

DAIANE THAIS MENEGUZZO

**INFLUÊNCIA DO FRACIONAMENTO DA ENERGIA DE IRRADIAÇÃO
NA FOTOTERAPIA COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE O
CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS DE POLPA DENTÁRIA HUMANA**

São Paulo

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Daiane Thais Meneguzzo

**Influência do fracionamento da energia de irradiação na
fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento
de fibroblastos de polpa dentária humana**

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

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Meneguzzo DT. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, 03/07/2007

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: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Thais e Ricardo...***

Vocês ao me conceberem já me deram tudo o que eu precisava: a vida.

Mas o seu amor incondicional e sem limites me ensinaram a amar, a lutar

pelos meus sonhos e a jamais desistir de alcançá-los!

*O seu apoio constante é o que me faz crescer ... O seu amor é a minha
força diante de cada aprendizado... A sua amizade é o que de mais sincero*

eu poderia ter! E a educação que vocês me deram, é digna de um best

seller!

Admiro muito vocês! E não existem palavras que descrevam o quanto eu os

amo!

Obrigada por existirem e por serem os meus pais!!

E o sorriso de vocês é a coisa mais linda que eu quero sempre ver!

*À **Lis**, querida amiga, querida esposa de meu pai, que nunca economizou*

esforços para ajudar e orientar. Médica, sempre me entendeu

profissionalmente, e sempre me estimulou em todos os meus passos

acadêmicos. Lis querida, você mora no meu coração.

*Aos meus irmãos... **Diego, Igor e Franco**, parceria maravilhosa, que se eu
pudesse escolher, não escolheria maninhos tão especiais!! Companheiros,
engraçados, me fazem ver o lado divertido e curioso da vida, vida esta que*

*vocês experimentaram grande parte ao meu lado... E ainda temos muito
que aproveitar!!! Vocês são demais!! Eu amo vocês!!!*

*Ao **meu amor, Thomas**, que dentro da sua forma divertida de ver a vida me
ensina a cada dia como é bom amar e ser amada! Companheiro
incondicional faz a nossa vida ser uma aventura diária, onde o principal
treino é o respeito e o amor um pelo outro. Eu te amo, meu amor!*

*A **minha família toda, avós, tios, tias, primos, primas, cunhadas** ... que
completam a minha felicidade cercando-me de amor e apoio. Eu Amo
todos vocês!! E prometo que quando terminar esta dissertação irei visitá-los
um a um!!!*

*E como não poderia esquecer, quero também dedicar esta dissertação a
minha mais nova família, que é maravilhosa e que me faz sentir tão amada
e querida! **Querida Omi, Sogrinha Ilme, Sogrão Luiz, cunhadinha Ivy e
cunhadão Luís**, eu amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

AOS MEUS MESTRES ETERNOS...

*À Deus por sempre me dar colo quando eu mais preciso... E ao meu **Anjo da Guarda** que sempre me guia para aquilo que é importante...*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, pelas oportunidades, orientações, incentivos e por me contagiar com a luz laser!*

*À minha amiga e **Professora Dra. Márcia Martins Marques**, por todo apoio e ensinamentos na minha vida acadêmica e pessoal, pelo carinho e amizade.*

*À **Professora Dra. Martha Simões Ribeiro**, pelo apoio nos momentos difíceis da dissertação, pelo aprendizado e pela amizade que se inicia.*

*Aos meus primeiros orientadores, que me incentivaram e contribuíram para a minha formação acadêmica: **Profa. Dra. Marinilce, Profa. Dra. Marina, Prof. Dr. Imparato** e novamente **Prof. Dr. Carlos** e **Profa. Dra. Márcia**.*

*Aos meus orientadores informais, a quem eu muito admiro, **Prof. Dr. Nivaldo, Prof. Dr. Vitor, Prof. Dr. Bauer, Prof. Charles, Prof. Dr. Virgílio, Prof. Dr. Waldyr Jorge, Profa. Dra. Luciana Almeida Lopes** e **Profa. Dra. Tina Karu**.*

AOS AMIGOS...

Agradeço de coração toda a amizade e companheirismo dos amigos da pós-graduação.... Em especial ao Washington, pelas incansáveis aulas de

*estatística! Às amigas do Lab, Carla, Lorena, Sueli e Dani pelo
companheirismo e trocas de experiência!!*

*Agradeço aos Amigos do LELO, professores, clínicos, estagiárias, Jô, Lili,
Haroldo e Kate pelos 5 anos de trabalho, aulas, estudos, casos clínicos,
companheirismo e amizade.*

*Agradeço aos Funcionários da Dentística, em especial para Soninha e
David, que muito me ajudaram, as meninas da diretoria Silvana e Leticia, e
aos funcionários da portaria, que compartilharam comigo muitos domingos
de sol e de trabalho.*

*Agradeço a todos os Professores da Dentística, pela amizade e apoio nesta
etapa importante da minha vida acadêmica. Profa. Dra. Adriana, Profa.
Dra. Miriam, Profa. Dra. Maria Aparecida, Profa. Dra. Maria Ângela, Profa.
Dra. Margarete, Profa. Dra. Eliza Prof. Dr. Garone, Prof. Dr. Michael, Prof. Dr.
Rubens, Prof. Dr. Toninho, Prof. Dr. Glauco e Prof. Dr. Bombana.*

*Agradeço as Professoras do LELO/Dentística, Profa. Dra. atrícia e Profa. Dra.
Ana Cecília, pela amizade e orientação.*

*E como não poderia esquecer, aos amigos com quem fiz grandes histórias
iluminadas pelo Laser... Leila, Karen, Camila, Aninha, Rê, Marina, Alyne, Jú,
Marcella, Amanda, Débora, Ana Paula, Bruna, Edgar e Bruno. E para não
esquecer mais ninguém... eu paro por aqui!*

Eu amo todos vocês! OBRIGADA!!!

*Também quero deixar meu agradecimento à **CAPES**, pela bolsa e Mestrado.*

"PODE-SE VIVER NO MUNDO UMA VIDA MAGNÍFICA QUANDO SE
SABE TRABALHAR E AMAR.. TRABALHAR PELO QUE SE AMA E
AMAR AQUILO EM QUE SE TRABALHA"

TOLSTOI

"OS FATOS SÃO AS PEÇAS QUE CONSTITUEM A CIÊNCIA, MAS A
CIÊNCIA NÃO COMEÇA COM OS FATOS. ELA COMEÇA COM AS
OBSERVAÇÕES."

J. HERRICH

Meneguzzo DT. Influência do fracionamento da energia de irradiação na fototerapia com laser em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A fototerapia com laser em baixa intensidade tem sido utilizada na odontologia em várias patologias bucais para o controle de dor e cicatrização. O objetivo do estudo foi comparar o efeito da fototerapia no crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana usando irradiações com energia total aplicada de uma vez ou fracionada. Após a determinação da metodologia, a linhagem celular FP5 (1×10^3 células por poço) cresceu em placas de cultivo de 96 poços (1 para cada grupo experimental) em déficit nutricional (meio suplementado com 5 % de SFB). A irradiação laser foi realizada com laser de diodo InGaAlP (comprimento de onda 685 nm, 40mW, área do feixe $0,0028\text{cm}^2$) usando a técnica pontual, no modo contínuo e em contato. As energias totais foram aplicadas em irradiações únicas de 0,12 J (G1), 0,24J (G2), 0,36 J (G3). Essas energias totais foram fracionadas em múltiplas irradiações de 0,12 feitas com intervalos de 6 horas: duas para G4 e três para G5. Grupos não irradiados de células cultivadas em déficit nutricional (5 % SFB, G6) e em condições nutricionais regulares (10 % SFB, G7) foram usadas como controles negativo e positivo respectivamente. O número de células foi indiretamente obtido pela mensuração da atividade celular mitocondrial 24 horas após a primeira irradiação. Os dados em quadruplicata foram comparados pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Houve diferença significativa entre os grupos. O controle positivo (G7) apresentou número de células significativamente maior quando comparado ao controle negativo (G6). Esse número foi similar aos dos grupos submetidos a irradiações múltiplas (G4 e G5). Os grupos irradiados uma única vez (G1 a G3) apresentaram número de células significativamente menores que aqueles do controle positivo e dos grupos com múltiplas irradiações. Com base na metodologia empregada concluiu-se que o fracionamento das energias de irradiação potencializa o efeito bioestimulador da fototerapia com laser em baixa intensidade no crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana.

Palavras-chave: Fototerapia, Fibroblastos pulpare, *Laser* de InGaAlP, Dosimetria, Crescimento celular

Meneguzzo DT. Influence of the fractioned irradiation energy in the phototherapy with low intensity laser on the growth of human dental pulp fibroblasts. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

Phototherapy with low intensity lasers has been used in dentistry in several oral pathologies for pain and healing control. The aim of this study was to compare the effect of phototherapy on human dental pulp fibroblasts growth using irradiations with whole energy delivered at once or fractioned. After the determination of the methodology, the FP5 cell line (1×10^3 cells per well) was grown in 96 wells-microtritation plates (one for each experimental group) in nutritional deficit (medium supplemented with 5% fetal bovine serum-fbs). Laser irradiation was carried out with an InGaAlP diode laser (λ -685nm, 40 mW, spot size 0.028 cm²) using the punctual technique, at continuous mode and in contact. The whole energies were delivered in single irradiations of 0.12J (G1), 0.24J (G2), 0.36J (G3). These whole energies were fractioned in multiple irradiations of 0.12J done with 6h-intervals: two for G4 and three for G5. Non-irradiated groups of cell cultured in nutritional deficit (5% fbs; G6) and in nutritional regular condition (10 % fbs; G7) were used as negative and positive controls, respectively. The number of cells was indirectly assessed by measuring the cell mitochondrial activity 24 hours after the first irradiation. The data from four replicates were compared by the ANOVA complemented by the Tukey's test ($p \leq 0.05$). There were significant differences amongst the groups. The positive control (G7) presented significantly higher number of cells when compared to the negative control (G6). This number was similar to those of multiple irradiation groups (G4 and G5). The single irradiated groups (G1 to G3) presented cell numbers significantly smaller than those of positive control and multiple irradiated groups. Under the conditions of this study it was concluded that multiple irradiations of fractioned energies improve the biostimulatory effect of the phototherapy with low intensity laser on the growth of dental pulp fibroblasts.

Keywords: Phototherapy, Pulp fibroblasts, InGaAlP laser, Dosimetry, Cell growth

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 HISTÓRICO DO <i>LASER</i> DE BAIXA POTÊNCIA	16
2.2 CARACTERÍSTICAS DO <i>LASER</i>	18
2.3 MECANISMOS DE AÇÃO CELULARES	20
2.4 CULTURA DE CÉLULAS X FOTOTERAPIA	25
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 CULTURA DE CÉLULAS	35
4.2 CONTAGEM E PLAQUEAMENTO CELULAR	37
4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT	40
4.4 FASE 1: DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	43
4.4.1 Etapa 1. Determinação do número de células a serem plaqueadas ...	43
4.4.2 Etapa 2. Determinação da porcentagem de soro fetal bovino no meio de cultura que promova um déficit nutricional celular.....	46
4.4.3 Etapa 3. Determinação da distribuição dos grupos nas placas experimentais para as irradiações.	49
4.4.3a Equipamento <i>Laser</i>	52
4.4.3b Protocolo de Irradiação	53
4.4.4 Etapa 4. Determinação do tempo experimental (plaqueamento, crescimento, irradiação e análise do MTT).....	56

4.5 FASE 2: REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA FINAL	66
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5 RESULTADOS	69
5.1 FASE 1 - DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	69
5.1.1 Etapa 1 - Determinação do número de células a serem plaqueadas ..	69
5.1.2 Etapa 2 - Determinação da porcentagem de soro fetal bovino no meio de cultura que promova um déficit nutricional celular.....	72
5.1.2a Resultados experimento 2.1	73
Neste experimento foram plaqueadas 500 células por poço experimental e foram testadas as concentrações de 2,5 %, 5 %, 7,5 % e 10 % de SFB ao longo de 4 dias experimentais.	73
5.1.2b Resultados experimento 2.2.....	75
5.1.3 Etapa 3 - Determinação da distribuição dos grupos nas placas experimentais para a realização das irradiações	78
5.1.3a Resultados do experimento 3.1	78
5.1.3b Resultados experimento 3.2.....	85
5.1.4 Etapa 4 - Determinação do tempo experimental (plaqueamento, crescimento, irradiação e análise do MTT)	92
5.2 FASE 2 - REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA FINAL.....	97
6 DISCUSSÃO	100
7 CONCLUSÃO	122
REFERÊNCIAS.....	123
ANEXOS.....	132

1 INTRODUÇÃO

A irradiação *laser* como modalidade terapêutica para a indução e aceleração da reparação tecidual foi introduzida por Mester e colaboradores na década de 70 (MESTER et al., 1971). A ampla aplicabilidade clínica e os resultados clínicos favoráveis relatados desde então fazem com que muitos trabalhos sobre fototerapia com *laser* em baixa intensidade sejam continuamente publicados na literatura.

A fototerapia com *laser* em baixa intensidade tem sido amplamente utilizada como um tratamento coadjuvante, alternativo e não invasivo promovendo a aceleração dos processos cicatriciais, redução de dor, edema e modulando a inflamação. Muitos profissionais da saúde como médicos, dentistas e fisioterapeutas recomendam cada vez mais a fototerapia e ampliam continuamente a sua aplicabilidade devido aos resultados clínicos favoráveis.

A fototerapia atua acelerando processos cicatriciais, como fechamento de feridas de lesões herpéticas e em pós-operatórios cirúrgicos (AMORIM et al., 2006; CATÃO, 2004); biomodulando inflamação periodontal (QUADRI et al., 2005); atua na estimulação e reparo de células nervosas em parestesias e nevralgias; tem efeito de biomodulação em tecido ósseo, acelerando a neoformação óssea (OZAWA et al., 1998) e estimulando a osseointegração em implantes (KHADRA et al., 2004) e acelerando a movimentação dental (CRUZ et al., 2004); promove analgesia e possui

efeitos antiinflamatórios em lesões aftosas e lesões de mucosite oral (NES; POSSO, 2005); acelera a drenagem linfática diminuindo o edema (FERREIRA et al., 2005); atua na analgesia (FERREIRA et al., 2005) e estimulação de dentina reacionária na hipersensibilidade dentinária (FERREIRA et al., 2006; KIMURA et al., 2000) e possui efeitos modulatórios na inflamação pulpar e muscular, como nas disfunções têmporo-mandibulares (BJORDAL et al., 2003; NUNEZ et al., 2004).

Atualmente, os efeitos benéficos da fototerapia com *laser* em baixa intensidade já não são mais questionados. O que se procura atualmente é saber como administrar a fototerapia dentro do conceito de dosimetria que envolve o comprimento de onda ideal para o tecido que será irradiado, a energia irradiada (J), a fluência (J/cm²), a forma de irradiação (pontual ou varredura), a potência que será utilizada (mW) e principalmente a quantidade e freqüência de irradiações que serão necessárias.

O conhecimento da maneira como as células respondem a essas variações dosimétricas direcionaria ou esclareceria muitas indagações clínicas sobre fototerapia. Sessões de irradiação única ou essa mesma energia total fracionada em várias sessões alcançariam resultados clínicos diferentes? Energias próximas possuem resultados clínicos relevantes? Entre outras perguntas que fazem parte da prática clínica da fototerapia.

Em realidade estas são as respostas que estamos buscando no desenvolvimento do presente trabalho cujos resultados poderão contribuir para o melhor entendimento dos protocolos clínicos utilizados na odontologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DO *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA

A palavra *LASER* é um acrônimo de: *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation* ou em português, Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação. A Emissão estimulada de Radiação foi a teoria proposta por Einstein em 1917 que possibilitou a invenção do *Laser em 1960 por Theodore Maiman* (TUNER; HODE, 1999).

O primeiro *laser* desenvolvido foi o *laser* de Rubi, e naquela época sua aplicabilidade ainda não era clara, como é descrito na frase famosa do seu criador Theodore Maimam: "*Laser* é a solução procurando o problema".

Ainda na década de 60, Javan, Bennett e Herriott desenvolveram o primeiro *laser* de baixa potência, o *laser* de hélio-neônio (HeNe), emitindo no comprimento de onda vermelho. E em 1971, Endre Mester, da Hungria, foi o pioneiro a publicar a utilização do *laser* em baixa intensidade na bioestimulação tecidual. Era o início de uma nova modalidade terapêutica não invasiva no tratamento de lesões superficiais que logo se popularizou na Europa Oriental e União Soviética (BASFORD, 1989; KITCHEN; PARTRIDGE, 1991).

Historicamente, os trabalhos seguintes ao de Mester foram realizados na mesma região geográfica e publicados também no idioma local. As publicações eram bastante empíricas, sem o crivo de uma publicação internacional onde cada detalhe metodológico deve ser relatado. Muitos trabalhos foram feitos, porém muitas informações metodológicas importantes foram omitidas. A ausência de padronização de como divulgar a metodologia gerou contradições em relação aos reais benefícios da fototerapia. Apesar da falta de divulgação dos resultados internacionalmente, na década de 80 a comunidade científica internacional despertou para os estudos com *laser* e desde então muitos trabalhos são anualmente publicados na literatura (MOORE et al., 2005; SCHINDL et al., 2000).

Os *lasers* em baixa intensidade que utilizamos atualmente são os *lasers* de diodo, cuja tecnologia de semicondutores foi desenvolvida ainda em 1962. Esta tecnologia teve que evoluir muito até chegar ao estado atual. O alto desempenho e confiabilidade dos *lasers* de Arseneto de Gálio (GaAs) (800 nm) permitiu, no final de década de 70, o seu uso no mercado de áudio em “compact disk” (CD). Este é, até hoje o único mercado de produção em massa para *lasers* de semicondutor, absorvendo mais de 90 % de todos os *lasers* produzidos no mundo. Outra aplicação importante dos *lasers* de semicondutor é em comunicações ópticas (CATUNDA et al., 1998).

Somente na década de 80 começou a ser desenvolvida a tecnologia dos *lasers* de semicondutor visíveis de índio, gálio, alumínio, fósforo (InGaAlP), cobrindo a região espectral de 630 a 690 nm, o que impulsionou a sua

utilização nas áreas biológicas. O comprimento de onda visível, era correspondente ao *laser* de HeNe até então empregado nos trabalhos de bioestimulação (CATUNDA et al., 1998).

Na odontologia, a tecnologia do diodo economicamente mais acessível, fez com que muitos profissionais da área adquirissem estes equipamentos contribuindo para sua popularização. A efetividade da fototerapia comprovada pelos resultados clínicos favoráveis experimentados pelos profissionais e pacientes impulsionou definitivamente a comunidade científica odontológica a realizar pesquisas *in vitro* e clínicas sobre os efeitos, aplicações e mais recentemente dosimetria em fototerapia (AZEVEDO et al., 2006; BJORDAL et al., 2003; CATÃO, 2004; FERREIRA et al., 2005; GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; LOEVSCALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; QADRI et al., 2005).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO LASER

A luz emitida pelos equipamentos *lasers* apresenta características específicas como monocromaticidade, paralelismo e coerência dos fótons que a compõem. Em contraste com os *lasers* de alta potência utilizados em cirurgia e dermatologia que operam com potências acima de 1W e cujos efeitos são relacionados com o aquecimento local do tecido promovendo corte, vaporização e ablação, os equipamentos *lasers* em baixa intensidade operam com potências na faixa de miliwatts (mW). A irradiação emitida é

não térmica, o que significa que seus efeitos biológicos não são causados por calor perceptível ou lesão celular e sim, por efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotomecânicos nas células dos tecidos irradiados (BAXTER, 1997; KARU, 1987).

A forma como a luz *laser* irá interagir com o tecido vai depender das características ópticas do *laser* utilizado como comprimento de onda, potência, tempo de exposição e densidade de energia assim como vai depender das características ópticas do tecido alvo, ou seja, os cromóforos presentes no tecido (KARU, 1989; LOW; REED, 2001).

Um cromóforo é um elemento presente no tecido que é capaz de absorver os fótons que constituem o feixe *laser*. Cromóforos podem ser enzimas, membranas ou qualquer outra substância que após absorver a luz a converte em energia fotoquímica. Os principais cromóforos endógenos relatados na literatura incluem: porfirinas, flavinas, citocromos mitocondriais, sistemas oxidatórios como o NADPH, enzimas mitocondriais e outras porfirinas endógenas (BECKERMAN et al., 1992; LUBART et al., 1992).

Assim, a luz *laser* só poderá ser absorvida se um cromóforo com afinidade com o comprimento de onda emitido for irradiado. Se isso não ocorrer, a luz poderá ser transmitida, espalhada ou refletida (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). Uma vez que o tecido possui uma grande diversidade de componentes se movimentando de uma forma dinâmica, estes fenômenos poderão ocorrer simultaneamente. Além disso, devido ao espalhamento da irradiação, um cromóforo distante do local da aplicação poderá absorver esta irradiação (LOW; REED, 2001; SCHINDL et al., 2000).

A absorção da energia luminosa pelo cromóforo ocorre a nível atômico. Os elétrons constituintes dos átomos do cromóforo ao captarem esta energia, saem do seu estado fundamental e se deslocam para uma órbita mais energética, ou seja, vão para um estado excitado de energia. Após um curto intervalo neste estado excitado, o elétron espontaneamente volta ao seu estado fundamental liberando a energia anteriormente absorvida. Esta energia, por sua vez, será utilizada pela célula nas suas funções metabólicas. A energia luminosa, portanto, é transformada em outro tipo de energia, resultando nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotomecânicos do *laser* (BAXTER, 1997; KARU, 1987).

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO CELULARES

Na literatura, algumas hipóteses bem estabelecidas explicam a indução dos efeitos fototerápicos celulares promovidos pelo *laser* em baixa intensidade em comprimentos de onda na faixa do visível e do infravermelho (BREITBART et al., 1996; GROSSMAN et al., 1998; JORI et al., 1996; KARU, 1989; LABBE et al., 1990; LUBARD et al., 1990; LUBART et al., 1997; OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981; POLO et al., 1999; SCHINDL et al., 2000; SMITH, 1991). Basicamente, dois tipos de reações ocorrem em fotobiologia: reações primárias induzidas pela luz e reações secundárias que ocorrem na ausência de luz (SCHINDL et al., 2000).

As reações fotoquímicas e fotofísicas primárias relevantes na fototerapia possuem pelo menos quatro modelos diferentes que foram propostos para responder como o *laser* pode interagir com as células vivas: 1) a absorção da luz pelas enzimas mitocondriais resultam em aquecimento local gerado pelo aumento de vibração molecular (OLSON; SCHIMMERLING; TOBIAS, 1981); 2) efeitos estimulatórios e inibitórios induzidos pela luz *laser* é resultado respectivamente da absorção da luz por flavinas e citocromos da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em alterações na transferência de elétrons para seus pares reduzidos localizados na mitocôndria (KARU, 1989; LABBE et al., 1990); 3) porfirinas endógenas foto-induzem oxigênios singletos (GROSSMAN et al., 1998; JORI et al., 1996; LUBARD et al., 1990; POLO et al., 1999); e 4) a luz *laser* ativa diretamente os canais de Ca^{+2} da membrana celular através de modificações fotofísicas induzindo a entrada de Ca^{+2} intracelular e proliferação celular (BREITBART et al., 1996; LUBART et al., 1997; SMITH, 1991). Muito provavelmente, dois ou mais destes modelos podem ocorrer simultaneamente no tecido irradiado contribuindo para os efeitos biológicos observados (SCHINDL et al., 2000) (Figura 2.1).

REAÇÕES PRIMÁRIAS

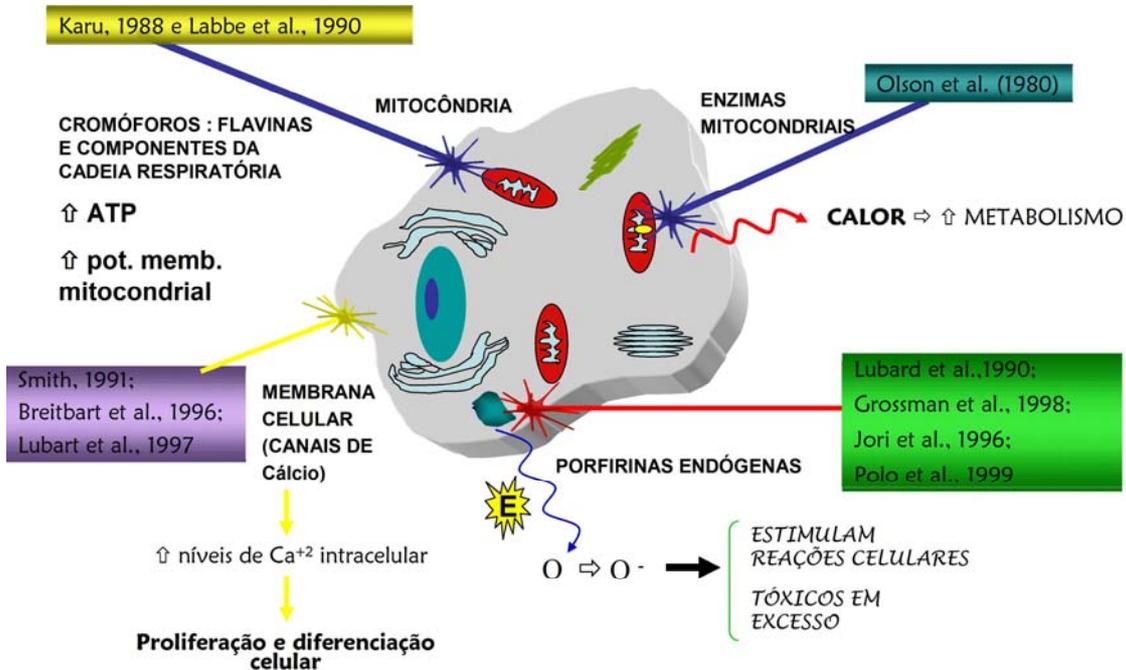


Figura 2.1 – Esquema das teorias que explicam as reações primárias que ocorrem na célula por estímulo da fototerapia

As reações secundárias (sem a presença de luz) sinalizam transdução e amplificação. As alterações do pH intracelular, relacionadas com a ativação das ATPases e seguidas por alterações nos níveis de cálcio intracelular, parecem ser um caminho comum para a transdução do sinal e amplificação de todas as fotoreações primárias citadas. A mudança do estado redox para oxidação acarreta em um aumento intracelular de Ca^{+2} e estimula o metabolismo celular. Por outro lado, a redução leva à diminuição de Ca^{+2} intracelular e, portanto, inibição do metabolismo celular. Altos níveis de Ca^{+2} intracelular por sua vez, estimulam vários processos

biológicos, como síntese de RNA e DNA, mitose celular e secreção protéica. Mesmo assim, altos níveis de Ca^{+2} intracelular também podem levar à inibição do metabolismo celular (FRIEDMAN; LUBARD, 1996). Recentemente, têm sido claramente mostrado que tanto a estimulação quanto a inibição da entrada de Ca^{+2} nas células de mamíferos podem ser induzidos por luz vermelha monocromática dependendo da dosagem aplicada (KARU, 1996).

Alguns dos mecanismos secundários relatados na literatura são: aumento no metabolismo celular, proliferação e síntese de colágeno mais acentuada em fibroblastos; síntese protéica; aumento no potencial de ação de células nervosas; estímulo da formulação de DNA e RNA no núcleo celular; efeitos sobre o sistema imunológico pela ativação de linfócitos; formação de capilares estimulada pela liberação de fatores de crescimento e aumento na atividade de leucócitos (ANDERS et al., 1993; BISHT et al., 1994; EFENDIEV et al., 1992; HAWKINS E ABRAHAMSE, 2006a; LOEVSCHALL; ARENHOLT-BINDSLEY, 1994; MARQUES et al., 2004; MESTER; SNOW JR; SHAMAN 1991; YU; NAIM; LANZAFAME, 1994) (Figura 2.2).

REAÇÕES SECUNDÁRIAS – NA AUSÊNCIA DE LUZ



Figura 2.2 – Esquema das reações secundárias a partir do estímulo da fototerapia

Segundo Karu (1987), os fotoreceptores primários (flavinas e citocromo c oxidase) são os responsáveis por estimularem e inibirem os processos celulares. Em altas doses de energia, os fotorreceptores são danificados e os efeitos diminuídos. Doses ainda maiores, estes fotorreceptores são destruídos e ocorre inibição no crescimento e letalidade das culturas quando estas são irradiadas. Nas doses estimulatórias, os processos celulares que aceleram a transferência de elétrons nos pares redox em algumas sessões da cadeia respiratória prevalecem. Enquanto que doses maiores, a transferência de energia de excitação para o oxigênio para formar O₂ prevalece, causando dano fotodinâmico. Outros autores também relatam efeitos inibitórios por

superdosagem no tecido/célula alvo, entre eles, Friedman, Lubart e Laulich (1991), Mester et al. (1985) e Schindl et al. (2000).

2.4 CULTURA DE CÉLULAS X FOTOTERAPIA

A cicatrização de feridas é o efeito da fototerapia mais estudado na literatura. Muitos trabalhos buscam explicar os mecanismos e os possíveis efeitos da terapia *laser* no reparo cicatricial estudando principalmente as células envolvidas, ou seja, os fibroblastos (KARU, 1989; LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LUBART et al., 1992; MARQUES et al., 2004; MOORE et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; VINCK et al., 2003).

O perfil da expressão gênica de fibroblastos humanos irradiados com o *laser* emitindo no vermelho em baixa intensidade e avaliados com a técnica de cDNA "microarrays", mostra que a irradiação regula 111 genes agrupados em 10 categorias funcionais diferentes, incluindo: proliferação, efeitos antioxidantes, metabolismo, canais iônicos e potencial de membrana, proteínas do citoesqueleto e matrix extracelular, síntese e reparo do DNA, fatores de transcrição e citocinas imunológicas/inflamatórias. A maioria dos genes de 7 das 10 categorias está direta ou indiretamente envolvida nos processos relacionados com a proliferação celular, e duas vias de sinalização, a p38 MAPK e a PDGF. Estas vias foram identificadas como tendo importante papel na mediação dos efeitos da luz vermelha

sobre a proliferação dos fibroblastos estudados. Além dos efeitos na proliferação celular, a irradiação também pareceu regular a expressão de genes relacionados à antioxição e metabolismo energético mitocondrial (ZHANG et al., 2003). Um outro estudo mostrou que o *laser* (685 nm) aumentou significativamente a quantidade de células tronco no período inicial da regeneração em planárias lesionadas (SOUZA et al., 2005).

Além dos estudos que buscam os mecanismos de ação celulares e seus efeitos, os questionamentos clínicos atuais sobre dosimetria são também transferidos aos estudos *in vitro*, e realizados com culturas celulares. Estes estudos, além de contribuir para a padronização das metodologias de pesquisa celulares indiretamente colaboram para responder as dúvidas clínicas.

A interação do comprimento de onda utilizado na fototerapia com o tecido alvo é de grande importância para que os efeitos terapêuticos sejam alcançados. A análise da absorção dos diferentes tipos de comprimento de onda por fotorreceptores presentes em fibroblastos mostrou que existem alguns picos favoráveis de absorção (420, 445, 470, 560, 630, 690 nm) concentradas na faixa de comprimento de onda visível, e apenas um pico no comprimento de onda maior, na faixa do infravermelho (730 nm) (VAN BREUGHEL; BAR, 1992).

Entretanto, outros estudos com culturas de células, mostraram existir efeitos em diversas faixas de comprimento de onda. Na faixa de 780 a 904 nm estudos revelaram que o *laser* estimulou a proliferação de fibroblastos (GROSSMAN et al., 1998; PEREIRA et al., 2002) e síntese de DNA e RNA

(LOEVSCHALL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; YU et al., 1996). Na faixa de 632 a 660 nm o *laser* mostrou estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos (HASS et al., 1990; MOORE et al., 2005; STEINECHNER; DYSON, 1993; YU et al., 1996), regular a produção de fatores de crescimento de fibroblastos (YU; NAIM; LANZAFAME, 1994), mostrou ser capaz de transformar fibroblastos em miofibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990), estimulou a liberação de IL-1 e IL-8 (YU et al., 1996) e aumentou a taxa de motilidade de queratinócitos (HASS et al., 1990; YU et al., 1996). Os macrófagos também podem ser estimulados pelo *laser* em 632,8 nm e assim como em outros comprimentos de onda, o *laser* atua aumentando a secreção de fator de crescimento dessas células em cultura (YOUNG et al., 1989).

Os diferentes comprimentos de onda que influenciam a proliferação de células endoteliais e fibroblastos dentro de uma mesma irradiância e fluência foram estudados por Moore et al. (2005). Após 72 horas da irradiação, tanto os fibroblastos quanto as células endoteliais apresentaram melhores resultados de proliferação celular no comprimento de onda vermelho, 665 e 655 respectivamente. A irradiação com o *laser* infravermelho (810 nm), no entanto, foi inibitória para os fibroblastos e pouco estimulatória para as células endoteliais (MOORE et al., 2005).

A maior afinidade celular por comprimentos de onda na faixa do visível relatada na literatura também foi estudada por Lubart et al. (1992). Avaliando a ocorrência de mitoses em fibroblastos irradiados com 360 nm, 632 nm e 780 nm em diferentes doses, foi verificado existir uma relação entre dose e comprimento de onda. No comprimento de onda 360 nm, a dose

relacionada com o maior número de mitoses é 25 vezes menor que a melhor dose do comprimento de onda 632 nm e aproximadamente 12 vezes menor que a melhor dose do 780 nm. Segundo o autor, isso pode estar relacionado com a banda de absorção das porfirinas endógenas (cromóforos absorvedores de luz) que está na região dos 360 nm. Como a sua absorção é maior, uma menor dose de energia é necessária para promover os efeitos bioestimulatórios esperados. Por outro lado, quando doses elevadas foram utilizadas, independentemente dos comprimentos de onda, ocorreu uma diminuição no número de mitoses, ou seja, o efeito inibitório foi verificado (LUBART et al., 1992).

Diferentes fluências e diferentes potências de irradiação também foram testadas em culturas de fibroblastos e mostraram interferir de forma importante no crescimento celular e produção de colágeno tipo I (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; VAN BREUGEL; BAR, 1992). Este fato observado na produção de colágeno, segundo os autores, deve estar relacionado com as fases proliferativas e produtivas das células especializadas, como ocorre nos processos cicatriciais.

A grande variedade de protocolos na literatura contribui para a grande divergência nos efeitos da fototerapia. Efeitos positivos da ação do *laser* são mostrados na maioria dos trabalhos, porém muitos ainda relatam ausência de efeitos ou efeitos inibitórios do *laser* (HALLMAN, 1988; LAGAN et al., 2001; POGREL; CHEN; ZHANG, 1997; WALKER et al., 2000). Isso pode ser explicado pelos efeitos bioinibitórios do *laser* quando doses elevadas em relação às doses ideais para aquele tecido irradiado são administradas

(KARU, 1987). Outra explicação é a falta de uma metodologia correta de investigação. Quando estudos com células são desenvolvidos, uma das vantagens da metodologia *in vitro* é o controle de todas as variáveis que podem influenciar nos resultados, mas, no entanto muitos trabalhos ainda comparam variáveis diferentes, obtendo resultados não tão confiáveis. O trabalho desenvolvido por Vinck et al. (2003), por exemplo, avaliou o crescimento celular de células irradiadas com *Laser* infravermelho e LED vermelho, infravermelho e verde. Cada uma das irradiações apresentava densidade de energia, potência e área de irradiações distintas, e apesar disso, foi concluído que entre as fontes de irradiação o LED verde foi o que promoveu maior crescimento celular. Esta conclusão deve ser analisada com cuidado, pois é limitada para aquele trabalho exclusivamente. Assim, na literatura, muitas conclusões são tiradas de forma aleatória e cada vez está mais difícil a padronização dos resultados encontrados.

Os efeitos do *laser* também estão relacionados com o estado fisiológico da célula prévio à irradiação. Segundo Karu (1987), a fotossensibilidade das células não é um fenômeno “tudo ou nada”, e as células podem responder aos estímulos da radiação de várias formas e intensidades. A magnitude da fotoresposta depende do estado fisiológico que a célula se encontra no momento que antecede a irradiação, sendo condicionado, por exemplo, pela quantidade de nutrientes disponíveis e pela idade da cultura. Células em déficit nutricional são mais fotossensíveis que células em meio nutricional ideal, sendo que a amplitude da resposta varia com o grau de déficit nutricional. Em seus estudos recentes, Karu (2000)

relaciona o efeito estimulante do *laser* com o estado redox da célula no sentido da oxidação, enquanto que alterações no sentido da redução estão relacionadas com os efeitos inibitórios do *laser*. Além disso, células na fase exponencial de crescimento (fase *log*) são também mais fotossensíveis que aquelas na fase estacionária de crescimento (fase *lag*).

Clinicamente, os efeitos do *laser* são, portanto melhor evidenciados em tecidos lesionados ou em pacientes com disfunções locais ou sistêmicas (TUNER; HODE, 1999). Assim, os tratamentos preventivos com *laser* só são eficazes em pacientes já comprometidos como é caso do tratamento preventivo da mucosite oral, lesão associada ao tratamento oncológico (COWEN et al., 1997).

Em trabalhos que envolvam a irradiação de culturas celulares uma das maneiras citadas na literatura de alterar o potencial redox celular é causando uma injúria local na monocamada celular. Esta injúria é realizada com a ponta de uma pipeta ou agulha, onde é removida uma faixa celular no meio da placa de cultura, como se esta tivesse sido arranhada. Este tipo de experimento causa uma ruptura nos contatos celulares que tendem a ser restabelecidos através da migração e proliferação celular (CHA et al., 1996; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006a; 2006b).

Outros trabalhos utilizam uma metodologia que gera uma situação de estresse nutricional. Este stress é causado pela deficiência nutricional causada quando a porcentagem de Soro Fetal Bovino (SFB) usualmente adicionada ao meio (10 %) é alterada para menores valores. Esta redução vai depender da linhagem celular e do tempo experimental necessário, que

é determinada a partir de experimentos pilotos (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

A alteração do estado fisiológico celular previamente à irradiação e induzido experimentalmente é defendido por muitos autores como sendo uma etapa experimental fundamental para que os efeitos do *laser* sejam evidenciados (HALLMAM, 1988; KARU, 1988; LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; NARA; MATONO; MORIOKA, 1991). No entanto, na literatura existem trabalhos comprovando que mesmo as células normais quando irradiadas apresentam resposta fisiológica ao *laser* (ENWEMEKA et al., 1990; HALLMAM et al., 1988; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; ALMEIDA-LOPES et al., 2001). Um dos efeitos observados por Almeida-lobes et al. (2001), quando fibroblastos normais (com nutrição ideal de 10 % SFB) foram irradiados, foi uma polarização celular em diferentes sentidos observada por microscópio de luz (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

A frequência e o número de irradiações também são controversos na literatura. A maioria dos trabalhos realizados com culturas celulares avaliou os efeitos do *laser* após uma única irradiação (LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LUBART et al., 1992; MOORE et al., 2005). Na prática clínica, no entanto, a maioria das lesões indicadas para o tratamento com o *laser* requer várias irradiações como é o caso do tratamento de lesões herpéticas e aftosas, para as quais são indicadas irradiações diárias até a regressão total da lesão (PRIKULS, 2000; SCHINDL; NEUMANN, 1999)

No entanto, nos estudos onde mais de uma irradiação foram realizadas, (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006a; 2006b; PEREIRA et al., 2002; VINCK

et al., 2003) a comparação direta dos efeitos de energias administradas de uma única vez e estas fracionadas sobre o crescimento celular de fibroblastos não foi o objetivo principal de nenhum dos trabalhos publicados.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi analisar os efeitos do fracionamento da energia comparados com energias totais na fototerapia com *laser* em baixa intensidade sobre fibroblastos pulpares humanos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP, sob o protocolo número 47/06 (Anexo A). Todos os procedimentos realizados com o *laser* seguiram as normas de segurança da ABNT, NBR/IEC 601.2.22 e IEC 60825-1/2001-8, ou seja, o pesquisador utilizou os óculos de proteção específicos sempre que o *laser* foi utilizado.

A análise do efeito da fototerapia com *laser* em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos pulpaes humanos foi feita a partir da comparação entre energias totais e fracionadas. O estudo foi realizado *in vitro* com fibroblastos pulpaes humanos da linhagem FP5 (Fibroblasto Pulpar 5) estabelecida a partir da polpa dental de terceiro molar humano. A linhagem celular FP5 utilizada pertence ao banco de células do Laboratório de Pesquisa Básica do Departamento de Dentística, sob coordenação da Profa. Dra. Márcia Martins Marques.

Os fibroblastos foram cultivados, mantidos em meio de cultura com déficit nutricional e os grupos experimentais foram divididos de acordo com a energia utilizada e o número de irradiações realizadas com *laser* de diodo emitindo no comprimento de onda vermelho (InGaAlP). Os efeitos da fototerapia foram avaliados pelo aumento da atividade mitocondrial através do teste de redução do MTT, onde o crescimento celular pode ser observado.

Para a realização do trabalho, o item Material e Métodos foi dividido em 2 fases. A Fase 1 compreendeu 4 etapas seqüenciais que determinaram o protocolo experimental (metodologia final) do trabalho. A Fase 2 compreendeu a realização da metodologia final estabelecida.

Em todos os experimentos da Fase 1 e da Fase 2 as metodologias de cultivo e contagem celular, bem como o plaqueamento celular e a análise de crescimento celular avaliado pelo método de redução do MTT foram realizados conforme descrito a seguir:

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Para a realização dos experimentos frascos de células da linhagem FP5 armazenados em nitrogênio líquido foram descongelados e as células cultivadas em meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Cultilab, Campinas, SP, Brasil) contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab) e 1 % de solução antibiótica-antimicótica (Cultilab) dentro de frascos apropriados ao cultivo celular de 5 ml. As células foram incubadas em estufa, em ambiente úmido, a 37 °C, numa atmosfera contendo 95 % de ar atmosférico e 5 % de dióxido de carbono (CO₂). A monitorização do crescimento celular foi realizada a cada 24 horas utilizando-se um microscópio invertido de fase. Ao atingirem a

subconfluência, condição onde mais de 75 % da superfície de cultivo está coberta por células e, para evitar a confluência, situação onde o crescimento celular passa a ser inibido pelo contato celular, foi realizada a subcultura. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado do frasco, e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA), pH 7,2. As células foram então incubadas durante 2 minutos a 37 °C com 2 ml de solução de tripsina-EDTA a 0,25 % (Cultilab). A atividade da tripsina foi digerir e clivar as proteínas de adesão celular e do EDTA de quelar os cátions divalentes livres possibilitando que as células aderidas ao fundo do frasco de cultura fossem liberadas. A seguir, as células foram examinadas no microscópio para verificar se estavam totalmente soltas e a tripsina foi inativada com o acréscimo de 5 ml de meio de cultura (com 10 % SFB) ao frasco. Todo o conteúdo do frasco foi então transferido para um tubo de ensaio e centrifugado a 300g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado de células resultante da centrifugação foi ressuscitado em 1 ml de meio de cultura fresco, e a suspensão de células foi replaqueada em frascos de cultivo maiores, de 20 ml. Para a manutenção da viabilidade celular, a troca dos meios de cultura foi realizada a cada dois dias (Figura 4.1).



Figura 4.1 - Esquema da Cultura de Células (descongelamento, cultivo e subcultura)

4.2 CONTAGEM E PLAQUEAMENTO CELULAR

Para a realização dos experimentos em placas experimentais de 96 poços (Figura 4.2), as células cultivadas precisavam ser contadas para que um mesmo número de células fossem plaqueadas em cada poço experimental. Desta forma, a contagem de células viáveis foi realizada

através do uso de hemocitômetro com o método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan (FRESHNEY, 2005).



Figura 4.2 - Placas Experimentais de 96 poços

As células cultivadas eram então tripsinizadas, seguindo o mesmo protocolo do subcultivo celular, e o precipitado de células resultante da centrifugação era ressuscitado em 1 ml de PBSA. Parte desta suspensão de células (0,1 ml) era então transferida para um tubo tipo *Eppendorf*, onde eram adicionados 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de Azul de Trypan. Cada uma das 2 câmaras do hemocitômetro recebia 15 μ l dessa nova suspensão de células, onde com o auxílio do microscópio invertido era realizada a contagem celular nos 2 quadrados centrais das câmaras do hemocitômetro (Figura 4.3). Somente as células vivas entravam no número total de células contadas. As células mortas encontravam-se coradas em azul, pela penetração do azul de Trypan nas lesões da membrana celular, e eram excluídas do cálculo. O número total de células viáveis originárias do frasco era obtido através da seguinte equação matemática:

Número total de células (NT)

$$NT = \frac{\text{Número total de células não coradas contadas} \times 10 \text{ (diluição)} \times 10^4}{2 \text{ (número de quadrados do hemocitômetro usados para contagem)}}$$

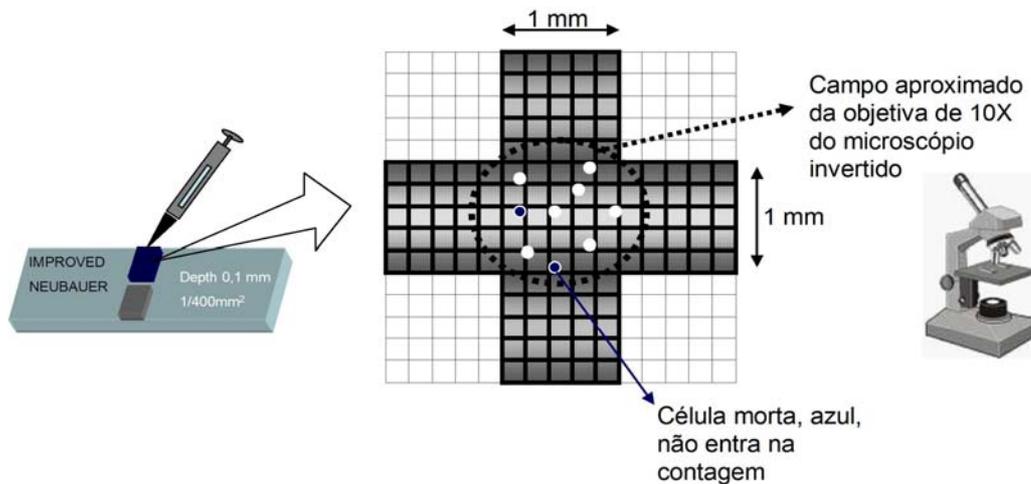


Figura 4.3 - Câmara de Neubauer (hemocitômetro)

De posse do número de células presentes em 1 ml da suspensão avaliada (NT), era possível a realização dos cálculos necessários para o plaqueamento celular dos experimentos realizados.

Para a realização do plaqueamento, era necessário o número de poços que seriam plaqueados (n. poços) e o número de células desejadas em cada poço (n. células). Obtendo-se o número total de células necessárias para o experimento (total células experimento = n. poços x n. células) era realizada uma regra de três para se obter a quantidade da suspensão celular (µl. suspensão) que seria utilizada para que o número total de células para o experimento fosse obtido:

Número total de células ——— 1000 μ l de suspensão

Total células experimento ——— X μ l de suspensão

Além disso, o número de poços plaqueados multiplicados por 100 era a quantidade de meio em que o X μ l de suspensão deveria ser diluído a fim de se colocar em cada poço experimental no momento do plaqueamento 100 μ l de meio com o n. células diluídas.

Depois de plaqueadas as células nos poços experimentais os demais poços das placas eram preenchidos com líquido (PBSA) para minimizar a evaporação dos meios de cultura.

4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR A PARTIR DO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT

Os dados do crescimento celular foram obtidos através da análise da atividade mitocondrial celular. Essa análise se baseia 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, realizado por enzimas mitocondriais, que é solúvel em água, em um formazan insolúvel (Figura 4.4). 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 é composto por 0,05 g de MTT (CalBioChem, Canadá) em 10 ml de PBSA e o reagente B por 1 g de SDS (dodecil sulfato de sódio; QBioGene, EUA) em 10 ml de 0,01 M de HCl (ácido clorídrico). O reagente A era preparado um dia antes da realização do teste e o reagente B, imediatamente antes da sua utilização.

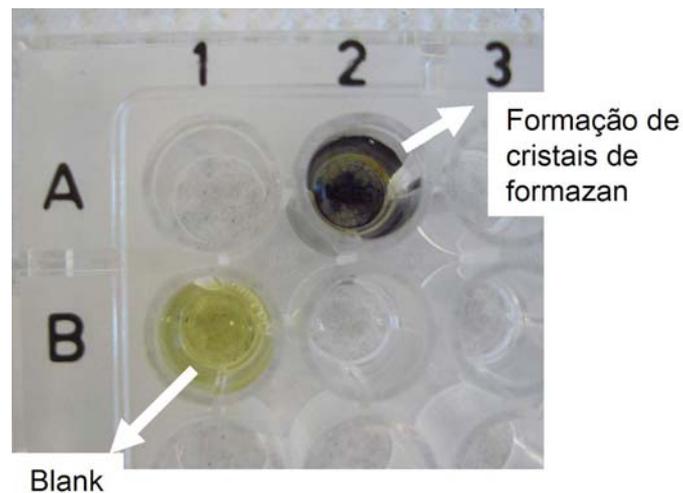


Figura 4.4 - Formação de cristais de formazan (poço A2 experimental) e *Blank* (poço B1, controle negativo para o espectrofotômetro)

No dia da realização do teste de MTT, os meios de cultura dos poços experimentais eram aspirados e substituídos por 100 μ L de meio DMEM fresco. Em seguida, eram adicionados 10 μ L do reagente A em cada poço, incluindo alguns poços sem células considerados controle negativo (*Blank*)

necessário para a leitura no espectrofotômetro. Depois de 4 h de incubação com o reagente A, em estufa a 37 °C e protegidas da luz com folha de papel alumínio, 100 µL do reagente B eram adicionados em cada poço experimental das placas avaliadas. Estas retornavam para incubação em estufa a 37 °C por mais 4 horas, também protegidas da luz. Decorrido esse período as culturas eram misturadas gentilmente com auxílio de pipetador multicanal, as bolhas eventualmente formadas eram aspiradas e a placa era levada ao espectrofotômetro (Leitor de ELISA, Amersham Biosciences, Biotrak II, Inglaterra) para leitura de sua absorbância com leitor de 562 nm. Uma impressora acoplada ao leitor imprimia os dados obtidos imediatamente após a leitura do espectrofotômetro com valores no formato de log do valor da absorbância (Figura 4.5 e 4.6).



Figura 4.5 - Esquema geral da Reação do MTT

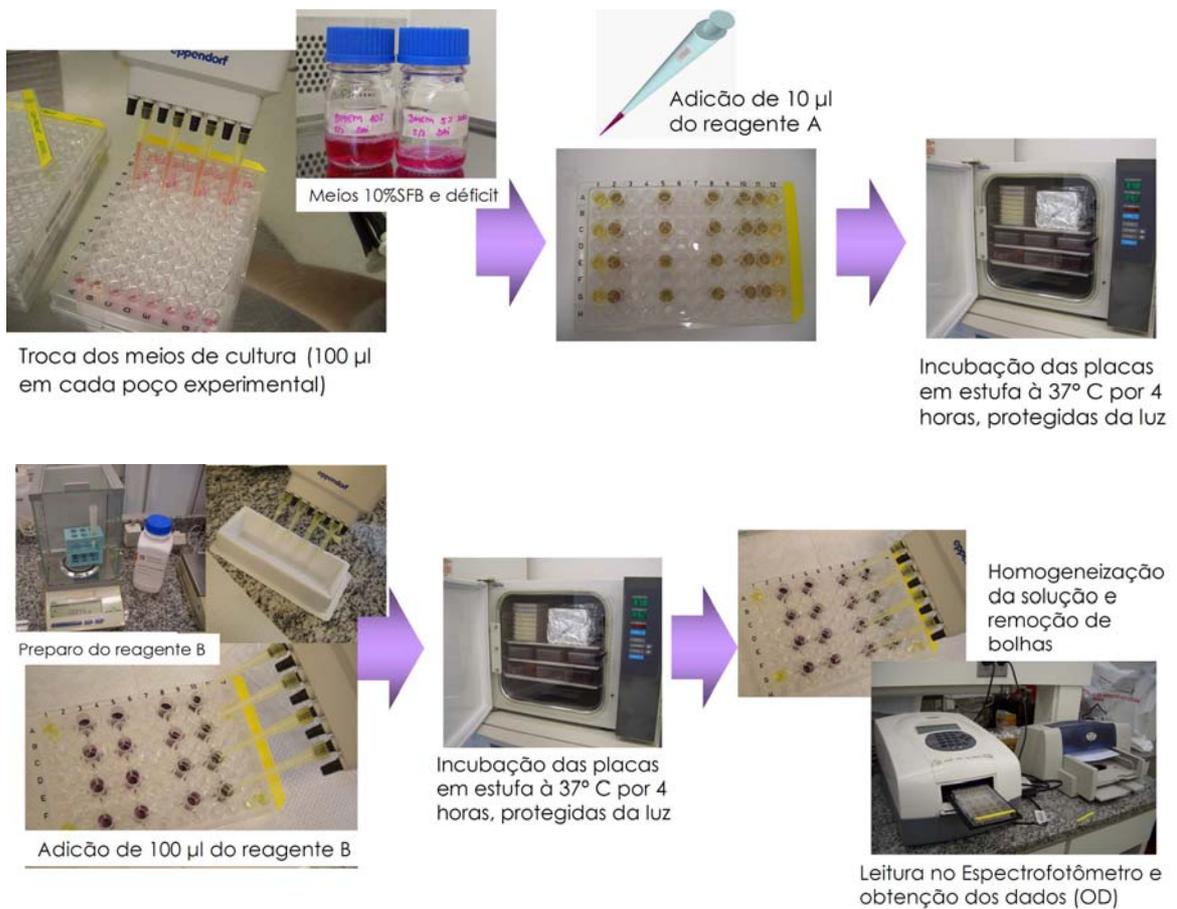


Figura 4.6 - Passos laboratoriais da reação do MTT

4.4 FASE 1: DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.4.1 Etapa 1. Determinação do número de células a serem plaqueadas

Em experimentos com cultura celular é importante como primeiro passo laboratorial avaliar o comportamento celular da linhagem específica que serão realizados os experimentos. Isso porque, cada linhagem possui um

ritmo próprio de crescimento, e cada experimento utiliza um tipo de placa de cultura. Assim, para a delimitação do experimento, é necessário conhecer como a linhagem celular se comportará nas placas de cultura ao longo dos dias experimentais. A quantidade de células que cada poço experimental da placa de cultura irá receber e seu crescimento ao longo do tempo experimental é, portanto o que queremos saber nesta primeira etapa.

Para a determinação do número de células foram realizados 3 experimentos para analisar a taxa de crescimento celular em 4 dias experimentais testando o plaqueamento de 500, 1000, 2000, 3000 e 5000 células. Cada experimento foi realizado seguindo o seguinte protocolo experimental:

1. Descongelamento celular.
2. Cultura celular em meio DME acrescido 10 % de SFB.
3. Plaqueamento celular de cada grupo em quadruplicata e em 4 placas de 96 poços.
4. Realização da Análise do crescimento celular a partir do método de redução do MTT nos 4 dias experimentais (em cada dia, uma placa experimental foi submetida ao teste do MTT).

Em todos os experimentos, nas Colunas 1 e 12 os poços tinham apenas meio de cultura + reagentes, sendo o controle negativo (*Blank, BK*) para o espectrofotômetro. As diferentes quantidades de células testadas foram plaqueadas nas demais colunas sempre em quadruplicata, como esquematizado na Figura 4.7.

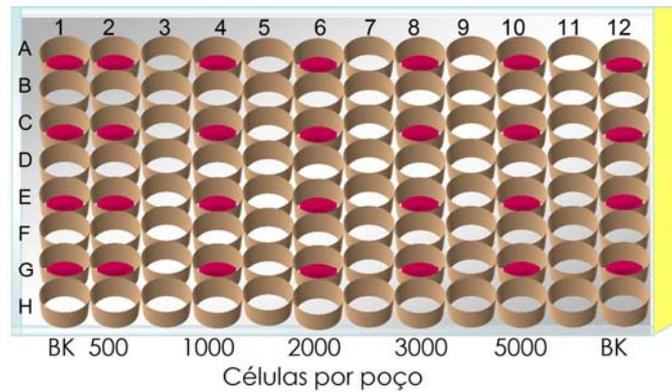


Figura 4.7 - Esquema da placa de cultura com a localização do controle negativo para o espectrofotômetro e dos grupos experimentais em quadruplicata

Todos os experimentos foram plaqueados em 4 placas experimentais, para a realização de 1 teste de MTT por dia, durante 4 dias (Figura 4.8).

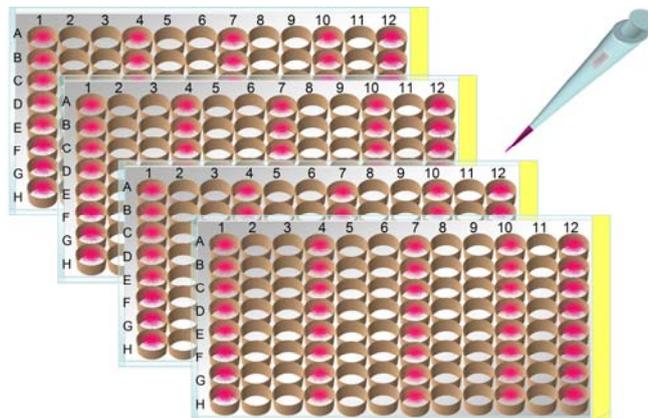


Figura 4.8 - Plaqueamento de 4 placas iguais por experimento

4.4.2 Etapa 2. Determinação da porcentagem de soro fetal bovino no meio de cultura que promova um déficit nutricional celular

Segundo a literatura (NARA; MATONO; MORIOKA, 1991; STEINLECHNER; DYSON, 1993), o efeito provocado pela *laserfototerapia* só pode ser observado se a estrutura a ser irradiada estiver em nível intermediário de potencial redox, ou seja, em estresse oxidativo. As células devem estar em um estado fisiológico não sadio, por exemplo, dentro de um processo de cicatrização celular após uma injúria tecidual. A maioria dos trabalhos na literatura reproduz esta situação de estresse celular através da diminuição da concentração do soro fetal bovino do meio de cultura causando um déficit nutricional celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; PEREIRA et al., 2002).

Desta forma, o objetivo da Etapa 2 foi encontrar a porcentagem de soro fetal bovino capaz de gerar um déficit nutricional na linhagem celular utilizada neste trabalho (FP5). A concentração de soro ideal para gerar este déficit deve diminuir a taxa de crescimento celular de forma significativa em relação ao crescimento regular da linhagem FP5 (em DMEM com 10 % de SFB) sem, no entanto, impedir sua viabilidade. Assim, foram realizados 2 experimentos que testaram diferentes concentrações de soro fetal bovino: 2,5 %, 5 %, 7,5 % e 10% (controle) avaliando o crescimento celular (pelo teste de MTT) em quatro dias experimentais.

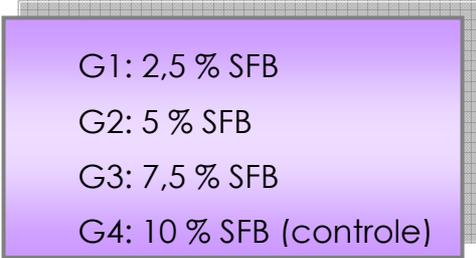
O protocolo experimental de descongelamento, cultura celular e plaqueamento seguiram o mesmo protocolo já descrito anteriormente. Em cada experimento testado, foram utilizadas 4 placas de 96 poços, da mesma forma que na Etapa 1, para avaliação do crescimento celular através do teste do MTT em 4 tempos experimentais (1, 2, 3 e 4, dias após o plaqueamento).

Diariamente o meio de cultura era aspirado e 200 µl de meio fresco era adicionado respeitando sempre a porcentagem de SFB correspondente a cada grupo experimental. Uma das placas era aleatoriamente escolhida para ser submetida ao teste de MTT. Nesta placa apenas 100 µl do meio fresco era acrescentado para que os outros reagentes do teste tivessem espaço dentro do poço experimental.

Em decorrência dos resultados da Fase 1 optamos por trabalhar daqui para frente com 500 ou 1000 células por poço experimental.

No experimento 2.1 foram plaqueadas 500 células por poço, em quadruplicata para os seguintes grupos experimentais de acordo com a concentração do SFB:

Grupos experimentais Experimento 2.1:



G1: 2,5 % SFB
G2: 5 % SFB
G3: 7,5 % SFB
G4: 10 % SFB (controle)

Distribuição dos grupos experimentais nas placas:

Colunas 1 e 12: controle negativo (BK) para o espectrofotômetro. As diferentes concentrações de SFB no meio de cultura foram distribuídas da seguinte forma: coluna 2 (10% SFB), 4 (7,5%), 7 (5%) e 10 (2,5%) (Figura 4.9). Em cada placa, as concentrações de SFB foram testadas em quadruplicata e foram plaqueadas 4 placas, para a realização do teste do MTT em 4 dias experimentais.

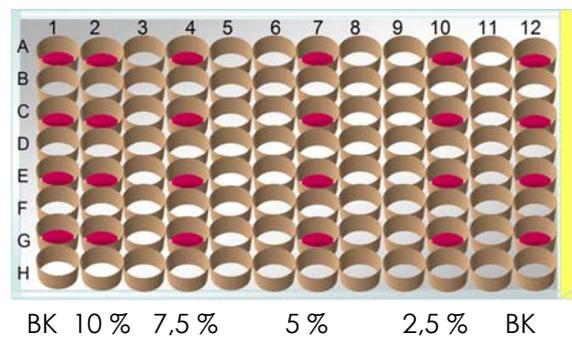
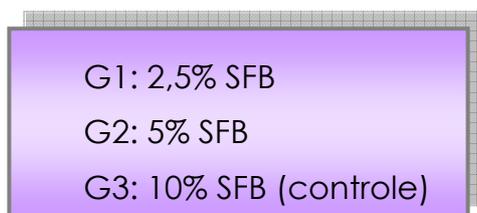


Figura 4.9 - Distribuição dos grupos na placa de cultura do experimento 2.1

No experimento 2.2 foram plaqueadas 1000 células por poço em quadruplicata, para os seguintes grupos de acordo com a concentração do SFB:

Grupos experimentais Experimento 2.2:



Distribuição dos grupos experimentais nas placas:

Colunas 1 e 12: controle negativo (BK) para o espectrofotômetro. As diferentes concentrações de SFB no meio de cultura foram distribuídas da seguinte forma: coluna 4 (2,5%), 7 (5%) e 10 (10% SFB) (Figura 4.10). Assim como no experimento 2.1, as concentrações de SFB foram testadas em quadruplicatas em 4 placas para a realização do teste do MTT diariamente.

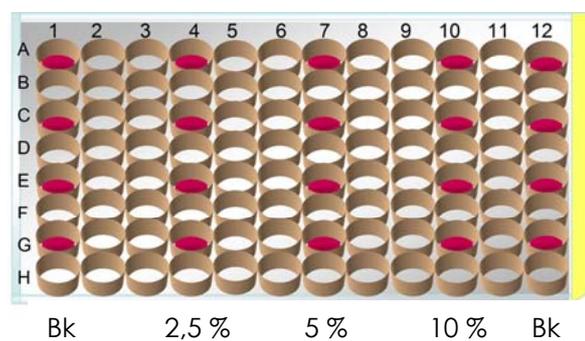


Figura 4.10 - Distribuição dos grupos na placa de cultura do experimento 2.2

4.4.3 Etapa 3. Determinação da distribuição dos grupos nas placas experimentais para as irradiações.

Em estudos que envolvem irradiação celular com *laser* em baixa intensidade, a realização de experimentos para testar a distribuição dos grupos nas placas é fundamental para a verificação de que tal organização dos grupos não interferirá nos resultados finais. Isso se deve, principalmente, ao fato da radiação *laser* possuir a característica de espalhamento

(GUTKNECHT; EDUARDO, 2004), podendo atingir mais de um poço experimental.

Desta forma, para a determinação da distribuição dos grupos nas placas experimentais foram realizados experimentos pilotos onde as células foram submetidas à irradiação com *laser* de baixa potência. O protocolo de irradiação foi realizado já na tentativa de responder ao objetivo do trabalho, ou seja, foram testadas energias inteiras e fracionadas.

Foram realizados dois experimentos (3.1 e 3.2), ambos com déficit nutricional de 2,5 % de SFB. No experimento 3.1 foram plaqueadas 500 células e no experimento 3.2, 1000 células. Os grupos experimentais (Tabelas 1 e 2) foram divididos em duas placas experimentais e cada uma foi plaqueada em quadruplicata (Figura 4.11 e Figura 4.12) para que o teste do MTT fosse realizado em 4 tempos experimentais (dias 1, 2, 3 e 4).

- G1. Única irradiação de 3 segundos, energia total de 0,12 J e 1,97 J/cm²
- G2. Única irradiação de 6 segundos, energia total de 0,24 J e 3,93 J/cm²
- G3. Única irradiação de 9 segundos, energia total de 0,36 J e 5,9 J/cm²
- G4. Controle positivo (10 % SFB, sem irradiação) placa 1
- G5. Controle negativo (2,5 % SFB, sem irradiação) placa 1

Quadro 4.1 - Grupos experimentais placa 1

G6. 2 irradiações de 3 segundos (6/6 h), energia total de 0,24 J e $2 \times 1,97 \text{ J/cm}^2$

G7. 3 irradiações de 3 segundos (6/6 h), energia total de 0,36 J e $3 \times 1,97 \text{ J/cm}^2$

G8. Controle positivo (10 % SFB, sem irradiação) placa 2

G9. Controle negativo (2,5 % SFB, sem irradiação) placa 2

Quadro 4.2 - Grupos experimentais placa 2

Distribuição dos grupos nas placas:

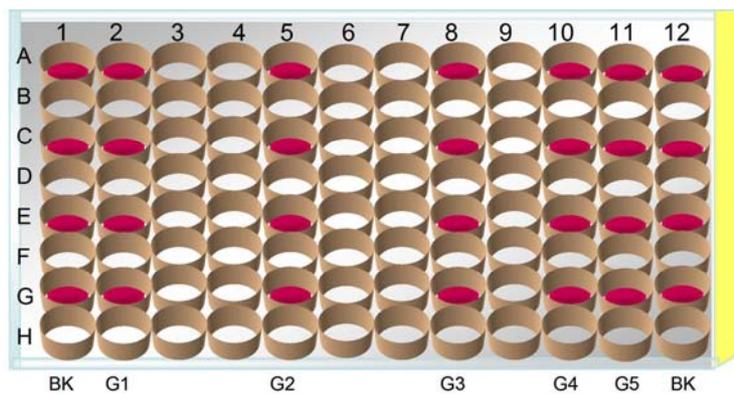


Figura 4.11 - Distribuição dos grupos experimentais na placa 1

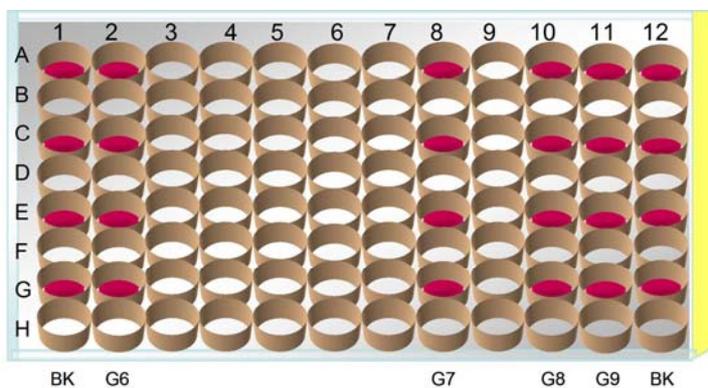


Figura 4.12- Distribuição dos grupos experimentais na placa 2

4.4.3a Equipamento *Laser*

O equipamento *laser* utilizado foi o *Twin Laser* (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil) pertencente ao LELO - Laboratório Especial de *Laser* em Odontologia da FOUSP (Figura 4.13). O *Twin Laser* possui dois diodos, um emitindo no comprimento de onda do vermelho visível (InGaAlP, 660 nm) com até 40 mW de potência e o outro, emitindo no comprimento de onda infravermelho (GaAlAs, 780 nm) com até 70 mW, sendo a área do feixe de irradiação 0,036 cm². Antes e após cada irradiação, a potência de emissão *laser* foi aferida por um medidor de potência (Powermeter, Molectron, EUA pertencente ao LELO -FOUSP) (Figura 4.14). Assim, o valor da potência foi ajustado para os valores desejados por meio do medidor de potência e não pelo valor apresentado no painel de controle do equipamento.



Figura 4.13 - *Twin Laser* (MMOPTICS Ltda, São Carlos, S.P. Brasil)



Figura 4.14 - Medidor de potência (Powermeter Molelectron, EUA)

4.4.3b Protocolo de Irradiação

No dia seguinte ao plaqueamento e imediatamente antes das irradiações, todos os meios de cultura foram trocados (meio déficit para os grupos irradiados e controle negativo e 10 % SFB para o grupo controle positivo). Nos grupos de múltiplas irradiações, estas foram realizadas a cada 6 horas (PEREIRA et al., 2002).

No momento da irradiação, as placas de cultura eram acomodadas dentro de uma máscara escura, confeccionada com cartolina preta, com apenas a área a ser irradiada exposta (Figura 4.15).



Figura 4.15 - Máscara escura com os espaços de irradiação por grupo experimental

O protocolo de irradiação foi delineado de maneira padronizada uma vez que a distância entre o *laser* e a superfície de aplicação interfere na dosagem utilizada. A distância entre o feixe *laser* e as células foi constante, mantendo-se a ponteira do *laser* em contato com o fundo da placa experimental em um aparato especialmente desenvolvido para irradiação de culturas celulares pelo Laboratório de Cultura de Células do Dept. de Dentística da FOU SP (Figura 4.16 e Figura 4.17).

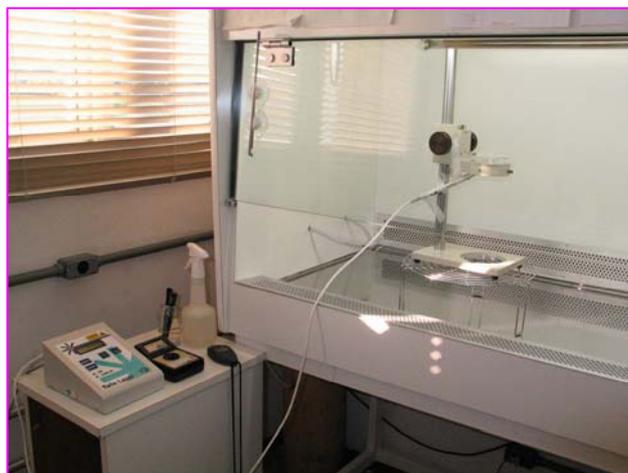


Figura 4.16 - Suporte desenvolvido no laboratório de Cultura de Células do Departamento de Dentística para aplicação padronizada do *laser* nos poços (Capela de fluxo laminar com suporte para a irradiação do *laser* e placa pronta para ser irradiada)

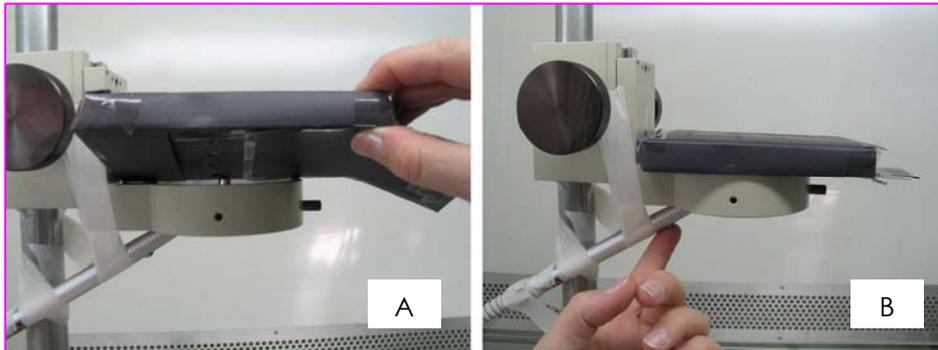


Figura 4.17 - Máscara escura com a placa de cultura dentro sendo posicionada para a irradiação (A) e o *laser* sendo acionado (B)

A incidência do feixe *laser* foi feita através da base das placas de cultivo celular (MOORE et al., 2005), incidindo diretamente na monocamada celular sem precisar ultrapassar o meio de cultivo. As placas de cultura utilizadas eram compostas por poliestireno transparente com 1 mm de espessura sendo a área cultivável de cada um dos 96 poços de 3 mm². Uma vez que a espessura do fundo da placa é de 1 mm, o *laser* foi acionado a esta distância da cultura de células, e os cálculos dos parâmetros utilizados foram feitos levando-se em consideração este dado, ou seja, a área de irradiação foi recalculada. Os parâmetros de irradiação estão descrito no Quadro 1 e foram escolhidos conforme trabalhos prévios realizados no laboratório (PEREIRA et al., 2002) e outros estudos relatados na literatura (MOORE et al., 2005).

Comprimento de onda (nm)	Potência (W)	Modo de irradiação	Área de irradiação (cm ²)	Tempo de irradiação (s)	Fluência ou Densidade de Energia (J/cm ²)	Energia total (J)
660 (<i>Laser</i> vermelho)	40	Contato e pontual	0,061	3	1,97	0,12
				6	3,93	0,24
				9	5,9	0,36

Quadro 4.3 - Parâmetros das irradiações com o *Twin Laser*

Todos os grupos experimentais foram expostos às mesmas condições de estresse ambiental (temperatura, umidade e luz), sendo que durante as irradiações os grupos controles permaneceram fora da estufa o mesmo tempo que os grupos irradiados.

Os meios de cultura foram trocados diariamente pelos meios correspondentes e duas placas por dia (placa 1 e 2) foram submetidas ao teste da redução do MTT.

4.4.4 Etapa 4. Determinação do tempo experimental (plaqueamento, crescimento, irradiação e análise do MTT)

Os intervalos de tempo entre o plaqueamento celular e as irradiações, e entre estas e os métodos de avaliação são bastante discutidos na

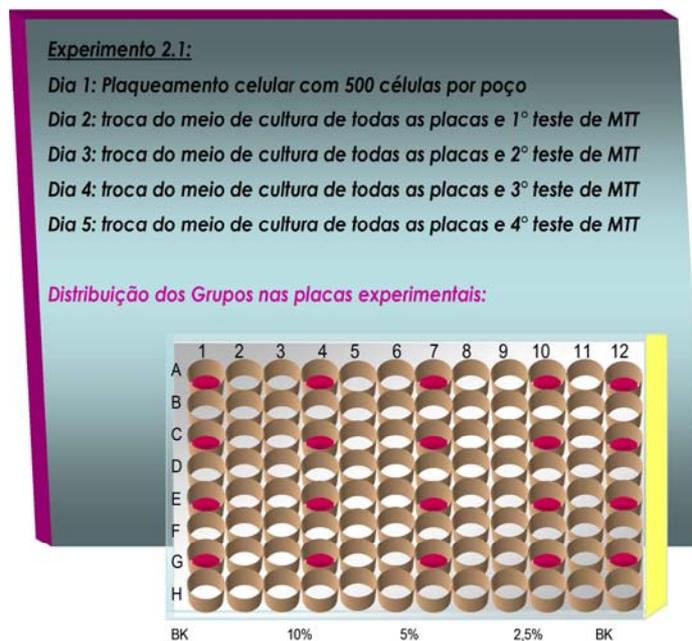
literatura. O primeiro intervalo deve ser tal que as células sejam capazes de se adaptarem a sua nova condição de vida, ou seja, ao meio de cultura e poço experimental (fase *lag*). Uma vez adaptadas, as células iniciam a fase *log* de multiplicação celular. Para responderem às irradiações, o ideal é que elas se encontrem no início da fase *log*, assim seu crescimento estimulado pelo *laser* poderá ser comparado com o crescimento do grupo controle não irradiado. O segundo intervalo é bastante crítico uma vez que segundo a literatura, a multiplicação celular é estimulada pela radiação *laser* (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; KARU, 1987; LUBART et al., 1992). Assim, se o tempo de avaliação após a irradiação for grande, as células podem confluir e perder sua vitalidade e, no momento da avaliação do crescimento, este não poderá ser mais observado. Trabalhos que avaliaram o crescimento celular 72 h após a irradiação encontraram resultados opostos comparados com avaliações 24 h após a irradiação (VINCK et al., 2003).

Para a determinação do tempo experimental primeiramente foram utilizados 2 experimentos com o objetivo de avaliar o intervalo ideal entre o plaqueamento e a irradiação (experimentos 2.1 e 4.2) e depois foram feitos 2 experimentos para avaliar o intervalo ideal entre as irradiações e a realização do teste de redução do MTT (experimentos 4.3 e 4.4).

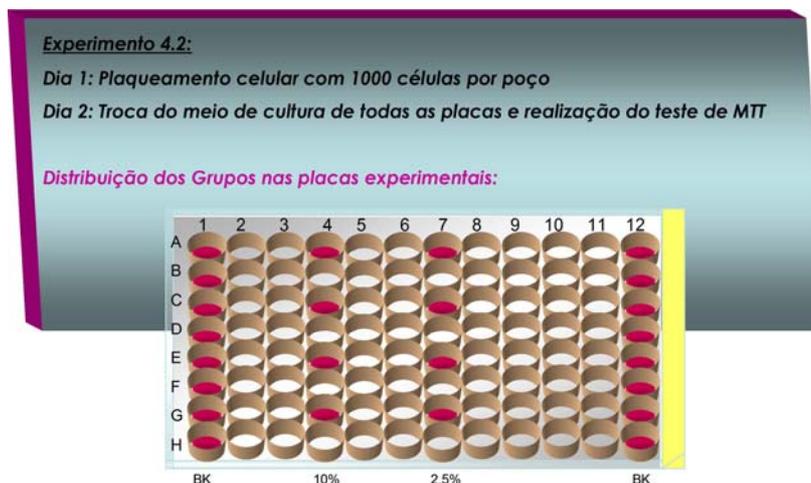
Os experimentos 2.1 e 4.2 foram realizados sem a etapa de irradiação celular, apenas avaliando a adaptação celular com o meio de cultura em 4 dias experimentais (2.1) e avaliando a adaptação celular 24 horas após o plaqueamento (4.2). Ambos os experimentos compararam as células em meio 10% e em meio déficit, sendo o experimento 2.1 realizado com 500

células por poço e meios déficits de 2,5% e 5% e o experimento 4.2 com 1000 células por poço e meio déficit de 2,5% de SFB.

O protocolo experimental do experimento 2.1 apesar de já ter sido apresentado, foi novamente descrito no quadro 4.5 e a descrição do experimento 4.2 está no quadro 4.6.



Quadro 4.5 - Cronograma e distribuição dos grupos nas placas do experimento 2.1



Quadro 4.6 - Cronograma e distribuição dos grupos nas placas do experimento 4.2

Os experimentos 4.3 e 4.4 foram realizados de acordo com os seguintes grupos experimentais:

G1: 3 segundos de irradiação / 0,12 J / 6,3 J/cm²

G2: 6 segundos de irradiação / 0,24 J / 12,6 J/cm²

G3: 9 segundos de irradiação / 0,36 J / 18,9 J/cm²

G4: 2 x 3 segundos de irradiação / 2 x 0,12 J (0,24 J) / 2 x 6,3 J/cm²

G5: 3 x 3 segundos de irradiação / 3 x 0,12 J (0,36 J) / 3 x 6,3 J/cm²

G6: controle negativo (5 % SFB, sem irradiação)

G7: controle positivo (10 % SFB, sem irradiação)

O protocolo experimental utilizado em ambos os experimentos foi igual (Quadro 4.7), a única diferença entre eles foi o tempo de avaliação pelo teste de MTT. No experimento 4.3 a análise foi realizada 24 h após as irradiações e o no experimento 4.4, 48 h após as irradiações.

Protocolo experimentos 4.3 e 4.4:

Dia 1: plaqueamento celular com 1000 células por poço

Dia 2: Troca dos meios de cultura

Dia 3: Irradiações (com intervalo de 6/6hs)

Dia 4: Troca de todos os meios de cultura + Avaliação da redução do MTT para o experimento 4.3

Dia 5: Troca de todos os meios de cultura + Avaliação da redução do MTT para o experimento 4.4

Quadro 4.7 - Protocolo dos experimentos 4.3 e 4.4

Distribuição dos grupos nas placas experimentais:

A distância deixada entre os grupos experimentais e entre os poços dentro de cada grupo foi modificada, conforme os resultados dos experimentos previamente realizados. Os grupos experimentais ficaram em placas diferentes e, dentro de cada placa, apenas 4 poços experimentais foram utilizados (Figura 4.18).

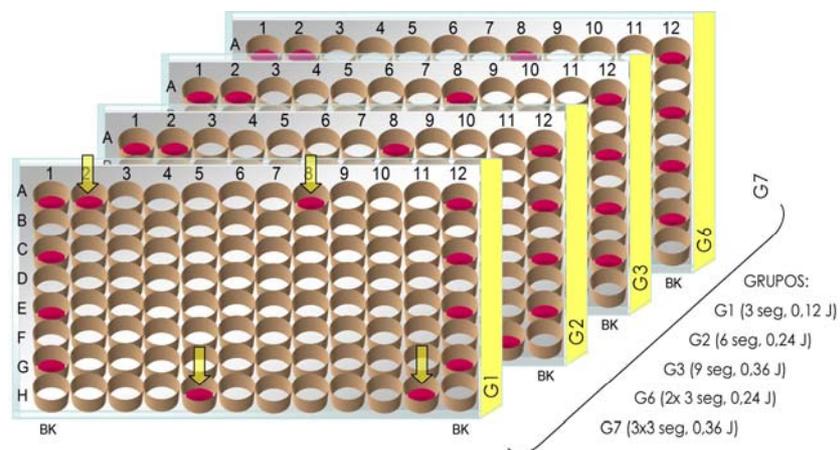


Figura 4.18 - Distribuição dos grupos irradiados nas placas experimentais.

Cada grupo irradiado foi plaqueado em uma placa, em quadruplicata, com os poços experimentais bastante afastados entre si (2 A, 8 A, 5H e 11H).

Os grupos controle por outro lado, G6: controle negativo (5% SFB, sem irradiação) e G7: controle positivo (10% SFB, sem irradiação), foram agrupados em 1 única placa, sendo 8 poços por grupo (Figura 4.19).

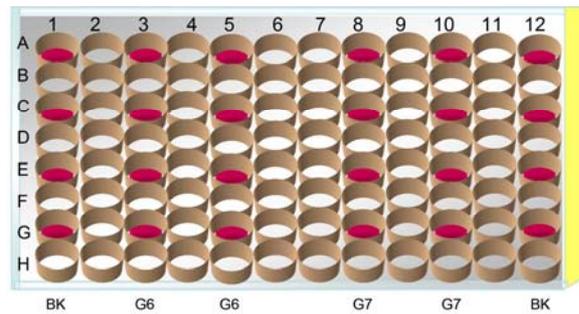


Figura 4.19 - Placa com os grupos controles (G6 e G7) dos experimentos 4.3 e 4.4

Equipamento *laser* utilizado para os experimentos 4.3 e 4.4:

O experimento *laser* utilizado foi o Thera Lase (DMC® Equipamentos Ltda - São Carlos, S.P, Brasil), pertencente ao LELO - Laboratório Especial de *Laser* em Odontologia da FOU SP (Figura 4.20). O Thera Lase é classificado como classe 3B, possui dois diodos emitindo no comprimento de onda do vermelho visível (InGaAlP), com comprimento de onda 685 nm, e outro emitindo no infravermelho (AsGaAl), com comprimento de onda de 830 nm.



Figura 4.20 - Equipamento Thera Lase (DMC Equipamentos LTDA, São Carlos, SP, Brasil)

O *laser* utilizado foi o vermelho, com uma potência de saída aproximada de 40 mW, área da fibra de 0.0028 cm², diâmetro do feixe de 0,06 cm, emissão contínua e aplicação pontual. Antes e após cada irradiação, a potência de emissão *laser* foi aferida por um medidor de potência (*LaserCheck*, Coherent, EUA/ Fapesp Auxílio a Pesquisa 05/55431-0) (Figura 4.21). Assim, o valor da potência foi ajustado para os valores desejados por meio do medidor de potência e não pelo valor apresentado no painel de controle do equipamento.



Figura 4.21 - Medidor de potência *LaserCheck* (Coherent, EUA)

Protocolo de irradiação utilizado nos experimentos 4.3 e 4.4:

No dia seguinte ao plaqueamento e imediatamente antes das irradiações, todos os meios de cultura foram trocados (meio déficit para os grupos irradiados e controle negativo e 10 % SFB para o grupo controle positivo).

No momento da irradiação, as placas de cultura eram acomodadas dentro de uma máscara escura, confeccionada com cartolina preta, com apenas a área a ser irradiada exposta. Esta máscara foi confeccionada com um reforço de cartolina na sua base com 4 orifícios destinados ao encaixe da ponteira do equipamento *laser* de forma que a irradiação ocorresse no ponto central do poço experimental. Ao encaixar a placa de cultura na máscara, era ajustado o ponto central de irradiação no centro do poço de cultura e a máscara era fechada com o auxílio de fitas adesivas (Figura 4.22).



Figura 4.22 - Colocação da máscara escura com checagem se o posicionamento estava certo, com o centro do orifício do *laser* no meio do poço experimental

Além disso, para que todas as irradiações fossem feitas de forma perpendicular à base da placa, foi desenvolvido um artifício de cartolina para ajustar a angulação existente na ponteira do equipamento. No momento da irradiação, este artifício juntamente com a ponteira encaixada na máscara escura e sua posição paralela, além do contato da ponteira com o fundo da placa, indicava que a irradiação poderia ser iniciada (Figura 4.23).

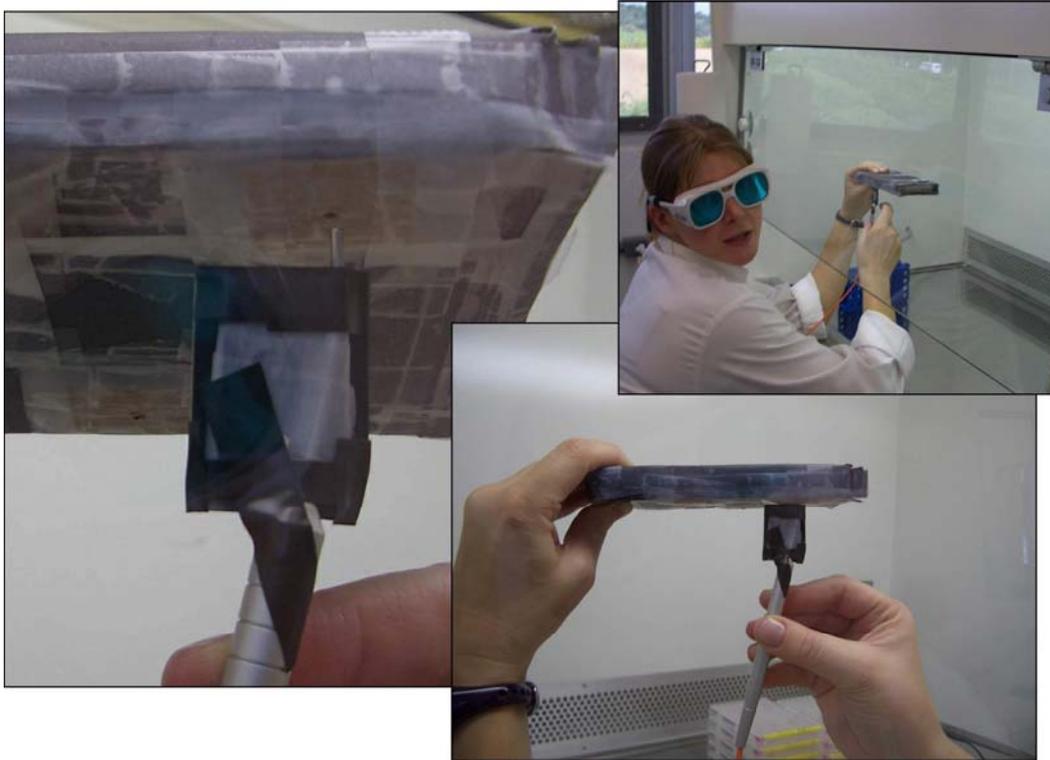


Figura 4.23 - Aparato para encaixar a ponta do *laser* e manter a aplicação perpendicular e encostada na placa de cultura

Uma vez que a incidência do feixe *laser* foi feita através da base das placas de cultivo celular (incidindo diretamente na monocamada celular), e a espessura do fundo da placa é de 1 mm, os cálculos dos parâmetros utilizados foram feitos levando-se em consideração a nova área de irradiação gerada (Quadro 4.8). Os parâmetros escolhidos seguiram o mesmo protocolo de tempo de irradiação e energia dos experimentos 3.1 e 3.2 anteriormente realizados neste trabalho.

Comprimento de onda (nm)	Potência (W)	Modo de irradiação	Área de irradiação (cm ²)	Tempo de irradiação (s)	Fluência ou Densidade de energia (J/cm ²)	Energia total (J)
685 (<i>Laser</i> vermelho)	40	Contato e pontual	0,019	3	6,3	0,12
				6	12,6	0,24
				9	18,9	0,36

Quadro 4.8 - Parâmetros das irradiações com o Thera Lase

Todos os grupos experimentais foram expostos às mesmas condições de estresse ambiental (temperatura, umidade e luz), sendo que durante as irradiações os grupos controles permaneceram fora da estufa o mesmo tempo que os grupos irradiados (Figura 4.24).

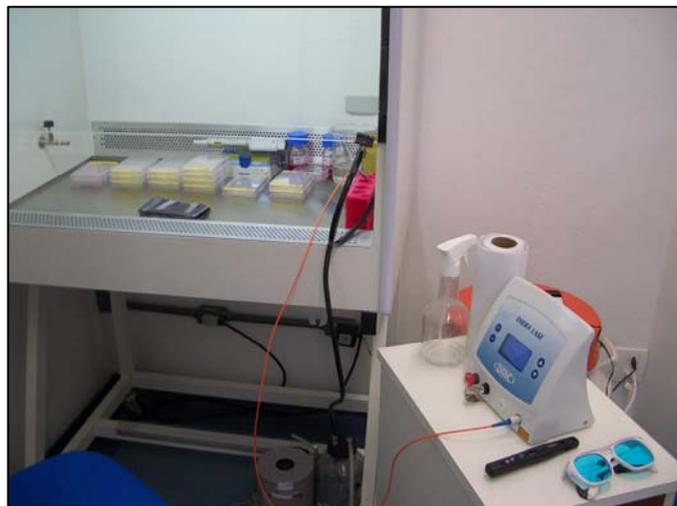


Figura 4.24 - Organização do fluxo evidenciando todas as placas fora da estufa durante as irradiações

Os meios de cultura foram trocados diariamente pelos meios correspondentes e duas placas por dia (placa 1 e 2) foram submetidas ao teste da redução do MTT.

4.5 FASE 2: REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA FINAL

A metodologia final estabelecida levou em consideração os resultados dos experimentos anteriormente realizados. Assim, para a metodologia final foram plaqueadas 1000 células por poço experimental, e o déficit nutricional escolhido foi o meio contendo 5 % de SFB. As placas foram separadas por grupo experimental, e em cada uma apenas 4 poços foram utilizados. As irradiações foram realizadas apenas 48 h após o plaqueamento celular, e a análise do MTT foi realizada 12 h após a última irradiação.

Os grupos experimentais foram irradiados com o *laser* vermelho sobre a linhagem FP5 variando o número de irradiações e a densidade de energia, com os mesmos grupos experimentais descritos nos experimentos 4.3 e 4.4.

O descongelamento, cultura e plaqueamento celular seguiram o mesmo protocolo dos experimentos anteriores. O tempo experimental, o equipamento *laser*, o protocolo de irradiação e a distribuição dos grupos

nas placas foram realizados da mesma forma que no experimento 4.3. A metodologia final do experimento está ilustrada na Figura 4.25.

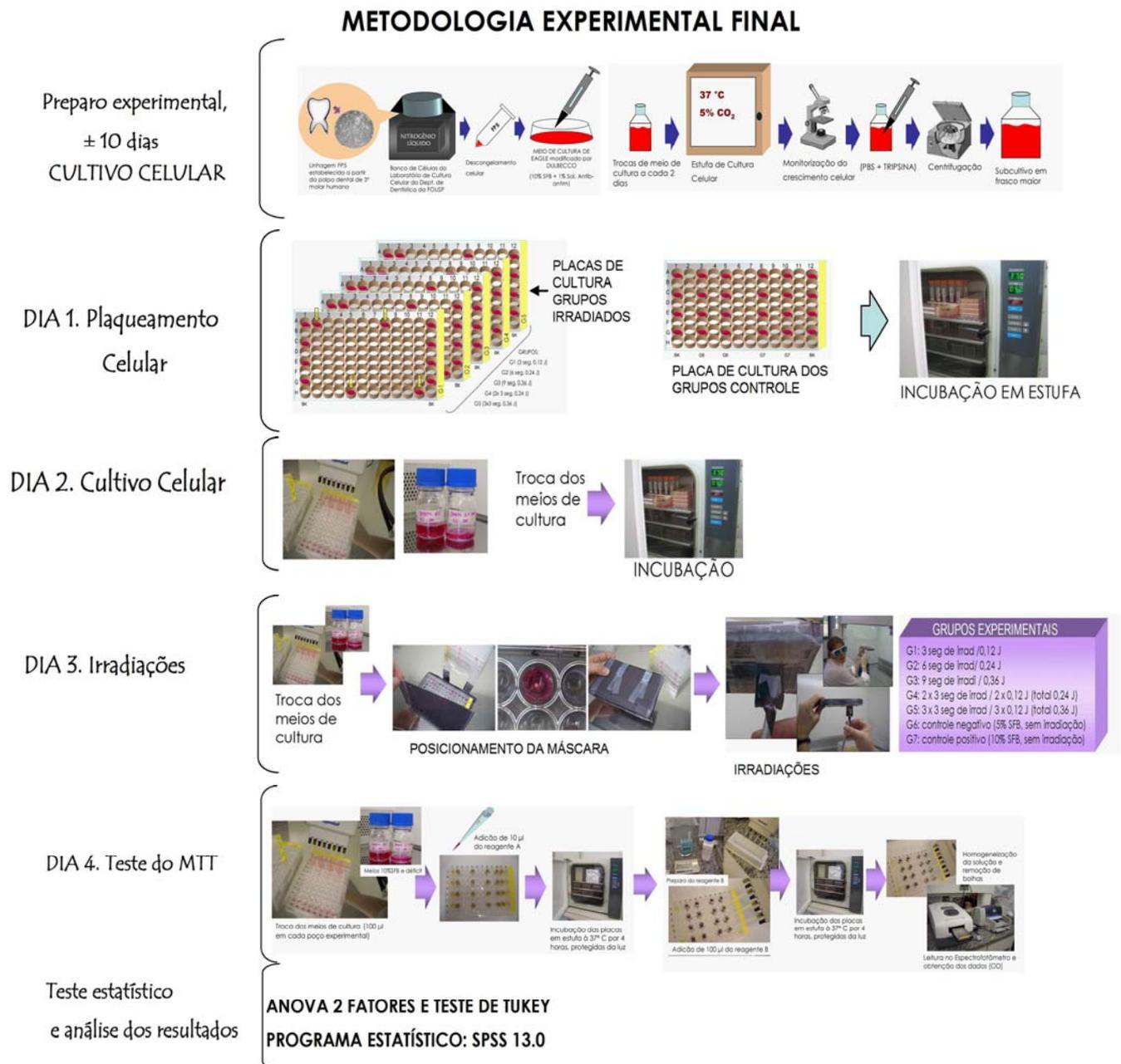


Figura 4.25 - Esquema da metodologia experimental final

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos testes de redução do MTT foram comparados estatisticamente pelo método de análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 % ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Em todos os experimentos, após a realização do teste do MTT os valores obtidos no espectrofotômetro no formato de log do valor de transmitância (densidade óptica, DO) foram comparados estatisticamente pelo método de análise de variância (ANOVA) complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5 % ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SPSS versão 13.0 (Apache Software Foundation, 2004).

5.1 FASE 1 - DETERMINAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1.1 Etapa 1 - Determinação do número de células a serem plaqueadas

Esta etapa foi realizada para determinar quantas células por poço experimental deveriam ser plaqueadas em cada poço experimental para que ao longo de 4 dias fosse observado um crescimento celular significativo.

Foram realizados 3 experimentos para a determinação do número de células e os dados obtidos através do espectrofotômetro, foram comparados em um mesmo teste estatístico (ANOVA dois fatores

complementado por Tukey). Para isso, o valor de 100% foi conferido à média dos dados do 4º dia e às médias dos outros dias foram atribuídos valores em porcentagem comparados a este (Gráfico 5.1).

A análise de variância no teste estatístico envolvendo todos os grupos experimentais mostrou que em relação à atividade mitocondrial (crescimento celular) houve diferença entre os grupos experimentais sendo: $F(4,60)=8,763$; $p=0,000$, entre os dias experimentais x grupos: $F(12,60)=1,93$; $p=0,048$, mas não houve diferença estatística entre os dias experimentais: $F(3,60)=1,323$; $p=0,275$ (Anexo B).

Para completar a interpretação da curva de crescimento e avaliar se houve diferença significativa entre os dias 1 a 4 em cada quantidade celular testada, foram realizados testes estatísticos individuais para cada grupo experimental (ANOVA a um fator complementada por Tukey) (letras no Gráfico 5.1 e Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Resultado estatístico da variável crescimento celular em função dos dias experimentais dentro de cada grupo. Letras diferentes equivalem à diferença estatística dentro de cada grupo. *p = valor de p da ANOVA a um fator

GRUPOS	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	F	p*
G1: 500 células	53,46 ± 27,44 ^a	52,99 ± 17,24 ^a	85,64 ± 8,77 ^{a,b}	100,0 ± 14,10 ^b	6,718	0,007
G2: 1000 células	59,88 ± 8,46 ^a	61,37 ± 4,92 ^a	86,22 ± 16,36 ^b	100,0 ± 10,91 ^b	12,719	0,000
G3: 2000 células	139,93 ± 52,54 ^a	111,22 ± 51,88 ^a	114,19 ± 36,43 ^a	100 ± 18,92 ^a	0,638	0,605
G4: 3000 células	103,36 ± 25,95 ^a	86,53 ± 13,99 ^a	81,18 ± 7,90 ^a	100,0 ± 13,35 ^a	1,621	0,236
G5: 5000 células	101,0 ± 22,21 ^a	111,59 ± 15,67 ^a	103,02 ± 23,94 ^a	100,0 ± 26,38 ^a	0,222	0,879

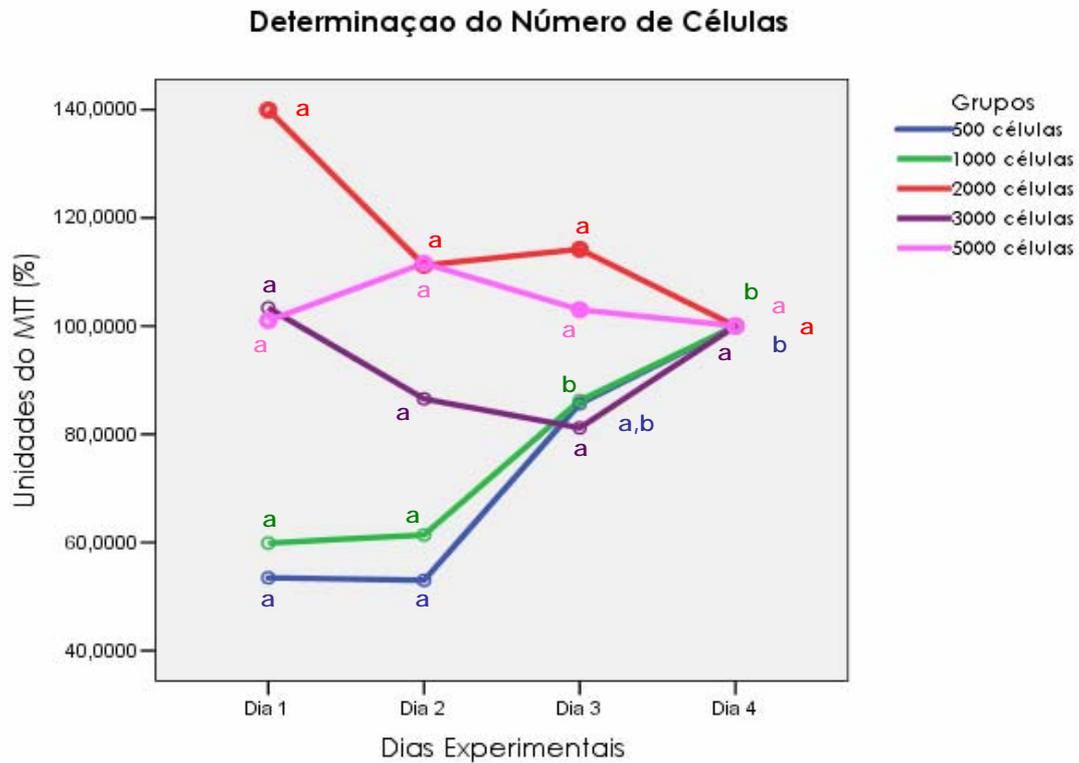


Gráfico 5.1 - Curva de crescimento de diferentes quantidades celulares plaqueadas (grupos) em função do tempo experimental. Letras diferentes significam diferença estatística dentro de cada grupo experimental (cores iguais)

Houve crescimento significativo de células do dia 1 ao dia 4 somente nos grupos de 500 e 1000 células. Esse crescimento apresentou uma fase *lag* do primeiro ao segundo dia e foi mais acentuado após o segundo dia, fase *log*, até o terceiro quando atingiu o platô, ou seja, no quarto dia o número de células foi similar aquele do terceiro. Nos demais grupos não foram identificados crescimento celular, o número de células se manteve estável durante todo o período experimental.

5.1.2 Etapa 2 - Determinação da porcentagem de soro fetal bovino no meio de cultura que promova um déficit nutricional celular

Em experimentos onde culturas celulares são irradiadas com luz *laser*, previamente à irradiação as células são mantidas em meio de cultura com déficit nutricional. Essa situação de estresse celular criada é fundamentada pelo fato da irradiação ser melhor absorvida por células cujo potencial redox esteja alterado (KARU, 1989). Uma das maneiras de se obter isso experimentalmente é reduzindo a porcentagem normal de SFB do meio de cultura DME, que em condições nutricionais ideais é 10 %, para menores concentrações.

O objetivo desta etapa foi, portanto, determinar a porcentagem de SFB que promova um déficit nutricional. A porcentagem déficit deve diminuir a taxa de crescimento celular de forma significativa em relação ao crescimento normal da célula (10 % de SFB) sem, no entanto, impedir a sua viabilidade.

Nesta etapa, foram feitos 2 experimentos (2.1 e 2.2) e suas análises foram realizadas durante 4 dias experimentais para se obter a curva de crescimento celular comparativa entre os meios com baixas concentrações de SFB (meios déficits) e o meio ideal de nutrição (10 % SFB).

5.1.2a Resultados experimento 2.1

Neste experimento foram plaqueadas 500 células por poço experimental e foram testadas as concentrações de 2,5 %, 5 %, 7,5 % e 10 % de SFB ao longo de 4 dias experimentais.

O teste da ANOVA 2 fatores mostrou significância entre os dias experimentais ($p=0,000$), mas não entre as concentrações de SFB ($p=0,311$) e nem entre os dias versus concentrações ($p=0,164$) (Anexo C).

A curva de crescimento celular ao longo dos 4 dias experimentais comparando as diferentes concentrações de SFB encontra-se no Gráfico 5.2. A avaliação da curva de crescimento foi complementada por testes estatísticos complementares (ANOVA a um fator) avaliando o crescimento de cada grupo ao longo dos 4 dias experimentais (Tabela 5.2) e testes comparando os grupos em cada dia experimental (Tabela 5.3).

O gráfico 5.2 mostra que as culturas tratadas com 10 % de SFB apresentaram crescimento durante todo o tempo experimental, enquanto as culturas tratadas com 2,5 %, 5 % e 7,5 % de SFB o número de células viáveis se manteve estável.

Quando comparamos o número de células de cada grupo no tempo final do experimento (dia 4) verificamos que os grupos tratados com 2,5 % e 5 % de SFB tiveram quantidades de células semelhantes, porém significativamente menores do que o grupo crescido nas condições ideais de nutrição (10 % SFB) (letras maiúsculas do Gráfico 5.2). O grupo tratado

com 7,5 % de SFB apresentou quantidade celular similar aos grupos 10 % e 5 %.

Experimento 2.1 Curva de crescimento em diferentes porcentagens de SFB

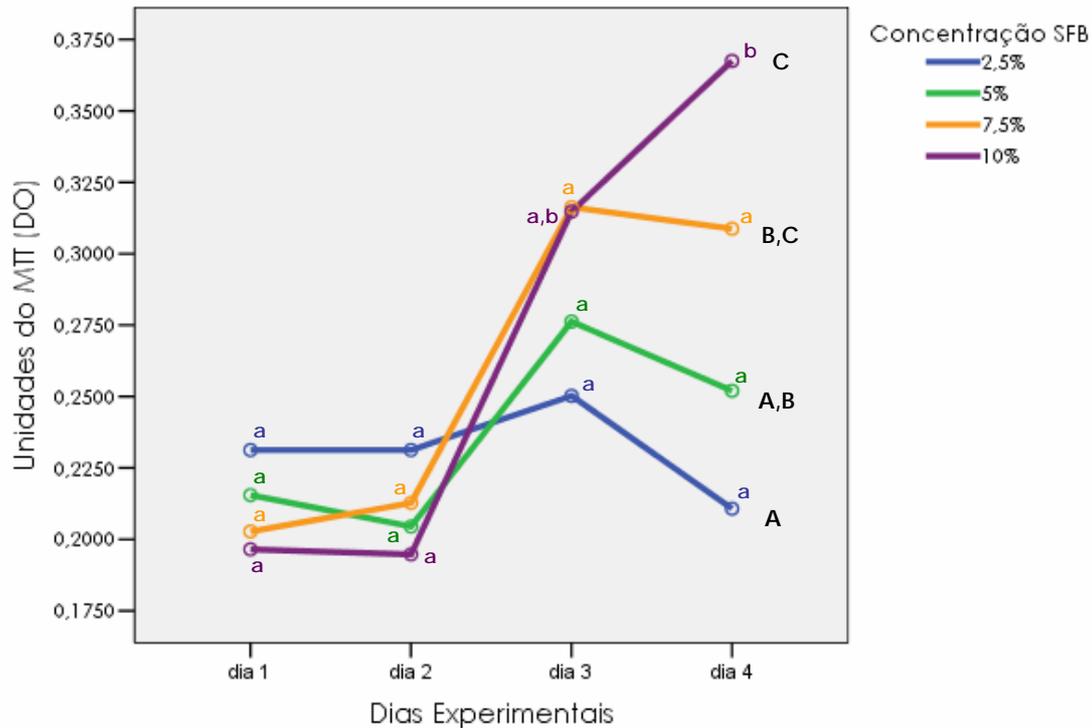


Gráfico 5.2 - Experimento 2.1, curva de crescimento em quatro dias experimentais diferentes concentrações de SFB testadas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo grupo em tempos experimentais diferentes. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos no mesmo período experimental

Tabela 5.2 - Resultados da análise de variância (ANOVA a um fator) avaliando o crescimento de cada grupo ao longo dos 4 dias experimentais. Letras diferentes significam diferença estatística entre os dias dentro de cada grupo experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

Grupos	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	F	p*
G1: 2,5 % SFB	0,23 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,10 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,03 ^a	0,245	0,863
G2: 5 % SFB	0,21 ± 0,05 ^a	0,20 ± 0,07 ^a	0,27 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,02 ^a	1,486	0,268
G3: 7,5 % SFB	0,20 ± 0,06 ^a	0,21 ± 0,07 ^a	0,31 ± 0,09 ^a	0,30 ± 0,02 ^a	2,81	0,85
G4: 10 % SFB	0,19 ± 0,10 ^a	0,19 ± 0,06 ^a	0,31 ± 0,03 ^{a,b}	0,36 ± 0,05 ^b	6,718	0,007

Tabela 5.3 - Resultados da análise de variância (ANOVA 2 fatores) comparando os grupos dentro de cada dia experimental. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos dentro de cada dia experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator.

Dias	G1: 2,5 % SFB	G2: 5 % SFB	G3: 7,5 % SFB	G4: 10 % SFB	F	p*
DIA 1	0,23 ± 0,06 ^a	0,21 ± 0,05 ^a	0,20 ± 0,06 ^a	0,19 ± 0,10 ^a	0,179	0,908
DIA 2	0,23 ± 0,10 ^a	0,20 ± 0,07 ^a	0,21 ± 0,07 ^a	0,19 ± 0,06 ^a	0,143	0,932
DIA 3	0,25 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,04 ^a	0,31 ± 0,09 ^a	0,31 ± 0,03 ^a	1,177	0,359
DIA 4	0,21 ± 0,03 ^a	0,25 ± 0,02 ^{a,b}	0,30 ± 0,02 ^{b,c}	0,36 ± 0,05 ^c	12,752	0,000

5.1.2b Resultados experimento 2.2

Neste experimento foram plaqueadas 1000 células por poço experimental e foram testadas as concentrações de 2,5, 5, e 10 % de SFB ao longo de 4 dias experimentais.

O teste da ANOVA 2 fatores mostrou significância entre os dias experimentais ($p=0,002$), as concentrações de SFB ($p=0,000$) e os dias versus concentrações ($p=0,000$) (Anexo D).

Assim como no Experimento 2.1, a avaliação da curva de crescimento (Gráfico 5.3) foi complementada por testes estatísticos (ANOVA a um fator) avaliando o crescimento de cada grupo ao longo dos 4 dias experimentais (Tabela 5.4) e testes comparando os grupos em cada dia experimental (Tabela 5.5).

A curva de crescimento do experimento 2.2 mostrou que ao longo dos 4 dias experimentais o grupo com 10 % de SFB apresentou crescimento

celular enquanto que o grupo déficit 5% o número de células manteve-se estável e o grupo 2,5 % apresentou diminuição significativa no número celular. Comparando os grupos em cada dia experimental, o grupo 10 % de SFB apresentou quantidade celular significativamente maior que os outros grupos em todos os tempos experimentais. Entre os grupos déficit, somente após o segundo dia experimental houve diferença estatística na quantidade celular, sendo o número de células do grupo 5 % de SFB significativamente maior que o do grupo 2,5 % de SFB. A partir do segundo dia experimental, a diferença estatística entre todos os grupos testados manteve a mesma relação: $G3 > G2 > G1$.

Tabela 5.4 - Resultados da análise de variância (ANOVA a um fator) comparando o crescimento celular ao longo dos 4 dias experimentais dentro de cada grupo. Letras diferentes significam diferença estatística entre os dias dentro de cada grupo experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	F	p*
G1: 2,5 %						
SFB	0,01 ± 0,00 ^a	-0,01 ± 0,00 ^b	-0,01 ± 0,00 ^b	-0,01 ± 0,00 ^b	42,936	0,000
G2: 5 % SFB	0,02 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,393	0,119
G4: 10 % SFB	0,05 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,00 ^b	12,719	0,000

Experimento 2.2 Curva de crescimento em diferentes concentrações de SFB

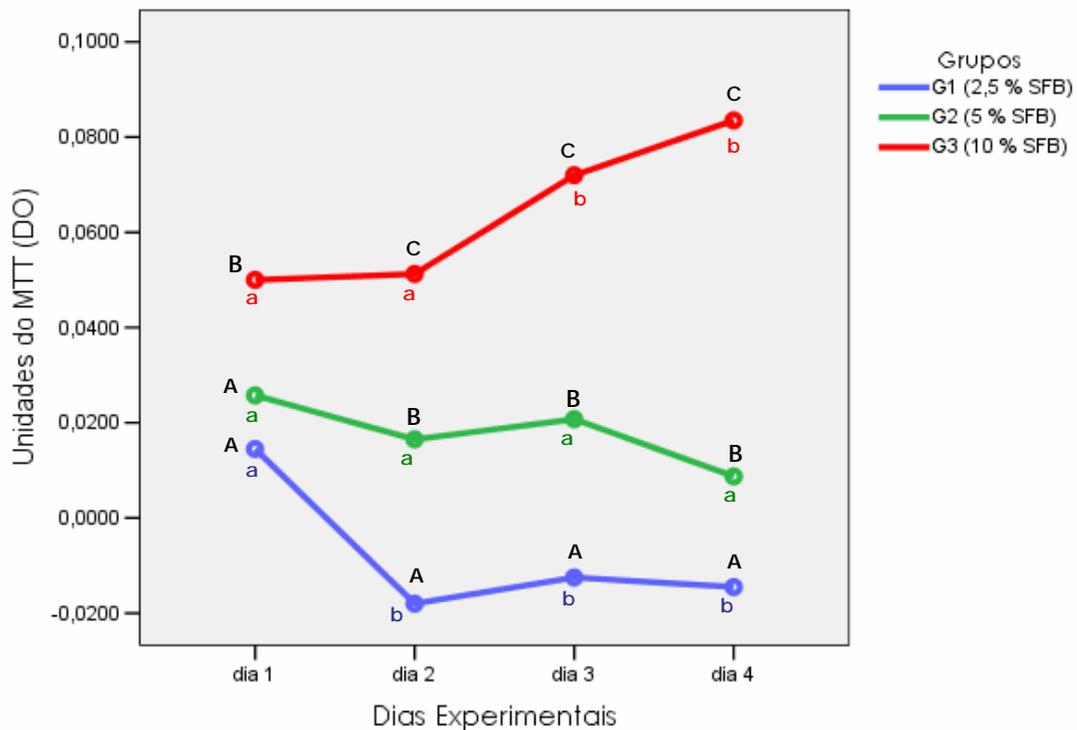


Gráfico 5.3 - Experimento 2.2, mostrando a curva de crescimento em quatro dias experimentais das diferentes concentrações de SFB testadas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística no mesmo grupo em tempos experimentais diferentes. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos no mesmo período experimental

Tabela 5.5 - Resultados da análise de variância (ANOVA a um fator) comparando os grupos em cada dia experimental. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos dentro de cada dia experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

	G1: 2,5 % SFB	G2: 5 % SFB	G3: 10 % SFB	F	p*
DIA 1	0,01 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,008 ^a	0,05 ± 0,007 ^b	25,662	0,000
DIA 2	-0,01 ± 0,004 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,004 ^c	72,937	0,000
DIA 3	-0,01 ± 0,003 ^a	0,02 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,01 ^c	326,901	0,000
DIA 4	-0,01 ± 0,003 ^a	0,008 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,009 ^c	68,255	0,000

5.1.3 Etapa 3 - Determinação da distribuição dos grupos nas placas experimentais para a realização das irradiações

Nesta etapa foram realizados dois experimentos 3.1 e 3.2, cujo objetivo foi avaliar se a distribuição dos grupos nas placas não interfere no resultado final, ou seja, a distância entre os poços experimentais é tal que impede que a luz emitida durante o procedimento de irradiação celular seja captada por outro poço experimental.

5.1.3a Resultados do experimento 3.1

Neste experimento, foram plaqueadas 500 células por poço experimental e 24 horas após o plaqueamento as células foram irradiadas com *laser* emitindo no comprimento de onda vermelho. Os grupos foram distribuídos em 2 placas experimentais. Na placa 1 estavam os grupos de irradiação única (3 s, 6 s e 9 s) e seus controles (controle positivo uni: 10 % SFB e o controle negativo uni: 2,5 % SFB) e na placa 2 os grupos de múltipla irradiação (2 x 3 s e 3 x 3 s) e seus controles (controle positivo multi: 10 % SFB e o controle negativo multi: 2,5 % SFB). 14 horas após a última irradiação, foi realizado o primeiro teste de MTT que foi repetido por mais 3 dias, totalizando 4 avaliações.

Os dados de todos os grupos obtidos pelo espectrofotômetro foram agrupados em um mesmo teste estatístico (ANOVA 2 fatores) e a curva de crescimento obtida encontra-se no Gráfico 5.4. Os resultados da ANOVA mostraram que houve diferença estatística entre os dias experimentais ($p=0,000$), grupos ($p=0,000$) e entre dias x grupos ($p=0,008$) (Anexo E).

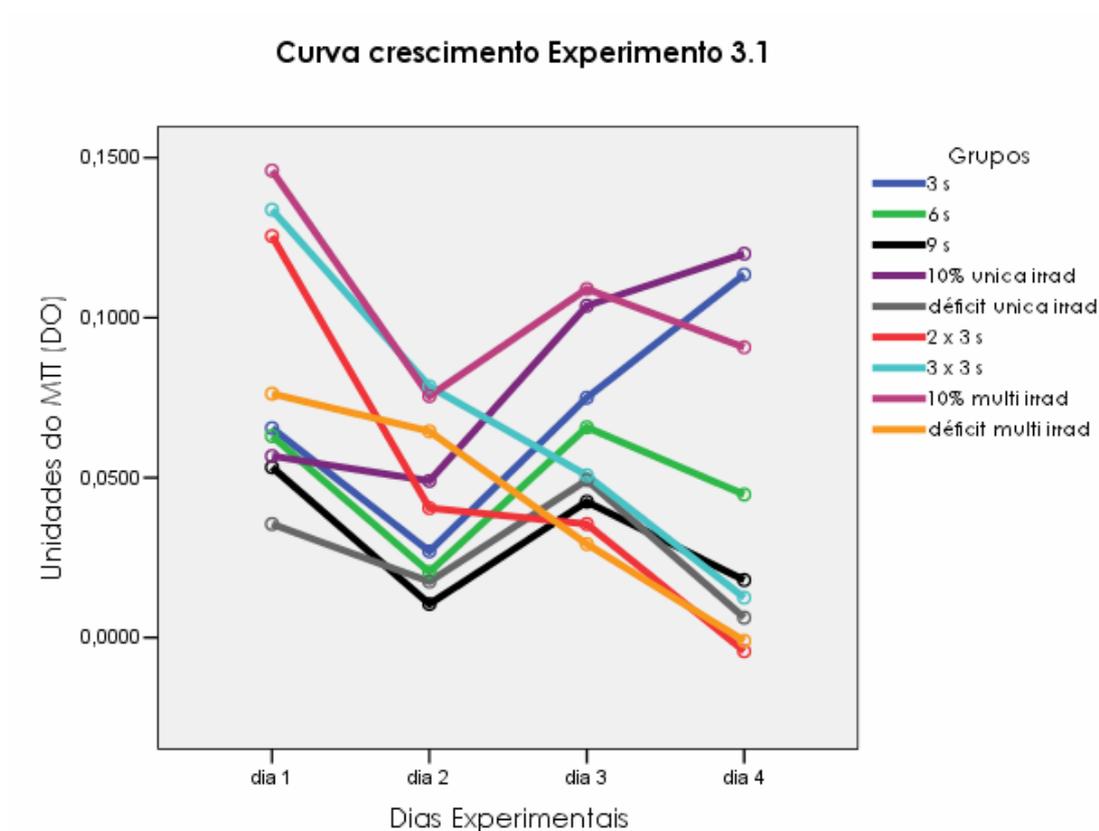


Gráfico 5.4 – Curva de crescimento celular do Experimento 5.4 ao longo de 4 dias experimentais

Foi realizado um teste estatístico (ANOVA a um fator) (Tabela 5.6) no intuito de avaliar a curva de crescimento celular de cada grupo ao longo de todo o período experimental. O número de células dos grupos pertencentes à placa 1 (única irradiação) permaneceu igual durante os 4

dias experimentais. Já os grupos da placa 2 tiveram diferentes comportamentos: enquanto o grupo controle positivo (10 % SFB) manteve-se estável, os grupos de múltiplas irradiações (2 x 3 s e 3 x 3 s) e o grupo controle negativo (5 % SFB) tiveram um declínio estatisticamente significativo no número de células ao longo dos 4 dias experimentais.

Tabela 5.6 – Resultado da ANOVA a um fator do Experimento 3.1. Avaliação do crescimento celular de cada grupo ao longo dos 4 dias experimentais. Letras diferentes significam diferença estatística entre os dias no mesmo grupo experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

	3 s	6 s	9 s	10 % uni	2,5 % uni	2x3 s	3x3 s	10 % multi	2,5 % multi
Dia 1	0,06 ±	0,06 ±	0,05 ±	0,05 ±	0,03 ±	0,12 ±	0,13 ±	0,14 ±	0,07 ±
	0,03 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,02 ^b	0,04 ^b	0,04 ^a	0,04 ^b
Dia 2	0,02 ±	0,02 ±	0,01 ±	0,04 ±	0,01 ±	0,04 ±	0,07 ±	0,07 ±	0,06 ±
	0,01 ^a	0,01 ^a	0,00 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,03 ^a	0,06 ^{a,b}	0,04 ^a	0,05 ^{a,b}
Dia 3	0,07 ±	0,06 ±	0,04 ±	0,10 ±	0,04 ±	0,03 ±	0,05 ±	0,10 ±	0,02 ±
	0,04 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a	0,07 ^a	0,05 ^a	0,00 ^a	0,02 ^{a,b}	0,05 ^a	0,01 ^{a,b}
Dia 4	0,11 ±	0,04 ±	0,01 ±	0,12 ±	0,00 ±	-0,00 ±	0,01 ±	0,09 ±	-0,00 ±
	0,14 ^a	0,06 ^a	0,03 ^a	0,08 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,01 ^a	0,02 ^a	0,00 ^a
F	0,829	1,171	2,18	1,439	1,487	20,475	5,795	2,006	3,932
*p	0,503	0,361	0,143	0,28	0,268	0,000	0,011	0,167	0,036

Outro teste estatístico (ANOVA a um fator) foi realizado comparando os grupos em cada dia experimental (Tabela 5.7 e Gráficos 5.5 a 5.8). Onde letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos.

Tabela 5.7 – Resultado da ANOVA a um fator do Experimento 3.1. Comparação entre os grupos por dia experimental. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos no mesmo tempo experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

Grupos	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4
3 s	0,06 ± 0,06 ^{a,b,c}	0,02 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,04 ^a	0,11 ± 0,14 ^{a,b}
6 s	0,06 ± 0,01 ^{a,b,c}	0,02 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,04 ^a	0,04 ± 0,06 ^{a,b}
9 s	0,05 ± 0,01 ^{a,b}	0,01 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,03 ^a	0,01 ± 0,03 ^{a,b}
10 % uni irrad	0,05 ± 0,01 ^{a,b,c}	0,04 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,08 ^{a,b}
5 % uni irrad	0,03 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,05 ^a	0,00 ± 0,01 ^a
2 x 3 s	0,12 ± 0,02 ^{b,c,d}	0,04 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	-0,00 ± 0,01 ^a
3 x 3 s	0,13 ± 0,04 ^{c,d}	0,07 ± 0,06 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
10 % multi irrad	0,14 ± 0,04 ^d	0,07 ± 0,04 ^a	0,10 ± 0,05 ^a	0,09 ± 0,02 ^b
5 % multi irrad	0,07 ± 0,04 ^{a,b,c,d}	0,06 ± 0,05 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	-0,00 ± 0,00 ^a
F	6,032	2,218	1,773	2,566
*p	0,000	0,058	0,127	0,032

Os resultados do primeiro dia experimental (Gráfico 5.5), 14 horas após a última irradiação e 48 horas após o plaqueamento celular, mostraram que não houve diferença estatística no número de células tanto entre os grupos da placa 1 (única irradiação) quanto entre os grupos da placa 2 (múltipla irradiação). No entanto, quando comparamos os grupos independentemente da placa em que pertencem notou-se que todos os grupos da placa 2 apresentaram valores numéricos maiores que os grupos da placa 1. O número de células do grupo 10 % SFB multi irrad foi estatisticamente maior que o número de células do grupo 10 % uni irrad. Além disso, o número de células do grupo 10 % multi irrad também foi superior estatisticamente quando comparado aos grupos 3 s, 6 s, 9 s e déficit uni irradiado.

No segundo e no terceiro dia, os resultados dos testes do MTT mostraram que não houve diferença estatística entre o número de células de todos os grupos experimentais. No dia 2 os grupos que se destacaram numericamente foram os grupos controles positivos (10 % multi e uni irradiados), o grupo 3 x 3 s e o grupo déficit multi irradiado. Já no dia 3, os grupos controles positivos, o grupo 3 s e 6 s apresentaram numericamente a maior quantidade celular apesar de assim como no dia 2 não ser significativa estatisticamente.

No último dia (dia 4), o perfil do número celular apresentou algumas modificações. O grupo controle positivo 10 % uni irradiado apresentou quantidade celular estatisticamente superior aos grupos experimentais multi irradiados (2 x 3 s e 3 x 3 s) e que ambos os grupos déficits. No entanto, quando o grupo 10 % uni irradiado foi comparado com os demais grupos, não houve diferença estatística no número celular.

Comparação entre os grupos Experimento 3.1 / DIA 1

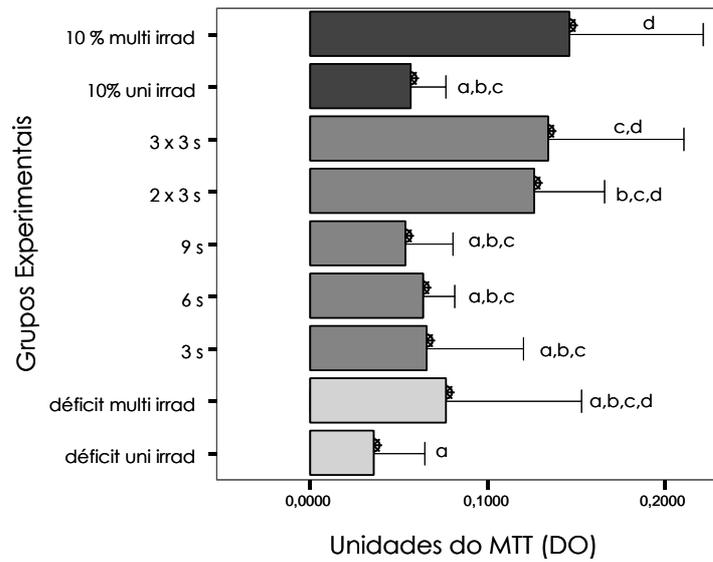


Gráfico 5.5 – Comparação entre os grupos experimentais no dia 1

Comparação entre os grupos Experimento 3.1 / DIA 2

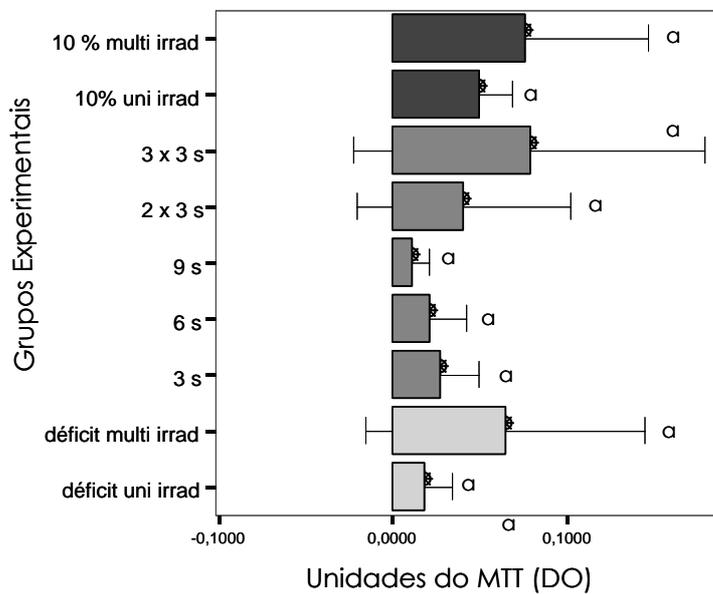


Gráfico 5.6 – Comparação entre os grupos experimentais no dia 2

Comparação entre os grupos Experimento 3.1 / DIA 3

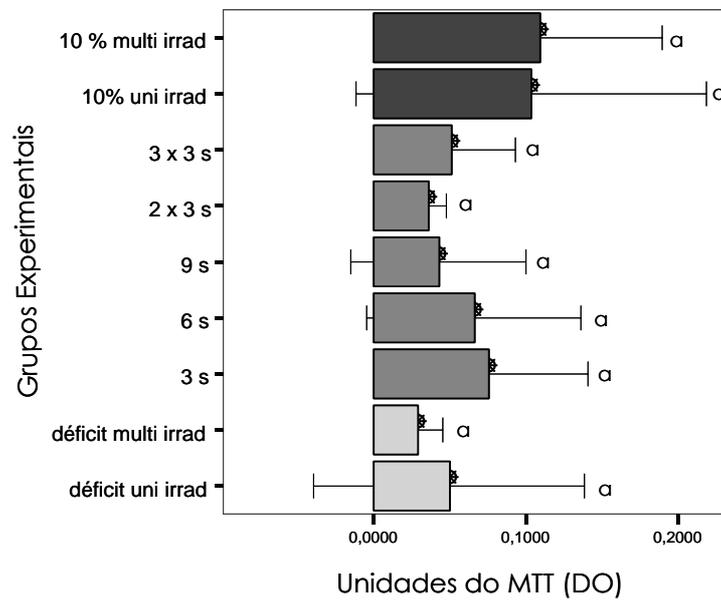


Gráfico 5.7 – Comparação entre os grupos experimentais no dia 3

Comparação entre os grupos Experimento 3.1 / DIA 4

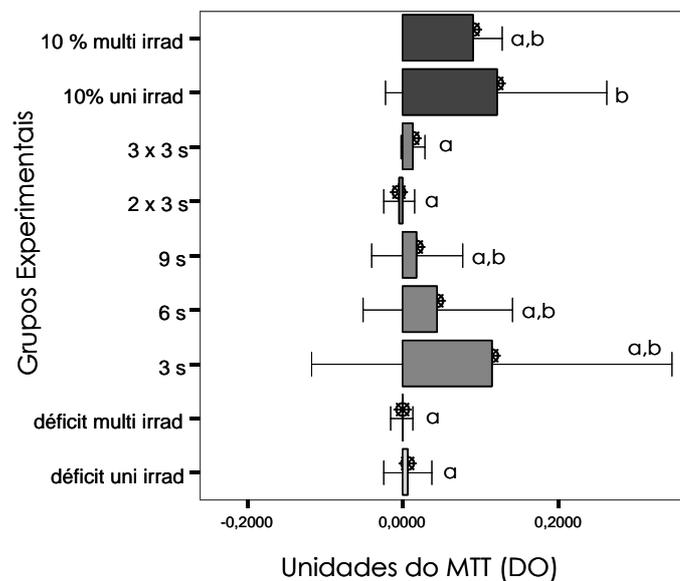


Gráfico 5.8 – Comparação entre os grupos experimentais no dia 4

5.1.3b Resultados experimento 3.2

Neste experimento, diferente do 3.1, foram plaqueadas 1000 células por poço experimental. Os tempos e protocolos experimentais, grupos e sua distribuição nas placas 1 e 2 foram feitos da mesma forma que o experimento 3.1. A curva de crescimento resultante dos dados obtidos pelo espectrofotômetro nos 4 dias experimentais e submetidos ao teste estatístico (ANOVA 2 fatores) encontra-se no Gráfico 5.9. Os resultados da ANOVA mostraram que houve diferença estatística entre os dias experimentais ($p=0,000$), grupos ($p=0,000$) e entre dias x grupos ($p=0,000$) (Anexo F).

Para avaliar o crescimento de cada grupo experimental ao longo dos 4 dias foi realizado o teste estatístico ANOVA a um fator, complementado por Tukey (Tabela 5.8). O gráfico 5.9 ilustra a curva de crescimento de todos os grupos testados ao longo de 4 dias experimentais. Os grupos controle positivos (10 % SFB multi e uni irradiação) apresentaram crescimento celular em dois tempos: do dia 1 para o dia 2 e do dia 3 para o dia 4. Este padrão de crescimento também foi verificado no grupo 3 s. Os grupos 9 s e o déficit uni irrad apresentaram crescimento apenas entre os dia 1 e 2, sendo que nos dias seguintes o grupo 9 s manteve-se estável enquanto que o grupo déficit uni irrad assim como o déficit multi irrad apresentaram diminuição no número de células entre os dias 3 e 4. O grupo déficit multi irradiação, assim como o grupo 2 x 3 s não apresentou crescimento entre os dias 1 e 2 mas cresceram entre os dias 2 e 3, sendo que o grupo 2 x 3 continuou estável até

último dia experimental. Em contraste, o grupo 3 x 3 s não apresentou alteração no número de células durante os 4 dias experimentais enquanto o grupo 6 s apresentou crescimento do dia 1 ao dia 3 e manteve-se estável entre os dias 3 e 4.

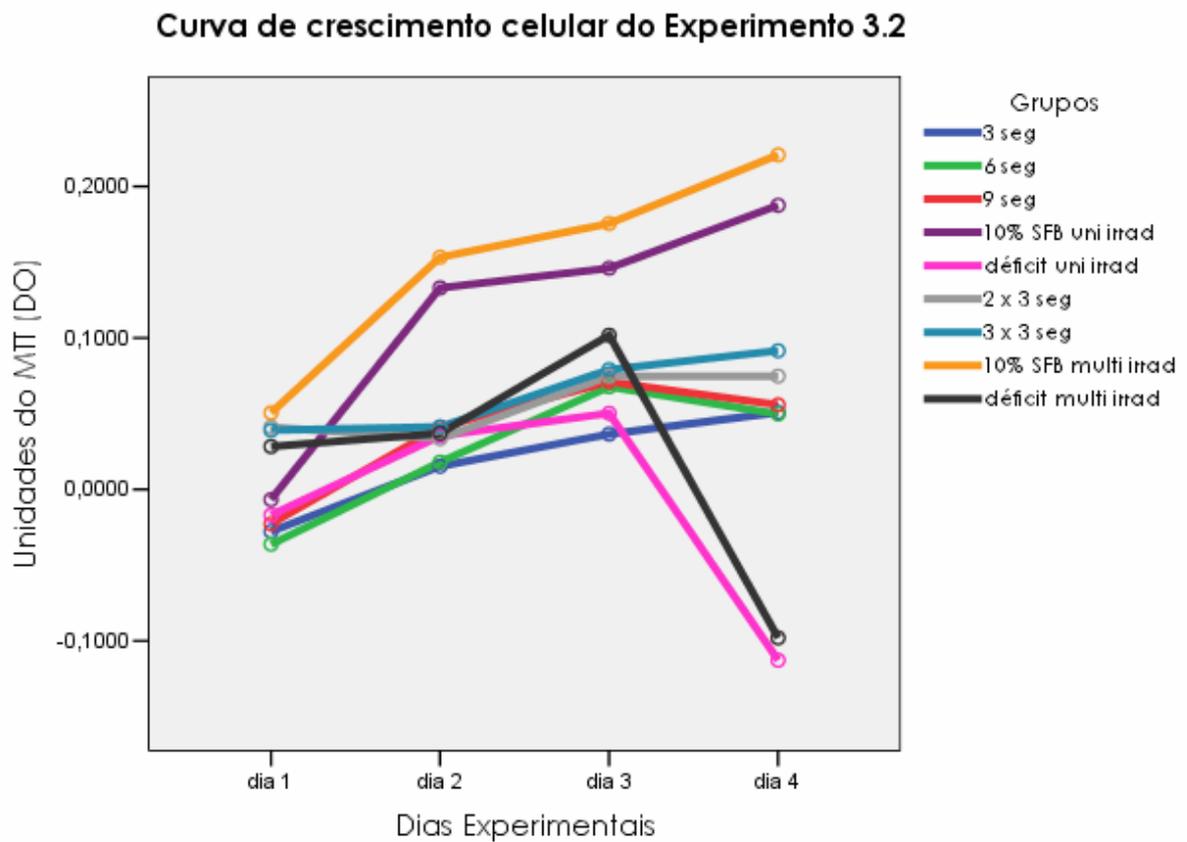


Gráfico 5.9 - Gráfico experimento 3.2, mostrando a curva de crescimento dos grupos experimentais em relação ao tempo

Tabela 5.8 – Resultado da ANOVA a um fator do Experimento 3.2. Avaliação do crescimento celular de cada grupo ao longo dos 4 dias experimentais. Letras diferentes significam diferença estatística entre os dias no mesmo grupo experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator

	3 s	6 s	9 s	10 % uni	2,5 % uni	2x3 s	3x3 s	10 % multi	2,5 % multi
Dia 1	-0,02 ± 0,01 ^a	-0,03 ± 0,00 ^a	-0,02 ± 0,00 ^a	-0,00 ± 0,01 ^a	-0,01 ± 0,00 ^b	0,04 ± 0,00 ^{a,b}	0,03 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^b
Dia 2	0,01 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	0,04 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,00 ^b	0,03 ± 0,01 ^c	0,03 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,02 ^b	0,03 ± 0,02 ^b
Dia 3	0,03 ± 0,02 ^{b,c}	0,06 ± 0,02 ^c	0,07 ± 0,01 ^b	0,14 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,01 ^c	0,074 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,04 ^c
Dia 4	0,05 ± 0,01 ^c	0,04 ± 0,00 ^c	0,05 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,01 ^c	-0,11 ± 0,01 ^a	0,074 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,04 ^a	0,22 ± 0,03 ^c	-0,09 ± 0,00 ^a
F	16,499	55,036	25,718	243,165	86,357	6,071	3,921	46,128	38,572
*p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037	0,000	0,000

Para comparar os grupos em cada dia experimental, foram realizados testes estatísticos (ANOVA a um fator e Tukey) (Tabela 5.9 e Gráficos 5.10 a 5.13).

Tabela 5.9 - – Resultado da ANOVA a um fator do Experimento 3.2. Comparação do crescimento celular entre os grupos em cada dia experimental. Letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos no mesmo dia experimental. *p = valor de p da ANOVA a um fator.

	3 s	6 s	9 s	10 % uni	2,5 % uni	2x3 s	3x3 s	10 % multi	2,5 % multi	F	*p
Dia 1	0	0	0	0,00 ± 0,00 ^f	0	0,04 ± 0,00 ^{b,c}	0,03 ± 0,00 ^{b,c}	0,05 ± 0,00 ^c	0,02 ± 0,01 ^b	30,41	0,000
Dia 2	0,02 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,00 ^a	0,04 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^a	43,63	0,000
Dia 3	0,01 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,00 ^{a,b}	0,04 ± 0,01 ^{a,b}	0,13 ± 0,00 ^{c,d}	0,03 ± 0,01 ^{a,b}	0,03 ± 0,01 ^{a,b}	0,04 ± 0,01 ^{a,b}	0,15 ± 0,02 ^d	0,03 ± 0,02 ^{b,c}	15,66	0,000
Dia 4	0,05 ± 0,05 ^{a,b}	0,04 ± 0,00 ^{a,b}	0,05 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,01 ^c	0	0,07 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,04 ^b	0,22 ± 0,03 ^c	0,09 ± 0,03 ^a	42,62	0,000

Os Gráficos 5.10 a 5.13 ilustram a atividade mitocondrial (crescimento celular) das células nos diferentes grupos testados em cada um dos 4 dias experimentais. Os resultados dos testes de Tukey estão representados por letras nos gráficos, sendo que letras diferentes significam diferença estatística. Para diferenciar as placas experimentais utilizadas, foram atribuídas cores diferentes para as placas: cinza claro para a placa cujos grupos foram irradiados uma única vez, e cor cinza escuro para os grupos multi irradiados.

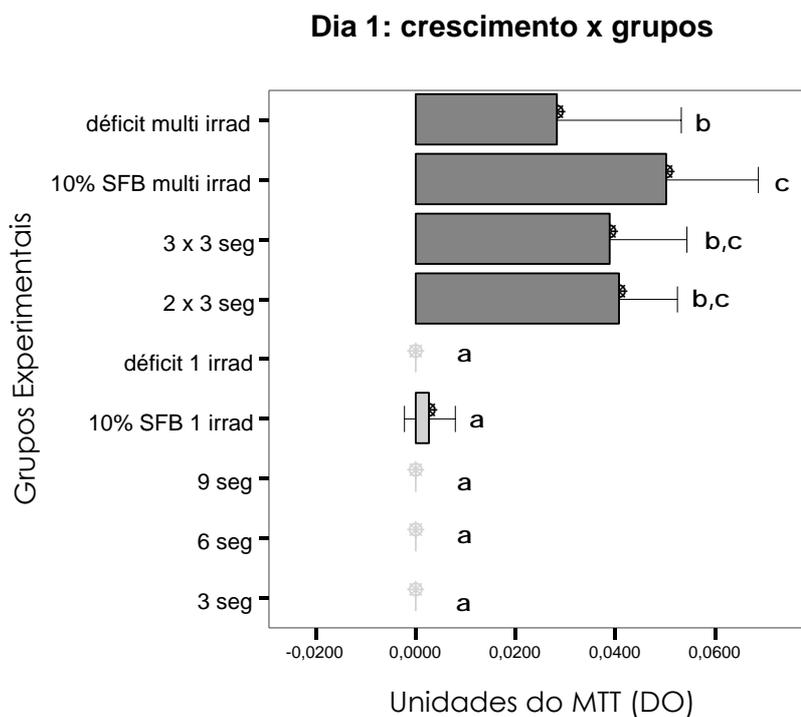


Gráfico 5.10 - Resultado estatístico do experimento 3.2, dia 1

No dia 1 (Gráfico 5.10) não houve detecção da atividade mitocondrial nos grupos de irradiação única. Enquanto que os grupos experimentais multi irradiados (2 x 3 s e 3 x 3 s) apresentaram atividade

mitocondrial semelhante entre si e semelhante aos grupos controles multi irradiad. O grupo controle positivo (10 % SFB) apresentou, no entanto, número de células estatisticamente maior que o grupo controle negativo (déficit multi irradiado).

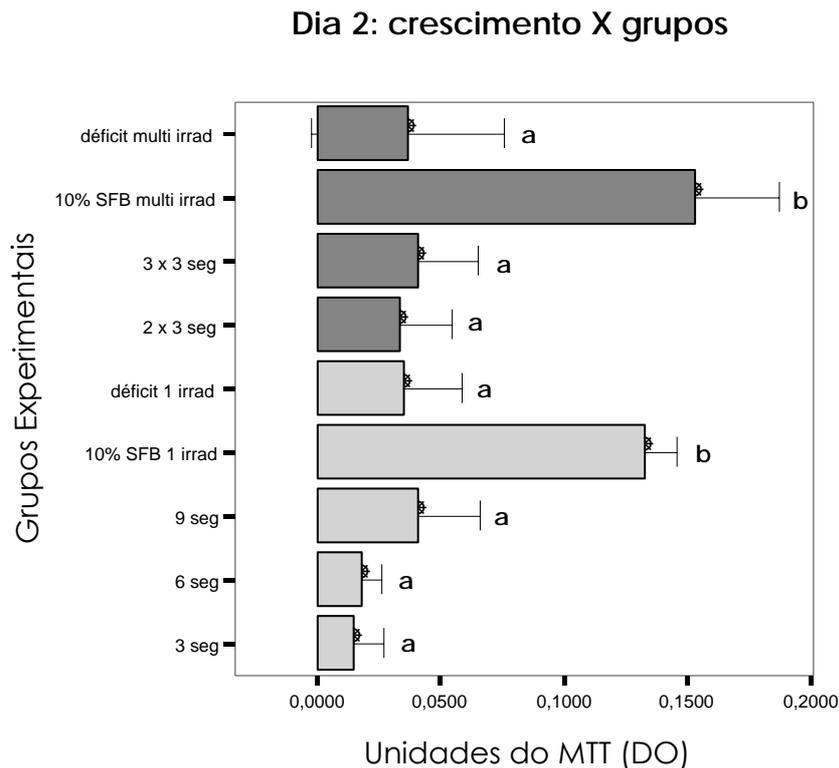


Gráfico 5.11 - Resultado estatístico do dia 2

O segundo dia experimental ilustrado pelo gráfico 5.11, mostra que a atividade mitocondrial (número de células) dos grupos controles positivos (10 % uni e mult irradiad) foi superior estatisticamente que todos os outros grupos. O número de células dos grupos irradiados, no entanto, foram similares entre si e similares ao número de células dos grupos controles negativos (déficits). Observou-se também o crescimento numericamente maior do grupo

controle positivo multi irradiado em relação ao controle positivo uni irradiado, apesar de não serem diferentes estatisticamente.

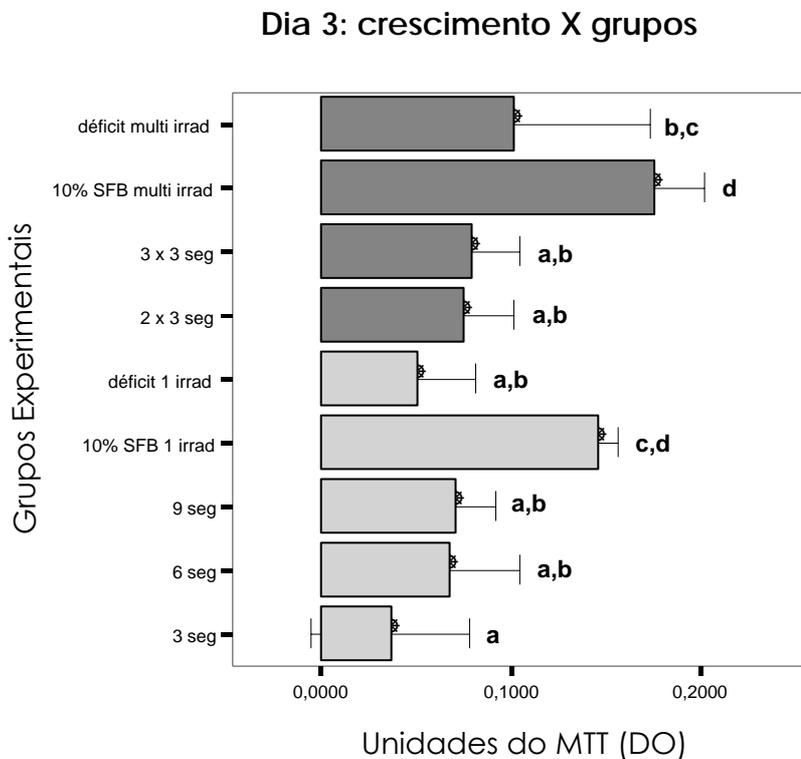


Gráfico 5.12 - Resultado estatístico do dia 3

O número de células dos grupos irradiados independentemente do número de irradiações (única ou múltipla) foi similar no dia 3 (Gráfico 5.12). O número de células dos controles positivos (10 % SFB multi e uni irradi) foram similares entre si e significativamente maiores que os grupos irradiados e que o controle déficit uni irradiação. Já o número de células do controle déficit da placa multi irradiada foi similar ao controle positivo 10 % uni irradi e aos grupos irradiados exceto o grupo 3 s que foi estatisticamente menor que o grupo controle (déficit) multi irradiado.

Dia 4: crescimento x grupos

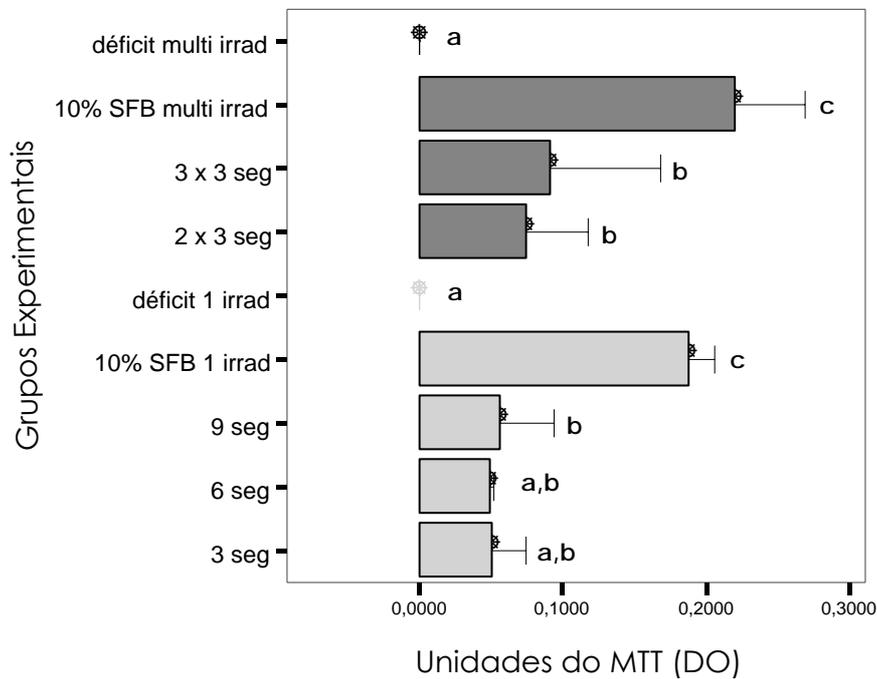


Gráfico 5.13 - Resultado estatístico do dia 4

No quarto dia experimental, ou seja, 5 dias após a irradiação, os grupos controles positivos (10 % SFB multi e uni irrad) apresentam o número de células estatisticamente maior que todos os outros grupos testados. Entre os grupos irradiados não houve diferença estatística no número de células, no entanto, foram estatisticamente superiores aos grupos controles déficits. Nos grupos déficit não foi detectado atividade mitocondrial pelo espectrofotômetro, indicando ausência ou quantidades mínimas de células viáveis.

5.1.4 Etapa 4 - Determinação do tempo experimental (plaqueamento, crescimento, irradiação e análise do MTT)

Nesta quarta etapa, foram realizados experimentos para se determinar:

1. O intervalo de tempo ideal entre o plaqueamento celular e as irradiações: este intervalo foi determinado a partir de experimentos onde as células não foram irradiadas, mas tratadas com meio nutricional completo ou meio déficit e avaliadas em 4 dias.
2. O intervalo de tempo ideal entre as irradiações e sua avaliação através dos testes do MTT: a determinação deste intervalo foi feita a partir de experimentos onde as células foram submetidas à irradiação e o tempo de avaliação foi feito em dois momentos: após 24 e 48 h da irradiação.

Para a determinação do tempo ideal entre o plaqueamento celular e a irradiação foram utilizados 2 experimentos. O experimento 2.1 cujos resultados já foram descritos anteriormente mostrou que entre os dias 1 e 2, os grupos experimentais testados não apresentam diferença estatística em relação ao número celular. Somente a partir do segundo dia experimental a curva de crescimento celular foi aparente, com uma tendência de crescimento celular ascendente até o 4º dia experimental, quando o número celular foi estatisticamente superior ao primeiro dia do teste do MTT.

No experimento 4.2, foram plaqueadas 1000 células por poço experimental e foi realizado com o objetivo de avaliar se após 24h do plaqueamento celular já existia diferença entre os grupos experimentais testados, ou seja, se o crescimento celular das células tratadas com o meio déficit era menor que as tratadas com o meio ideal de nutrição (10 % SFB). A presença de diferença estatística entre os grupos é fundamental uma vez que quando as células são submetidas à irradiação esta diferença é que determinará e possibilitará os efeitos do *laser* sobre estas células.

O gráfico 5.14 ilustra o resultado da ANOVA ($F(1,6) = 1,355$; $p = 0,289$) a um fator complementado pelo teste de Tukey. Não houve diferença entre o número de células dos grupos tratados com 2,5 % de SFB e com 10 % SFB após 24 horas do plaqueamento celular.

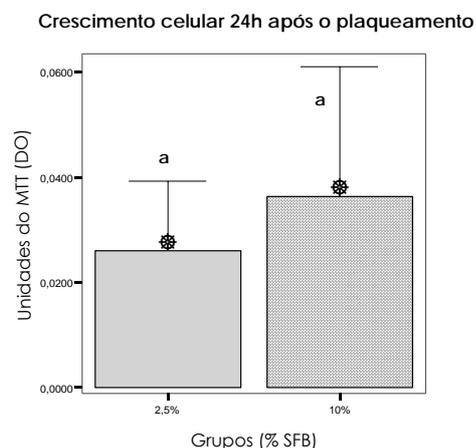


Gráfico 5.14 - Crescimento celular 24h após o plaqueamento. Letras diferentes significam diferença estatística

Para avaliar o tempo experimental ideal entre as irradiações e a análise pelo teste do MTT foram realizados outros 2 experimentos cujas

análises do MTT foram realizadas em diferentes tempos experimentais. Em ambos os experimentos foram plaqueadas 1000 células por poço experimental, a concentração do SFB déficit foi de 5 % e os grupos controles foram mantidos em placas separadas dos grupos experimentais e estes foram distribuídos conforme já descrito nas Figuras 4.16 e 4.17 do Material e Métodos. O experimento 4.1, avaliou o MTT 24 h após as irradiações e o experimento 4.2 avaliou o MTT 48h após as irradiações. Os dados obtidos pelo espectrofotômetro foram unidos e os resultados da ANOVA e teste de Tukey encontram-se no Gráfico 5.15 e Tabela 5.10.

As comparações entre os grupos experimentais avaliados após 24 e 48 horas, avaliação A e B respectivamente, indicam que as diferenças entre os grupos da avaliação A são mais evidentes que entre os grupos da avaliação B. Em A, o número de células dos grupos controle positivo 10%, 2 x 3 s e 3 x 3 s foram estatisticamente similares entre si, e maiores que todos os demais grupos testados. Já em B, os mesmos grupos continuaram estatisticamente similares entre si, porém apenas o controle 10% foi maior estatisticamente que os outros grupos. O número de células do grupo 3 x 3 s foi estatisticamente semelhante a todos os grupos e o 2 x 3 s foi semelhante a todos exceto ao grupo 3 s ao qual foi estatisticamente superior em número de células.

Em A, o número de células do controle negativo 5 % em relação aos grupos uni irradiados mostrou ser similar aos grupos 3 s e 9s, porém estatisticamente menor que o grupo 6 s. Também foi inferior estatisticamente

aos grupos 10 %, 2 x 3 e 3 x 3 s. O controle negativo 5 % em B, apenas foi menor estatisticamente que os grupos 10 % e 9 s.

Entre os grupos uni irradiados (3 s, 6 s e 9 s), em A o grupo que apresentou maior número de células foi o grupo 6 s, porém só foi maior estatisticamente que o grupo 9s que, juntamente com o grupo 5 %, apresentaram a menor quantidade celular em relação a todos os grupos testados. Em B, inversamente, o grupo que apresentou maior número de células foi o grupo 9s, similar ao grupo 6 s e maior estatisticamente que o grupo 3 s.

Comparando o número de células entre os grupos A e B, os grupos controles negativos mantiveram-se estáveis, sendo similares estatisticamente. Por outro lado, o grupo controle positivo 10 % de A apresentou quantidade celular estatisticamente maior que em B.

Efeito fototerapia - MTT 24 h (A) e 48 h (B) após as irradiações

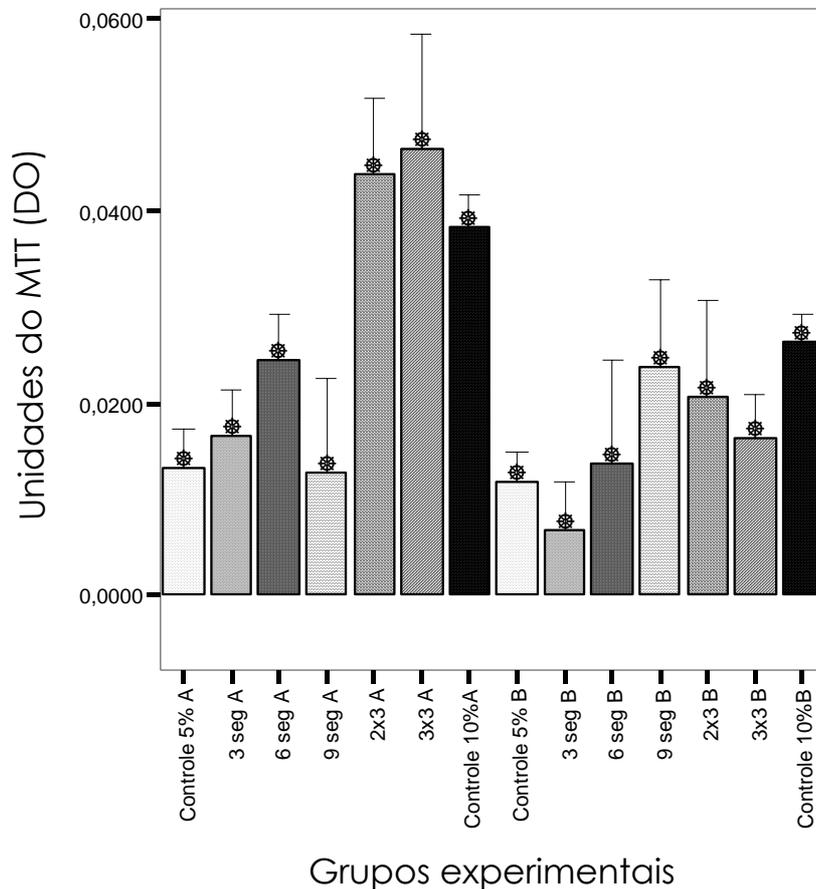


Gráfico 5.15 - Avaliação do crescimento celular 24h (A, Experimento 4.1) e 48h (B, Experimento 4.2) após as irradiações. Barras com cores iguais indicam o mesmo grupo experimental e as letras A ou B tempo de avaliação diferente

Comparando os grupos 3 s e 6 s dos experimentos avaliados em A (24h) e B (48h), não houve diferença estatística no número de células. Já entre os grupos de 9 s de irradiação, em B o número de células foi estatisticamente superior que em A.

Já entre os grupos multi irradiados, 2 x 3 s e 3 x 3 s a comparação entre eles do número de células apresentou valores estatisticamente maiores em A que em B.

Tabela 5.10 - Dados estatísticos da comparação entre os grupos dos experimentos 4.1(A) e 4.2 (B) Letras diferentes significam diferença estatística

Grupos A	Resultados	Grupos B	Resultados
Controle 5% A	0,01 ± 0,00 a,b,c,d	Controle 5% B	0,01 ± 0,00 a,b
Controle 10%A	0,03 ± 0,00 f	Controle 10%B	0,02 ± 0,00 e
3 seg A	0,01 ± 0,00 a,b,c,d,e	3 seg B	0,00 ± 0,00 a
6 seg A	0,02 ± 0,00 d,e	6 seg B	0,01 ± 0,00 a,b,c,d
9 seg A	0,01 ± 0,00 a,b,c	9 seg B	0,02 ± 0,00 c,d,e
2x3 A	0,04 ± 0,00 f	2x3 B	0,02 ± 0,00 b,c,d,e
3x3 A	0,04 ± 0,00 f	3x3 B	0,01 ± 0,00 a,b,c,d,e
valor de F	29,397	valor de p	0,000

5.2 FASE 2 - REALIZAÇÃO DA METODOLOGIA FINAL

Esta fase foi realizada baseada nos resultados da Fase 1, cujos experimentos buscaram determinar:

- O número de células a serem plaqueadas;
- A porcentagem de soro fetal bovino no meio de cultura que promovesse um déficit nutricional celular;
- A distribuição dos grupos nas placas experimentais para a realização das irradiações;
- O tempo experimental ideal entre o plaqueamento e as irradiações e entre essas e a análise do MTT.

Foi determinado o protocolo experimental, ou seja, a metodologia final, que foi realizada com o intuito de avaliar os efeitos do fracionamento

de energias comparados com energias totais na fototerapia com *laser* em baixa intensidade sobre o crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana.

A metodologia final foi realizada com o plaqueamento de 1000 células por poço experimental, sendo o meio déficit composto por 5 % de SFB. A distribuição dos grupos na placas foi feita conforme os experimentos 4.3 e 4.4, ou seja, os controles foram colocados em placas separadas dos grupos irradiados e estes foram distribuídos ocupando cada grupo experimental uma única placa e dentro desta as réplicas ocupavam 4 poços experimentais afastados entre si. Após o plaqueamento celular foi deixado um intervalo de 24 h para em seguida serem realizadas as irradiações conforme o grupo experimental. O teste do MTT foi realizado após 14 horas da última irradiação, ou seja, no dia seguinte às irradiações.

Os grupos experimentais testados na metodologia final foram: G1 (SFB 5 %, sem irradiação); G2 (3 s); G3 (6 s); G4 (9 s); G5 (2x3 s); G6 (3x3 s); G7 (SFB 10 %, sem irradiação). O resultado da análise de variância (ANOVA a um fator) mostrou que há diferença entre os grupos experimentais para a variável crescimento celular (% MTT), sendo $F(6,21) = 40,311$; $p = 0,000$.

Para detectar as diferenças entre os grupos foi realizado o teste de Tukey a nível de 5%. O resultado foi: G1(0,01±0,00) ^a; G2(0,01±0,00)^{a,b}; G3(0,02±0,00)^b; G4(0,01±0,00)^a; G5 (0,04±0,00)^c; G6(0,04±0,00)^c; G7(0,03±0,00)^c (Gráfico 20).

O Gráfico 5.16 ilustra o número de células em relação ao grupo experimental testado. O número de células do grupo controle positivo (G7,

10% SFB) foi estatisticamente similar aos grupos multi irradiados 2 x 3 e 3 x 3 s e todos estes foram estatisticamente superiores aos demais grupos testados. Entre os grupos uni irradiados, o grupo 3 s foi estatisticamente semelhante aos grupos 6 s e 9 s, porém entre estes, o grupo 6 s foi estatisticamente superior ao grupo 9 s. O grupo controle negativo 5 % SFB foi estatisticamente semelhante aos grupos 3 s e 9 s e menor estatisticamente que os grupos controle positivo e os multi irradiados.

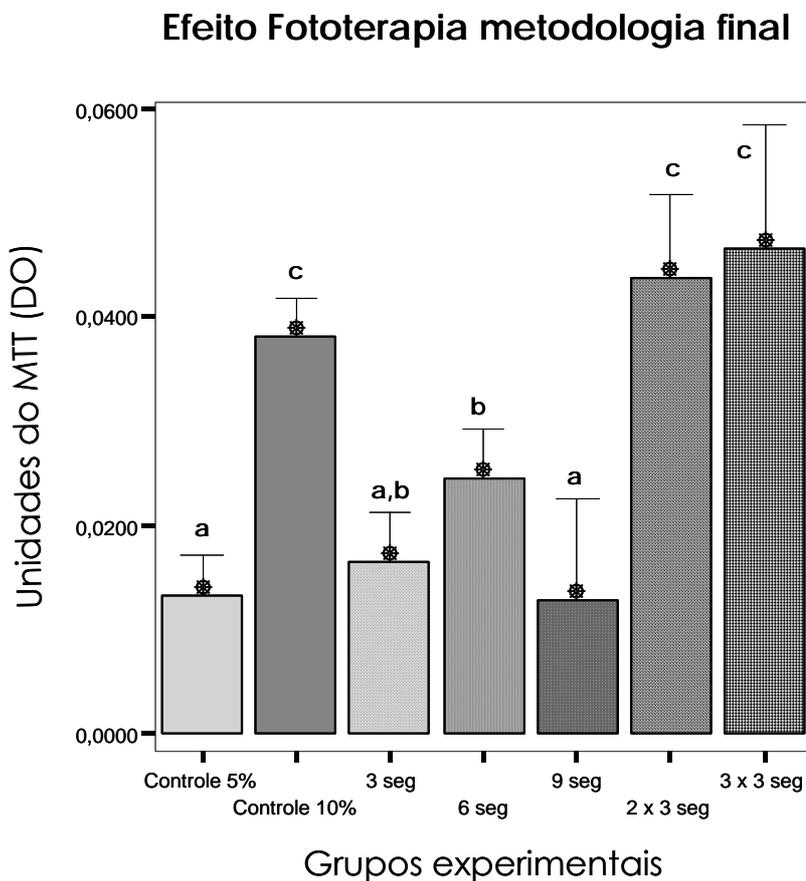


Gráfico 5.16 - Efeito da fototerapia do experimento final. Letras diferentes significam diferença estatística

6 DISCUSSÃO

A fototerapia com *laser* em baixa intensidade tem sido amplamente utilizada como um tratamento coadjuvante, alternativo e não invasivo promovendo a aceleração dos processos cicatriciais, redução de dor, edema e modulando a inflamação. Atualmente, a literatura já não busca mais comprovar a eficácia da ação do *laser* sobre os tecidos, uma vez que a literatura é vasta de trabalhos científicos que justificam seus mecanismos e efetividade. Os profissionais atualmente querem saber como melhor administrar a dosimetria para alcançar melhores resultados clínicos. A energia administrada diariamente poderá ser somada para ser administrada semanalmente? A efetividade de uma única irradiação é correspondente a esta mesma energia fracionada? Estas questões impulsionaram a realização deste trabalho que teve como objetivo testar o efeito da fototerapia no crescimento de fibroblastos usando irradiações com energia total aplicada de uma vez ou fracionada.

Com o intuito de responder a estas perguntas a partir do método de cultura celular, este trabalho inicialmente desenvolveu uma metodologia experimental e posteriormente realizou esta metodologia comparando os efeitos da irradiação *laser* usando irradiações com energia total aplicada de uma vez ou fracionada. O efeito da radiação *laser* foi verificado em

todas as células irradiadas, sendo que as células irradiadas com energias fracionadas apresentaram maior proliferação celular.

Este trabalho utilizou a linhagem celular FP5, de fibroblasto pulpar humano desenvolvida no laboratório a partir da polpa dental de terceiro molar humano e armazenada no banco de células do mesmo. Os protocolos de cultura, contagem e plaqueamento celular utilizados foram semelhantes aos trabalhos previamente realizados no laboratório (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; PEREIRA et al., 2002).

A quantificação celular, realizada após as irradiações, foi realizada pelo método colorimétrico do MTT descrito por Mosmann (1983). O método da redução do MTT quantifica a conversão deste reagente pelas enzimas mitocondriais cujo produto final de cor azul, o formazam, é quantificado por um espectrofotômetro. A atividade mitocondrial é então utilizada para avaliar a viabilidade celular e conseqüentemente fazer sua quantificação durante o experimento. Este método, assim como outros métodos colorimétricos entre eles o azul de trypan, e o do corante neutro vermelho são usualmente utilizados pela literatura para avaliar o crescimento celular (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006a; VINCK et al., 2003).

Para a realização deste trabalho, o item Material e Métodos foi dividido em 2 fases. Na primeira fase foram realizados experimentos cujo objetivo foi a determinação da metodologia experimental e a segunda fase foi a realização desta metodologia estabelecida.

O primeiro passo para a realização de experimentos com culturas celulares é o seu cultivo. Este é necessário para que no momento experimental o número de células seja suficiente para que as amostras por grupo experimental testado sejam plaqueadas em quadruplicata (MOORE et al., 2005). Cada amostra, no entanto, deve conter um número de células fixas cujo valor vai depender do objetivo do trabalho bem como do tipo de placa de cultura que será utilizada no experimento.

O número de células ideal para a realização de experimentos com radiação *laser* em baixa intensidade deve ser tal que permita o crescimento celular acelerado, que segundo a literatura é o que acontece com células submetidas à fotoativação (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006a; VINCK et al., 2003). Desta forma, os primeiros experimentos realizados neste trabalho tiveram o objetivo de estabelecer a quantidade ideal de células que deveriam ser plaqueadas.

Os experimentos que testaram 500 e 1000 células, apresentaram curvas de crescimento ascendente, com diferença estatística entre o 1º e 4º dia, ao passo que nos grupos com 2000, 3000 e 5000 células, não foi observado crescimento celular ao longo dos 4 dias experimentais. Segundo Freshney (2005) esta fase de estabilidade é chamada de fase lag, que segundo Karu, não é a fase propícia de irradiação, pois as células não estão fotossensíveis (FRESHNEY, 2005; KARU, 1987). Além disso, quando utilizamos placas experimentais de 96 poços nos experimentos, ou seja, placas com espaço de cultivo pequeno (3 mm), o número celular plaqueado deve ser tal que possibilite o crescimento celular ao longo de todo o tempo

experimental ou ainda que possibilite o crescimento celular que é esperado após a irradiação com *laser*. Assim, foi estabelecido que para o plaqueamento celular desta linhagem estudada (FP5), a quantidade de células por poço pode ser de 500 ou 1000 células.

Moore et al. (2005) também utilizaram placas de 96 poços, mas realizaram seus experimentos com 250 células por poço. A linhagem celular utilizada foi de fibroblastos de pele de ratos, o que pode justificar esta quantidade escolhida comprovando a importância de antes de cada experimento testar a quantidade celular ideal para linhagem que for ser utilizada.

Os estudos sobre fototerapia com *laser* em baixa intensidade na literatura são ainda muito controversos. No que diz respeito a fase no ciclo celular que as células se encontram, alguns estudos como de Miyata et al. (2005), Hawkins e Abrahamse (2006a) irradiaram células confluentes, e mesmo nos grupos controles foram encontrados resultados estimulatórios.

Segundo Karu (1987) a célula deve estar com o seu potencial redox alterado para absorver a luz e desta forma, a resposta celular será mínima ou ausente quando o potencial redox for ótimo e máximo quando o potencial redox estiver alterado (KARU, 1987; 1988). Essa condição pode ser simulada em culturas celulares deixando as células em déficit nutricional através da redução da porcentagem de SFB (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002).

No entanto, muitos trabalhos apenas se preocupam em alterar o meio de cultura para uma solução tampão fosfato (PBS) (LOEVSCHELL;

ARENHOLT-BINDSLEV, 1994) ou reduzir a porcentagem de meio durante a irradiação (VINCK et al., 2003) no intuito da cor do meio experimental interferir o menos possível na irradiação. Isso, porém, não caracteriza um estresse celular, nem tem este objetivo. Ao contrário, em muitos estudos da literatura onde não foram observados efeitos benéficos do *laser* (HALLMAN et al., 1988; POGREL; CHEN; ZHANG, 1997) o motivo pode estar relacionado entre outros fatores com a ausência prévia da alteração no potencial redox nas células irradiadas.

No intuito de utilizar um déficit nutricional para causar alteração no potencial redox celular, foi fundamental encontrar a porcentagem de SFB déficit que para a linhagem celular estudada caracterize um estresse celular. Desta forma, foram realizados experimentos para determinar a porcentagem de SFB déficit que caracterize a situação de estresse celular comparando o crescimento celular dos grupos défits testados com os controles com nutrição completa.

Avaliando a curva de crescimento do experimento realizado com 500 células os grupos défits de 2,5 % e 5 % de SFB apresentaram viabilidade celular e mantiveram o número de células estável ao longo dos quatro dias experimentais. Comparados ao grupo controle 10%, os grupos défits 2,5 % e 5 % apresentaram quantidades celulares significativamente menores, enquanto que o grupo testado com 7,5 % de SFB foi semelhante ao controle. Estes resultados caracterizam os meios 2,5 % e 5 % como possíveis meios défits podendo ser utilizados para experimentos com irradiação celular.

Já no experimento com 1000 células, o grupo déficit 2,5 % não apresentou viabilidade ao longo dos 4 dias experimentais. O grupo 5 %, no entanto, manteve sua viabilidade além de apresentar durante todo o período experimental, o número de células estatisticamente inferior ao grupo controle 10%. A porcentagem de 5 % de SFB é, portanto indicada para gerar déficit nutricional quando são plaqueadas 1000 células por poço experimental.

Desta forma, os meios déficits entre 2,5 e 5 % parecem ser ideais quando fibroblastos são irradiados. Outros estudos realizados no laboratório concordam com esta faixa, Pereira et al. (2002) utilizaram 2,5 % de SFB enquanto Almeida-Lopes et al. (2001) utilizaram 5 % de SFB para gerar um déficit nutricional celular.

Quando células são irradiadas, a metodologia de irradiação nem sempre é totalmente esclarecida pela literatura. Muitos trabalhos utilizam placas de cultura que variam entre 3 e 6 cm de diâmetro (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006a), enquanto outros utilizam placas de 96 poços, cada um com diâmetro aproximado de 3 mm (AZEVEDO et al., 2006; MOORE et al., 2005; POGREL; CHEN; ZHANG, 1997; TIMBERLAKE; ENWEMEKA, 2004). Quando placas de 96 poços são utilizadas, durante a irradiação uma máscara escura é usualmente colocada para impedir que a irradiação alcance os poços dos grupos adjacentes (MOORE et al., 2005).

Porém, experimentos realizados anteriormente a este trabalho, seguindo a metodologia de irradiação descrita pela literatura, falharam em

demonstrar os efeitos do *laser* em relação ao grupo controle positivo (10 % SFB) e negativo (5 % SFB). Esta experiência particular estimulou a realização de experimentos, cujo objetivo foi avaliar se esta distribuição dos grupos nas placas impediu realmente que a luz emitida durante o procedimento de irradiação celular fosse captada por outro poço experimental, em particular, os poços controles.

Nos experimentos 3.1 e 3.2 foram testados os mesmos grupos experimentais, de irradiação única de 3, 6 e 9 segundos e de irradiação múltipla 2 x 3 s e 3 x 3 s. Em cada experimento, os grupos foram distribuídos em 2 placas experimentais, divididos por uni ou múltiplas irradiações e em ambas as placas foram colocados grupos controles positivos e negativos.

No experimento 3.1 o número de células dos grupos pertencentes à placa 1 (única irradiação) permaneceu igual durante os 4 dias experimentais. Uma vez que o grupo controle negativo (déficit) está incluso neste resultado, podemos sugerir que a irradiação chegou até ele. Os grupos multi irradiados por sua vez, apresentaram no primeiro dia um grande número de células, sem diferença estatística entre eles. Novamente, o grupo déficit, por ter se comportado igual aos grupos irradiados e controle positivo, podem também ter recebido irradiação.

No entanto, ao longo dos 4 dias experimentais, enquanto o grupo controle positivo manteve-se estável, os grupos de múltiplas irradiações e o controle déficit apresentaram um declínio no número de células estatisticamente significativa. Partindo do princípio que as irradiações foram realizadas 24 horas antes da primeira avaliação, no primeiro dia as células

podem ter alcançado o seu auge proliferativo devido ao estímulo luminoso, fazendo com que a viabilidade celular decaísse nos dias consecutivos. Isso é explicado na literatura (FRESHNEY, 2005) uma vez que os contatos celulares estabelecidos quando a cultura celular encontra-se em confluência sinaliza morte celular. Esta perda na viabilidade somada ao fato de que o meio de cultura que é fornecido diariamente as células é um meio com déficit nutricional e que a irradiação não foi mais repetida, este comportamento celular é compreensível. O controle positivo, no entanto, mesmo sofrendo queda na sua viabilidade celular, conseguiu voltar ao equilíbrio logo que novo meio de cultura completo lhe foi fornecido, mantendo o mesmo número de células até o final do tempo experimental.

Comparando os grupos controles positivos entre si, o grupo multi irradiado apresentou número de células estatisticamente superior ao mesmo grupo uni irradiado. Este resultado concorda com a literatura (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; ENWEMEKA et al., 1990; HALLMAN et al., 1988; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005) onde células saudáveis também são estimuladas pela radiação *laser*. Assim, neste trabalho, em células saudáveis múltiplas irradiações foram mais eficientes que uma única irradiação.

O interessante, no entanto, é que as células irradiadas uma única vez, durante todo o tempo experimental foram nutridas com o mesmo meio déficit que os grupos multi irradiados. Contudo, elas não apresentaram queda no número celular em nenhum momento, mantendo-se estáveis. Isso pode indicar o efeito a longo prazo da radiação *laser*, também verificado por Webb, Dyson e Lewis (1998) e Pourreau-Schneider et al. (1990). Além

disso, pode-se sugerir que energias fracionadas apresentam efeitos a curto prazo comparados com os efeitos de energias únicas e menores. Energias baixas em curtos períodos de irradiação mostraram causar um macroefeito duradouro na irradiação de células HeLa em estudo realizado por Karu (1988).

Os grupos controles déficits, no entanto, no primeiro dia experimental apresentaram número de células semelhantes entre si, não seguindo a tendência dos grupos controles positivos, entre os quais o pertencente a placa multi irradiada apresentou maior crescimento celular. Uma possível explicação para isso pode ser a localização dos grupos controles déficits estar mais afastado que todos os outros nas placas experimentais (Figuras 4.11 e 4.12). Partindo da premissa que os grupos foram irradiados, a quantidade de luz recebida foi proporcional à distância dos grupos irradiados e a energia do grupo cuja irradiação foi espalhada. Desta forma, o grupo irradiado 6 s, localizado na região central da placa, deve ter recebido mais energia extra que os outros grupos, uma vez que recebeu dos outros dois grupos 3 s e 9 s. A energia recebida pelos grupos controles déficits localizados 3 colunas de distância do grupo 9 s deve ter sido intermediária. Todos os poços, portanto receberam mais energia do que foi determinado.

Nos 4 dias experimentais, os grupos multi irradiados foram numericamente maiores nos dias 1 e 2, e nos dias 3 e 4 esta situação se inverteu e os grupos 3 s e 6 s mostraram-se superiores numericamente. Essa situação pode ter ocorrido pela morte celular após as células terem atingido

a confluência, no entanto, uma vez que as células dos grupos 3 s e 6 s mantiveram o mesmo número celular durante todo o experimento, isso pode indicar um efeito duradouro e não tão estimulante causado por estas energias.

No quarto dia experimental, nota-se o efeito residual do *laser*, que apesar de ainda perdurar (principalmente no grupo 3 s), todos os grupos irradiados possuem estatisticamente o mesmo número de células e estão muito próximos ao limite mínimo de detecção do espectrofotômetro.

É importante lembrar, todavia, que como o espalhamento da irradiação foi verificado a partir do comportamento dos controles, nestes experimentos comparações entre energias fracionadas e totais perdem o seu efeito, uma vez que a energia real que cada grupo recebeu não pode ser mensurada.

Outro experimento, agora com 1000 células foi realizado de forma similar ao anterior. No primeiro dia, os grupos pertencentes a placa 2 (múltiplas irradiações) foram estatisticamente semelhantes entre si e maiores que todos os grupos da placa 1, cujos valores não foram detectados pelo espectrofotômetro. Por mais que tenham célula nos poços experimentais, justificado pelo plaqueamento ter sido realizado de forma coordenada com as duas placas ao mesmo tempo, a quantidade pode não ser detectada pelo espectrofotômetro.

A curva de crescimento ao longo dos 4 dias experimentais mostrou que todos os grupos, exceto o grupo 3 x 3 apresentaram crescimento no número celular. Este crescimento mesmo 48 horas após a irradiação indica o

novamente o efeito duradouro da fototerapia. O grupo 3 x 3 s apresentou quantidade celular estável ao longo do tempo experimental. O que pode ter ocorrido é que logo no primeiro dia, estas células atingiram o seu platô, e se mantiveram estáveis pelos efeitos duradouros do *laser*, pois da mesma forma que no outro experimento, as células eram mantidas em meio déficit durante todo o tempo experimental.

No segundo dia experimental, o número de células tanto dos grupos multi irradiados como dos grupos uni irradiados, e entre esses e o grupo controle déficit, não foram encontradas diferenças estatística no número celular. Apenas os grupos controles positivos apresentaram estatisticamente maior número celular que todos os grupos sendo semelhantes entre si. Notou-se novamente, o maior número de células do grupo controle multi irradiado, o que confirma que houve estímulo em células saudáveis e nos grupos controles déficits.

No dia 3 a mesma tendência foi repetida, em destaque o grupo 3 s que apresentou o menor número celular e o grupo controle déficit multi irradiado que apresentou semelhança significativa em relação ao grupo controle positivo uni irradiado. No dia 4, os grupos controles positivos foram superiores a todos os grupos, os grupos experimentais mantiveram-se semelhantes e os grupos controles déficits não puderam ser detectados pelo espectrofotômetro. Mais uma vez, a localização nas placas experimentais dos grupos controles déficits pareceu influenciar e a dosagem recebida a distância não perdurou até o último dia experimental como ocorreu com os outros grupos.

Comparando energias únicas com energias fracionadas, estas apresentaram melhores resultados apenas no primeiro dia experimental. O fato das diferenças entre as quantidades celulares serem melhor percebidas no dia 1, indica que os efeitos do *laser* são melhores avaliados 24 horas após sua irradiação.

Os resultados dos experimentos 3.1 e 3.2 levantaram a importância da realização de experimentos levando-se em consideração a possibilidade de ocorrer uma sobreposição de energia uma vez que em placas de 96 poços a irradiação com o *laser* vermelho mostrou atingir até 3 colunas adjacentes, afetando os grupos controles negativos. Assim, a sugestão deste trabalho para que a sobreposição de energia fosse evitada foi a colocação de um grupo experimental por placa, sendo que entre as amostras experimentais fosse deixada uma distância de no mínimo 3 colunas. Além disso, que os grupos controles não estivessem localizados na mesma placa experimental que os grupos irradiados.

Quando queratinócitos e fibroblastos foram irradiados em placas de culturas de 96 poços, incluindo os grupos controles dentro das placas, a proliferação, migração e adesão celular dos grupos irradiados não foi diferente estatisticamente dos grupos controles não irradiados (POGREL; CHEN; ZHANG, 1997). No estudo realizado por Moore et al. (2005), os grupos controles e experimentais também foram alocados na mesma placa experimental. Este estudo comparou diferentes comprimentos de onda em células endoteliais e fibroblastos. Os resultados demonstraram que os fibroblastos são melhores estimulados entre 665 e 675 nm enquanto que as

células endoteliais pareceram preferir 655 nm. Além disso, o comprimento de onda infravermelho testado, 810 nm, foi inibitório para os fibroblastos. Ora, diante de muitos trabalhos que comprovaram os efeitos bioestimulatórios do infravermelho em fibroblastos (ALMEIDA-LOPES, et al., 2001; BOLTON; YOUNG; DYSON, 1995; KREISLER et al., 2002; LOEVSCHELL; ARNOLD-BINDSLEY; 1994) novos trabalhos devem ser feitos para eliminar a possibilidade do efeito encontrado não ter sido causado por sobreposição de energia.

Além disso, aparatos para irradiação mecânica de placas experimentais desenvolvidos (TIMBERLAKE; ENWEMEKA, 2004) devem levar em consideração o espalhamento da irradiação e serem reprogramados para manter uma distância segura entre os poços que serão irradiados.

Dentre os diversos protocolos experimentais relatados da literatura quando culturas celulares são irradiadas, a seqüência experimental realizada ainda é muito diversificada, ampliando as diferenças entre os trabalhos e diminuindo seus parâmetros de comparação. Por exemplo, o tempo experimental entre o plaqueamento e as primeiras irradiações nos trabalhos da literatura varia muito: 12 h (ALMEIDA-LOPES et al., 2001), 24h (MOORE et al., 2005; PEREIRA et al., 2002; VINCK et al., 2003), 48h (LUBART et al., 1992), e até o momento cujas células encontram-se próximas à confluência (LOEVSCHELL; ARENHOLT-BINDSLEY, 1994) ou confluentes (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006a).

O intervalo de tempo entre as irradiações e suas avaliações pelos diferentes métodos de análise é outro intervalo também variado na literatura. No entanto, este intervalo é um pouco mais crítico uma vez que os

efeitos do *laser* podem ser perdidos quanto mais tarde forem avaliados. Este fato pode ser observado por Vinck et al. (2003). Neste trabalho foram comparados os efeitos de diferentes fontes de luz em diferentes irradiâncias (W/cm^2) sobre fibroblastos. Comparando os resultados de diferentes experimentos semelhantes apenas realizados em tempos de avaliação diferente, foi observado que os resultados avaliados em 72 h após a última irradiação foram totalmente contrários aos avaliados no tempo de 24 h. No trabalho de Moore et al. (2005) as avaliações do crescimento de fibroblastos e keratinócitos irradiados com diferentes comprimentos de onda só foram realizadas 72 horas após as irradiações. Seus resultados da ação do *laser* infravermelho, anteriormente comentados, foram inibitórios para os fibroblastos. Por outro lado, Lubart et al. (1992), realizou as análises após 24 h da irradiação e verificou o aumento no número de mitoses de células irradiadas comparadas com o controle não irradiado.

Ainda para a determinação da Metodologia experimental deste trabalho, foram finalmente realizados experimentos que buscaram encontrar o intervalo de tempo ideal entre o plaqueamento celular e as irradiações e o intervalo entre essas e sua avaliação através do teste do MTT.

Analisando os resultados do experimento 2.1 foi verificado que entre os dias 1 e 2 não houve diferença no número de células entre os grupos testados. Este experimento assim como o 4.2 comparou somente grupos em déficit nutricional e grupos com nutrição ideal, com o intuito de verificar qual é a tendência normal das células nestas duas condições nos dias consecutivos ao plaqueamento. No experimento 4.2, 24 horas após o

plaqueamento, também não foi encontrado diferença estatística no número celular entre o grupo déficit e controle 10% testado. Nos experimentos com irradiação é fundamental haver uma diferença significativa no número de células entre os grupos déficit e controle antes da irradiação para que os resultados sejam verificados. Desta forma, o tempo de 24 horas antes da realização das irradiações foi escolhido como ideal. Este intervalo é o mesmo relatado na literatura que uma célula leva para se adaptar ao meio de cultura (FRESHNEY, 2005).

No intuito de determinar o tempo ideal entre as irradiações e a análise do MTT foram realizados dois experimentos semelhantes cujas análises foram realizadas 24 (A) e 48 (B) horas após a última irradiação. Os experimentos foram plaqueados com 1000 células, em meio déficit com 5 % de SFB, as placas experimentais foram separadas por grupo e dentro de cada uma delas os poços foram distanciados. As irradiações foram realizadas conforme o objetivo do trabalho, avaliando se energias únicas são equivalentes as mesmas fracionadas no crescimento celular.

As diferenças entre os grupos experimentais em A foram mais significativas que em B. Enquanto em A os grupos controle positivo 10 % de SFB, 3 X 3 s e 2 x 3 s foram semelhantes entre si, porém maiores que os demais grupos e os grupo 6 s foi superior em número de células que 9s e que o controle, em B apesar dos grupos multi irradiados serem semelhantes como controle positivo 10 % de SFB, apenas este foi estatisticamente superior a todos os outros. Ocorreu uma tendência de inversão da quantidade de células que pode ser verificado com o aumento do número de células do

grupo 9 s, que 24 horas antes seria o menos populoso, ao mesmo tempo que a diferença entre os grupos multi irradiados com os grupos uni irradiados que era significativa agora se tornou semelhante.

O contato celular extremo quando a cultura celular atinge a confluência faz com que a viabilidade celular diminua com a morte celular de algumas células. Isso ocorre para que o processo proliferativo da população celular fique em equilíbrio. Esta diminuição na viabilidade após o grande crescimento celular pode ser verificada nos grupos multi irradiados. Assim, o grupo 9 s ainda estava em fase lenta de crescimento não tendo passado, portanto pela perda da viabilidade que pode ter sido experimentada pelo grupo 6 s, por exemplo.

Para evitar estas especulações sobre crescimento e perda de viabilidade, que é cíclico (FRESHNEY, 2005), a fase mais sensível ao teste de MTT verificada e entendida neste trabalho como ideal foi a avaliação 24 horas após as irradiações.

Baseado nos experimentos realizados foi determinada a metodologia final experimental no intuito de avaliar os efeitos do fracionamento de energia comparados com energia total na fototerapia com *laser* em baixa intensidade sobre fibroblastos pulpaes humanos. 1000 células foram plaqueadas e a porcentagem déficit adicionada ao meio foi de 5 % de SFB. Os grupos experimentais foram distribuídos nas placas conforme os experimentos 4.3 e 4.4. O protocolo de irradiação foi realizado 24 horas após o plaqueamento, com o *laser* vermelho (InGaAIP), potência aproximada de 40 mW, com os seguintes grupos experimentais: G1 (SFB 5 %, sem irradiação);

G2 (3 s, 6,3 J/cm² e 0,12 J); G3 (6 s, 12,6 J/cm² e 0,24 J); G4 (9 s, 18,9 J/cm² e 0,36 J); G5 (2x3 s, 2 x 6,3 J/cm² e 0,24 J); G6 (3 x 3 s, 6,3 J/cm² e 0,36 J); G7 (SFB 10 %, sem irradiação).

Segundo Karu (1987), existe uma forte relação entre os parâmetros da luz e os efeitos bioestimulatórios a nível celular e, entre o momento da irradiação e os limites da magnitude dos efeitos biomodulatórios. Parâmetros da irradiação como comprimento de onda, irradiância e fluência são as características mais importantes tanto na estimulação quanto na inibição do metabolismo celular (KARU, 1987).

Neste trabalho, o comprimento de onda escolhido foi o visível (685 nm) que conforme a literatura possui os melhores resultados na estimulação de fibroblastos (HASS et al., 1990; MOORE et al., 2005; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990; STEINECHNER; DYSON, 1993; YOUNG et al., 1989; YU et al., 1996) A potência utilizada também está de acordo com a literatura (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006; ALMEIDA-LOPES et al., 2001; PEREIRA et al., 2002) e as fluências concordam com a literatura nos grupos 3 s (6,3 J/cm²) e 9 s (18,9 J/cm²) (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006a; KREISLER et al., 2002). Já a fluência do grupo 6 s (12,6 J/cm²) possui resultados contraditórios na literatura (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006b).

Os efeitos terapêuticos do *laser*, segundo Karu (1988) são geralmente atribuídos ao aumento na proliferação celular. Este trabalho concordou com a literatura (ALMEIDA-LOPES et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006; BOLTON, 1995; BOULTON 1981; HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006A; 2006B; NARA; MOTONO; MORIOKA, 1992; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990; VAN BREUGEL;

BAR, 1992; VINCK et al., 2003) demonstrando que os grupos irradiados apresentaram maior número de células que os grupos não irradiados e mantidos com o mesmo déficit nutricional.

O objetivo deste trabalho foi comparar o fracionamento da energia com esta mesma quantidade de Joules administrada de uma única vez. Este tipo de comparação, assim como o fracionamento de doses nos mais variados parâmetros é bastante controverso na literatura.

Utilizando doses baixas e fracionadas, um estudo feito por Hawkins e Abranhamse (2006b), mostrou que uma irradiação de 5J/cm² e duas de 2,5 J/cm² no mesmo dia em 2 dias consecutivos estimularam a proliferação celular, mantendo a viabilidade celular e a atividade mitocondrial sem causar efeitos adicionais danosos para a célula. Este estudo indicou que dose acumulada administrada uma vez ao dia determina o efeito estimulatório ou inibitório do *laser* sobre as respostas celulares. Também com doses baixas, Mester, Mester e Mester (1985) demonstraram que quando administradas repetidamente, porém com um intervalo apropriado de tempo entre si, são mais efetivas que as mesmas doses administradas em menor intervalo de tempo.

Abergel em culturas de fibroblastos demonstrou que repetições de doses menores em longos intervalos são mais efetivos (ABERGEL et al., 1984). E segundo Tuner e Hode (1999) a fototerapia tem se demonstrado cumulativa, ou seja, os efeitos da dose de um tratamento perduram por um tempo e se outro tratamento for realizado neste intervalo os efeitos são somados. Isto torna essencial que os intervalos entre os tratamentos não

sejam muito próximos evitando sobreposição de estímulo que eventualmente podem estar acima do ideal para a bioestimulação, podendo até levar a uma faixa bioinibitória com resultados insatisfatórios.

Hawkins e Abrahamse (2006b) compararam a irradiação de doses múltiplas e seus resultados demonstraram que o acúmulo de efeitos que levam a uma inibição é dose-dependente. Foram testadas múltiplas irradiações diárias (1,2 ou 3) de 2,5, 5 e 16 J/cm², em dois dias consecutivos. Apenas uma irradiação de 5 J/cm² ou duas de 2,5J/cm² mostraram efeitos satisfatórios no crescimento, viabilidade a atividade mitocondrial das células estudadas. As outras dosagens mostraram efeitos bioinibitórios.

Na clínica, ao contrário dos estudos *in vitro*, os efeitos atingem uma região tecidual com diversos tipos celulares e uma cascata complexa de reações chega até as células em diferentes momentos. Em processos cicatriciais de feridas, por exemplo, têm sido demonstrados efeitos positivos em irradiações diárias ou a cada 48 horas no início do tratamento, e depois os intervalos são aumentados. Em tratamentos de cicatrização de aftas, herpes, mucosite oral, pós-operatórios cirúrgicos entre outros, também um intervalo a cada 24 horas tem tido efeitos positivos (COWEN et al., 1997; LAGAN et al., 2001; PRIKULS, 2000; SCHINDL; NEUMANN, 1999).

Entre as energias únicas testadas a energia correspondente a 6 s de irradiação foi numericamente a que promoveu maior crescimento celular, sendo estatisticamente semelhante a irradiação por 3 s e estatisticamente maior que 9 s de irradiação. Este resultado foi diferente do relatado na literatura, uma vez que fluências correspondentes a utilizada, de 12,6 J/cm²,

mostraram ser inibitórias em fibroblastos (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006b;). No entanto, comparar apenas um parâmetro dosimétrico pode não ser confiável. O ideal seria que a energia total depositada por irradiação fosse relatada nos trabalhos ou que a área do feixe *laser* fosse disponibilizada para indiretamente realizar o cálculo da energia. Outra opção é comparar a irradiância (W/cm^2) entre os trabalhos, que conforme Almeida-Lopes et al. (2001) os mesmo resultados biológicos foram encontrados utilizando a mesma irradiância em fibroblastos irradiados tanto com o *laser* vermelho como com o infravermelho.

Além disso, cada tipo celular ou cada linhagem pode ter um pico ótimo de irradiação que é dose-dependente. Segundo alguns autores (BAXTER, 1997; LOW; REED, 2001; TIPHLOVA; KARU, 1987) acredita-se que exista uma “janela terapêutica” para uma fotoestimulação efetiva acima de um valor limiar, porém abaixo de um valor que ocasione uma fotoinibição, conforme o conceito da lei de Arndt-Schultz. Esta lei prediz a existência de um efeito dose-dependente representado por uma curva de fluência versus resposta biológica. Segundo esta lei, podemos relacionar a energia de 3 s de irradiação ($0,12 J$ ou fluência de $6,3 J/cm^2$) como estimulatória, porém aquém da energia ótima que seria a energia que alcançaria os mesmos resultados de crescimento que o grupo controle. Da mesma forma, 6 s apesar de melhor que 3 s também não chegou na energia ótima. Por outro lado, 9 s de irradiação já faz parte da descida da curva de Arndt-Schultz, resultando em um efeito inibitório.

As energias fracionadas, no entanto, não se encaixariam na lei de Arndt- Schultz porém seus resultados equivalem aos resultados do controle, sendo portanto ótimos para a linhagem celular testada. Comparando a resposta do grupo de 9 s (0,36 J) com a mesma energia fracionada, esta foi estatisticamente mais efetiva. Da mesma forma, 6 s (0,24 J) foi estatisticamente inferior que a sua versão fracionada.

O intervalo de 6 em 6 horas, utilizado em cultura de fibroblastos, foi um intervalo efetivo para este tipo de estudo. Clinicamente poderia ser correspondente a irradiações diárias de fototerapia, se considerarmos que 6 horas seja um ciclo de vida médio de um fibroblasto.

Hawkins e Abrahamse (2006a, 2006b) realizaram experimentos com irradiações únicas e repetidas em 2 dias consecutivos. A partir de seus resultados, foi sugerido que mesmo quando as células recebem energia acima do seu ideal, sofrendo até alguns efeitos danosos, isso não é significativo na terapia total. Os autores sugerem que durante o intervalo para a próxima repetição a saúde celular é restabelecida e mais do que isso, as células parecem se adaptar ao estímulo luminoso de forma que os efeitos danosos causados na primeira irradiação não mais ocorrem. Isso pode justificar porque energias totais altas e fracionadas são mais eficientes que a mesma energia irradiada uma única vez.

Assim, novas pesquisas podem ser desenvolvidas no sentido de investigar uma possível vantagem da realização de uma irradiação inicial adaptativa. E com certeza, assim como na posologia medicamentosa, a

idéia de iniciar um tratamento com energias baixas e aumentá-las gradativamente deve ser levada em consideração na fototerapia.

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada concluiu-se que o fracionamento das energias de irradiação potencializa o efeito bioestimulador da fototerapia com laser em baixa intensidade no crescimento de fibroblastos de polpa dentária humana.

REFERÊNCIAS¹

Abergel, P., Meeker, C.A., Lam, T.S., et al. (1984). Control of connective tissue metabolism by lasers: Recent developments and future prospects. *J. Am. Acad. Dermatol.* 11, 1142–1150.

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

Amorim JC, de Sousa GR, de Barros Silveira L, Prates RA, Pinotti M, Ribeiro MS. Clinical study of the gingiva healing after gingivectomy and low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006 Oct;24(5):588-94.

Anders JJ, Borke RC, Woolery SK, Van de Merwe WP. Low power lasers irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve. *Lasers Surg Med.* 1993;13(1):72-82.

Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. A pilot study. *Lasers Med Sci* 2006;21:86–9.

Basford JR. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. *Lasers Surg Med* 1989;9:1-5.

Baxter GD. *Therapeutic lasers: theory and practice.* United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

Beckerman H, De Bie R, Bouter I, De Cuyper H, Oostendorp R. The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: a criteria based meta-analysis of randomized clinical trials. *Phys Ther* 1992;72:483-91.

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

Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity lasers radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res* 1994;100:43-6.

Bjordal JM, Couppé C, Chow RT, Tunér J, Ljunggren EA. A systematic review of low level lasers therapy with location-specific doses for pain from joint disorders. *Aust J Physiother* 2003;49:107-16.

Bolton P, Young S, Dyson M. The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human Fibroblasts in vitro. *Laser Therapy* 1995;7:55-60.

Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe lasers). *J Photochem Photobiol B* 1996;34(2-3):117-21.

Catão MH. Os benefícios do lasers de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia. *Revista Brasileira de Patologia Oral* 2004; 3(4):214-18.

Catunda T, Pataia A, Romero A, Sartori J, Nunes LAO. Laser de Semicondutor Visível: um instrumento didático de baixo custo. *Rev Bras Ensino Física* 1998;20(3):230-37.

Cha D, O'Brien P, O'Toole EA, Woodley DT, Hudson LG. Enhanced modulation of keratinocyte motility by TGF relative to EGF. *J Investig Dermatol* 1996;106:590-597.

Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers Surg Med* 2004;35(2):117-20.

Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut ,Faucher C, Franquin J. Low energy helium-neon laser in the prevention of oral Mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1997;38(4):697-703.

Efendiev AI, Tolstykh PI, Dadashev AI, Azimov SA. Increasing the scar strength after preventive skin irradiation with low-intensity lasers. *Klin Khir* 1992;(1):23-5.

Enwemeka CS, Rodriguez O, Gall N, Walsh N. Morphometries of collagen @bril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. *J Clin Laser Med Surg* 1990Dic;47±52.

Ferreira ANS, Silveira L, Genovese WJ, Araújo VC, Frigo L, Mesquita RA, GUEDES E. Effect of GaAlAs lasers on reactional dentinogenesis induction in human teeth. *Photom Lasers Surgery* 2006;24(3):358-365.

Ferreira DM, Zângaro RA, Balbin Villaverde A, Cury Y, Frigo L, Piccol G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic effect of He-Ne (632,8nm) low-level lasers therapy on acute inflammatory pain. *Photom Lasers Surg* 2005;23(2):177-81.

Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5ª ed. New Jersey (EUA): Wiley-Liss; 2005.

Friedman H, Lubard R. Photostimulation by light-induced cytosolic calcium oscillations. *Lasers Ther* 1996;8:137-42.

Friedmann, H., Lubart, R., Laulicht, I., et al. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J. Photochem Photobiol*. 1991;11:87-91.

Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, LUBART R. 780 nm low power diode lasers irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: Involvement of reactive oxygen species. *Lasers Surg Med* 1998;22(4):212-18.

Gutknecht N, Eduardo CP. *A odontologia e o lasers: atuação do lasers na especialidade odontológica*. São Paulo: Quintessence; 2004.

Haas AF, Isseroff RR, Wheeland RG, Rood PA, Graves PJ. Low-energy helium-neon lasers irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1990;94(6):822-6.

Hallman HO, Basford Jr., O'Brien JF, Cummins LA. Does low-energy helium±neon laser irradiation affect in vitro replication of human Fibroblasts? *Lasers Surg Med* 1988;8:125± 129.

Hawkins DH, Abrahamse H. Biological effects of Helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(3):251-9.

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

Hawkins DH, Abrahamse H. Effect of multiple exposures of low-level laser therapy on the cellular responses of wounded human skin fibroblasts. *Photomed Laser Surg* 2006b;24(6):705-14.

Jori G, Schindl L, Schindl A, Polo N. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. *J Photochem Photobiol A Chem* 1996;102:101-7.

Karu T. Mechanisms of interaction of monochromatic light with cells. In: Karu T, Young AR, editors. *Effects of low power light on biological systems*. Washington, DC: Proceedings of the European Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers;1996: 26(30):2-9.

Karu T. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers in the life sciences* 1988;2(1):53-74.

Karu T. Photobiology of low-power lasers effects. *Health Phys* 1989; 56(5):691-704.

Karu TI. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: Karu TI, Lubart R. Effects of low-power light on biological systems V. Amsterdam, Netherlands: Proceedings of SPIE 2000;4159:1-7.

Karu TI. Photobiological fundamentals of low-power lasers therapy. IEEE J Quantum Elect 1987;23(10):1703-19.

Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanæs HR. Low-level lasers therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. Clin Oral Implant Res 2004;15:325-32.

Kimura Y, Wilder-Smith P, Yonaga K, Matsumoto K. Treatment of dentine hypersensitivity by lasers: a review. J Clin Periodontol 2000;27:715-21.

Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. Physioter 1991;77(3):161-8.

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

Labbe RF, Skogerboe KJ, Davis HA, Rettmer RL. Lasers photobioactivation mechanisms: In vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. Lasers Surg Med 1990;10:201-7.

Lagan KM, Clements BA, McDonough S, Baxter GD. Low intensity laser therapy (830nm) in the management of minor postsurgical wounds: a controlled clinical study. Lasers Surg Med 2001;28(1):27-32.

Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode lasers irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med 1994;14(4):347-354.

Low L, Reed A. Eletroterapia Explicada: Princípios e Prática. 3ª ed., Barueri: Ed. Manole Ltda, 2001

Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breitbart H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med* 1997;21(5):493-9.

Lubart R, Malik Z, Rochkind S, Fisher T. A possible mechanism of low level lasers-living cell interaction. *Lasers Ther* 1990;2:65-68.

Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B*. 1992;12(3):305-10.

Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of Low-Power Lasers Irradiation on Protein Synthesis and Ultrastructure of Human Gingival Fibroblasts. *Lasers Surg Med* 2004;34:260-65.

Mester AF, Snow Jr JB, shaman P. Photochemical effects of lasers irradiation on neuritic outgrowth of olfactory neuroepithelial explants. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;105(3):449-56.

Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 1985;5:31-39.

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

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

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.

Miyata H, Genma T, Ohshima M, Yamaguchi Y, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Otsuka K. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by

low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int Endod Journal*, 2006;39:238–244.

Nara Y, Matono S, Morioka T. Regulatory action of low intensity lasers on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin. *Surg Med Lasers* 1991;4:17-20.

Nes AG, Posso MBS. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *International Council of Nurses, International Nursing Review* 2005;52:68-72.

Núñez SC, Garcez AS, Suzuki SS, Ribeiro MS. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. *Photomed Laser Surg*. 2006 Feb;24(1):45-9.

Olson JE, Schimmerling W, Tobias CA. Lasers action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res* 1981;204(2):436-40.

Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy lasers irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998;22(4):347-54.

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

Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. Effects of low-energy galliumaluminum-arsenide lasers irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med* 1997;20(4):426–32.

Polo I, Presti F, Schindl A, Schindl L, Bertoloni G, Jori G. Role of ground and excited singlet state oxygen in the red light induced stimulation of *Escherichia coli* cell growth. *Biochem Biophys Res Com* 1999; 257:753-58.

Pourreau-Schneider N, Ahmed A, Soudry M, Jacquemier J, Kopp F, FRANQUIN JC, et al. Helium-neon lasers treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol* 1990;137(1):171–8.

Prikuls VF. Experience in irradiating with helium-neon lasers to treat patients with relapsing aphthous stomatitis. *Stomatologija* 2000;79(6):20-2.

Qadri T, Miranda L, Tune J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2005;32:714–9.

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, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L. Low-intensity lasers therapy: a review. *J Investig Med* 2000;48:312-26.

Smith KC. The photobiological basis of low level lasers irradiation therapy. *Lasers Ther* 1991;3:19-24.

Souza SC, Munin E, Alves LP, Salgado MA, Pacheco MT. Low power lasers radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration. *J Photochem Photobiol B.* 2005;80(3):203-7.

Steinlechner C, Dyson M. The effects of low level lasers therapy on the proliferation of keratinocytes. *Lasers Therapy* 1993;5:65–73.

Timberlake GT, Enwemeka CS. An inexpensive, automated instrument for laser irradiation of cultured cells. *Photomed Laser Surg* 2004;22(3):233–9.

Tiphlova OA, Karu TI. Action of monochromatic low-intensity visible light on growth of *E. coli*. *Microbiol*, 1987;60:626-30.

Tuner J, Hode L. Low level laser therapy. Clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books, 1999.

Van Breugel HH, Bar PR. Power density and exposure time of He-Ne lasers irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med* 1992;12(5):528-37.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power lasers irradiation. *Lasers Med Sci* 2003;18:95-9.

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

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

Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med* 1989; 9(5):497-505.

Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium-neon lasers irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1996;107(4):593-6.

Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of lasers irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol* 1994;59(2):167-170.

Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol* 2003;120:849-57.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 47/06**

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa “Influência da dosimetria no crescimento celular de fibroblastos pulpares”, de responsabilidade da Pesquisadora **Daiane Thais Meneguzzo**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia Martins Marques**.

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

São Paulo, 04 de abril de 2006

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

ANEXO B – Resultados da análise de variância (ANOVA 2 fatores) da etapa 1

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Amostra (dias)	2394,54	3	798,18	1,323	0,275
Colunas (n° células)	21148,87	4	5287,21	8,763	0,000
Interações	13995,54	12	1166,29	1,933	0,048
Dentro	36199,63	60	603,32		
Total	73738,58	79			

ANEXO C – Resultados da análise de variância (ANOVA 2 fatores) do experimento 2.1

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Amostra (dias)	0,092	3	0,031	7,280	0,000
Colunas (n° células)	0,16	3	0,005	1,223	0,311
Interações	0,058	9	0,006	1,533	0,164
Dentro	0,203	48	0,004		
Total	0,369	63			

ANEXO D – Resultados da análise de variância (ANOVA 2 fatores) do experimento 2.2

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Amostra (dias)	0,001	3	0,000	6,296	0,002
Colunas (n° células)	0,042	2	0,021	332,096	0,000
Interações	0,005	6	0,001	13,837	0,000
Dentro	0,002	36	6,38E-005		
Total	0,051	63			

ANEXO E - Resultados da análise de variância (Anova 2 fatores) do experimento 3.1

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Amostra (dias)	0,040	3	0,013	6,610	0,000
Colunas (n° células)	0,083	8	0,010	5,152	0,000
Interações	0,097	24	0,004	2,006	0,008
Dentro	0,218	108	0,002		
Total	0,438	143			

ANEXO F - Resultados da análise de variância (ANOVA 2 fatores) Experimento 3.2

ANOVA					
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>
Amostra (dias)	0,130	3	0,043	6,610	0,000
Colunas (n° células)	0,336	8	0,042	5,152	0,000
Interações	0,240	24	0,010	2,006	0,000
Dentro	0,039	108	0,000		
Total	0,745	143			

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](#)