se para uma nova fase do trabalho que buscou entender os mecanismos básicos do efeito da fototerapia com laser em baixa intensidade na infecção com o HSV-1.

Em primeiro lugar buscou-se verificar se a irradiação de células Vero antes da inoculação do vírus HSV-1 modificaria a susceptibilidade dessas células à infecção viral. Isso teria sentido, uma vez que a irradiação de gânglios de camundongos durante a fase aguda da infecção com o HSV-2 inibiu o estabelecimento da latência do vírus, ou seja, impediu que os gânglios fossem infectados (PERRIN et al., 1997).

Clinicamente já foi observado que quando o paciente apresenta apenas sintomas de infecção do HSV-1 e sinais iniciais como prurido e eritema local respectivamente, a fototerapia com laser em baixa intensidade leva à suspensão desses sinais e sintomas e a lesão não ocorre (CECHINI; CECHINI; EDUARDO; 1995). Adicionalmente, quando lesões peribucais da infecção do HSV-1 são irradiadas diariamente durante 10 dias, a ocorrência de lesões recorrentes é diminuída significativamente (SCHINDL; NEUMANN, 2000). Assim fica a dúvida se a fototerapia com laser em baixa intensidade interfere na susceptibilidade à infecção pela célula, ou se as lesões não ocorrem por uma alteração da imunidade local que debelaria os vírus e impediria sua chegada à célula epitelial.

Assim, esse modelo, onde as células são irradiadas *in vitro* e a seguir o HSV-1 é inoculado poderia trazer informações importantes sobre a susceptibilidade que a célula teria à infecção independentemente do sistema imunológico. Assim, as células

Vero foram irradiadas nos quatro parâmetros e, a seguir, foram inoculadas com suspensões de HSV-1. Os efeitos citopáticos foram observados diariamente através da microscopia de luz e ao final de 96 horas da inoculação a viabilidade das células foi analisada. Baseados nos achados iniciais deste estudo, onde as células irradiadas apresentaram maior crescimento que as controle, esperava-se observar maior número de células com efeito citopático nos grupos irradiados em relação ao controle não irradiado. No entanto, durante todo o experimento o aparecimento de células com efeito citopático foi similar em todos os grupos experimentais e ao controle. Os primeiros efeitos foram observados em 24 horas após a inoculação e foram aparecendo nas culturas de forma similar, independentemente, dos parâmetros utilizados e do número de irradiações.

Esse achado indica que, apesar das mitocôndrias terem sido bioestimuladas pelas irradiações, estas não interferiram nem na entrada dos vírus nas células e nem em sua replicação dentro das células infectadas. Com três irradiações, exceto para o grupo 660 nm/ 3 J/cm², o metabolismo celular aumentou, ou seja, houve mais crescimento celular que o das culturas controle não irradiadas, mas nem isso interferiu com a biologia do HSV-1. Isso foi uma surpresa, porque quando a célula é infectada pelo vírus, a duplicação do DNA viral é dependente da duplicação do DNA da célula, assim se com três irradiações houve maior replicação do DNA da célula, seria esperado que um maior número de partículas virais fossem formadas e, portanto, mais células seriam infectadas e maior número de células com o efeito citopático do HSV-1 seriam observadas. Apesar dos efeitos citopáticos terem sido similares nos diversos grupos deste estudo, um achado chamou a atenção, a viabilidade das células 96 horas após a inoculação foi maior para o grupo 780 nm/ 3

J/cm² que foi irradiado por mais de uma vez. Isto indica que a fototerapia com laser em baixa intensidade é capaz de manter a célula infectada viva por mais tempo.

Isto talvez explicasse o porquê das lesões não se manifestarem quando a fototerapia com laser em baixa intensidade é realizada na fase prodrômica da doença. Se as células infectadas não morrem não há formação de vesícula.

O não aparecimento de lesões da infecção pelo HSV-1 que é conseguido com a fototerapia com laser em baixa intensidade poderia ser também devido à ação da radiação laser sobre as partículas virais antes de serem inoculadas nas células. Poderia haver uma ação sobre os vírus de forma a diminuir a sua virulência, em sua capacidade de adsorção à célula susceptível. Para testar essa hipótese suspensões virais do HSV-1 foram irradiadas por 1, 2 e 3 vezes antes de serem inoculadas nas culturas de células Vero. Os efeitos citopáticos causados por vírus previamente irradiados e aqueles não irradiados foram similares tanto em função dos grupos experimentais quanto em função do número de irradiações a que as suspensões virais foram submetidas. Isso indica que a fototerapia com laser em baixa intensidade não exerce efeito na capacidade do vírus HSV-1 de se adsorver a membrana das células susceptíveis à infecção, nem na sua replicação dentro das células e nos efeitos que essa replicação causa nas mesmas. Mas, mais uma vez observou-se que as irradiações duplas e triplas de alguma forma tornaram essas partículas menos ativas já que, apesar da significância estatística não ter sido observada, houve uma tendência de células infectadas pelos vírus irradiados 2 e 3 vezes de se manterem com maior atividade mitocondrial que células controle e aquelas infectadas com vírus irradiados somente uma vez. Mas isso não seria suficiente para explicar o não aparecimento de lesões quando a fototerapia com laser em baixa intensidade é utilizada na fase prodrômica da infecção pelo HSV-1.

Finalmente, a última hipótese de ação da fototerapia com laser em baixa intensidade seria que células infectadas e irradiadas apresentassem menores efeitos citopáticos e maior viabilidade celular. Então células Vero foram infectadas e a seguir irradiadas nos 4 parâmetros propostos que *in vivo* apresentam ação contra os efeitos do HSV-1 na pele e na mucosa de humanos. Mais uma vez, os efeitos citopáticos foram similares. Estes achados foram corroborados pelos da literatura, onde os efeitos citopáticos tanto do HSV-1 (KORNER; BAHMER; WIGARD, 1989), quanto do HSV-2 (PERRIN et al., 1997) sobre células Vero infectadas não foram modificados pela irradiação.

No entanto, neste experimento resultados interessantes foram observados em relação à manutenção da viabilidade celular após a infecção e irradiação. Após duas irradiações todos os grupos irradiados apresentaram atividade mitocondrial significativamente maior que a das culturas controle e aquelas irradiadas por uma vez. Esse achado mostrou que células infectadas e irradiadas se mantêm viáveis por mais tempo. *In vivo* isso implicaria no atraso do aparecimento das vesículas que ocorrem em decorrência da necrose das células infectadas. Essas vesículas são ricas em partículas virais e quando se rompem espalham as partículas que irão infectar outras células. Talvez, a radiação laser por manter viáveis as células infectadas por mais tempo impeçam o espalhamento dos vírus, dando tempo à imunidade local de agir no sentido de manter a saúde daquele tecido. Nesse sentido, estudos anteriores mostraram efeitos estimulatórios do sistema imune. Células imunocompetentes tratadas por fototerapia com laser em baixa intensidade apresentaram a capacidade de diminuir em 50 % o número de partículas virais em cultura (KORNER; BAHMER; WIGARD, 1989).

Tomando esses resultados em conjunto, e baseados na patogenia das lesões recorrentes da infecção pelo HSV-1, poderíamos sugerir que quando da irradiação das lesões, o sistema imune local ficaria estimulado e, portanto, impediria uma ação eficiente dos vírus. Assim, após o rompimento das células epiteliais infectadas, um menor número de partículas virais se manteria viável, tornando a reparação das lesões mais fácil e rápida, além de prejudicar a reinfecção dos gânglios. Isso explicaria o aumento do tempo de recorrência das lesões como observado por Schindl e Neumann (1999), e o efeito benéfico das irradiações como observados por outros autores (EDUARDO; CECHINI; CECHINI, 1996; OLIVEIRA, 2002).

Nossos experimentos indicam que a fototerapia com laser em baixa intensidade tem ação somente no prolongamento da viabilidade de células epiteliais infectadas, mesmo quando os efeitos citopáticos do HSV-1 ocorram na sua forma característica e usual. Isto indica que essa terapia, que têm demonstrado efeito clínico desejado, tem ação não direta no HSV-1, nem na susceptibilidade da célula hospedeira como aqui demonstrado e previamente proposto por Schindl e Newmann (1999), mas sim poderia ter uma ação indireta no sistema imune (PERRIN et al., 1997; SCHINDL; NEWMANN, 1999). Assim, novos estudos devem ser realizados *in vitro*, no sentido de entender a ação da fototerapia com laser em baixa intensidade em células imunocompetentes. Estes estudos deverão ser realizados na seqüência *in vivo* para confirmar as hipóteses aqui levantadas.

7 CONCLUSÕES

Nas condições deste trabalho pode-se concluir que: a radiação laser:

- Fase 1:

É capaz de estimular o crescimento de células Vero cultivadas em déficit nutricional, porém não o suficiente para atingir o crescimento característico destas células quando crescidas em condições nutricionais ideais.

- Fase 2:

Não altera os efeitos citopáticos e nem a viabilidade das células infectadas, portanto não interferem nem na susceptibilidade das células Vero, nem no curso da infecção pelo HSV-1.

- Fase 3:

Não altera os efeitos citopáticos e nem a viabilidade das células infectadas quando suspensões virais são irradiadas antes de serem inoculadas, portanto os lasers não têm efeito sobre a virulência do HSV-1

- Fase 4:

Somente a dupla irradiação é capaz de prolongar a viabilidade de células Vero infectadas pelo HSV-1, porém não altera os efeitos citopáticos causado pelo vírus.

REFERÊNCIAS¹

Albertini R, Aimbire FSC, Correa FI, Ribeiro W, Cogo JC, Antunes E, Teixeira SA, et al. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (GaAlAs) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. *J Photoch Photobiol B: Biology* 2004;74:101-7.

Al-Watban FAH, Zhang Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. *Laser Ther* 1994;6:119-24.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med* 2001;29(2):179-84.

Anderson RR, Parrish JA. The optics of the skin. *J Invest Dermatol* 1981;77:13-9.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of Different Power Densities of LILT on Cultured Human Fibroblasts Growth. A pilot study. *Lasers in Medical Sciences*. In press 2006.

Basford JR. Low energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? *Mayo Clin* 1986;61:671-5.

Cecchini RCM, Cecchini SCM, Eduardo CP. Uma nova alternativa para o tratamento da úlcera aftosa e herpes labial: Caso clínico. *Âmbito Odontológico* 1995;2:21-4.

Eduardo CP, Cecchini SCM, Cecchini RCM. Benefits of low power lasers on oral soft tissues. In: *Lasers in Dentistry II*, H.A. Wigdor JDB, Featherstone JM, White J Neev, Proc. SPIE 1996;2672:27-33.

Epstein JB, Scully C. Herpes simplex virus in immunocompromised patients: Growing evidence of drug resistance. *Oral Surg* 1991;72(1):47-50.

Fields BN, Kinpe DM, Chanock RM. *Virology*, 2nd ed. New York; Raven Press; 1990;

Freshney RI. *Culture of animals cells- a manual of basic technique*. 4th ed. New Cork: A John Wiley&Sons; 2000.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Friendmann H, Lubart R, Laulich I, Rochkind S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 1991; 11:87-91.

Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med*. In press 2006.

Hawke RA. General principles underlying laboratories diagnosis of viral infection. In: Lenette EH; Schmidt JN. *Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection*. 5^{ed}. Washington, 1979:3-48.

Herman JH, Khosla RC. Nd:YAG laser modulation of synovial tissue metabolism. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7(5):505-12.

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

Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J Quant Electr QE* 1987;23:1703.

Karu TI, Ryabykh TP, Fedoseyeva GE, Puchkova NI. Helium-neon laser-induced respiratory burst of phagocytic cells. *Lasers Surg Med*. 1985;9:585-8.

Kolari PJ. Penetration of unfocused laser light into the skin. *Arch Dermatol Res* 1985; 277:342-4.

Kolarova H, Ditrichova D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers Surg Med* 1999;24:231-5.

Kornër R, Bahmer F, Wigand R. The effect of infrared laser rays on herpes simplex virus and the functions of immunocompetent cells. *Hautarzt* 1989;40(6):350-4.

Lizarelli R. Protocolos clinico Odontológicos. In: *Uso do laser de baixa intensidade*. 2^o ed. 2005

Lubart R, Wollman Y, Friendmann H, Rochkind S, Laulich I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 1992;12:305-10.

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

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Laser Surg Med* 1985;5:31-9.

Mester E, Yaszsagi-Nagy E. The effect of laser radiation on wound healing and collagen síntesis. *Stud Biophys* 1973;35:227-30.

Migliorati C, Massumoto C, Eduardo FP, Müller KP, Carrieri T, Haypek P, Eduardo CP. Low-energy laser therapy in oral mucositis. *J Oral Laser Applications* 2001;1:97-101.

Oliveira RG. Tratamento de herpes labial com laser de baixa intensidade: Apresentação de caso clínico. 1º encontro Nacional da ABLO Laser em Odontologia. 1 a 3 de Maio 2002;23

Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2002;31(4):263-7.

Perrin D, Jolivald JR, Triki H, Garbarg-Chenon A, Lamotte Dincamps B, Lefevre B, et al. Effects of laser irradiation on latency of herpes simplex virus in a mouse model. *Path Biol* 1997;45(1):24-7.

Rallis TM, Spruance SL. Low-intensity laser therapy for recurrent herpes labialis. *J Invest Dermatol* 2000;115(1):131-2.

Ribeiro MS. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. [TeseDoutorado], São Paulo: Instituto de Pesquisa Nuclear, IPEN/USP; 2000.

Roizman B, Whitley RJ, Lopez C. Herpes Simplex Viruses and Their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Virology* 3º ed, Philadelphia 1990;1:2231-95

Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, et al. Clinical Practice Guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer Supplement* 2004;100(9):2026-46.

Schindl A, Neumann R. Low-Intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double blind placebo controlled study. *J Invest Dermatol* 1999; 113(2):221-3.

Schindl A, Neumann R. Low-intensity laser therapy for recurrent herpes labialis – Reply. *J Invest Dermatol* JUL 2000;115(1):132-3

Scully C, Samaranayake L. Oral and Perioral viral infection. In: *Clinical Virology in oral medicine and Dentistry* 1990;11-69.

Sêneda Lm. Análise da proliferação e viabilidade de células de carcinoma epidermóide de boca humana em cultura irradiadas por laser em baixa intensidade. [Dissertação de Mestrado] – São Paulo: Hospital Do Câncer Fundação Antonio Prudente; 2005.

Shafer WG. *Tratado de Patologia Bucal*. Rio de Janeiro: Interamericana; 4ª edição, 1985.

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

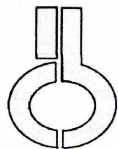
Triphlova O, Karu TI. Role of primery photoacceptors in low-power laser effects: action of He-Ne laser radiation on bacteriophage T4-Escherichia coli interac. *Lasers Surg Med* 1989;9:67-9.

Túner J, Hode L. It's all in parameters: a critical analysis of some well-know negative studies on low-level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1998;16:245-8.

Zezell DM. *Curso clínico de laser em Odontologia*. São Paulo: FUNDECTO/USP, 2001. [Apostila do curso]

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 8130900 - telefax : (55) (011) 818 7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o sub-projeto intitulado: "*ANALISE IN VITRO DOS EFEITOS DA FOTOTERAPIA COM LASERS EM BAIXA INTENSIDADE (660NM E 780 NM) SOBRE A AÇÃO DO VÍRUS HERPES SIMPLIS TIPO 1 EM CÉLULAS EPITELIAIS DE MACACOS (VERO)*" sob a responsabilidade da aluna FERNANDA DE PAULA EDUARDO e orientação da Profa. Dra. DOLORES URSULA MEHNERT, está vinculada a linha de pesquisa de Herpesvírus, com os protocolos aprovados na Comissão de Ética em Experimentação Animal Certificado-088/2001 e Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos Parecer 258/CEP, foi analisado pelas referidas comissões, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de março de 2006.

Prof. Dr. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP_{SH} - ICB/USP

DECLARAÇÃO

Essa tese foi financiada por projeto de auxílio a Pesquisa n° 2003/05087-5.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)