

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Allison Gustavo Braz

**Resposta proliferativa de células-tronco submetidas à radiação laser de baixa
potência**

São Jose dos Campos, SP
2008

Allison Gustavo Braz

**Resposta proliferativa de células-tronco submetidas à radiação laser de baixa
potência**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof.Dr. Egberto Munin e Prof.
Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

**São Jose dos Campos, SP
2008**

B839d

Braz, Allison Gustavo

Dinâmica da proliferação de células tronco induzida por radiação laser em modelo animal/ Allison Gustavo Braz. Orientador: Prof. Dr. Egberto Munin; Co-orientador Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco. São José dos Campos: 2008.

1 Disco laser: color.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.2008.

1. Células-tronco 2. Terapia a laser de baixa intensidade I. Munin, Egberto, Orient. II . Pacheco, Marcos Tadeu Tavares, Co-orient. III. Título

CDU:574.87

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Aluno:



Data:

28/09/08

ALLISON GUSTAVO BRAZ

**“RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS-TRONCO SUBMETIDAS À RADIAÇÃO
LASER DE BAIXA POTÊNCIA: INVESTIGAÇÃO “IN VIVO” EM MODELO ANIMAL”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dra. **VIVIANE PILLA** (UNIVAP)

Viviane Pilla

Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP)

Egberto Munin

Prof. Dr. **MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO** (UNESP)

Miguel Angel Salgado

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 30 de junho de 2008.

À Deus por sempre iluminar meus passos, por me mostrar que nem sempre o que desejamos de bom, é o melhor para nós mesmos e por sempre me fornecer o apoio necessário para seguir em frente.

À meus pais Toninho e Denise, onde cada um a sua maneira, me ajudaram e me apoiaram, e por todo o amor.

Aos meus irmãos Breno e Igor, por todas as alegrias e inspirações que me proporcionaram. Desejo a vocês grande sucesso profissional e pessoal.

Aos meus avós maternos, Francisca e Alcides, e paternos, Izabel e Francisco (*in memóriam*) que sempre olharam por mim, me dando forças para seguir em frente, graças a suas orações consegui!

AGRADECIMENTOS

Acredito que eu precisaria de outra dissertação, que renderia na verdade um grande livro com páginas e mais páginas sobre o quão importantes foram as pessoas pra mim neste mestrado. Mas como aqui o foco é outro, terei que ser breve e apenas citar alguns nomes, mas tenham certeza que cada nome aqui citado já seria digno de receber um capítulo inteiro em meu livro de agradecimentos.

A meu orientador Prof.Dr. Egberto Munin, que me deu a oportunidade de realização deste trabalho. Meu orientador acabou fazendo muito mais que apenas me orientar, fazendo o papel de pai ou irmão. Muito obrigado por tudo!

À FAPESP, que graças a seu apoio financeiro tive condição de realizar este mestrado.

À minha tia Laura pelo apoio e suporte em minhas viagens, bem como o seu filho Déco e sua nora Daniela.

Aos meus amigos de sala, aos quais me proporcionaram momentos de aprendizado e também de descontração.

A meus amigos de São José dos Campos e amigos de outras cidades aos quais vivi: Kaique, Anne, Belinha, Bella, Renata, André, Rodrigo pindurico, Márcio japonês, Leandro, Marquinho, Jó, Luciana, Marcão, Flávio, Regiane, Adriano, Aline Nascimento, Heloisa Helena, e vários outros que eu tive oportunidade de viver e compartilhar experiências no condomínio Flat School, onde vivemos como uma grande família.

A todas as pessoas que passaram por minha república, entre eles Danilo, Darcy, Ênio, Renato, Geraldo, Ivo, Marcelo Válio, Karlão, Rafael (Evo Morales), Molina entre outros.

Ao apoio imensurável que minha nova amiga, Alda, me concedeu.

A toda a ajuda e atenção que meu amigo/irmão César Jana me concedeu, sua ajuda foi essencial.

À minha mãe, por toda a sua luta por dar condições de estudos a todos os seus filhos, me ajudando e me apoiando intensamente durante esta fase.

À Graziela, por todo carinho, atenção e apoio. Fico muito feliz por tudo.

Aos funcionários e amigos da UniVap, alguns acabaram até mesmo me adotando como filho e eu a elas como mãe: Rosângela, Rúbia, Valéria e Ivone. Além de tantos outros professores aos quais tive a oportunidade de aprender muito: Leandro, Lima,

M. Tadeu, Flavio, Regiane, Wellington, Maricilia, Landulfo, entre tantos outros.

Ao Leandro, por toda sua competência e pronto socorro, e as nossas conversas sobre o mundo da informática.

Ao Dr. Miguel (UNESP), por prontamente abrir as portas de seu laboratório e de seu funcionário Walter.

Ao meu amigo Mairto Geromel, por todo o ensinamento.

Ao Dr. Mandarin-de-Lacerda e à Dra. Danielle, por abrir as portas da UERJ e me passarem os ensinamentos sobre a estereologia.

Certamente o espaço é pouco para expressar toda minha gratidão por todos, ou citar ainda mais pessoas que igualmente merecem, mas todos estão em meu coração e em minha memória.

Enfim, a todas as pessoas que me ajudaram de alguma maneira nesta etapa de minha vida, a vocês, toda a felicidade do mundo e o meu muito obrigado.

Resposta proliferativa de células-tronco submetidas à radiação laser de baixa potência

RESUMO

A ação do laser de baixa potência foi observada e descrita durante o processo de regeneração de planárias, após a amputação de sua região cefálica durante os 7 dias que se seguiram à lesão. Para isso foram utilizados espécimes de *Dugesia tigrina* medindo ± 1 cm e divididas em quatro grupos: um grupo sem lesão (GSL), o qual não sofreu amputação e não foi irradiado; um grupo controle (GC), amputado, mas não irradiado; um grupo amputado e irradiado com laser no infravermelho (GI), $\lambda=820$ nm; e outro grupo amputado e irradiado com laser no vermelho (GV), $\lambda=680$ nm. Os grupos GI e GV foram irradiados a cada 24 horas utilizando parâmetros iguais: $t = 60$ s; $A = 0,385$ cm² e $P = 35$ mW. Todos os grupos, com exceção do GSL, foram subdivididos em períodos experimentais (0, 12, 24, 48, 72, 84, 96, 108, 120, 144 e 168 horas) que correspondem aos períodos em que foram fixados em Bouin, para posteriormente serem processados histologicamente e corados com hematoxilina e eosina. Foi utilizado o método estereológico (área teste de 1485 μm^2 com 36 pontos) para a quantificação da densidade de perfis por área dos neoblastos ($Q_{A\text{neo}}$), a densidade de volume de neoblastos ($V_{V\text{neo}}$), densidade de volume de fibras musculares ($V_{V\text{musc}}$) e a densidade de volume do estroma ($V_{V\text{est}}$). Com os resultados obtidos, puderam ser notados comportamentos diferentes entre todos os grupos, sugerindo haver efeitos na proliferação e possivelmente na diferenciação, mesmo entre os grupos GI e GV, indicando haver diferentes comportamentos celulares para os diferentes comprimentos de onda utilizados neste experimento. O GC apresentou sua máxima contagem de perfis celulares nos período experimental 72 horas, o grupo GV apresentou no período 84 horas e o grupo GI no período 96 horas. O grupo GV apresentou a maior contagem de perfis celulares entre todos os grupos, enquanto GI e GC apresentaram seus maiores resultados similares, porém em períodos distintos.

Palavras Chaves: Neoblastos, planária, estereologia, células-tronco, laserterapia

Proliferative response of stem cells exposed to low power laser radiation:

ABSTRACT

The action of the low power laser was observed and described in this work for regenerating planarians submitted to cephalic amputation along the first 7 days after lesion. Those flatworms were chosen as subjects for the present work due to their regenerating capability and to their intrinsic high concentration of stem cells (neoblasts). Planarians of the specie *Dugesia tigrina* with ± 1 cm of length were divided in four groups: a group not submitted to any lesion (GSL), which was not irradiated; a control group (GC) which had the head amputated, but was also not irradiated; a group that had the head removed and the body fragment irradiated by an infrared laser diode at $\lambda=820$ nm (GI) and another group that had the head removed and the body fragment irradiated by a red laser diode at $\lambda=680$ nm. The animals of the groups GI and GV were submitted to 60 seconds irradiation sections with a 24 hours interval between sections. The employed optical power was 35 mW for both, red and infrared lasers and the beams were adjusted to illuminate an area of $0,385 \text{ cm}^2$ at the sample plane. The experimental periods, except for the group GSL, were defined at 0, 12, 24, 48, 72, 84, 96, 108, 120, 144 e 168 hour, corresponding to the moment the specimens were fixed in Bouin for histological processing under hematoxylin-eosin staining. Stereological tools were used (test area of $1485 \mu\text{m}^2$ with 36 points) for quantifying the profile density of the neoblasts $Q_{A\text{neo}}$; the volume density of neoblasts ($V_{V\text{neo}}$), the amount of muscular tissue ($V_{V\text{musc}}$) and amount of stroma ($V_{V\text{est}}$). From the obtained results, it could be observed different behaviors among the studied groups, suggesting the occurrence of some kind of effect promoted by the laser light into cell differentiation and proliferation, as well as into cell morphology. In addition, the obtained results are also different in some extent when different wavelengths were used. The group GC presented maximum count for cell profiles for the experimental period of 72 hour. For the Group GV maximum count was observed at 84 hour and for the group GI at 96 hour. The higher cell count among all groups was obtained for GV. Furthermore, it was observed that the maxima for the three study groups occurred in different experimental periods.

Key words: Neoblasts, planaria, estereology, stem cells, lasertherapy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros para irradiação das planárias.....	52
Tabela 2 – Tabela detalhando a hora da fixação após amputação de cada grupo....	53
Tabela 3 – Protocolo de fixação, desidratação, diafanização e impregnação, utilizados no experimento.....	55
Tabela 4 – Protocolo de coloração em HE utilizado no experimento.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quanto maior a complexidade de um organismo, menor sua habilidade regenerativa e maior a incidência de câncer.	19
Figura 2 – Esquema da capacidade de diferenciação em tecidos de alguns tipos de células-tronco: totipotentes, pluripotentes e unipotentes [16].	22
Figura 3 – Fotomicrografia de um neoblasto obtido por microscopia eletrônica, colorido artificialmente em azul (citoplasma) e rosa (núcleo). A área ocupada pelo núcleo é muito maior que a estreita área ocupada pelo citoplasma da célula.	26
Figura 4 – Etapas do processo de regeneração de uma planária amputada, relacionando os períodos diários pós-amputação.	27
Figura 5 – Índice mitótico (mitotic index) de planárias após a amputação na região da faringe durante sua regeneração por 7 dias. Contagem realizada em um grupo com 8mm e outro com 11mm, com análise da região do blastema e distante do blastema.	28
Figura 6 – Ilustração a respeito da proliferação (crescimento) e da absorção de tecidos (diminuição). O crescimento ocorre por alimentação farta e a diminuição por escassez alimentar.	30
Figura 7 – Esquema mostrando as fases da intérfase, que precede a mitose. G1 (Gap 1); S (Síntese); G2 (Gap 2); M (mitose) [45].	32
Figura 8 – Elementos básicos de um aparelho para a formação da radiação laser. Meio amplificador que fica dentro da cavidade óptica, fonte de energia para excitação do meio ativo e cavidade óptica com espelhos.	34
Figura 9 – Características únicas da radiação laser. Coerência, colimação e monocromaticidade.	35
Figura 10 – Exemplo de uma luz comum onde não se observa coerência, monocromaticidade e nem colimação.	35
Figura 11 – Comportamento da luz em tecidos biológicos, separados apenas para fins didáticos: reflexão, absorção, espalhamento e transmissão.	37
Figura 12 – Parâmetros importantes para o manuseio do laser, onde f = frequência da onda $1/s$ (Hz); r = raio do círculo formado pelo feixe incidente; $p = 3,1415$; F = altura; V = velocidade.	38
Figura 13 – Eventos celulares produzidos após irradiação com laser emitindo radiação na região do vermelho e infravermelho próximo, com comprimentos de onda entre 600 – 1064 nm do espectro eletromagnético.	40
Figura 14 – Esquema da ação fotobiológica do laser na promoção da saúde.	42
Figura 15 – Esquema exemplificando a contagem de perfis por área. As linhas pontilhadas são previamente estabelecidas como proibidas, deste modo as bolas	

vermelhas não entram na contagem por tocarem a linha pontilhada, as bolas azuis não entram na contagem por estarem fora do sistema-teste e, portanto apenas as bolas amarelas são consideradas.	44
Figura 16 – Nesta figura esquemática temos representado a contagem de pontos através do sistema de 36 pontos-teste. Observe que são computados todos os pontos que tocam a estrutura (círculo amarelo), mesmo as estruturas que são tocadas por mais de um ponto.	45
Figura 17 – Sistema de 36 pontos eqüidistantes acoplados ao sistema de área-teste composta por duas linhas proibidas (pontilhadas).	45
Figura 18 – Planária da espécie <i>Dugesia tigrina</i> com características peculiares desta espécie, tal como cor marrom tigrada e aurículas.	47
Figura 19 – Vista superior da bandeja branca de plástico onde eram realizadas as procuras e coletas das planárias presentes nas folhas e raízes dos aguapés. Note a cor escura da água e os aguapés com suas raízes.	48
Figura 20 – Arranjo para triagem e amputação dos espécimes: Lupa estereoscópica com magnificação de 30x acoplada a um monitor onde foi possível observar detalhes dos espécimes durante sua manipulação. Nesta imagem também são observados uma fonte de alimentação e o aparato utilizado para o resfriamento das planárias durante sua amputação.	48
Figura 21 – Esquema da montagem do sistema de suporte mecânico para irradiação com laser no experimento.	49
Figura 22 – Representação esquemática de uma planária. A linha pontilhada indica o local da incisão feita durante a amputação da região cefálica do espécime.	50
Figura 23 – Moldes plásticos utilizados no acondicionamento dos espécimes durante fase experimental, cada espécime ficou isolado em um cubo.	51
Figura 24 – Ilustração mostrando como foram feitas as dobraduras nos papéis com as planárias para sua inserção dentro das cápsulas histológicas.	54
Figura 25 – Microscópio e computador utilizados para análise das lâminas histológicas.	57
Figura 26 – Fotomicrografia de um corte histológico do corte sagital de uma planária <i>Dugesia tigrina</i> . Note que a região cefálica é mais espessa que a região caudal. A área em verde mostra a ligação entre a faringe e o corpo da planária (HE 50x).	57
Figura 27 – Fotomicrografia com os sistemas teste utilizado para a quantificação da densidade de volume (VV) e da densidade de perfis por área (QA).	58
Figura 28 – Fotomicrografias representativas do grupo GSL mostrando o aspecto e distribuição normal dos neoblastos e tecidos adjacentes em dois cortes diferentes (H.E. 100x).	60
Figura 29 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	

0 h (H.E. 100x).	61
Figura 30 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
0 h (H.E. 100x).	61
Figura 31– Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
0 h (H.E. 100x).	61
Figura 32 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
12 h (H.E. 100x).	62
Figura 33 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
12 h (H.E. 100x).	62
Figura 34 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
12 h (H.E. 100x).	62
Figura 35 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
24 h (H.E. 100x).	63
Figura 36 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
24 h (H.E. 100x).	63
Figura 37 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
24 h (H.E. 100x).	63
Figura 38 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
48 h (H.E. 100x).	64
Figura 39 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
48 h (H.E. 100x).	64
Figura 40 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
48 h (H.E. 100x).	64
Figura 41 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
72 h (H.E. 100x).	65
Figura 42 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
72 h (H.E. 100x).	65
Figura 43 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
72 h (H.E. 100x).	65
Figura 44 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
84 h (H.E. 100x).	66
Figura 45 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
84 h (H.E. 100x).	66
Figura 46 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
84 h (H.E. 100x).	66
Figura 47 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
96 h (H.E. 100x).	67
Figura 48 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	

96 h (H.E. 100x).....	67
Figura 49 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
96 h (H.E. 100x).....	67
Figura 50– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
108h (H.E. 100x).....	68
Figura 51 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
108 h (H.E. 100x).....	68
Figura 52 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
108 h (H.E. 100x).....	68
Figura 53– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
120 h (H.E. 100x).....	69
Figura 54 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
120 h (H.E. 100x).....	69
Figura 55 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
120 h (H.E. 100x).....	69
Figura 56– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
144 h (H.E. 100x).....	70
Figura 57 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
144 h (H.E. 100x).....	70
Figura 58 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
144 h (H.E. 100x).....	70
Figura 59– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental	
168 h (H.E. 100x).....	71
Figura 60 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental	
168 h (H.E. 100x).....	71
Figura 61 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental	
168 h (H.E. 100x).....	71
Figura 62 – Densidade de perfis por área dos neoblastos (QAneo). A linha pontilhada equivale ao GSL, que é apresentado apenas no período experimental 0 h. As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.	72
Figura 63 – Densidade volumétrica dos neoblastos (VVneo). O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.	73
Figura 64 – Relação entre VVneo/QAneo entre os grupos GC, GSL, GV e GI.	74
Figura 65 – Densidade volumétrica de fibras musculares. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em	

alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.	75
Figura 66 – Densidade volumétrica do estroma entre todos os grupos. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.	76
Figura 67 – Imagem por fluorescência do sistema digestório de uma planária. Ramos principais dos intestinos: (1) anterior, (2 e 3) posteriores.	99
Figura 68 – Ilustração mostrando a distribuição e composição do sistema digestório de uma planária.	99
Figura 69 – Ilustração mostrando os ramos do sistema nervoso de uma planária.	101
Figura 70 – Ilustração mostrando os comportamentos apresentados por planárias com abstinência de cocaína.	101
Figura 71 – Ilustração mostrando o sistema reprodutor de uma planária.	102
Figura 72 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	105
Figura 73 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	106
Figura 74 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	106
Figura 75 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	107
Figura 76 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	108
Figura 77 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	108
Figura 78 – Gráfico do grupo da densidade volumétrica da musculatura do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	109
Figura 79 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica da musculatura do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.	110

Figura 80 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica da musculatura do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.....	110
Figura 81 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.....	111
Figura 82 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.....	112
Figura 83 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μm : micrometro
 A_T : área do sistema-teste
ATP: Adenosina tri-fosfato
 c : velocidade da luz no vácuo
 Ca^{2+} : íon de cálcio
DNA: ácido desoxirribonucleico
 G_1 : período de intervalo 1 do ciclo celular
 G_2 : período de intervalo 2 do ciclo celular
GC: Grupo controle
GI: Grupo infravermelho
GSL: Grupo sem lesão
GV: Grupo vermelho
HE: hematoxilina e eosina
Hz: hertz
LBP: laser de baixa potência
LED: light emitting diode - diodo emissor de luz
mW: miliwatt
NADH: dinucleótido de nicotinamida-adenina
nm: nanometros
 Q_A : densidade de perfis por área
 $Q_{A\text{neo}}$: densidade de perfis de neoblastos por área
 r : raio
RLP: rhodopsin-like protein
RNA: ácido ribonucleico
 S : período de síntese do ciclo celular
 V_V : densidade volumétrica
 $V_{V\text{est}}$: densidade volumétrica de estroma
 $V_{V\text{mus}}$: densidade volumétrica de tecido muscular
 $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$: relação entre a densidade volumétrica de neoblastos sobre a densidade de perfis de neoblastos por área
 $V_{V\text{neo}}$: densidade volumétrica de neoblastos
 W/m^2 : Watt por metro quadrado
 x : vezes, relacionado à magnificação de um objeto
 λ : comprimento de onda
Sperfis: somatório de perfis celulares no contados no sistema-teste
 SP_P : somatório do número de pontos que tocam as estruturas
 SP_T : somatório do número de pontos totais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	Planárias	24
2.1.1	Regeneração	25
2.2	Ciclo Celular.....	31
2.3	Laser.....	32
2.3.1	Fundamentos físicos	33
2.3.2	Características básicas da construção de um laser	33
2.3.3	Características da radiação laser.....	34
2.3.4	Propriedades fotobiológicas do laser de baixa potência	37
2.4	Estereologia	43
2.4.1	Densidade de perfis por área (Q_A).....	44
2.4.2	Densidade volumétrica (V_V).....	44
3	OBJETIVOS.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Coleta dos espécimes.....	47
4.2	Lasers utilizados	49
4.3	O experimento	50
4.4	Histologia	54
4.5	Quantificação do estroma, fibras musculares e neoblastos.....	56
4.5.1	Análise por estereologia	58
5	5 RESULTADOS	60
5.1	Quantificação dos neoblastos	72
5.2	Quantificação das fibras musculares	74
5.3	Quantificação do estroma	75
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO.....	90
	APÊNDICE A: Anatomia das planárias	99
	Sistema digestório	99
	Sistema nervoso.....	100
	Sistema reprodutor.....	102
	APÊNDICE B: Interpretação dos gráficos estatísticos	104
	APÊNDICE C: Gráficos estatísticos referentes à quantificação dos neoblastos.....	105
	APÊNDICE D: Gráficos estatísticos referentes à quantificação do tecido muscular	109
	APÊNDICE E: Gráficos estatísticos referentes à quantificação do estroma.....	111

1 INTRODUÇÃO

Duas das mais importantes propriedades dos seres vivos são suas capacidades de reparação e de regeneração. Essas propriedades garantem sobrevivência às espécies quando qualquer uma delas é acometida por um ferimento, doença, dano ou até mesmo perante a amputação de um membro ou órgão. Tais propriedades podem devolver a função perdida ou comprometida por estas lesões, além de impedir o contato direto do organismo com o meio externo, dificultando assim a ação de microorganismos patogênicos.

A regeneração, de modo geral, é preferível à reparação, pois na regeneração a parte lesada é recuperada e substituída por um tecido especializado, igual ao que foi perdido. Quanto mais complexo é o organismo, menor sua capacidade regenerativa, já que este processo de cura mais primitivo é mais observado em animais inferiores, tal como salamandras e planárias [1]. Outra observação sobre a regeneração e a complexidade de cada organismo é que quanto maior sua capacidade regenerativa, menor sua propensão de gerar tumores (Figura 1) [2].

Na reparação, ocorre um preenchimento do sítio acometido com um tipo de tecido diferente daquele perdido, fazendo assim com que o órgão diminua suas características e versatilidade [1]. Outra diferença entre tais propriedades é que o reparo tecidual só tem início após ocorrer um processo inflamatório no tecido lesado, ou seja, primeiramente ocorre uma fase inflamatória que desencadeia uma cascata de reações bioquímicas que precedem outras duas fases do processo de reparo tecidual: fase proliferativa e a fase de remodelamento dos tecidos envolvidos na reparação. Já na regeneração, a fase inflamatória não é necessária para que a regeneração tecidual se inicie. As reações que ocorrem na fase inflamatória causam efeitos característicos que podem ser observados macroscopicamente, conhecidos como sinais cardinais clínicos da inflamação (tumor, calor, rubor, dor e perda da função) [3, 4].

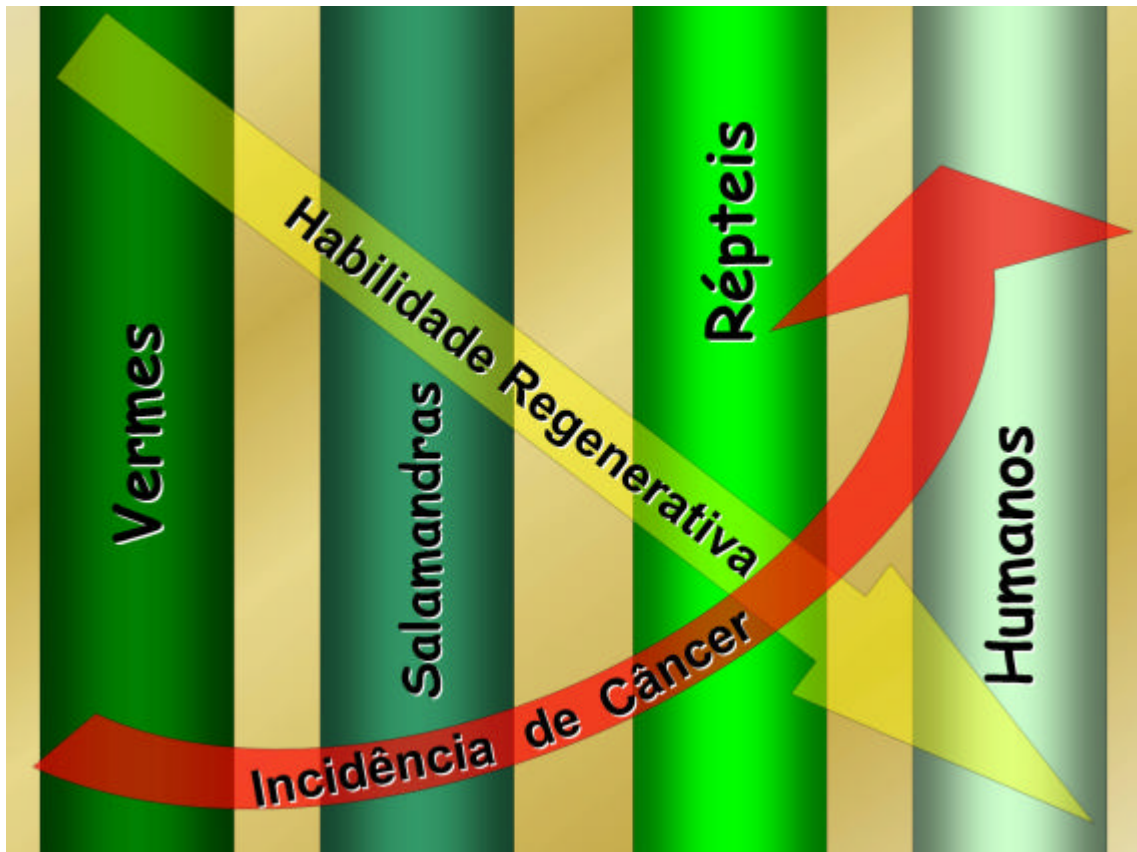


Figura 1 – Quanto maior a complexidade de um organismo, menor sua habilidade regenerativa e maior a incidência de câncer.

Fonte: Adaptada da obra de Becker e Selden [2].

A renovação dos tecidos tem início a partir do momento em que os órgãos são formados e perdem efetividade conforme envelhecem [5]. Essa renovação é considerada um tipo de regeneração, já que as células mortas do tecido são substituídas por outras de mesma especialidade, tal como ocorre em intestinos, pele e fígado. Nos intestinos, a renovação ocorre devido ao desgaste ocorrido pela passagem de alimentos; na pele, devido ao atrito e descamação que ocorre pelas agressões do tempo e pelo contato físico; e no fígado, ocorre pela degradação de várias toxinas.

A regeneração acaba se tornando um dos mais fascinantes fenômenos que ocorre na vida. Infelizmente a capacidade regenerativa dos humanos e dos mamíferos em geral, é bem reduzida, principalmente se tratarmos da regeneração de um órgão muito complexo ou de grande extensão. Diferentemente, organismos menos complexos, tal como a salamandra e a planária, possuem extraordinária capacidade regenerativa [2].

Nos humanos, o fígado é o único órgão que tem uma grande capacidade de

regeneração [6]. A primeira vez que foi citada sua capacidade regenerativa foi em um antigo mito grego, o de Prometeu. Neste mito, um gigante Titan, Prometeu, rouba o fogo do Olimpo e o dá aos homens. Como Zeus, o deus dos deuses e dos homens, guardava o fogo apenas para o Olimpo, impôs um castigo a Prometeu e lhe deu a imortalidade para que o castigo durasse eternamente. No castigo, ordenou que Prometeu fosse acorrentado ao Monte Cáucaso e que seu fígado fosse dolorosamente devorado por um abutre. Ao final do dia após o abutre ir embora, enquanto Prometeu agonizava, seu fígado se regenerava e no dia seguinte o abutre voltava para se alimentar do fígado do gigante Titan. Essa mesma história se perpetuou até sua libertação por Hércules [7, 8].

Em humanos o fígado possui a capacidade de se regenerar muito rapidamente. Se um doador receber metade de um fígado sadio, por volta de 30 dias a massa e funções desse fígado voltam ao normal [7]. Entretanto, a regeneração hepática é um termo erroneamente usado, pois o fígado não volta ao seu aspecto normal, já que os lobos do fígado não voltam a aparecer no caso de extração [7]. Isto ocorre devido à resposta hiperplásica (divisão das próprias células) das células hepáticas maduras, ou seja, não há a necessidade da ação de células-tronco.

Apenas o fígado tem essa capacidade, os outros órgãos e tecidos têm apenas uma pequena capacidade regenerativa e, dependendo da extensão da lesão, a maior parte da sua recuperação se dá por reparo, que implica em restauração por tecido cicatricial, freqüentemente tecido fibroso.

O processo de cura por regeneração em órgãos e organismos vivos é um tema bastante atual em pesquisa científica. O interesse é ainda maior para todas aquelas pessoas podem ser reabilitadas por esta técnica.

Pensando em todos os benefícios provindos de uma terapêutica para fins regenerativos, pesquisadores buscam a solução estudando células que tem a capacidade de se diferenciar para a formação de células de outros tecidos, células estas conhecidas como células-tronco. Células-tronco são células indiferenciadas que possuem o potencial de se tornar qualquer tipo de célula especializada de um organismo. Na verdade existem diferentes tipos de células-tronco, que são classificadas conforme a sua capacidade de diferenciação em células de diferentes tecidos.

As células-tronco são classificadas de acordo com sua potencialidade de desenvolvimento (Figura 2) [9, 10, 11]. Abaixo são exemplificados os tipos de

células-tronco existentes:

- Totipotentes: tem a capacidade de diferenciação em qualquer célula de qualquer tecido do organismo, ou seja, tanto em células embrionárias como extra-embriônicas;
- Pluripotentes: tem a capacidade de diferenciação em células do embrião, mas não da placenta e seus anexos;
- Multipotentes: tem a capacidade de formar apenas um grupo do sistema, como por exemplo, o sistema nervoso;
- Oligopotentes: tem a capacidade de diferenciação em tecidos mais específicos de um sistema;
- Unipotentes: só possuem a capacidade de se diferenciar em apenas um tipo de tecido.

Com o potencial de diferenciação em células especializadas que as células-tronco possuem, seria teoricamente possível gerar órgãos e membros a partir de células-tronco obtidas da própria pessoa, melhorando a qualidade de terapias regenerativas e até mesmo anulando o risco de rejeição à transplantes [11].

Em 1997, cientistas deram um salto evolutivo em pesquisas com células-tronco, divulgando a primeira clonagem de um mamífero a partir de uma célula somática diferenciada, a ovelha Dolly. O feito foi amplamente comentado pela mídia, dando início a discussões religiosas, políticas, econômicas, éticas e legais, a respeito de células-tronco.

Esta clonagem foi realizada utilizando o núcleo de uma célula somática adulta transferida para um óvulo enucleado. Este tipo de experimento ainda é muito difícil de ser obtido, por exemplo, no estudo que gerou Dolly, foram necessárias 277 células, e na clonagem de um gato em 2002, o Copycat, sendo necessários 188 óvulos, gerando várias anormalidades e apenas um animal vivo [12].

As inúmeras tentativas frustradas ressaltam a grande dificuldade na manipulação deste tipo de material, e ajuda a confundir sobre os conceitos de células-tronco e seus benefícios, trazendo discussões éticas sobre o assunto.

O Congresso Brasileiro aprovou em 2005 a Lei de Biossegurança, autorizando a pesquisa com embriões inviáveis ou congelados a mais de três anos, com o consentimento dos genitores (artigo 5º da Lei 11.105/05). Devido a uma ação expedida, a lei foi considerada inconstitucional e seu efeito legal foi anulado. Foi

marcada uma votação em plenário, em março de 2008, para a sustentação ou não sobre a inconstitucionalidade da lei. O caso foi defendido pelo procurador-geral da República, Antonio Fernando Souza [13], e rebatida pela Pró-Reitora de Pesquisa e Coordenadora do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, Mayana Zatz [12, 14]. Finalmente após prorrogações, no dia 29 de maio deste ano (2008), as pesquisas com células-tronco embrionárias foram liberadas sem ressalvas à lei [15].

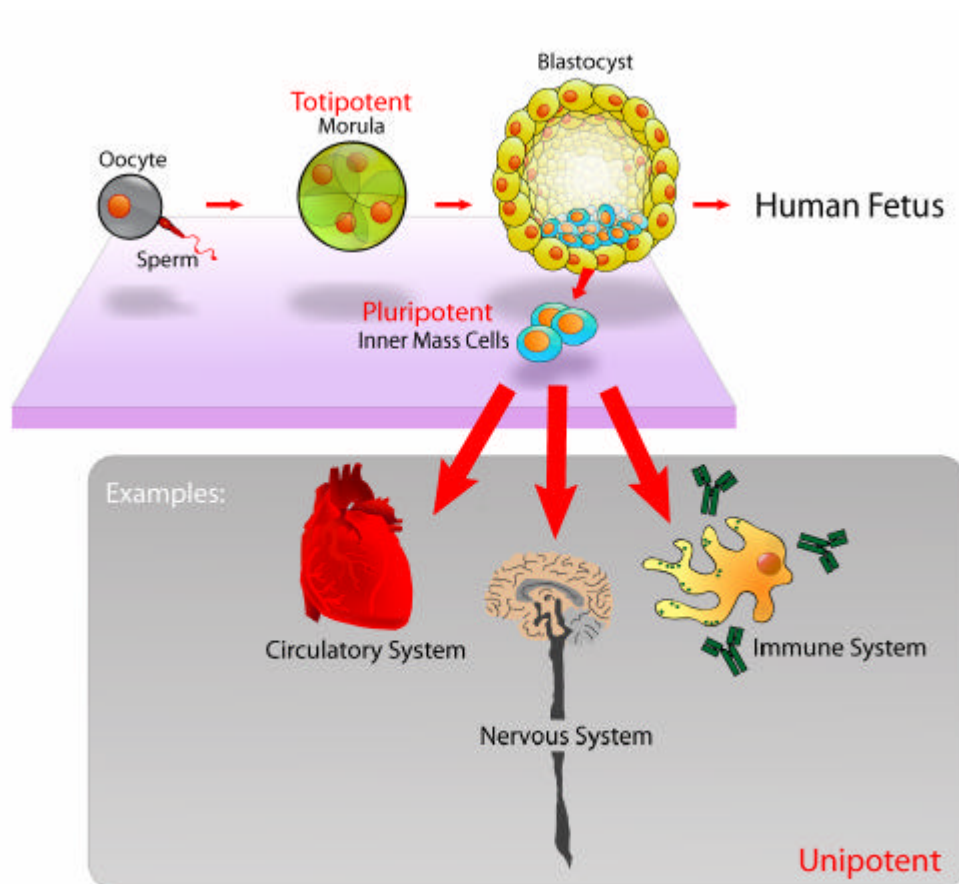


Figura 2 – Esquema da capacidade de diferenciação em tecidos de alguns tipos de células-tronco: totipotentes, pluripotentes e unipotentes [16].

Devido a estes fatos, aliados ao alto custo e tecnologias envolvidas, outros meios para o estudo com células-tronco devem ser implantados.

Alguns organismos possuem grande capacidade regenerativa e são utilizados para pesquisas em regeneração. Tais estudos servem de base para futuras pesquisas com humanos. Os mais utilizados são ratos e coelhos, por possuírem certa similaridade com os humanos.

Como as pesquisas, principalmente com mamíferos, sempre envolvem muita

discussão entre entidades tais como as Sociedades Protetoras dos Animais e Comitês de Ética em Pesquisa, além de possuírem capacidade regenerativa reduzida comparada a animais como planárias e salamandras, elegemos a planária para nossa pesquisa.

A planária é um espécime primitivo e possui sistema digestório, sistema nervoso com órgãos sensoriais, sistema reprodutor masculino e feminino na mesma planária (hermafroditismo) e sistema muscular [17, 18]. Este espécime pode ser encontrado nas margens dos rios de nossa região (Vale do Paraíba), sendo mais fácil obter o número de organismos necessário para a pesquisa.

Em nosso Laboratório de Biofotônica, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap), são realizadas pesquisas que mostram a eficácia da fototerapia com lasers, tanto em baixa, média e alta potência. Habitualmente, apenas o laser de baixa potência (LBP) é utilizado em pesquisas que envolvem reparação e regeneração, pois apresentam os melhores resultados e os lasers de média e alta potência são utilizados para outra finalidade, tal como ablação de tecidos, terapia fotodinâmica e cirurgias. Os lasers mais utilizados e comercializados são os lasers que emitem radiação vermelha e infravermelha, e também são os lasers que apresentam resultados positivos no estímulo de tecidos.

Com base nestes conhecimentos a respeito de planárias e laser, Souza e colaboradores [19] apresentaram resultados sobre a proliferação de células-tronco de planárias (*Dugesia tigrina*), com amputação cefálica, submetidas à radiação laser (685 nm). Foram realizadas observações ao 4^o, 7^o e 15^o dias após a amputação, sendo que apenas na contagem do 4^o dia foi observada diferença significativa. Este trabalho serviu como incentivo na pesquisa com LBP em planárias, onde a metodologia e resultados serão apresentados no presente trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Planárias

Planárias são animais invertebrados, com simetria bilateral, acelomados, derivados dos três folhetos embrionários, ectoderme, mesoderme e endoderme (triploblásticos). Pertencem ao reino *Animalia*, filo *Platyhelminthes* (do grego platy, 'chato', e helmins, 'verme') da classe *Turbellaria* (que significa redemoinho, devido ao batimento ciliar em sua superfície), subclasse *Archoohora* da ordem *Tricladida* (devido aos três ramos principais que compõem seu sistema digestório) e da família *Planariidae*, sendo também conhecidas como vermes chatos, devido a sua fina espessura [17, 18, 20, 21, 22]. Em sua maioria, são animais de vida aquática (água doce e salgada), sendo que as espécies de vida terrestre vivem em ambientes úmidos, tais como poças d'água e sob rochas, pedras e folhas. A literatura cita que as planárias de água doce vivem em lagos e lagoas, ou seja, em locais de águas mais calmas [17, 21, 22].

O corpo da planária é recoberto por uma epiderme com cílios (apenas ventralmente) e microvilos, que ficam sobre uma lâmina basal, a qual é utilizada como parede celular, e mais profundamente existe uma lâmina reticular, a qual envolve todo seu parênquima e estroma. Em sua epiderme existem células glandulares que são responsáveis pela liberação de rabditos. O rabdito é uma secreção em forma de bastão lamelar que após ser secretado, incha e se dissolve, formando o muco [17, 22, 23].

Abaixo de sua epiderme estão presentes quatro camadas de fibras musculares densamente sobrepostas, que somadas possuem uma espessura variável entre 7 e 12 μm : uma circular mais externa, uma de fibras longitudinais, uma com fibras obliquas e uma mais interna com fibras longitudinais. Todas as fibras estão presentes tanto ventralmente como dorsalmente, [20] auxiliando sua locomoção, que ocorre por ondulações de sua musculatura ventral, auxiliada por movimentos ciliares. Estas ondulações de sua musculatura atuam também na distribuição da alimentação por seu corpo [17]. Mais detalhes a respeito da anatomia e fisiologia das planárias podem ser encontrados no apêndice A.

2.1.1 Regeneração

Por todo seu corpo, espalhados por seu estroma, existem muitas células totipotentes com pequeno diâmetro (5 - 10 μm) de forma ovalada, com uma relação núcleo/citoplasma bem alta, ou seja, apresentam núcleo bem extenso e um estreito citoplasma, conhecidas como neoblastos (Figura 3). [22, 24, 25, 26, 27] O citoplasma destas células basofílicas é rico em ribossomos e também contam com a presença de mitocôndrias. Em seu núcleo são encontrados DNA e RNA [25].

Mesmo os neoblastos possuindo a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula e conseqüentemente, qualquer tipo de tecido, agindo na renovação e regeneração celular, na formação de gametas e também na reprodução assexuada [25], alguns autores [28, 29,] os consideram como células-tronco pluripotentes. Os neoblastos são as únicas células das planárias que podem sofrer mitose, se diferenciando em células especializadas de seu corpo [29, 30, 31, 32, 33].

Caso a planária sofra dilaceração ou amputação, na extremidade lesada que permanece voltada para o meio externo, há a formação do blastema (Figura 4). Nele ocorre uma série de eventos até a regeneração total da parte amputada. As várias etapas relacionadas à regeneração de planárias e descritas por vários autores podem ser resumidas a seguir:

- Redução da extensão da lesão pela contração da parede muscular logo após a lesão [20] associada à migração de células epiteliais sobre a lesão, mas sem proliferação (1h) [22, 34];
- Fagocitose e absorção das células mortas e fragmentadas e da superfície da lesão (0 – 12h) [17];
- Selamento do contato entre o corpo e o meio externo pela expansão e crescimento da epiderme marginal sobre a lesão. A epiderme que aparece é translúcida e mais fina (24h) [17];
- Aumento da atividade celular local [17];
- Aparecimento de neoblastos e diferenciação de células especializadas [17];
- Surgimento e crescimento do blastema, que é uma massa composta por várias células indiferenciadas (neoblastos e células

desdiferenciadas*), que é coberto pela epiderme translúcida e sem pigmentação (24 – 48h) [30, 33];

- Diferenciação dos neoblastos em células especializadas de tecidos durante a regeneração [17];

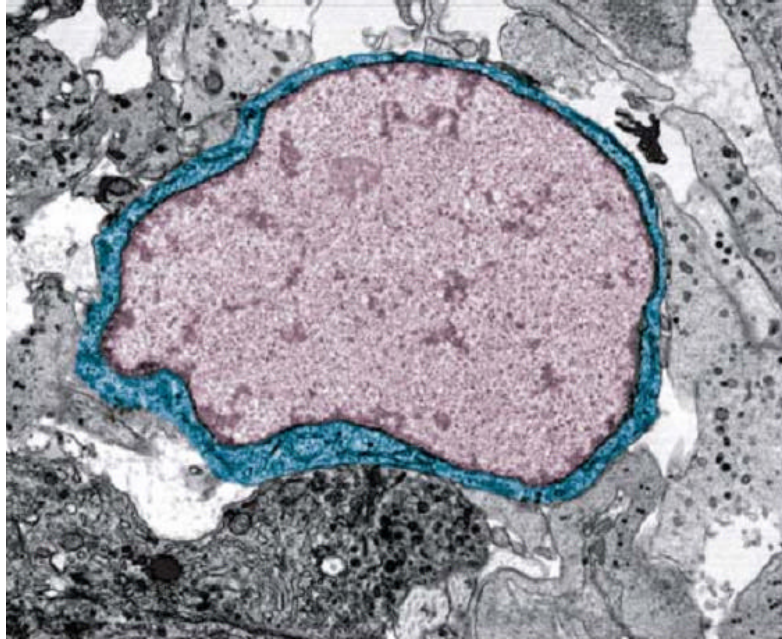


Figura 3 – Fotomicrografia de um neoblasto obtido por microscopia eletrônica, colorido artificialmente em azul (citoplasma) e rosa (núcleo). A área ocupada pelo núcleo é muito maior que a estreita área ocupada pelo citoplasma da célula.

Fonte: Adaptada da obra de Reddien e Alvarado [35].

Com 48 horas já se observa o início da formação dos ocelos, mas apenas no depois de transcorridas 96 horas, sua formação se completa. Neste período pode ser observado comportamento fotonegativo [36]. Em sete dias já é evidente o aparecimento de todos os componentes nervosos (gânglio cefálico e ocelos) [37];

- Fim da regeneração, desaparecimento do blastema [2, 37, 38];
- Pigmentação natural da epiderme em duas ou três semanas [17].

Dentro do blastema não há divisão celular, portanto, os neoblastos que o compõe são provindos do corpo remanescente pós-lesão. As células indiferenciadas que formam o blastema são formadas por dois tipos de células: os neoblastos, já presentes em seu parênquima, e células desdiferenciadas (são células especializadas que se transformam em células indiferenciadas para depois se

* O processo de desdiferenciação celular em planárias não é consensual na literatura.

diferenciarem em outro tipo celular) [2, 22]. Os neoblastos presentes no blastema se diferenciam em células especializadas para recompor os tecidos necessários para a regeneração [2, 29, 32], entretanto as células que formam o blastema é ainda polêmico [29].



Figura 4 – Etapas do processo de regeneração de uma planária amputada, relacionando os períodos diários pós-amputação.

Fonte: Adaptado de Newmark e Alvarado [22].

A não participação de células desdiferenciadas na formação do blastema foi comprovada por Baguñà, Saló e Auladell [31] em pesquisa realizada em planárias irradiadas com raios-X com dose suficiente para esterilizar neoblastos, ou seja, impedir a divisão de neoblastos. As planárias foram decapitadas e cada grupo foi enxertado com células mistas (células diferenciadas + neoblastos), células diferenciadas ou neoblastos, de outros espécimes que não sofreram radiação por raios-X. Seus resultados apontaram que os grupos que foram enxertados com neoblastos obtiveram uma maior taxa de sobrevivência, sugerindo que a sobrevivência destes animais depende apenas da quantidade de neoblastos presente.

Os neoblastos possuem certa mobilidade e quanto mais próximo à lesão, maior sua capacidade de se movimentar. Eles têm a velocidade de 90 - 140 $\mu\text{m}/\text{dia}$ quando estão próximos (da margem da lesão até 400 μm) e a 40 - 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$ quando estão afastados da lesão (600 μm em diante), ou seja, quanto mais próximos da margem da lesão, maior é sua velocidade [30, 33]. Esta mobilidade dos neoblastos presentes próximos à borda da lesão juntamente aos que se dividem, são suficientes para colaborar para o aumento do volume e do número de neoblastos presentes no blastema. Por volta do sétimo dia de regeneração o blastema começa a desaparecer, sugerindo que os neoblastos mais afastados do blastema, não participam de sua formação e que apenas os neoblastos próximos à margem da lesão são suficientes para a formação do blastema, não sendo necessário nem ao menos a participação de células desdiferenciadas para a

formação do blastema [30, 33].

O ápice mitótico após a amputação da planária *Dugesia tigrina* ocorre em 2 períodos distintos: entre 4 e 12 horas e 2 a 3 dias pós lesão, e o índice mitótico apresentado dentro do blastema é similar ao apresentado em regiões distantes da lesão (Figura 5). Nos períodos entre os picos mitóticos apresentados, ocorrem atividades mitóticas reduzidas [30]. Foi observado que a atividade mitótica ocorre sistematicamente, devido a uma provável comunicação intracelular disparada pela lesão e o índice mitótico dos neoblastos não apresenta grande variação entre animais de tamanhos diferentes, tal como observado na Figura 5. Entretanto Saló e Baguñà e Auladell [30, 33] não encontraram nenhuma atividade mitótica dentro do blastema, confirmando a ausência de atividade mitótica dentro do blastema. A região onde foram encontrados mais neoblastos em mitose, foi na margem da lesão e quanto maior o distanciamento da margem, menor era o sinal mitótico, mesmo não havendo diferença significativa entre as regiões [33].

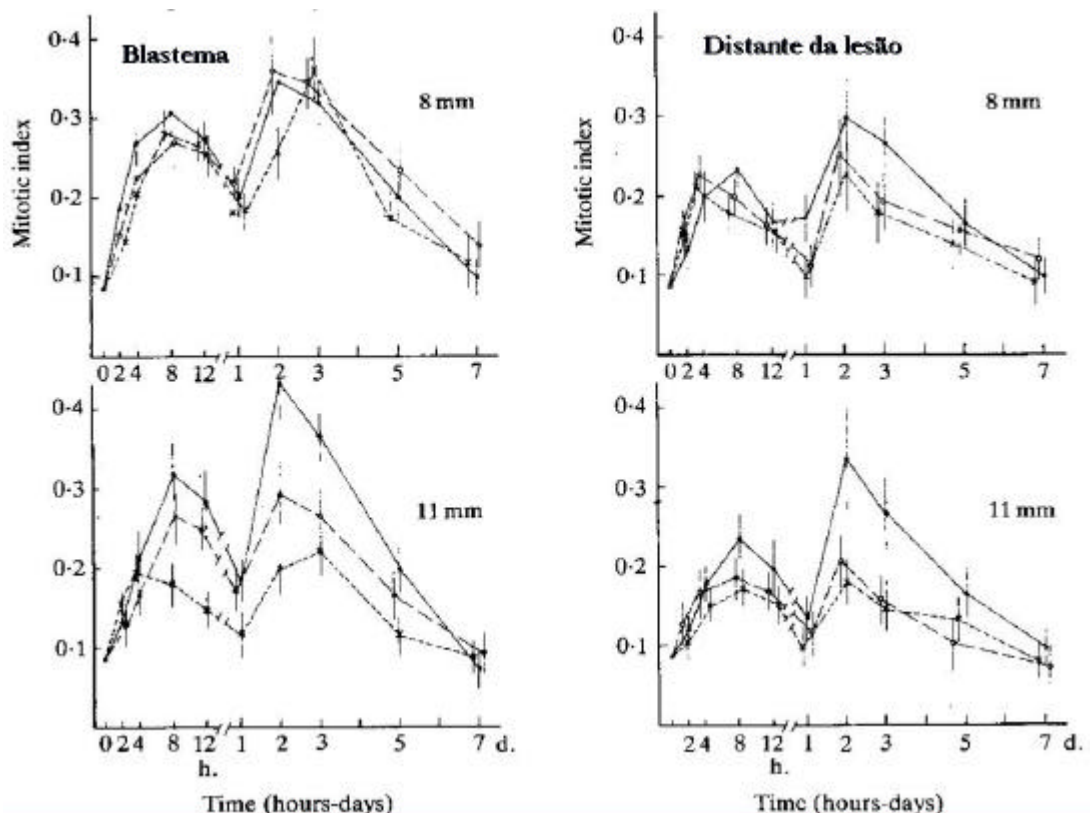


Figura 5 – Índice mitótico (mitotic index) de planárias após a amputação na região da faringe durante sua regeneração por 7 dias. Contagem realizada em um grupo com 8mm e outro com 11mm, com análise da região do blastema e distante do blastema.

Fonte: Adaptada de Saló e Baguñà [30].

O blastema sempre mantém sua polaridade dorso-ventral, próximo-distal e

céfalo-caudal, fazendo com que, por exemplo, blastemas posteriores dêem origem à parte caudal e blastemas anteriores dêem origem à parte cefálica [34, 24]. Caso o fragmento da planária se torne significativamente pequeno, a ponto deste fragmento perder sua polaridade, ocorre um caso raro chamado de cabeça de *janus*, onde o fragmento dá origem a duas cabeças [2, 22]. Nos blastemas existem genes específicos que são necessários à regeneração, que se expressam temporalmente diferente no blastema cefálico e no blastema caudal [34]. Existem dois tipos de regeneração conhecidos no mundo animal, a regeneração epimorfótica (*epimorphosis* vem do grego, *epi* = sobre, após; e da palavra *morphosis* = processo de formação) e a morfolaxia (*morphallaxis/morphallactic* vem do grego *morphosis*; e *allaxis* = troca). Na epimorfia, ocorre a multiplicação e diferenciação celular para a regeneração da área amputada. Já na regeneração morfilática, ocorre regeneração da área amputada por uma reorganização celular do tecido existente, não havendo proliferação celular, apenas desdiferenciação das células existentes para posterior diferenciação [39]. A utilização desses termos geram tanta confusão que eles foram assunto de uma *correspondence* publicada no periódico *BioEssays*, por Newmark e Alvarado [39], onde os autores argumentaram sucintamente sobre os conceitos de epimorfia e de morfolaxia, mostrando o correto emprego de tais termos.

Embora ainda exista certa confusão sobre o tipo de regeneração observado nas planárias, Saló [18] sugere haver um modelo de regeneração misto nestes animais, ou seja, uma regeneração morfilática-epimórfica, pois no fechamento da lesão e na fina camada que se estabelece no blastema, onde é criado um padrão regenerativo ântero-posterior, ocorre de maneira morfilática, enquanto o restante da regeneração de maneira epimórfica. Mas em um artigo mais recente Agata, Saito e Nakajima [40] afirmaram que o mais aconselhável seria a utilização de dois outros termos ao invés dos já conhecidos, que seria distalização (*distalization*) e intercalação (*intercalation*), pois esses dois termos dizem respeito ao tipo de sinalização molecular que ocorre durante a regeneração. Fato também observado por Romero e Bueno [41] anteriormente.

Desde que bem alimentadas, as planárias apresentam aumento do seu tamanho, aumento este caracterizado por divisões celulares e diferenciação tecidual. A partir do momento em que a planária permanece por um período muito longo sem se alimentar inicia-se um processo de absorção de todos os seus tecidos, diminuindo seu número de células (Figura 6). Seu volume corporal pode chegar a

reduzir a até 1/300 de seu tamanho original e retardando o processo de regeneração. É importante observar que a absorção de seus tecidos ocorre de forma homogênea, já que não é observada nenhuma deformação durante este período, onde poderia indicar certa preferência de absorção por determinado tecido [17, 29, 42, 43]. Da mesma maneira é observada a manutenção da proporção corporal em planárias com partes de seu corpo amputadas, onde após a regeneração, sua proporção corporal volta ao normal [43].

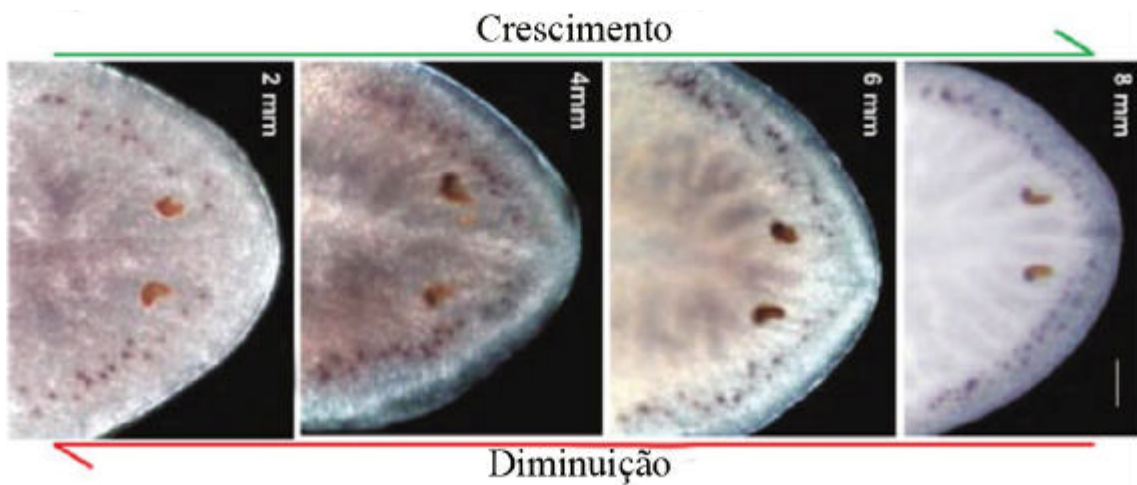


Figura 6 – Ilustração a respeito da proliferação (crescimento) e da absorção de tecidos (diminuição). O crescimento ocorre por alimentação farta e a diminuição por escassez alimentar.
Fonte: Adaptada de Oviedo, Newmark e Alvarado [43].

Saló e Baguña [30] após colocarem planárias em solução de Hydroxyurea, responsável por provocar a morte celular na fase S da divisão celular, observaram que, após amputadas, apenas o primeiro pico mitótico é evidenciado, diminuindo o número de neoblastos após este, ou seja, apenas as células que estavam em G_2 ou em mitose prosseguiram com seu ciclo, a restante fica retido na fase S. No mesmo trabalho, os autores demonstraram que do total de neoblastos de uma planária, de 12 a 20 % dos estão em G_2 e que ~80 % estão em G_1 ou S.

Em outro trabalho Baguña, Saló e Auladell [31] irradiaram planárias com 8000 rad de raios-X, dose letal para neoblastos, e mostraram que em planárias intactas, houve grande diminuição da quantidade de neoblastos presentes do momento inicial até o 14º dia. Em planárias amputadas e irradiadas com raios-X, apresentaram um pequeno aumento do número de neoblastos 24 horas após a irradiação, mas nos dias seguintes ocorreu uma grande queda da porcentagem de neoblastos contabilizados, ficando próximo à porcentagem apresentada pelo grupo

que apenas sofreu irradiação por raios-X, apresentando por volta de 1 % de neoblastos do total de células ao 14^o dia, enquanto que uma planária intacta e sem sofrer irradiação conta com 24 % de neoblastos do total de células.

Com a devida compreensão de eventos moleculares em células de animais mais simples, a regeneração em organismos mais complexos poderá ser mais bem detalhada e compreendida [24].

2.2 Ciclo Celular

A célula possui a capacidade de se contrair e se expandir, conforme a sua necessidade e função. A alteração da morfologia celular tem várias funções, e em geral são reversíveis devido à fraqueza das forças que atuam nesta alteração, mas que conjuntamente, apresentam notável força, como exemplo as células do tecido muscular, que são capazes de suportar e mobilizar vários quilos de peso. Existem outras funções celulares que dependem da alteração da morfologia celular, tal como os movimentos amebóides, que algumas células podem realizar para a locomoção, e a divisão celular [44].

A divisão celular é dividida em duas fases, a mitose e a intérfase (Figura 7). Cada uma dessas fases possui funções diferentes e são divididas em outras fases. A mitose é caracterizada pela divisão do material genético celular e seu núcleo, a cariocinese, e subsequente citocinese, que é a divisão do citoplasma e da célula em duas células-filhas. No período entre duas mitoses consecutivas, na intérfase, deve haver crescimento celular para que as células filhas, após a divisão celular, conservem tamanho celular constante, garantindo assim a manutenção das características essenciais das células-filhas [44, 45, 46].

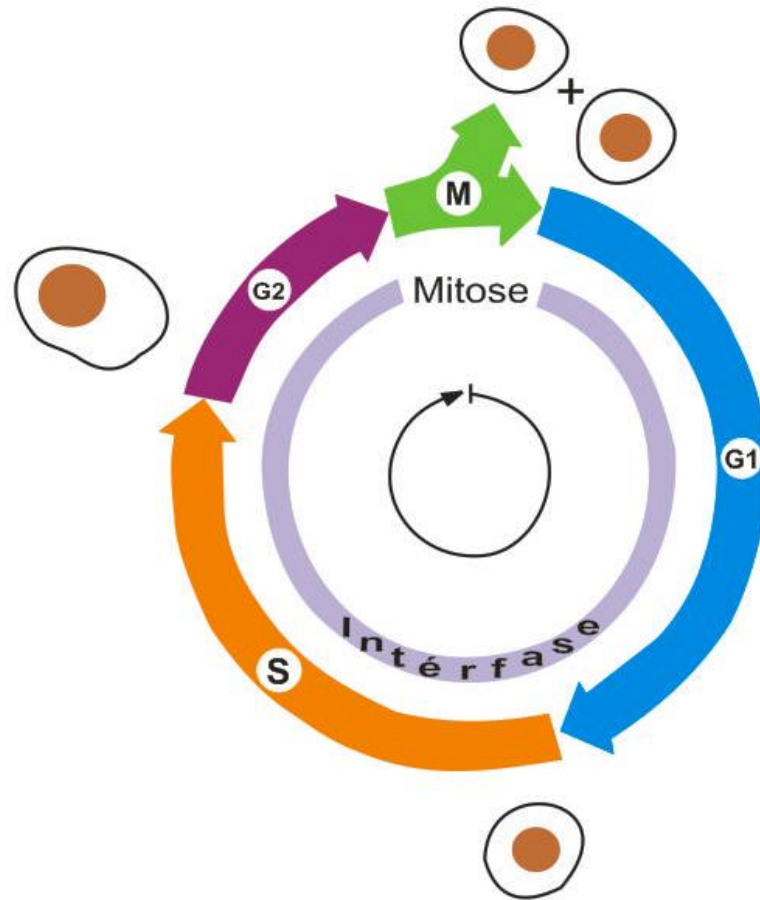


Figura 7 – Esquema mostrando as fases da intérfase, que precede a mitose. G₁ (Gap 1); S (Síntese); G₂ (Gap 2); M (mitose) [45].

A intérfase é dividida em 3 fases consecutivas, conhecidas como G₁, S e G₂, onde as fases “G” e “S” vem ,respectivamente, do inglês abreviado *gap* (intervalo) e *synthesis* (síntese). Durante a fase G₁ ocorrem a síntese de RNA e proteínas, o crescimento celular e a formação de organelas. Durante a fase S ocorre intensa duplicação de DNA, necessária para que após a citocinese cada célula contenha o mesmo DNA da célula mãe. Ao final da fase S, tem início a fase G₂, retomando o crescimento celular e além da síntese de biomoléculas necessárias na mitose. Antes de passar para a próxima fase (de G₁ para S e de G₂ para a mitose) existem pontos de checagem que asseguram que a célula possua tamanho favorável para que a etapa seguinte ocorra [44].

2.3 Laser

2.3.1 Fundamentos físicos

A luz é um tipo de radiação eletromagnética composta por fótons (pacotes de energia), que apresenta comportamento tanto de uma partícula como de uma onda, teoria conhecida como dualidade onda-partícula. A intensidade da luz está relacionada à quantidade de fótons presentes, e sua cor está relacionada com o comprimento de onda (?) [47].

A luz branca se decompõe em sete cores básicas (vermelho, laranja, amarelo, verde, azul, anil e violeta), como se observa em um arco-íris ou na dispersão que ocorre da luz branca incide sobre um prisma. Estas sete cores fazem parte do espectro de radiações eletromagnéticas visíveis, e são definidas por seus comprimentos de onda, geralmente expressos em unidades de nanômetros (nm) ou micrometros (μm).

Os comprimentos de onda visíveis constituem apenas uma pequena fração dos comprimentos de onda existentes e utilizados. Embora outros tipos de ? não sejam visíveis, eles estão presentes por todo o ambiente em que vivemos, e fazendo parte de nosso cotidiano, tal como ondas de rádios e TV, microondas e raios X.

Para melhor entendimento, o ? é definido pela distância medida em dois pontos similares consecutivos nas ondas, por exemplo, a distância entre picos ou vales consecutivos.

O elétron de um átomo é excitado para uma camada mais energética quando recebe energia (elétrica, química, óptica, nuclear ou térmica) fazendo com que o elétron presente em estado fundamental seja excitado para o nível mais externo. Para o elétron retornar para a camada mais estável (estado fundamental), libera a energia que o excitou para a camada superior, gerando um fóton ou transferindo sua energia para outro átomo, mantendo o princípio da conservação de energia [47].

O laser é luz e, portanto, tem o comportamento de luz, ou seja, tem comportamento de uma onda eletromagnética, mas possui características peculiares à sua radiação e de sua construção.

2.3.2 Características básicas da construção de um laser

Existem muitos tipos de laser, porém, o princípio básico do funcionamento de um laser é o mesmo para todos eles.

Para a produção de uma radiação laser, são necessárias algumas condições especiais tal como um meio ativo composto por substâncias (gasosas, líquidas ou sólidas), que geram luz quando excitadas por uma fonte de energia externa, normalmente elétrica ou óptica. O conjunto, meio ativo e energia externa, são responsáveis por causar a inversão de população dos elétrons do meio envolvido, ou seja, a quantidade de elétrons excitados se torna maior que a quantidade do estado fundamental, facilitando assim seu decaimento e a liberação de fótons.

O meio ativo deve estar contido em uma cavidade ressonante óptica, constituída por espelhos, sendo um deles de reflexão total e outro de reflexão parcial. Devido à cavidade óptica, os fótons emitidos por estimulação entram em fase e a radiação é amplificada, ou seja, todos os fótons assumem um mesmo ? e direção permitindo que ocorra um incremento a cada trânsito entre os espelhos (reflexões múltiplas), completado dentro da cavidade (Figura 8) [47].

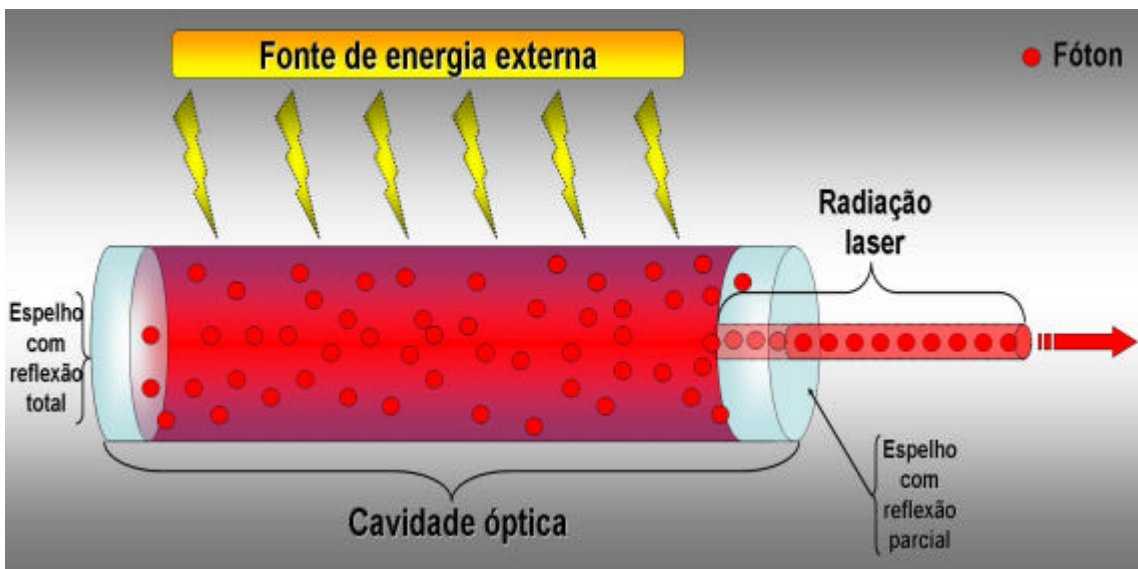


Figura 8 – Elementos básicos de um aparelho para a formação da radiação laser. Meio amplificador que fica dentro da cavidade óptica, fonte de energia para excitação do meio ativo e cavidade óptica com espelhos.

2.3.3 Características da radiação laser

A radiação gerada pelos aparelhos de laser difere da radiação gerada por outras fontes, por exemplo, as lâmpadas e LED (*light emitting diode* - diodo emissor de luz), em três aspectos: monocromaticidade, colimação e coerência (Figura 9 e Figura 10), principalmente devido aos aspectos envolvidos com as características básicas de sua construção [42].

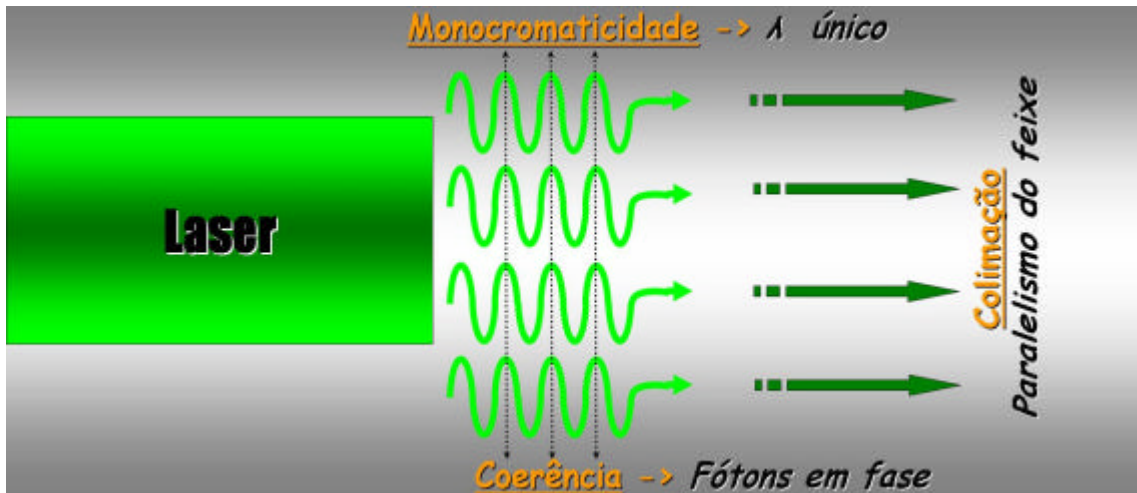


Figura 9 – Características únicas da radiação laser. Coerência, colimação e monocromaticidade.

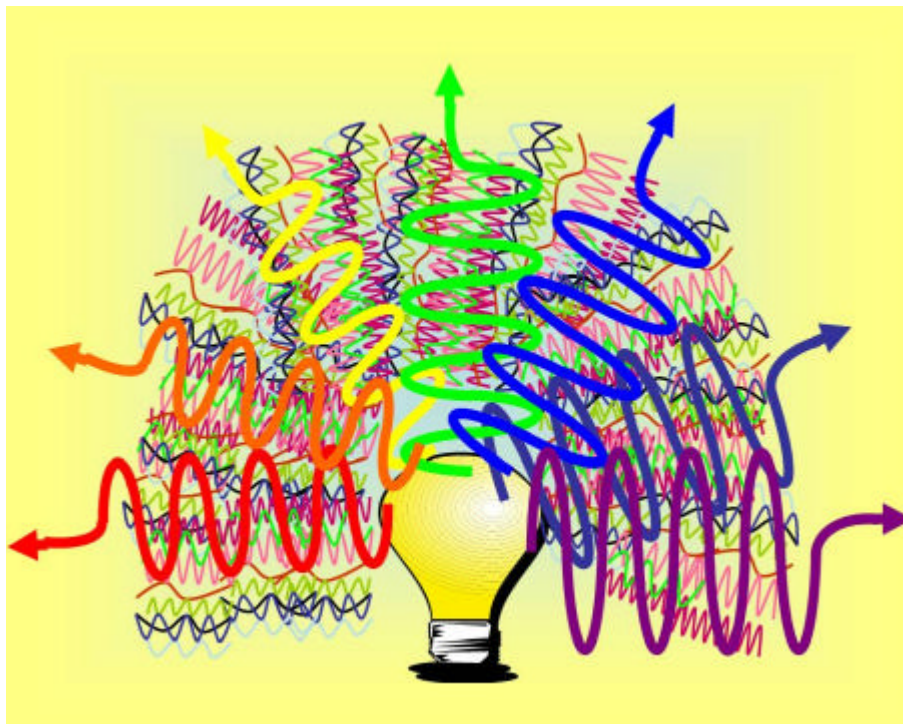


Figura 10 – Exemplo de uma luz comum onde não se observa coerência, monocromaticidade e nem colimação.

2.3.3.1 Monocromaticidade

A luz produzida por um laser é monocromática, portanto a radiação emitida pelo aparelho possui uma variação muito pequena na largura de sua banda espectral de emissão. Qualquer variação na largura de banda pode alterar a coerência do feixe [47]. A largura de banda de um laser de hélio-neônio, por exemplo, é extremamente estreita, sendo praticamente uma linha com 0,002 nm, centrada em 632,8 nm [47]. Em contraste, a luz gerada por outras fontes é formada

por uma enorme variedade de comprimentos de onda, podendo incluir, além da luz branca, componentes espectrais no infravermelho e no ultravioleta, gerando uma largura de banda maior que 450 nm.

Cada material ou combinação de materiais gera comprimento de onda diferente e único, sendo possível a construção de inúmeros aparelhos lasers que produzem radiação em comprimentos de onda diversos, permitindo que os lasers fabricados possam ter finalidades específicas, pelas diferentes respostas dos materiais frente a comprimentos de onda diferentes, tal como a maior ou menor absorção por diferentes materiais e tecidos vivos. Os lasers utilizados na área da saúde, em terapias, cirurgias, ablações e diagnóstico, emitem radiações que estão situadas na faixa das radiações visíveis, infravermelhas e ultravioletas [47].

O comprimento de um laser é uma das mais importantes características para aplicações fotobiológicas, pois cada tecido tem uma maior ou menor absorção para um determinado comprimento, conforme o tipo de cromóforo presente, e com isso pode haver importantes interações entre luz e tecido, mas através de diferentes seqüências de reações bioquímicas foto-induzidas [47].

2.3.3.2 Colimação

Na luz emitida por um laser, os fótons são praticamente paralelos, permitindo que o feixe permaneça estreito por grandes distâncias, devido ao próprio mecanismo de geração da luz laser, baseado no princípio da emissão estimulada que induz a emissão de fótons sempre na mesma direção do fóton estimulante [48].

Tal propriedade permite, por exemplo, que um feixe laser seja disparado da Terra até a Lua, atingindo um dos quatro retro refletores lunares, que devolvem parte do feixe a Terra, servindo como análise para a distância e movimentação destes planetas [49].

2.3.3.3 Coerência

Todos os fótons emitidos pelo laser estão em fase, ou seja, todos os picos e vales estão sincronizados, vales sobre vales e picos sobre picos. Para manter essa característica, os fótons devem ser de comprimento iguais ou muito similares, além de possuírem direção e sentidos iguais, ou seja, a coerência traz as outras duas

propriedades do laser intrinsecamente, a monocromaticidade e a colimação [42].

2.3.4 Propriedades fotobiológicas do laser de baixa potência

Nesta seção será abordado apenas o laser de baixa potência (LBP) e seu uso terapêutico, embora os princípios de interação de todos os lasers em geral, obedeçam a um mesmo princípio.

Além da monocromaticidade, coerência e colimação, já descritas acima, o laser, como qualquer tipo de luz, tem algumas propriedades quando entram em contato direto com um tecido biológico, fazendo com que o feixe possa sofrer reflexão, absorção, espalhamento ou transmissão (Figura 11). Como o tecido biológico é formado por várias estruturas, é praticamente impossível separar esses quatro tipos de interação na prática, pois a interação entre eles ocorre em um mesmo momento, existindo tecidos que possuem uma predominância de um efeito sobre outro [50].

Além das características mostradas acima, existem parâmetros que devem ser analisados, pois qualquer mudança destes pode causar mudanças significativas no objetivo da utilização do laser, fazendo que o mesmo não tenha a eficácia em sua utilização na finalidade desejada. Estes parâmetros são apresentados na Figura 12.

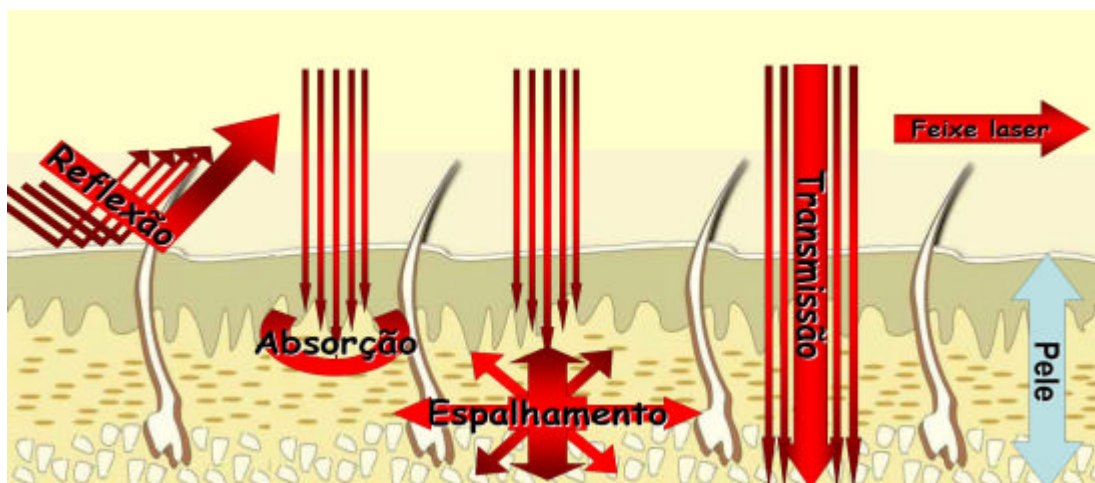


Figura 11 – Comportamento da luz em tecidos biológicos, separados apenas para fins didáticos: reflexão, absorção, espalhamento e transmissão.

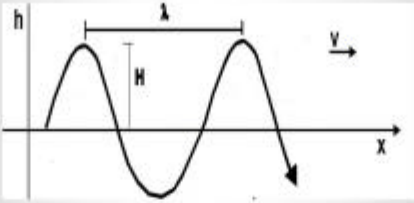
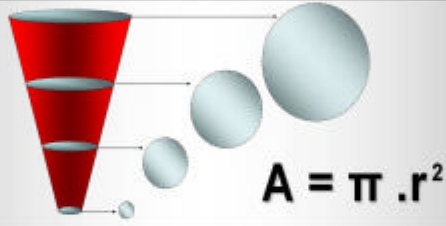

<u>Parâmetros</u>	<u>Equações</u>	<u>Unidades</u>
Comprimento de Onda (λ)		Nanômetros (nm)
Energia (E)	$E = P \cdot t$	Joules (J)
Potência (P)	$P = \frac{E}{t}$	Watts (W)
Área do Feixe Incidente (A)	 $A = \pi \cdot r^2$	cm ² ou mm ²
Tempo (t)		Segundos (s)
Densidade de Energia (DE)	$DE = \frac{E}{A}$	W/cm ² W/mm ²
Densidade de Potência (DP)	$DP = \frac{P}{A}$	J/cm ² J/mm ²

Figura 12 – Parâmetros importantes para o manuseio do laser, onde f = frequência da onda 1/s (Hz); r = raio do círculo formado pelo feixe incidente; $p = 3,1415$; F = altura; V = velocidade.

Um feixe de luz monocromático pode apresentar diferentes profundidades de penetração na pele, mesmo quando utilizados em tecidos de uma mesma pessoa, mas de regiões diferentes. Isso é devido à presença de maior ou menor quantidade de componentes, tais como colágeno, água e vasos sanguíneos [50], pois estes componentes influenciam por apresentarem diferentes coeficientes de absorção e espalhamento.

A absorção é o princípio básico da ação da luz laser no tecido, seja lá qual a finalidade, já que a absorção da radiação laser desencadeia reações bioquímicas diretamente relacionadas a funções celulares importantes [51].

Após a irradiação pelo laser, as células apresentam efeitos diretos, dados por uma resposta rápida (segundos ou minutos após a irradiação) que elevam a atividade de sua cadeia respiratória e da síntese de ATP, e efeitos indiretos, por respostas mais demoradas (horas ou dias após a irradiação), que devido aos efeitos secundários aos efeitos diretos, causam aumento da síntese de DNA e RNA, crescimento celular e estimulando também a proliferação celular [52, 53].

O desencadeamento das reações fotobiológicas ocorre devido à ativação de componentes da cadeia respiratória nas mitocôndrias tal como o transporte interno de íons de cálcio (Ca^{2+}), elevando o potencial de membrana [54], a NADH-desidrogenase e o citocromo c-oxidase, favorecendo a oxigenação celular, aumentando a síntese de ATP, havendo então uma maior oferta energética às células, favorecendo assim a síntese de DNA e RNA, necessárias para a divisão celular [51, 54, 55].

Nicolau [56] mostrou a seqüência de eventos que levam ao aumento da atividade em células após serem irradiadas por um laser vermelho e infravermelho próximo, com comprimentos de onda entre 600 – 1064 nm do espectro eletromagnético na Figura 13. Após a difusão da radiação laser em um dado tecido biológico, ela atinge o citocromo c, dentro das mitocôndrias, mas cada comprimento de onda utilizado é absorvido por um centro metálico ativo da cadeia redox (redução-oxidação) diferente. O laser de 680nm é absorvido pelo Cu_A , que é onde ocorre a oxidação, e o de 820nm pelo Cu_B , que é onde ocorre a redução. Esta absorção pelo citocromo c leva a alterações do gradiente protônico da membrana mitocondrial, aumentando a atividade da bomba de sódio/potássio e de sódio/hidrogênio, além do aumento da ATPase, elevando assim a concentração de ATP e assim ao aumento da atividade celular. Devido ao aumento da atividade

mitocondrial, é liberada dentro da célula íons de hidrogênio, causando a diminuição do pH citoplasmático, levando a um balanço de pH pela ação da bomba de sódio/hidrogênio da membrana celular. O aumento da atividade desta bomba leva a uma rápida alcalinização do citoplasma, sendo esta rápida alcalinização um sinal mitogênico de divisão celular, que juntamente com o aumento da atividade celular, favorecem a divisão celular [53, 57].

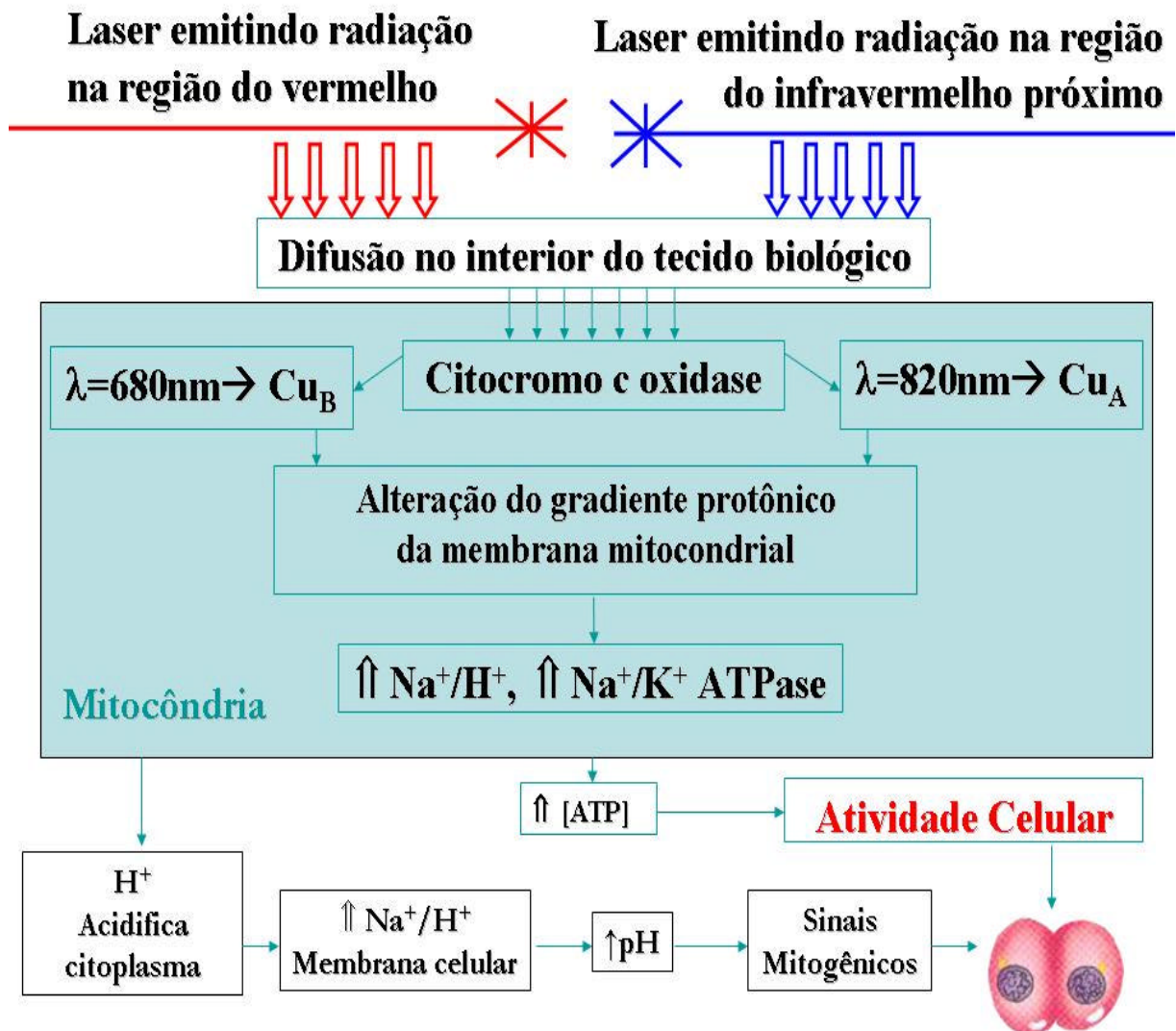


Figura 13 – Eventos celulares produzidos após irradiação com laser emitindo radiação na região do vermelho e infravermelho próximo, com comprimentos de onda entre 600 – 1064 nm do espectro eletromagnético.

Fonte: Nicolau [56], modificada por Braz (2008).

É possível observar efeitos celulares positivos com a utilização do laser de baixa potência tanto com irradiação com comprimentos de onda no vermelho como no infravermelho. Karu, Pyatibrat e Kalendo [58], após irradiarem células HeLa com

os mesmos comprimentos de onda utilizados neste experimento (680nm e 820nm), além de outros, observaram maior adesão celular nestes grupos em questão. Este aumento da adesão celular é causado por maior produção energética, neste caso, obtida pela radiação. Em outro momento neste mesmo trabalho, as células HeLa foram tratadas com inibidores de alguns dos mecanismos envolvidos com produção energética, tal como da cadeia respiratória e da síntese de ATP, e então foram irradiadas, apresentando alteração na aderência. Com os resultados foi possível observar a influência da radiação laser nestes mecanismos de produção energética, e foi possível notar a existência de um intrínseco mecanismo que une estas reações ao núcleo e citoplasma celular.

Bortoleto et al [59] irradiaram células HEP-2 com radiação laser de comprimento de onda 635nm, (vermelho) verificando aumento da síntese de ATP, que retornou ao mesmo nível do grupo controle após 24 horas da irradiação.

Com a utilização do laser de 810nm em linhagens celulares B-14 de hamsters, Kujawa et al [60] mostraram que não ocorrem efeitos citotóxicos ou genotóxicos. No mesmo trabalho, mas com membranas celulares de eritrócitos humanos, mostraram redução em danos protéicos celulares causados pela metodologia empregada.

Comparativamente aos efeitos da radiação monocromática do laser e do LED, Vink et al [61] utilizaram um laser infravermelho (830nm) e dois LEDs, um emitindo no vermelho (660nm) e outro no infravermelho (950nm), e analisaram a proliferação de fibroblastos submetidos a tais radiações. Todos os grupos apresentaram resultados superiores ao grupo controle, mas os dois grupos apresentaram resultados semelhantes e inferiores ao grupo irradiado com LED vermelho.

Mognato et al [62] utilizaram dois lasers infravermelhos com comprimentos de onda diferentes ($\lambda=808\text{nm}$ e 905nm pulsado) em duas diferentes culturas de células humanas, HeLa e de TK6. A proliferação de células da linhagem HeLa não foi alterada com a aplicação do laser de 808nm , mas foi notada com a aplicação do laser pulsado de 905nm e com a utilização combinada dos dois lasers. Na linhagem TK6, foi notada leve inibição de seu índice mitótico tanto com a utilização do laser 808nm , do 905nm como com a utilização combinada das duas radiações, além de também apresentar maior permanência na fase G_1 do ciclo celular.

Além das mudanças que ocorrem na cadeia respiratória, entre outros processos que envolvem a produção de ATP, Amat et al [63] observaram que

quando o ATP é submetido à radiação laser de 635nm e de 830nm, ocorre mudanças no comportamento bioquímico das próprias moléculas de ATP.

Os efeitos celulares causados pela radiação laser se tornaram uma grande arma na promoção da saúde, já que sua utilização terapêutica tem mostrado resultados clínicos positivos [55] (Figura 14) em diversos tipos de patologias, agindo com eficácia em:

- Tratamento de fibromialgia [64], artrite [65], disfunções temporomandibulares [66];
- Rápida ativação de células satélites musculares [67], e resolução de traumas musculares [68];
- Maior proliferação de fibroblastos (*in vitro*) [69, 70, 71], síntese de colágeno e fibras elásticas (*in vitro*) [72], condrócitos (*in vitro*) [73];
- Redução de áreas isquêmicas em miocárdios enfartados e redução da formação de tecido conjuntivo cicatricial [74, 75];
- Aumento da proliferação de linfócitos, ajudando na defesa do corpo [76];
- Diminuição da dor [77, 78];
- Diminuição da inflamação [72, 77, 79];
- Biomodulação da reparação tecidual, [77, 80, 81] óssea [65, 82, 83], e muscular [84].

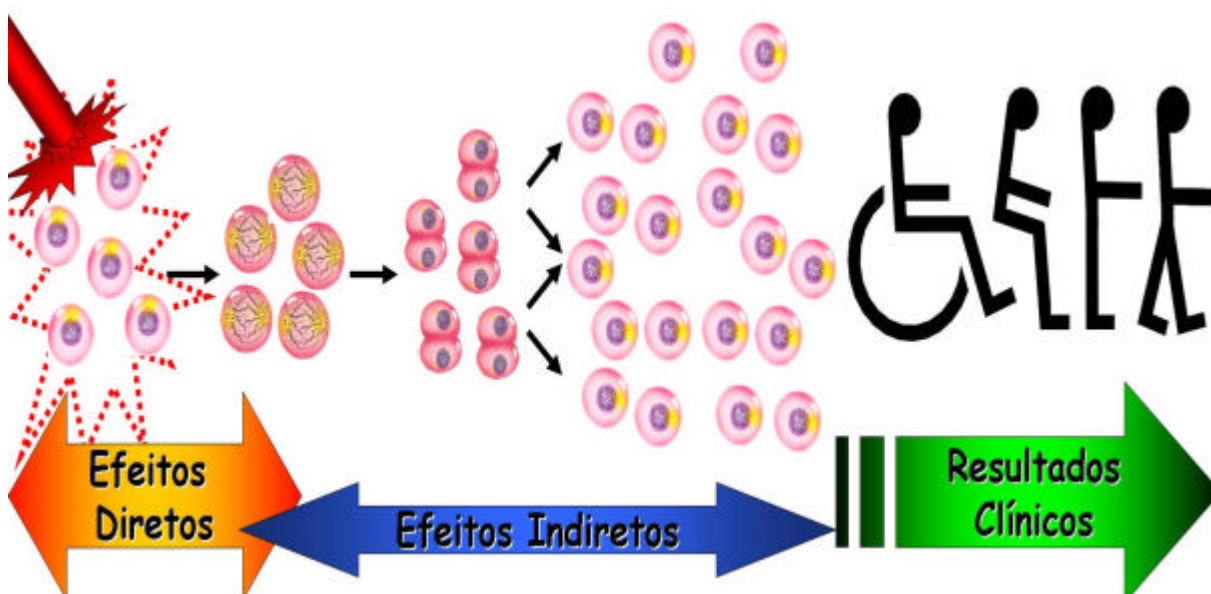


Figura 14 – Esquema da ação fotobiológica do laser na promoção da saúde.

A principal motivação para a realização deste trabalho, foi os resultados observados por Souza et al [19], onde planárias *Dugesia tigrina* amputadas na região entre a faringe e suas aurículas, submetidas à radiação laser vermelha (685nm), foram sacrificadas e analisadas em 3 períodos experimentais diferentes: ao 4º dia, ao 7º dia e ao 15º dia. Foram notadas diferenças nos resultados apresentados ao 4º dia experimental, mostrando aumento da proliferação de neoblastos dos grupos irradiados com laser em relação ao controle, enquanto que ao 7º e ao 15º dias, não pode ser constatadas diferenças entre os grupos analisados [19].

Munin et al [85], utilizando a mesma metodologia empregada por Souza et al [19], analisou os efeitos do laser na proliferação dos neoblastos de planárias *Dugesia tigrina* durante os dias experimentais: 0, 1, 2 e 3. Foi observado que apenas ao 3º dia o grupo laser apresentou maior número de neoblastos, em relação ao grupo controle.

Garcia et al [86] observaram macroscopicamente que planárias amputadas submetidas à radiação laser de 685nm levaram tempo comparativamente igual ao grupo controle para formar um órgão completo, ou seja, mesmo com uma maior oferta de neoblastos [19, 85, 86], não houve maior rapidez na diferenciação e formação dos ocelos.

2.4 Estereologia

A estereologia nos permite estimar um valor tridimensionalmente a partir de cortes bidimensionais enquanto outros métodos de quantificação utilizam informações somente bidimensionais. A importância da estereologia como ferramenta de quantificação se dá por três fatores: reprodutibilidade, rapidez e economia. Para que atinja tal eficiência o método utiliza-se de sistemas testes que pode constar, por exemplo, de pontos teste e áreas com linhas proibidas (Figura 15). Além disso, a técnica faz uso de fórmulas geométricas e estatísticas [87, 88, 89, 90].

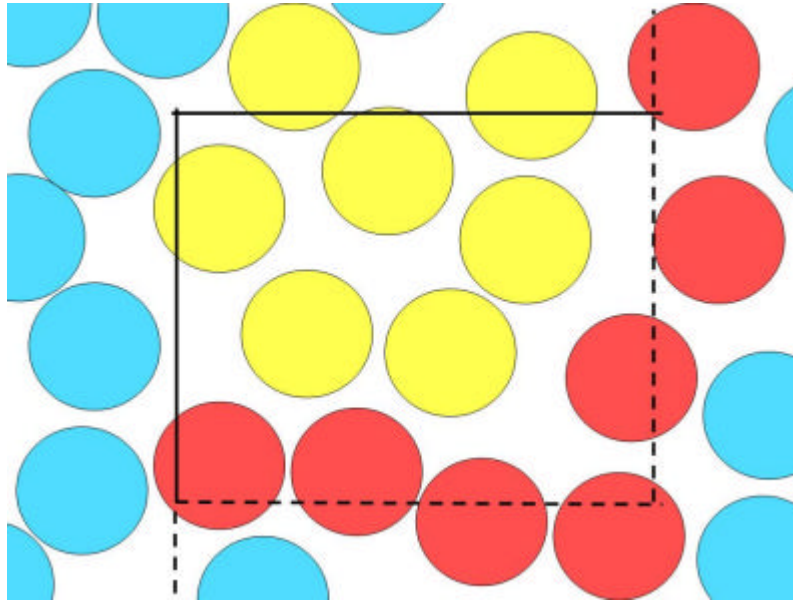


Figura 15 – Esquema exemplificando a contagem de perfis por área. As linhas pontilhadas são previamente estabelecidas como proibidas, deste modo as bolas vermelhas não entram na contagem por tocarem a linha pontilhada, as bolas azuis não entram na contagem por estarem fora do sistema-teste e, portanto apenas as bolas amarelas são consideradas.

2.4.1 Densidade de perfis por área (Q_A)

É considerada uma medida direta, pois representa a quantidade de estrutura que esta sendo avaliada numa determinada área-teste onde duas linhas são consideradas proibidas, ou seja, qualquer perfil que passe por essas linhas não pode ser contado para que não haja superestimação dos resultados (Figura 15). Para obtenção dos valores de perfis por área utilizamos:

$$Q_A = \frac{\sum \text{perfis}}{A_T}$$

Em que $\sum \text{perfis}$ é o número de perfis dentro do sistema-teste que não tocam a linha proibida e A_T é área do sistema calibrada em $1/\mu\text{m}^2$.

2.4.2 Densidade volumétrica (V_V)

Este parâmetro, que é considerado relativo, nos permite através de contagem de pontos, a determinação do volume ocupado pelo objeto dentro de um volume teste. É um dado de fácil análise e seus valores são representados em percentuais (%). A Figura 16 exemplifica a estimativa do V_V que é obtido pela fórmula:

$$V_V = \frac{\sum P_P}{\sum P_T}$$

Em que P_P é o somatório do número de pontos que tocam as estruturas analisadas P_T é o somatório do número de pontos totais do sistema-teste.

Os sistemas de área com linhas proibidas (Q_A) e de pontos (V_V), comentados acima, podem ser utilizados concomitantemente (Figura 17).

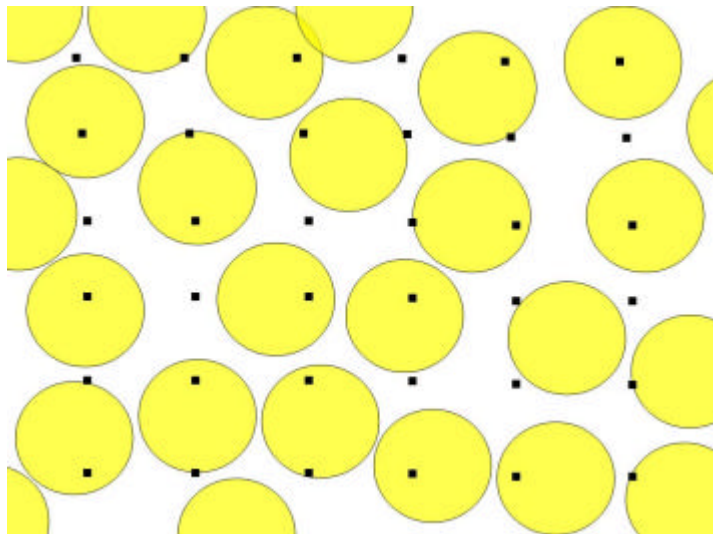


Figura 16 – Nesta figura esquemática temos representado a contagem de pontos através do sistema de 36 pontos-teste. Observe que são computados todos os pontos que tocam a estrutura (círculo amarelo), mesmo as estruturas que são tocadas por mais de um ponto.

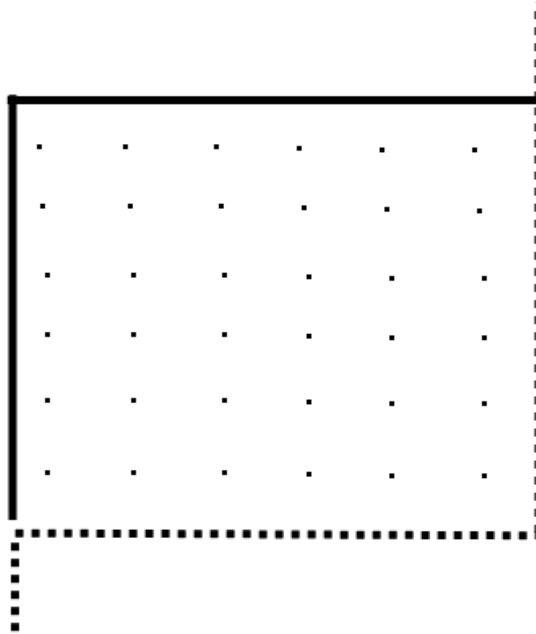


Figura 17 – Sistema de 36 pontos equidistantes acoplados ao sistema de área-teste composta por duas linhas proibidas (pontilhadas).

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar a dinâmica proliferativa de células-tronco (neoblastos) em planárias durante os sete primeiros dias de regeneração pós-amputação e realizar análise comparativa da proliferação e diferenciação celular em dois comprimentos de onda, um no visível (680 nm) e outro no infravermelho (820 nm).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta dos espécimes

Foram utilizados animais da espécie *Dugesia tigrina*, que possuem características facilmente identificáveis, como aurículas e cor marrom tigrada (Figura 18), além de ser abundantemente encontradas em nossa região, comparativamente a outras espécies (dados não publicados). As planárias foram coletadas de aguapés retirados do Rio Paraíba do Sul, em área rural da cidade de São José dos Campos –SP.



Figura 18 – Planária da espécie *Dugesia tigrina* com características peculiares desta espécie, tal como cor marrom tigrada e aurículas.

As planárias desta espécie se aderem em substratos tais como raízes e folhas de plantas aquáticas (aguapés) e devido ao seu pequeno tamanho e cor amarronzada, se tornava muito difícil sua coleta às margens do rio. Então, para a realização de uma coleta mais rentável, com melhores condições de captura deste espécime, os aguapés eram trazidos do rio em contêineres com água até o laboratório do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba (UniVap). No laboratório eram realizadas seleções das planárias dos aguapés dentro de uma bandeja plástica branca, como visto na Figura 19, a olho nu com o auxílio de pipeta Pasteur para a captura dos espécimes. Posteriormente a captura destas, foi realizada a triagem das espécies de planárias, separando aquelas de interesse para o experimento (*Dugesia tigrina*) das demais,

sob as lentes de uma lupa estereoscópica acoplada a um monitor (Figura 20).



Figura 19 – Vista superior da bandeja branca de plástico onde eram realizadas as buscas e coletas das planárias presentes nas folhas e raízes dos aguapés. Note a cor escura da água e os aguapés com suas raízes.

Após a triagem, as planárias eram mantidas em laboratório com temperatura entre 19-21°C, dentro de recipientes plásticos contendo água não clorada. Elas eram alimentadas uma vez por semana, com fígado bovino fresco fragmentado, tal como realizado em outros experimentos [30, 42], e adotado como protocolo de rotina nos trabalhos realizados de nosso laboratório [19, 85, 86]. Sua alimentação foi suspensa apenas sete dias antes do início do experimento.



Figura 20 – Arranjo para triagem e amputação dos espécimes: Lupa estereoscópica com magnificação de 30x acoplada a um monitor onde foi possível observar detalhes dos espécimes durante sua manipulação. Nesta imagem também são observados uma fonte de alimentação e o aparato utilizado para o resfriamento das planárias durante sua amputação.

4.2 Laseres utilizados

O aparelho laser utilizado neste experimento foi o Photon Lase III, da empresa DMC, que possui dois lasers, um operando no vermelho e outro no infravermelho. O meio ativo emissor de radiação dos dois lasers são semicondutores (diodo), fosfeto de índio-gálio-alumínio (InGaAlP) para o laser vermelho e arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs) para o infravermelho.

Os dois lasers foram aferidos por um espectrômetro *Oriel Instruments*, modelo MS257, equipado com grade de difração com 300 linhas por milímetro e câmera CCD intensificada, constatando que o laser no vermelho apresentou comprimento de onda 680nm e no infravermelho apresentou 820nm. A potência óptica de saída utilizada para a realização do experimento foi de 35 mW em ambos os lasers. Esta potência foi aferida por um medidor de potência da *Melles Griot*, modelo *Broadband Power/Energy Meter* 13PEM001.



Figura 21 – Esquema da montagem do sistema de suporte mecânico para irradiação com laser no experimento.

4.3 O experimento

Foram selecionados 260 animais com perfeita morfologia (± 10 mm) e estabelecidos quatro grupos experimentais, sendo um grupo controle sem lesão (GSL), o qual não sofreu amputação e não foi irradiado; um grupo controle amputado (GC), mas não irradiado; um grupo irradiado com laser infravermelho (GI) em $\lambda=820$ nm; e outro grupo irradiado com laser vermelho (GV) em $\lambda=680$ nm. Os animais dos grupos GI e GV sofreram amputação e foram irradiados com laser.

Para se proceder a anestesia dos espécimes é comum a utilização de fontes resfriadas, tal como uma face plana de um cubo de gelo [19, 26, 29, 85, 86]. Como o gelo se funde em temperatura ambiente, ocorrendo deformação, era necessária sua substituição constante, causando atraso nesta fase. Para resolver este problema, utilizamos um dispositivo que fornece em sua superfície plana em alumínio, uma temperatura pouco superior a 0°C , não havendo mais a necessidade de substituição da fonte resfriada.

Cada planária era posicionada sobre papel filtro, este previamente colocado sobre a superfície plana do aparelho de resfriamento, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e uma pinça. O papel filtro foi utilizado para evitar a aderência do animal à superfície de alumínio. Com auxílio de uma lupa estereoscópica acoplada a um monitor de vídeo, instrumentação mostrada na Figura 20, foi realizada a amputação da região cefálica dos espécimes logo abaixo de suas aurículas, na região entre a cabeça e a faringe, conforme ilustrado na Figura 22.

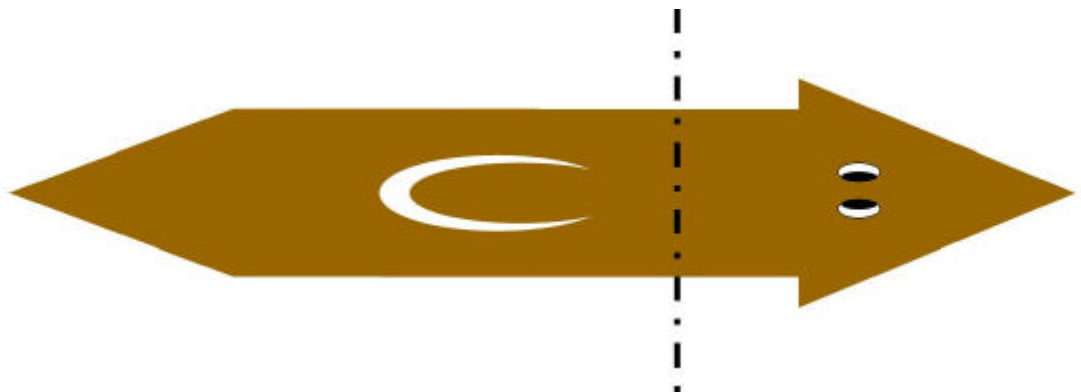


Figura 22 – Representação esquemática de uma planária. A linha pontilhada indica o local da incisão feita durante a amputação da região cefálica do espécime.

Após a amputação, todos os segmentos da região caudal das planárias foram acondicionados individualmente dentro de moldes plásticos (Figura 23) e separados por grupos.



Figura 23 – Moldes plásticos utilizados no acondicionamento dos espécimes durante fase experimental, cada espécime ficou isolado em um cubo.

No momento da irradiação com laser, as planárias eram transportadas para outra sala, onde se encontrava montado um sistema de suporte do aparelho laser para que o diâmetro de seu feixe óptico se mantivesse inalterado a 7 mm no plano da amostra (Figura 21). As planárias eram colocadas uma a uma, em uma placa de Petri com algumas gotas de água, suficientes apenas para manter o corpo da planária molhado. Essas placas de Petri eram colocadas sob o feixe laser por 60 segundos, tempo previamente calculado para o experimento. Embora os animais do grupo GC não fossem irradiados, este grupo também foi transportado juntamente com os grupos GV e GI, para que todos os grupos pudessem sofrer as mesmas perturbações causadas por seu transporte.

Os parâmetros utilizados na irradiação dos dois grupos que utilizaram radiação laser (GI e GV) constam na Tabela 1, resultando numa densidade espacial média com potência (DP) de 91 mW/cm^2 para os dois comprimentos de onda. Como a planária é um ser plano e delgado, a atenuação do feixe laser em seu corpo pode ser considerada desprezível, ou seja, tanto as densidades de potência como as densidades de energia devem permanecer similares às calculadas.

Tabela 1 – Parâmetros para irradiação das planárias.

Grupos	λ (nm)	P (mW)	Área (cm ²)	Tempo (s)
GV	680	35	0,385	60
GI	820	35	0,385	60

A irradiação dos espécimes prosseguiu todos os dias no mesmo horário, a cada 24 horas, até seu sacrifício nos períodos experimentais 0, 12, 24, 48, 72, 84, 96, 108, 120, 144 e 168 horas, relacionados na Tabela 2. Todos os espécimes eram sacrificados pela solução fixadora (Bouin).

No primeiro período experimental (0 h), o grupo GSL foi o primeiro grupo a ser sacrificado e fixado, já que não sofreu amputação. O grupo GC (0 h) foi sacrificado e fixado logo após a amputação. Os grupos laser GI (0 h) e GV (0 h), primeiro eram irradiados para depois ser fixados. Após este primeiro período experimental, todas as planárias foram sacrificadas e fixadas em solução de Bouin, nos devidos períodos experimentais (Tabela 2), sempre contados a partir do momento da amputação de sua região cefálica.

Como se observa na Tabela 2, apenas os grupos sacrificados no período experimental 0 hora são compostos por 5 espécimes cada um, uma vez que, devido ao sacrifício imediatamente após os procedimentos, não há o risco de perda de espécimes nestes grupos durante a fase experimental. Já os outros grupos dos períodos experimentais subsequentes, necessitavam de maior tempo de sobrevivência até atingirem os períodos experimentais já definidos para o sacrifício, com um número mínimo para a quantificação dos neoblastos, portanto, foi padronizado em todos os grupos a quantificação em 5 animais, e os espécimes não utilizados permaneceram como amostras sobressalentes, como medida de segurança.

Tabela 2 – Tabela detalhando a hora da fixação após amputação de cada grupo.

Período Experimental (horas)	Grupos	Número de Planárias
0	GSL	5
	GC	5
	GV	5
	GI	5
12	GC	8
	GV	8
	GI	8
24	GC	8
	GV	8
	GI	8
48	GC	8
	GV	8
	GI	8
72	GC	8
	GV	8
	GI	8
84	GC	8
	GV	8
	GI	8
96	GC	8
	GV	8
	GI	8
108	GC	8
	GV	8
	GI	8
120	GC	8
	GV	8
	GI	8
144	GC	8
	GV	8
	GI	8
168	GC	8
	GV	8
	GI	8
Total		260

4.4 Histologia

Para a fixação das planárias foi utilizada uma placa de Petri, papel absorvente, pinças, pipeta Pasteur e solução de Bouin. Dentro da placa de Petri era posicionado um pedaço de papel absorvente umedecido com água destilada cortado em quadrado (5 cm de lado). Sobre o papel era posicionada a planária com a ajuda das pinças e então eram despejadas algumas gotas da solução de Bouin com a pipeta de Pasteur. Com a planária enrijecida, devido a ação do fixador, o papel era dobrado com o auxílio de pinças, como mostra a Figura 24 e colocado dentro de uma cápsula histológica, para posterior imersão dentro de um becker com um volume maior da solução de Bouin, permanecendo 26 horas dentro deste fixador. Note que nenhuma das dobraduras compromete a integridade física da planária, pois em nenhum momento o vinco da dobradura passa por seu corpo.

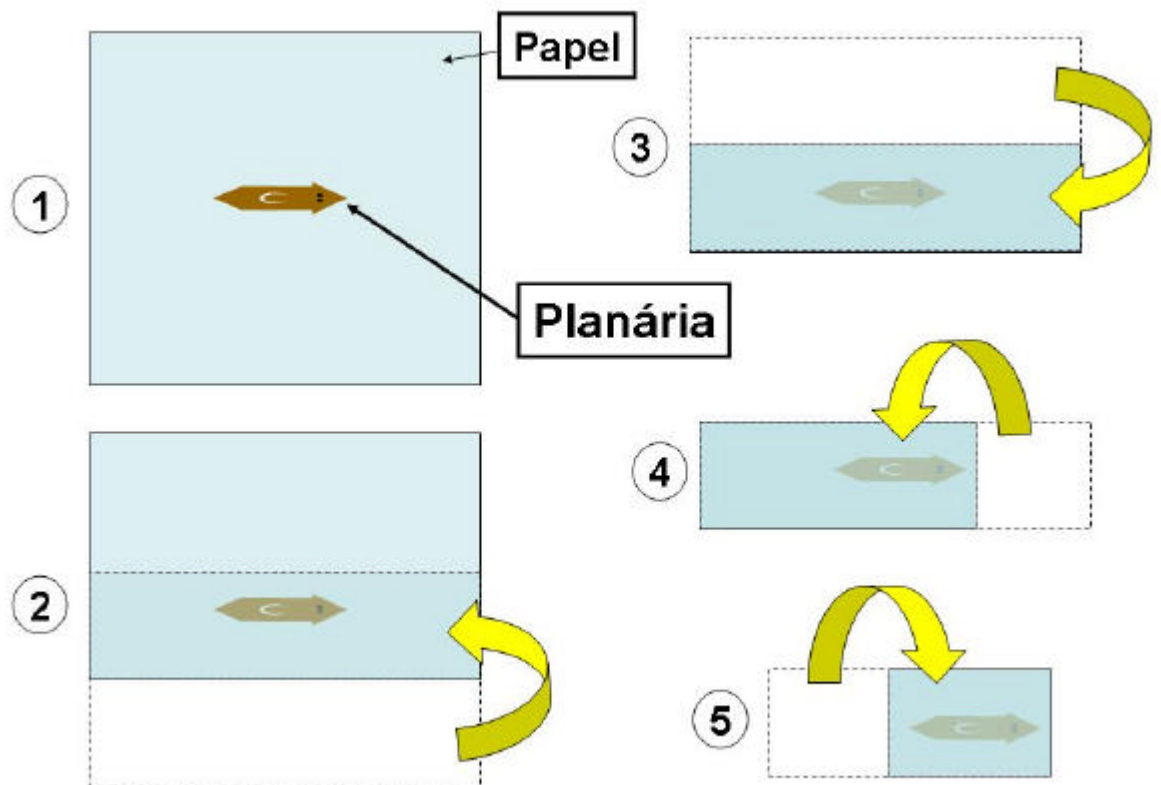


Figura 24 – Ilustração mostrando como foram feitas as dobraduras nos papéis com as planárias para sua inserção dentro das cápsulas histológicas.

Após a fixação, as cápsulas histológicas contendo planárias passaram por

todo o protocolo rotineiro da técnica histológica: fixação em solução de Bouin; desidratação em álcool; e impregnação em parafina resinada Histosec™ (Merck). Todo o protocolo é detalhado na Tabela 3. Entre cada procedimento, o excesso era retirado por um pequeno tempo de escoamento da cápsula.

Tabela 3 – Protocolo de fixação, desidratação, diafanização e impregnação, utilizados no experimento.

Procedimento	Produto	Concentração (%)	Tempo
Fixação	Bouin	-----	26h
Desidratação	Álcool	70	15min
Desidratação	Álcool	80	15min
Desidratação	Álcool	90	15min
Desidratação	Álcool	100	15min
Desidratação	Álcool	100	10min
Diafanização	Xilol	-----	15min
Diafanização	Xilol	-----	15min
Impregnação	Histosec	-----	20min
Impregnação	Histosec	-----	20min

Após todos os procedimentos (Tabela 3), as amostras foram inclusas no Histosec previamente colocado em forminhas de papel arredondadas para inclusão. As planárias eram retiradas dos papéis dobrados dentro das cápsulas e inclusas em posição tal que possibilitasse a execução de cortes dorso-ventrais, perpendiculares ao plano de corte no micrótomo. Com o endurecimento da parafina Histosec, os blocos foram desenhados e suas bordas foram aparadas, dando um aspecto cubóide ao bloco, facilitando assim o seu encaixe no porta-amostra do micrótomo.

Na fase seguinte, todos os blocos contendo as amostras foram cortados em tiras de 3µm de espessura, passando pela estufa para a fixação da amostra à lâmina e escoamento do excesso de parafina da tira, para iniciar o processo de hidratação, constituído por banhos consecutivos em xilol, álcool e água respectivamente. Após esta hidratação foi feita a coloração em hematoxilina e eosina (HE), nova desidratação do tecido em álcool e xilol (Tabela 4) e a subsequente montagem das lâminas com Entellan™ (Merck). Após a secagem das lâminas, estas estavam prontas para análise em microscópio de luz.

Tabela 4 – Protocolo de coloração em HE utilizado no experimento.

Produto	Concentração (%)	Procedimento
Xilol	-----	15 min
Xilol	-----	5 min
Álcool	100	3 min
Álcool	95	3 min
Álcool	70	3 min
Água Corrente	-----	3 min
Hematoxilina	-----	3 min
Água	-----	3 min
Eosina	-----	3 min
Álcool	95	Lavar
Álcool	100	Lavar
Álcool	100	Lavar
Xilol	-----	Montagem das lâminas

4.5 Quantificação do estroma, fibras musculares e neoblastos

Foi utilizado um sistema para permitir a captura das imagens observadas no microscópio. Este sistema conta com um microscópio (Leica) com lente de 100x de magnificação, acoplado a uma câmera fotográfica digital (Leica), com 14,5x de magnificação, associada a uma placa de captura de um computador (Figura 25), permitindo assim que as imagens observadas no monitor do computador fossem capturadas no computador com uma área padrão de $8600 \mu\text{m}^2$ para posterior quantificação. O computador conta ainda com um *software* específico da Leica, o *Image Manager 50*, que torna possível trabalhar a imagem antes de ser feita sua captura, por exemplo, uma ferramenta que faz o balanço da cor branca automaticamente, ajudando a melhora da qualidade da imagem adquirida.



Figura 25 – Microscópio e computador utilizados para análise das lâminas histológicas.

Como critério para a análise na contagem dos neoplastos, ficou estabelecido que o local a ser contado estivesse na região medial e cefálica da planária. A específica localização desse local era possível, pois na região medial da planária se localiza a faringe, que fica presa ao seu corpo na região cefálica, além da região cefálica ser mais espessa que a região caudal, tal como a Figura 26 indica.

Todas as quantificações de tecido muscular, estroma e neoplastos foram realizados por estereologia.

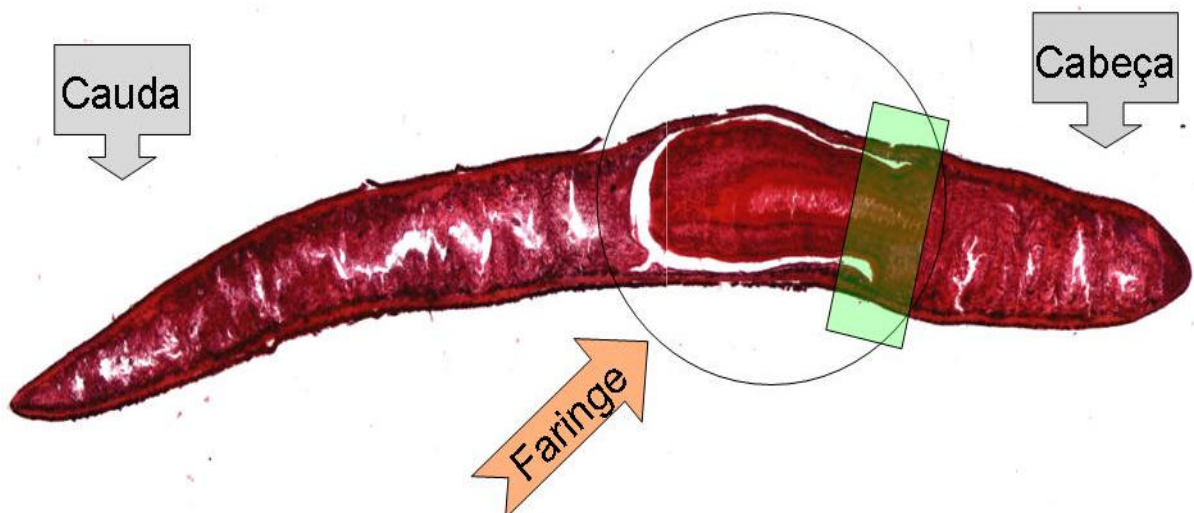


Figura 26 – Fotomicrografia de um corte histológico do corte sagital de uma planária *Dugesia tigrina*. Note que a região cefálica é mais espessa que a região caudal. A área em verde mostra a ligação entre a faringe e o corpo da planária (HE 50x).

4.5.1 Análise por estereologia

Para a análise foram utilizados cinco cortes de cada animal e em cada corte, foram analisados três campos, totalizando 15 campos por animal. Como ao todo foram utilizados cinco animais por grupo, foram analisados 75 campos por grupo, cada campo com $1485 \mu\text{m}^2$. Os restantes dos espécimes não utilizados permaneceram como amostras sobressalentes, como medida de segurança caso houvesse alguma perda dos espécimes durante a fase experimental. Não houve necessidade de aumentar o número de espécimes dos grupos sacrificados durante o período experimental 0 hora, pois eles foram sacrificados imediatamente aos procedimentos, não havendo o risco de perda durante a fase experimental.

Foram realizados dois tipos de análises: a de densidade de volume (V_V) e a densidade de perfis por área (Q_A). Os dois sistemas foram unificados em um sistema teste (Figura 27), possibilitando realizar todas as análises em uma mesma área.

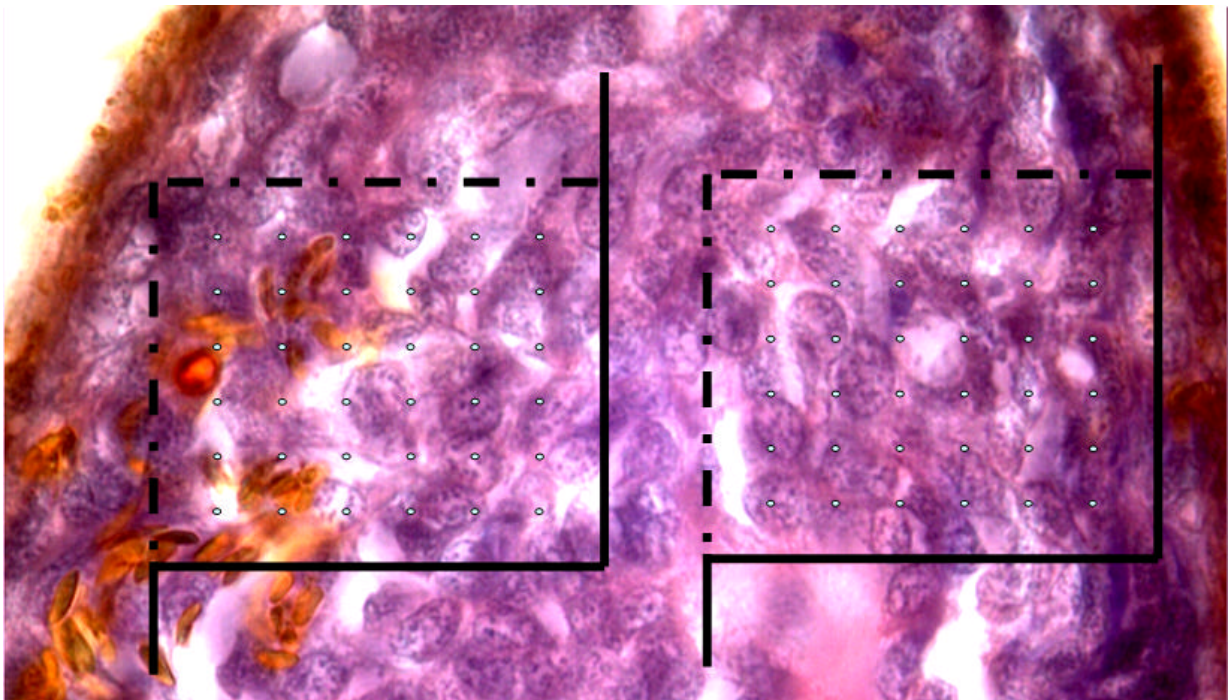


Figura 27 – Fotomicrografia com os sistemas teste utilizado para a quantificação da densidade de volume (V_V) e da densidade de perfis por área (Q_A).

Em cada análise foi possível a obtenção de diversos dados, tal como a Q_A de neoblastos (Q_{Aneo}) e a V_V de neoblastos (V_{Vneo}), músculos (V_{Vmus}) e estroma (V_{Vest}) em todos os períodos de experimento.

Para isso, o sistema teste foi sobreposto às fotomicrografias previamente

adquiridas e com o auxílio do *software ImageJ* foi realizada a calibração e contagem do sistema. O *ImageJ* possui um *plugin* chamado *Cell Counter*, que auxilia na contagem manual de células marcando, numerando e fazendo a soma automática de todas as células marcadas pelo operador do *software*, evitando assim a contagem repetida de uma mesma célula. Toda a contagem foi transposta para o *Excel* para o cálculo da média de cada grupo e os gráficos foram trabalhados e obtidos com o *software Origin 6.0*.

5 RESULTADOS

Nas fotomicrografias obtidas das lâminas histológicas coradas com HE de todos os grupos (GSL, GC, GV e GI), foram quantificadas várias estruturas, tal como neoblastos (Q_{Aneo} e V_{Vneo}), estroma (V_{Vest}) e tecido muscular (V_{Vmus}). Observando as fotomicrografias referentes aos períodos do experimento, podem ser observadas mudanças decorrentes da regeneração, tendo o tempo como variável principal, além os efeitos da radiação laser.

A fotomicrografia abaixo (Figura 28) ilustra o grupo controle GSL, onde as planárias não foram submetidas a qualquer fonte de radiação e qualquer tipo de lesão, correspondendo a uma planária intacta.

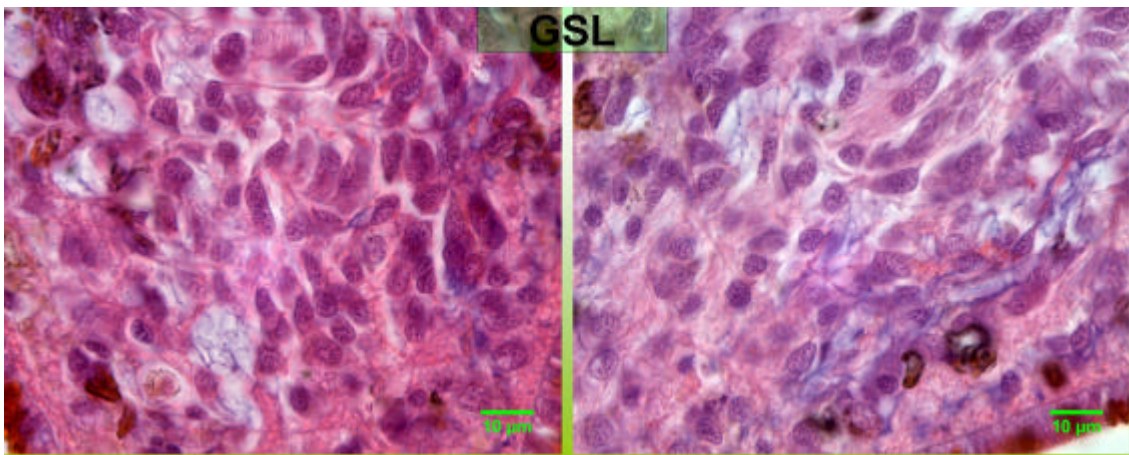


Figura 28 – Fotomicrografias representativas do grupo GSL mostrando o aspecto e distribuição normal dos neoblastos e tecidos adjacentes em dois cortes diferentes (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 29), GI (Figura 30) e GV (Figura 31) no período experimental 0 h pós-lesão.

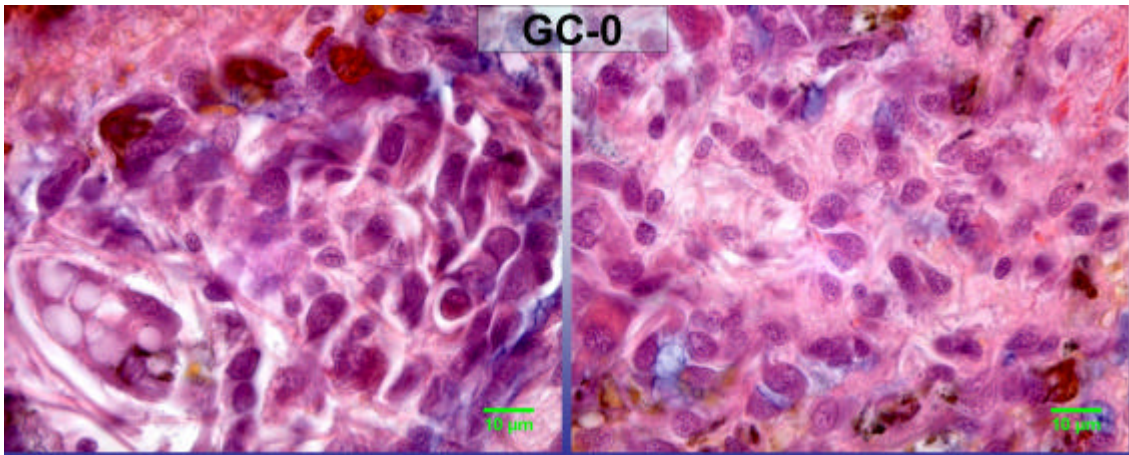


Figura 29 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 0 h (H.E. 100x).

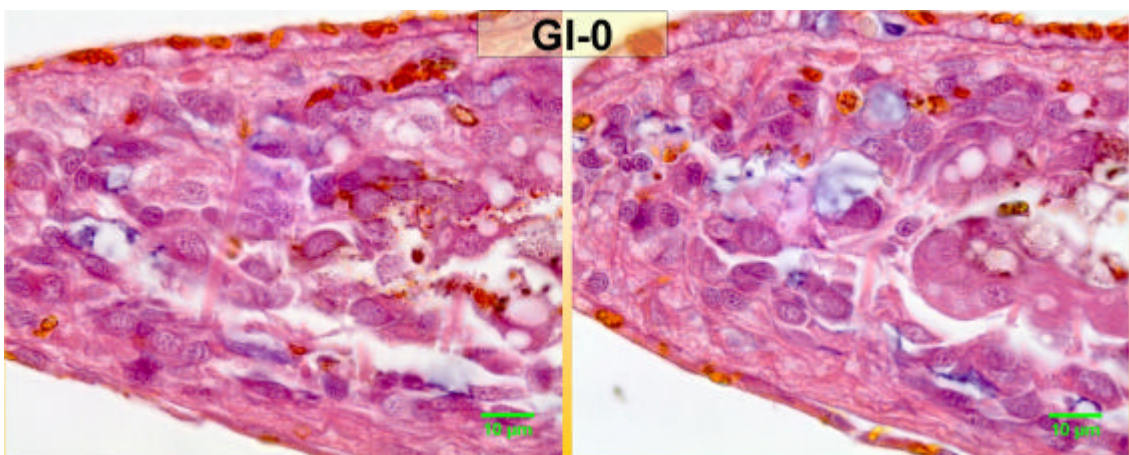


Figura 30 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 0 h (H.E. 100x).

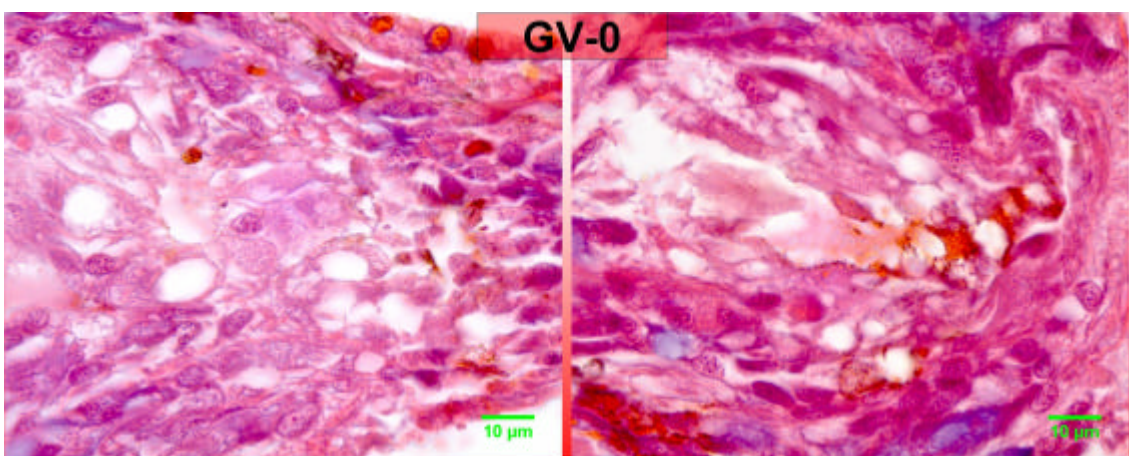


Figura 31 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 0 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 32), GI (Figura 33) e GV (Figura 34) no período experimental 12 h pós-lesão.

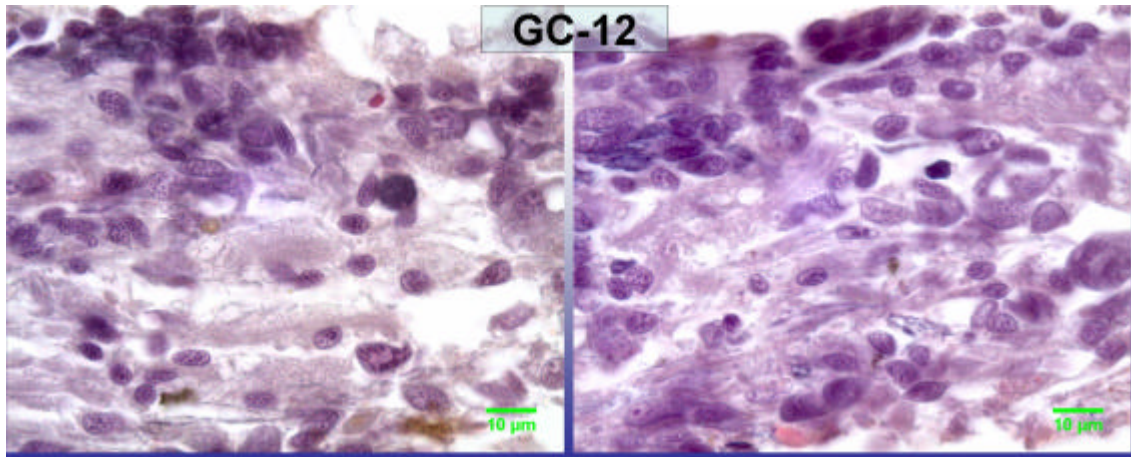


Figura 32 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 12 h (H.E. 100x).

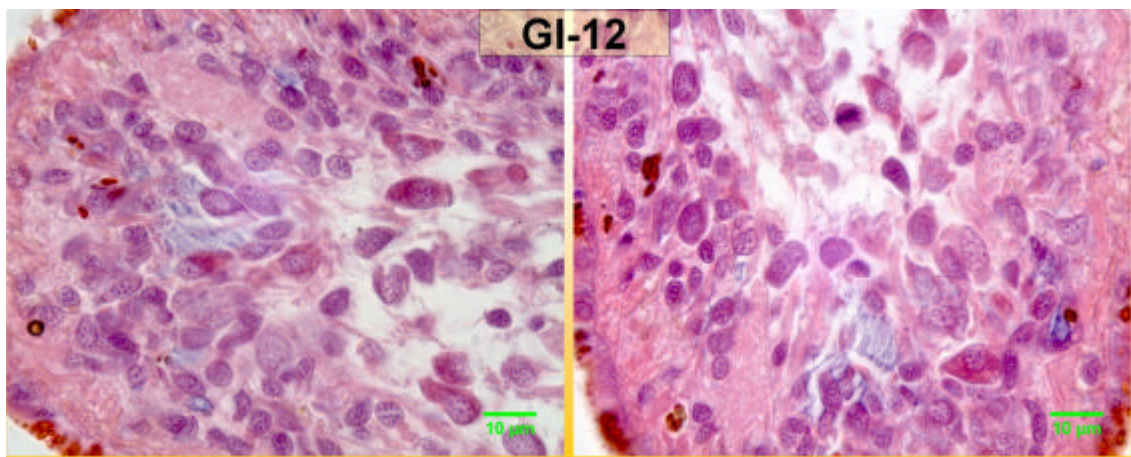


Figura 33 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 12 h (H.E. 100x).

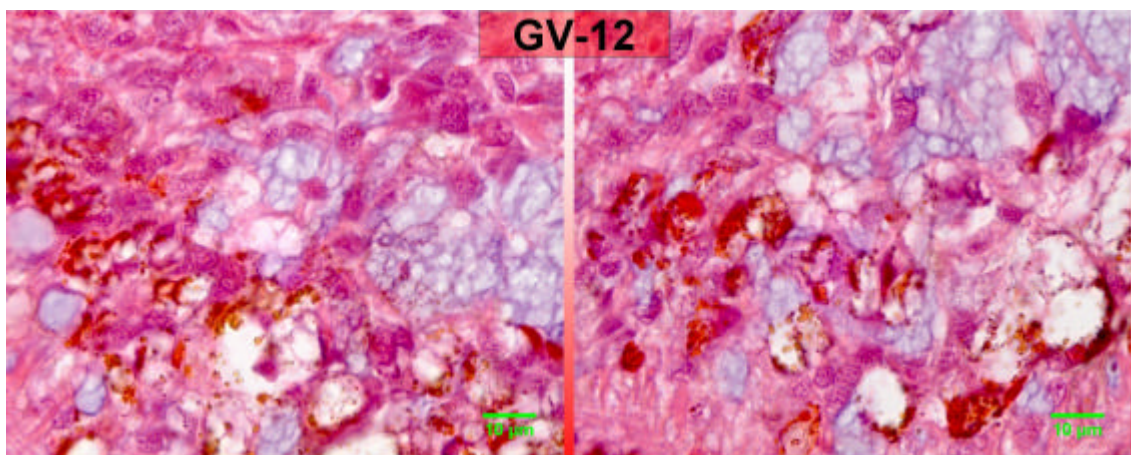


Figura 34 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 12 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 35), GI (Figura 36) e GV (Figura 37) no período experimental 24 h pós-lesão.

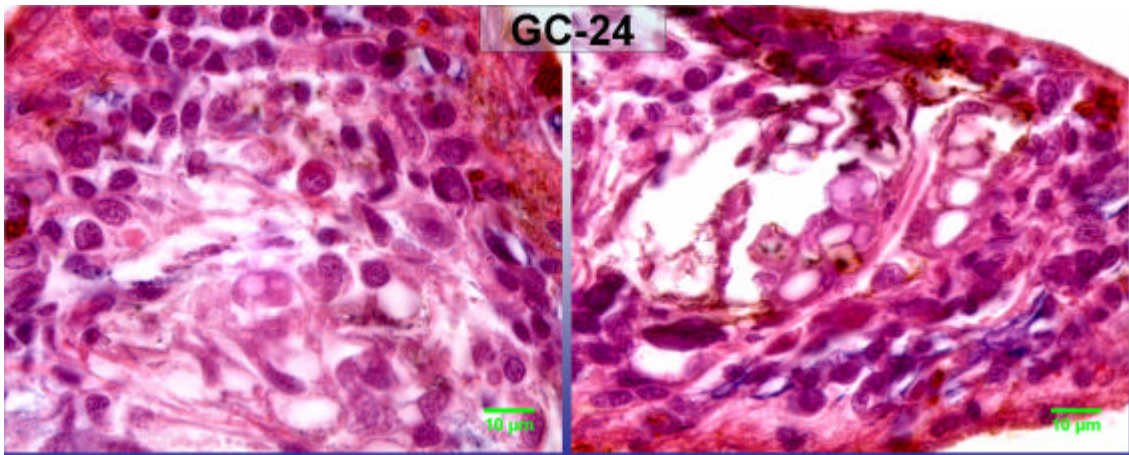


Figura 35 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 24 h (H.E. 100x).

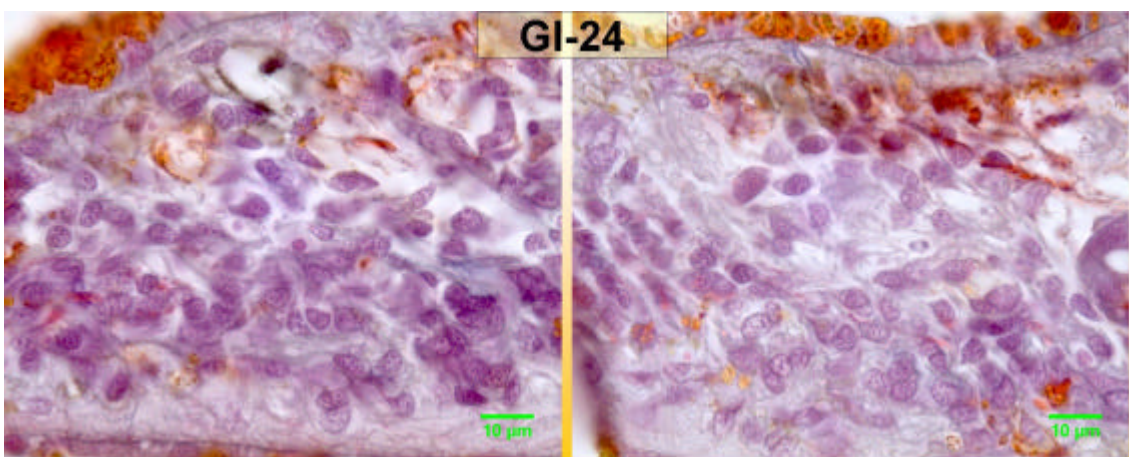


Figura 36 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 24 h (H.E. 100x).

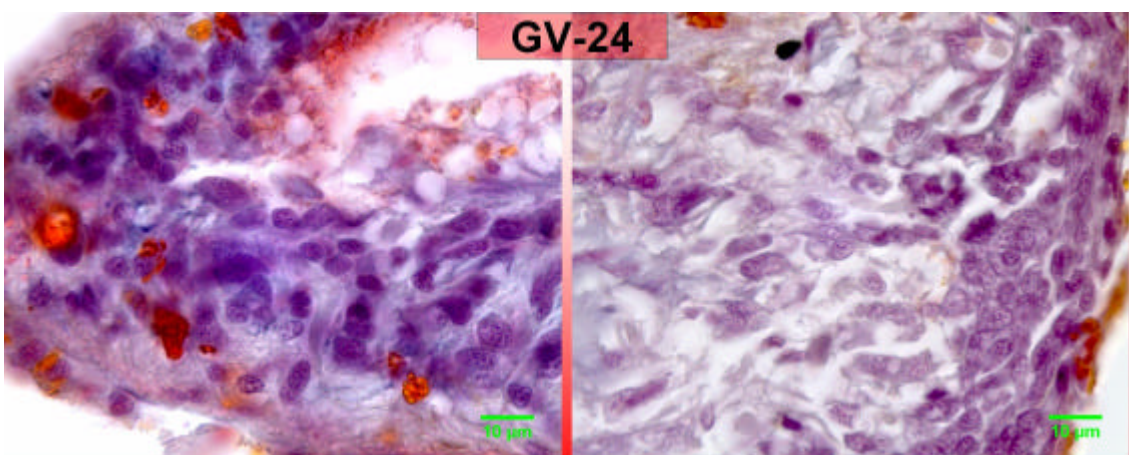


Figura 37 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 24 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 38), GI (Figura 39) e GV (Figura 40) no período experimental 48 h pós-lesão.

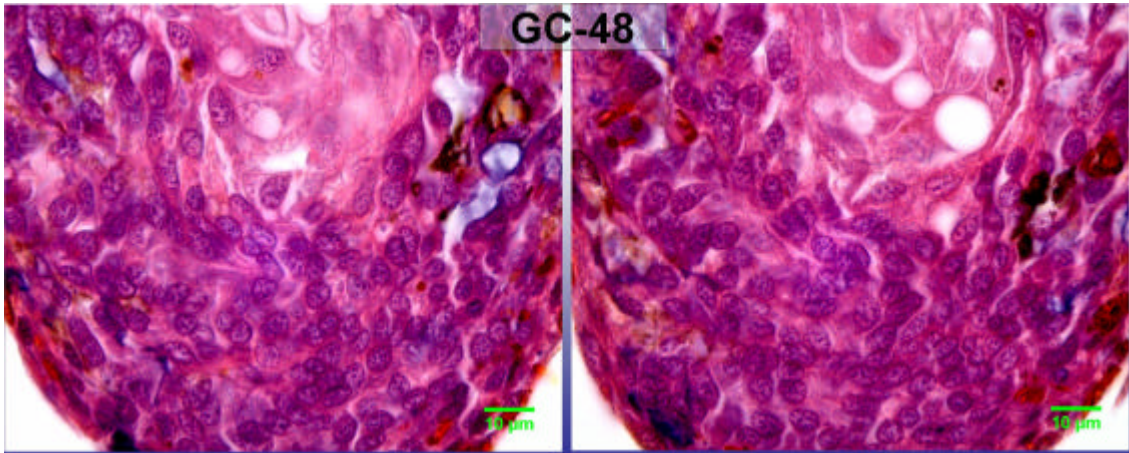


Figura 38 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 48 h (H.E. 100x).

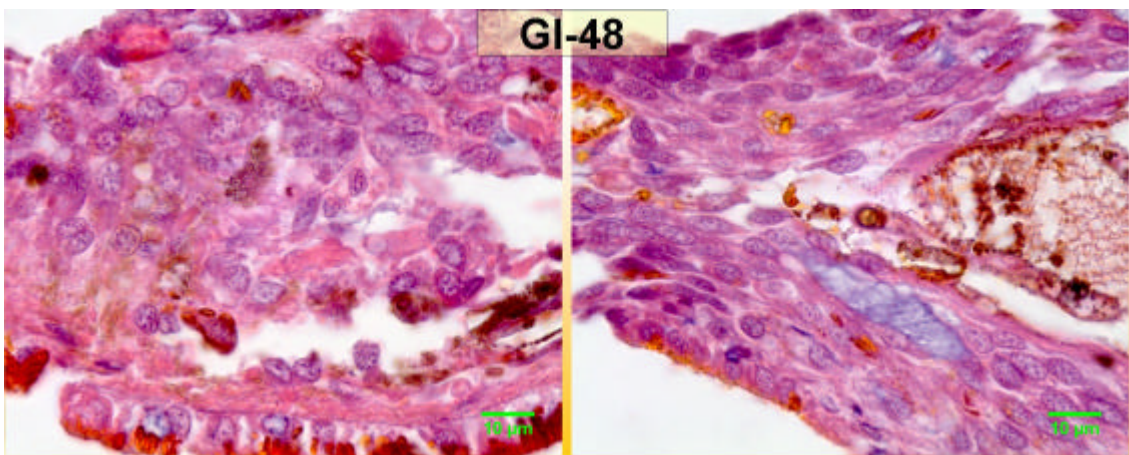


Figura 39 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 48 h (H.E. 100x).

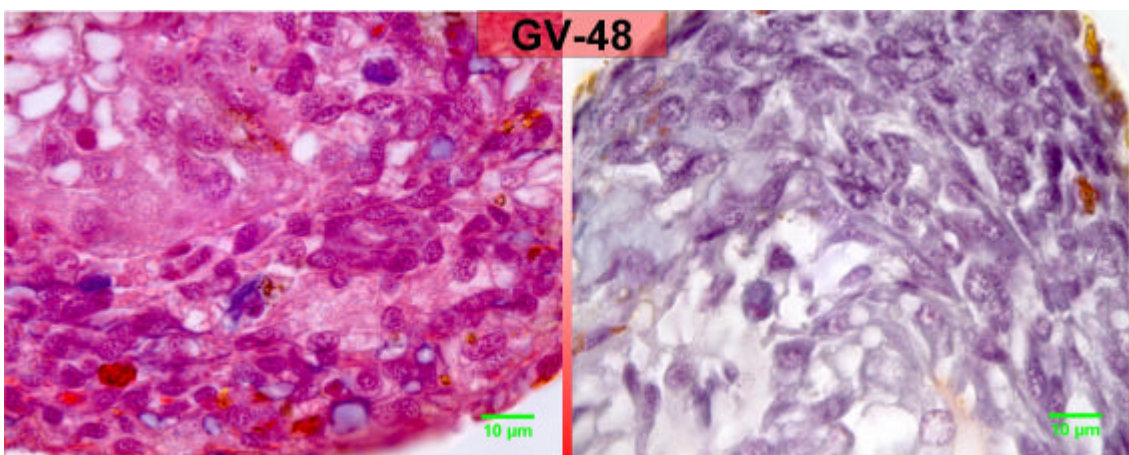


Figura 40 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 48 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 41), GI (Figura 42) e GV (Figura 43) no período experimental 72 h pós-lesão.

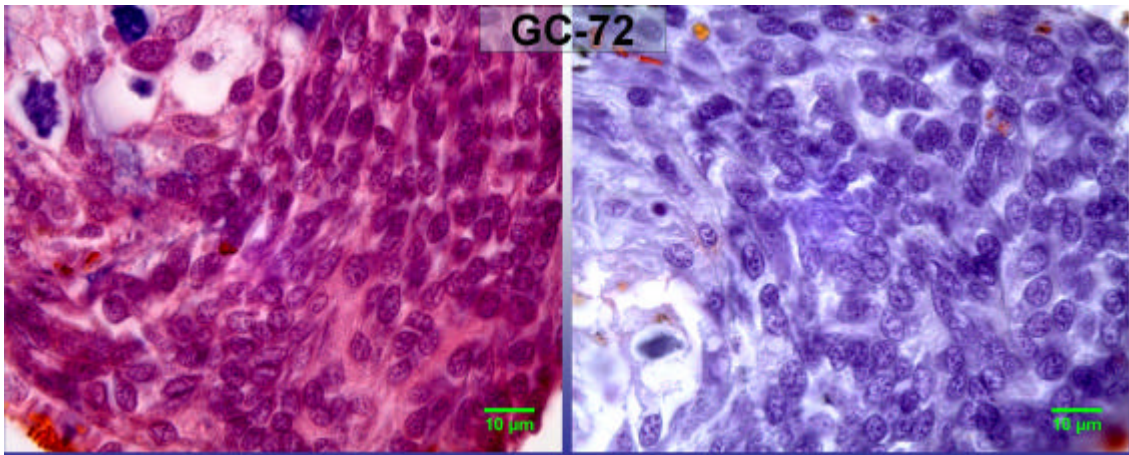


Figura 41 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 72 h (H.E. 100x).

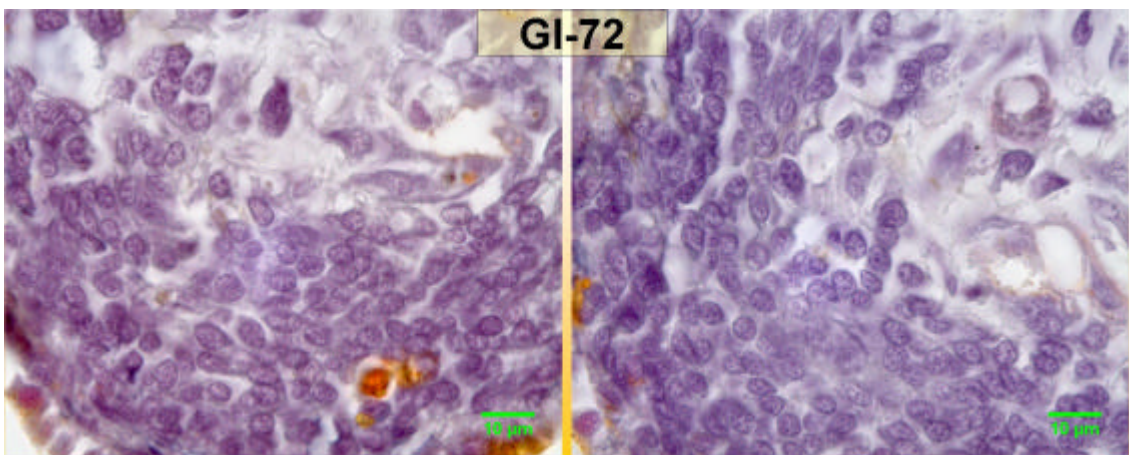


Figura 42 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 72 h (H.E. 100x).

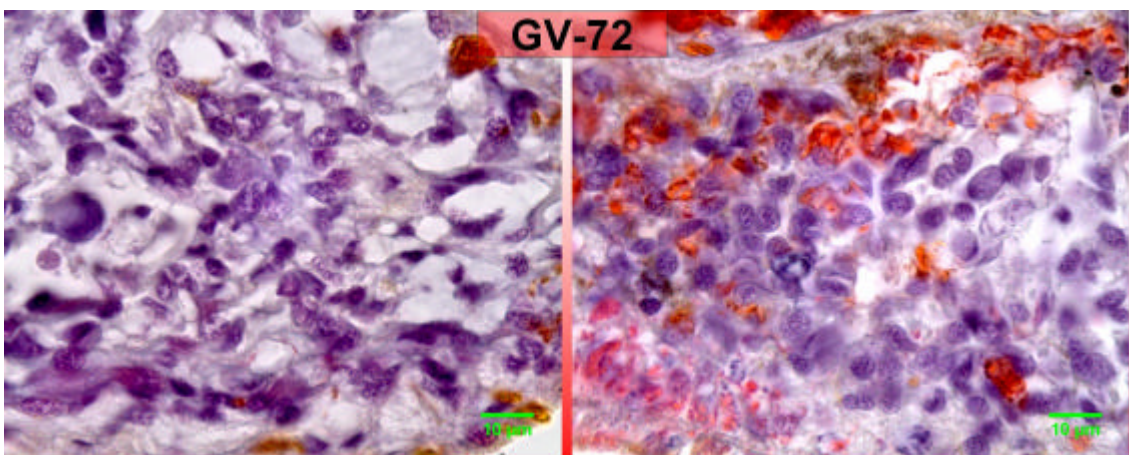


Figura 43 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 72 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 44), GI (Figura 45) e GV (Figura 46) no período experimental 84 h pós-lesão.

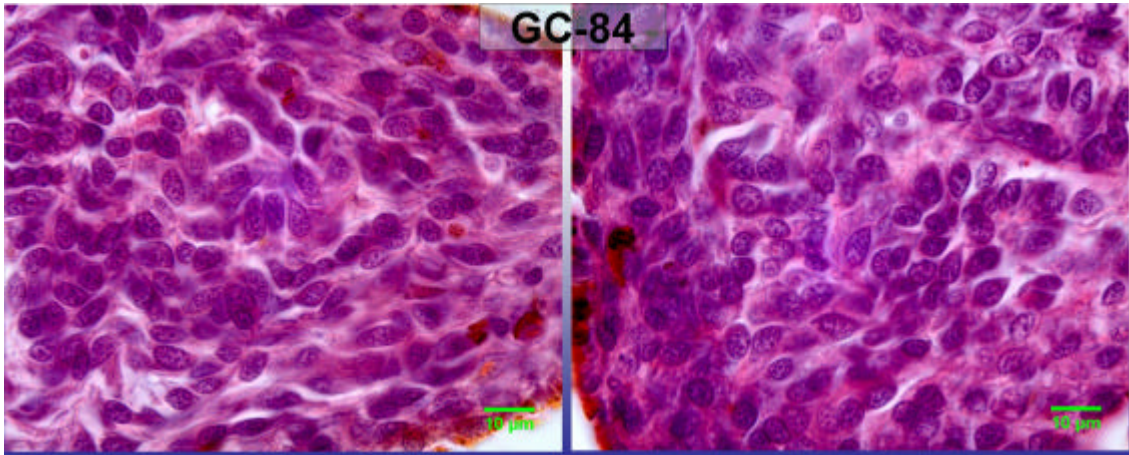


Figura 44 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 84 h (H.E. 100x).

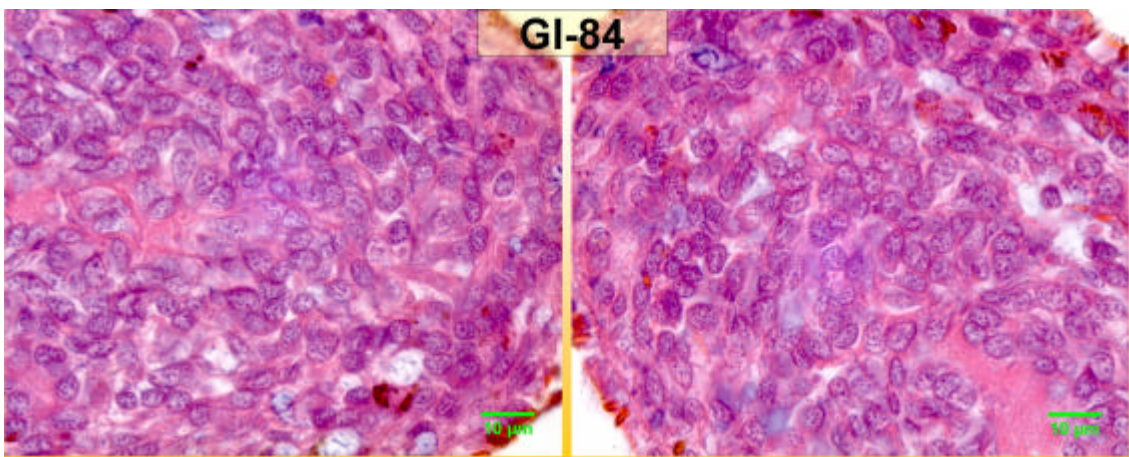


Figura 45 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 84 h (H.E. 100x).

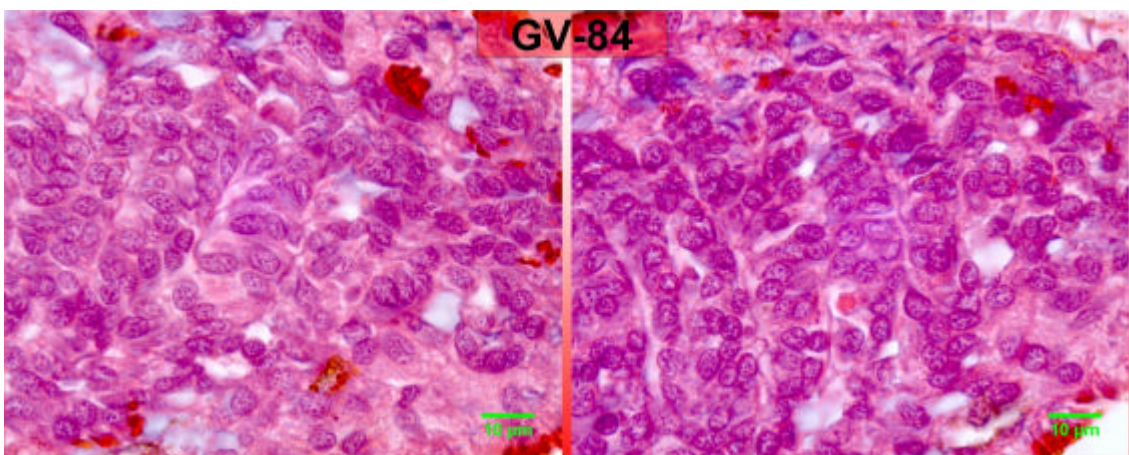


Figura 46 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 84 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 47), GI (Figura 48) e GV (Figura 49) no período experimental 96 h pós-lesão.

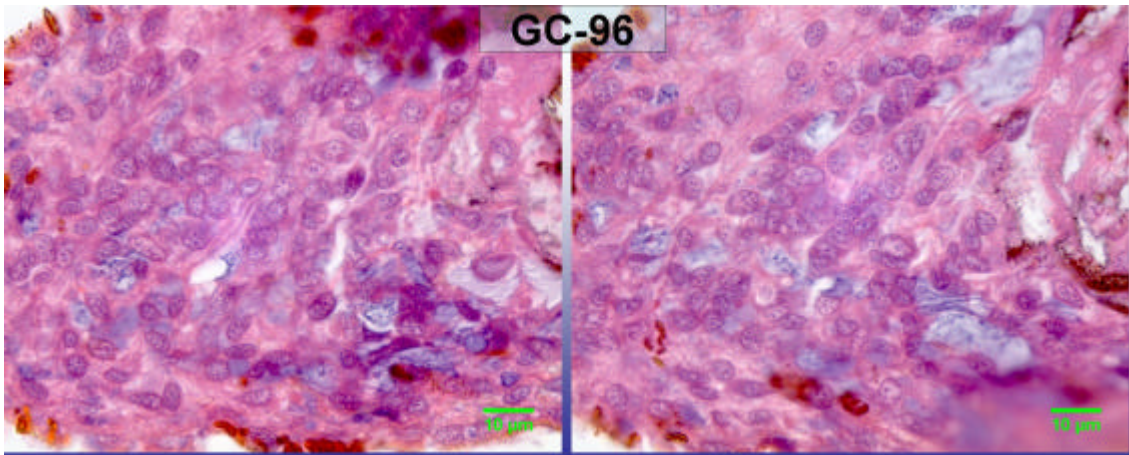


Figura 47 – Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 96 h (H.E. 100x).

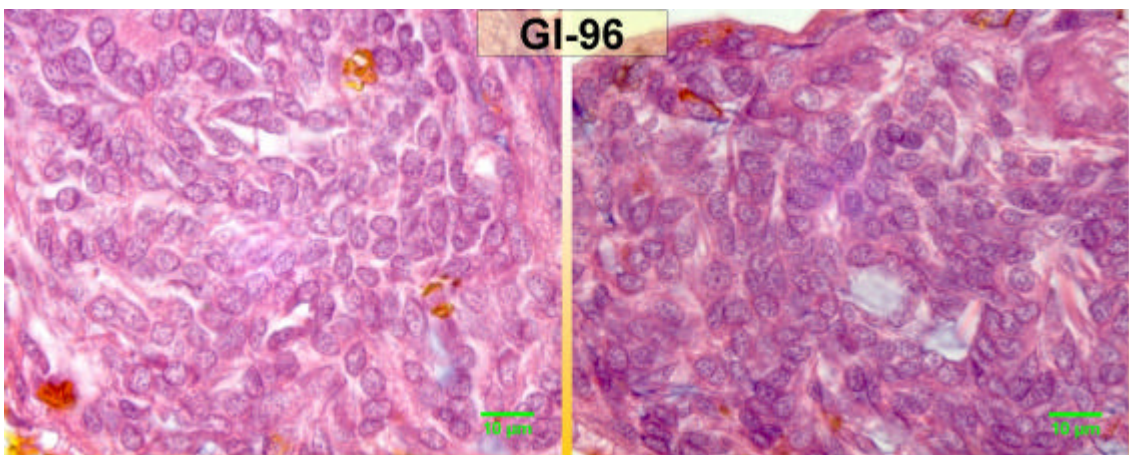


Figura 48 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 96 h (H.E. 100x).

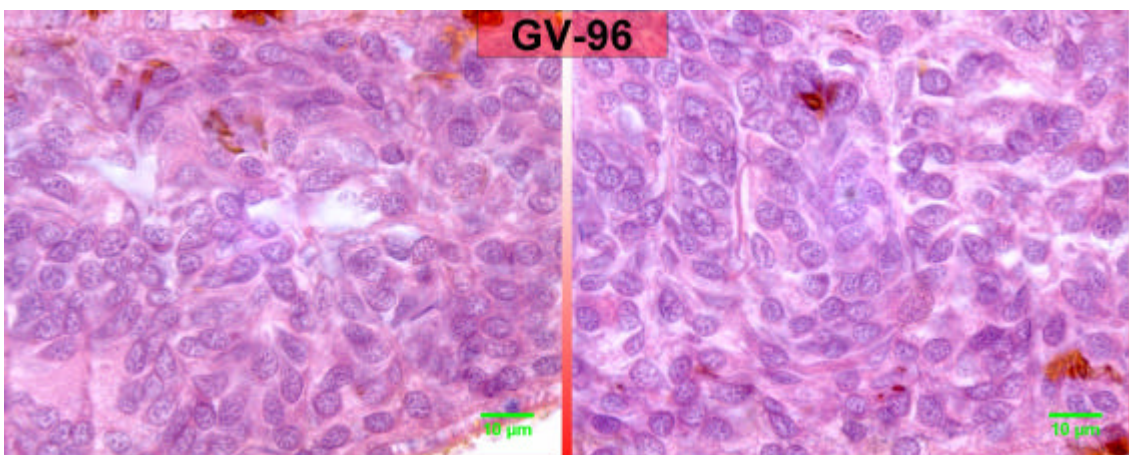


Figura 49 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 96 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 50), GI (Figura 51) e GV (Figura 52) no período experimental 108 h pós-lesão.

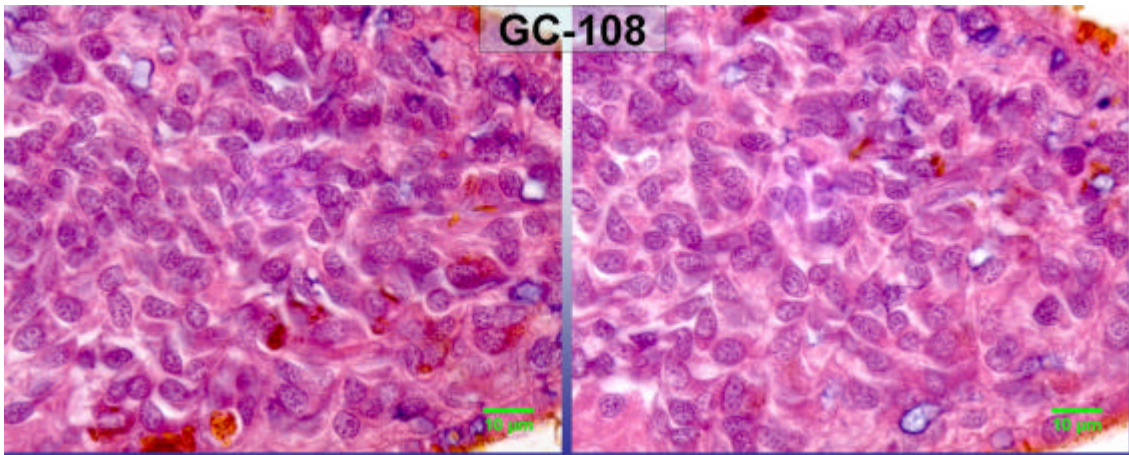


Figura 50– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 108h (H.E. 100x).

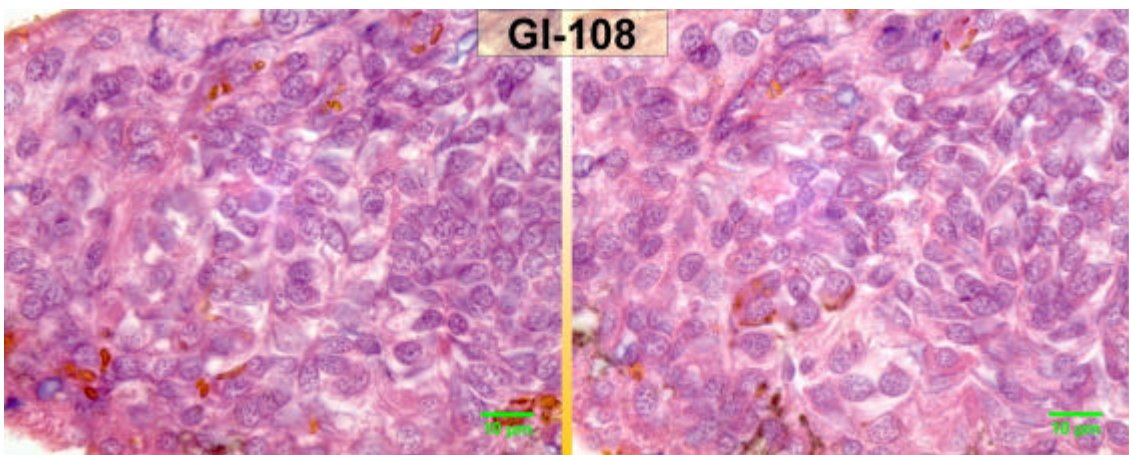


Figura 51 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 108 h (H.E. 100x).

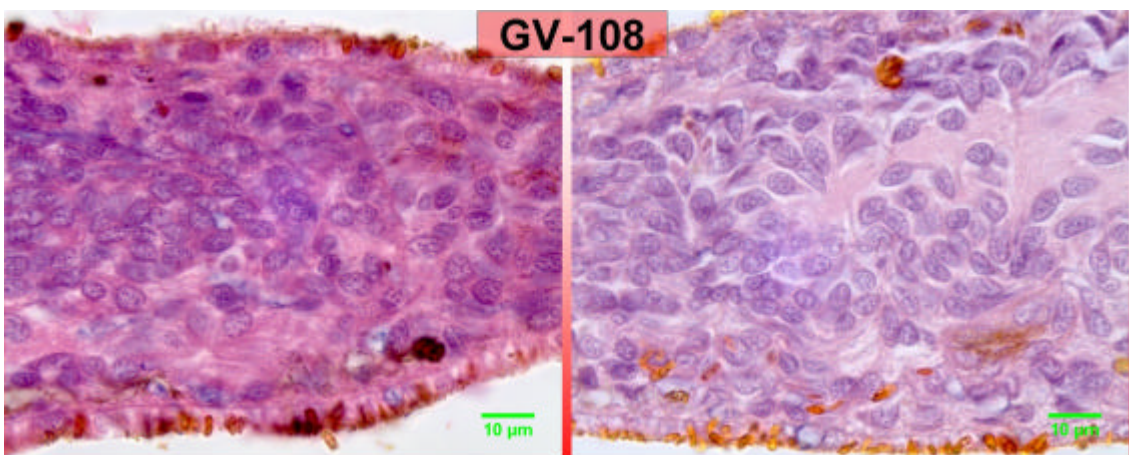


Figura 52 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 108 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 53), GI (Figura 54) e GV (Figura 55) no período experimental 120 h pós-lesão.

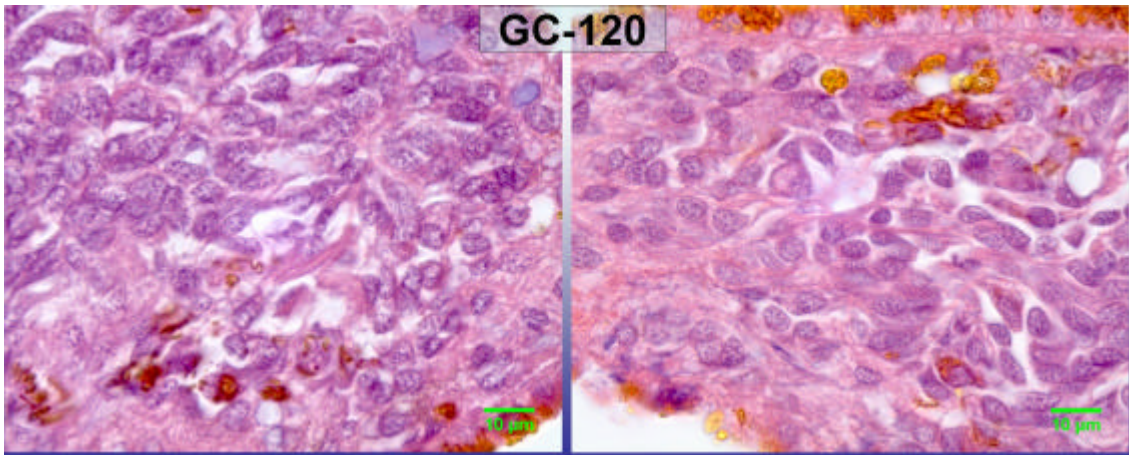


Figura 53– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 120 h (H.E. 100x).

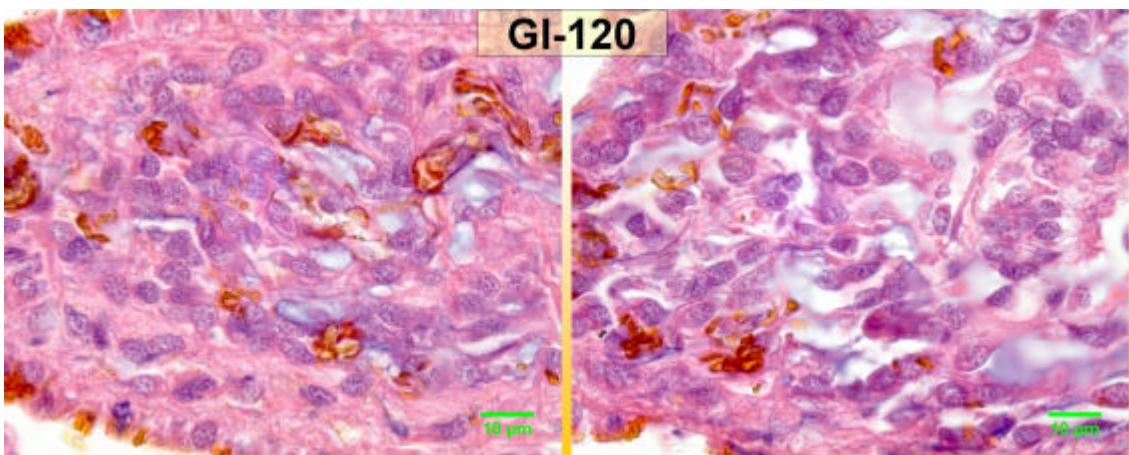


Figura 54 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 120 h (H.E. 100x).

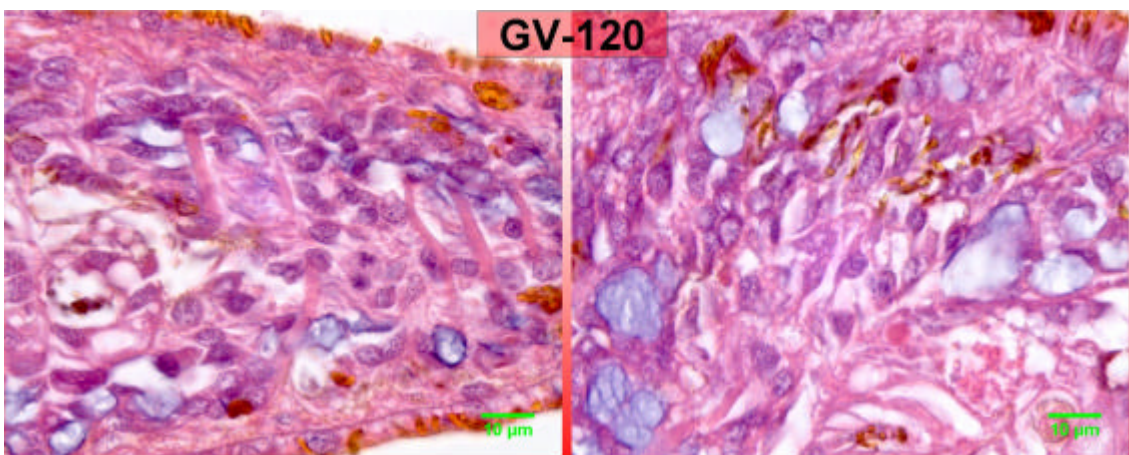


Figura 55 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 120 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 56), GI (Figura 57) e GV (Figura 58) no período experimental 144 h pós-lesão.

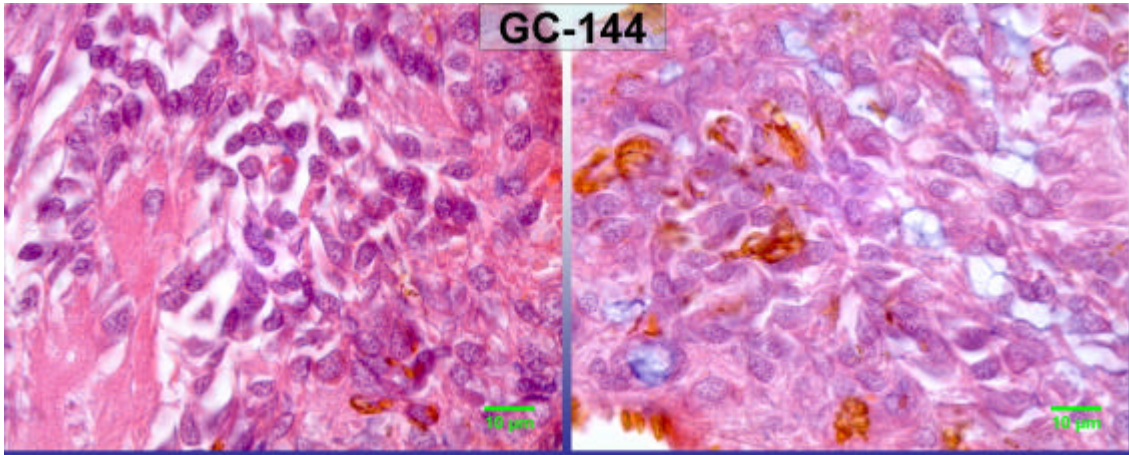


Figura 56– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 144 h (H.E. 100x).

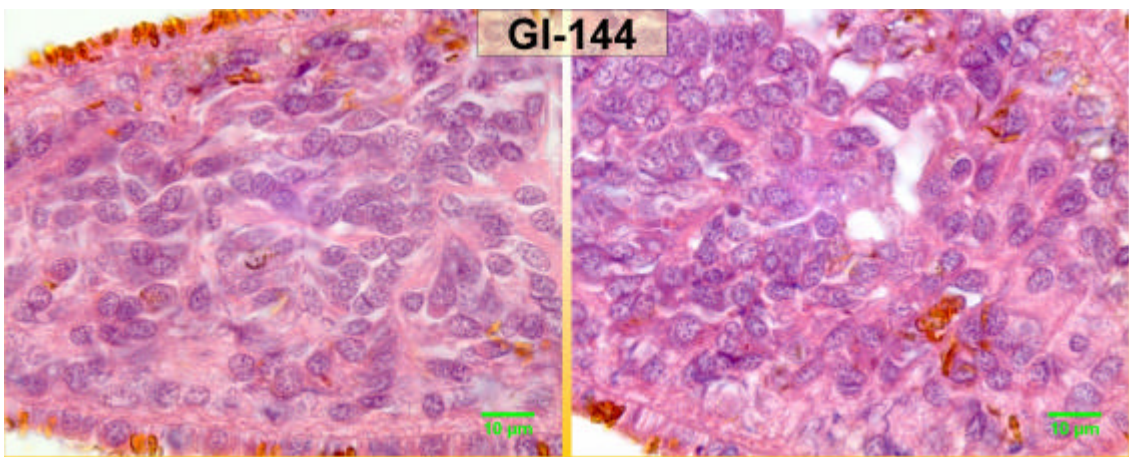


Figura 57 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 144 h (H.E. 100x).

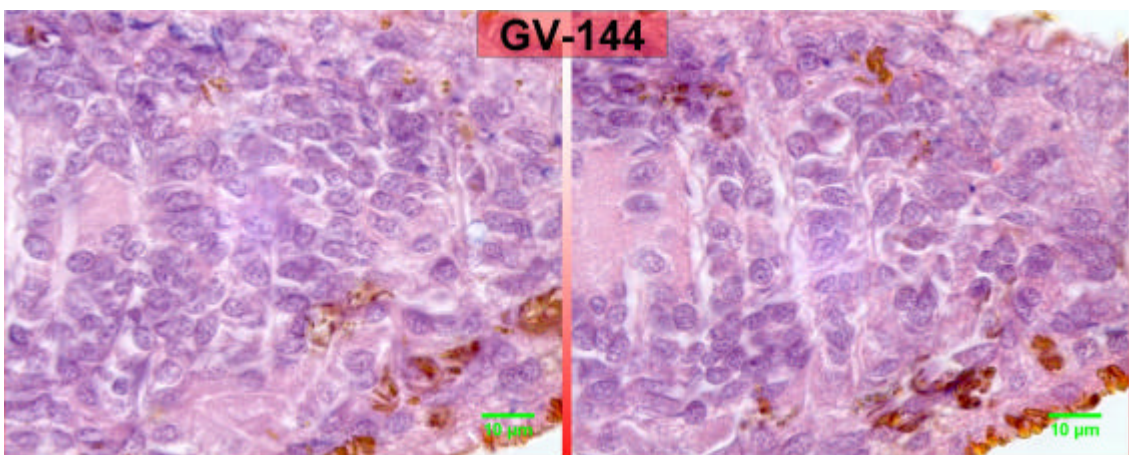


Figura 58 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 144 h (H.E. 100x).

Fotomicrografias dos grupos GC (Figura 59), GI (Figura 60) e GV (Figura 61) no período experimental 168 h pós-lesão.

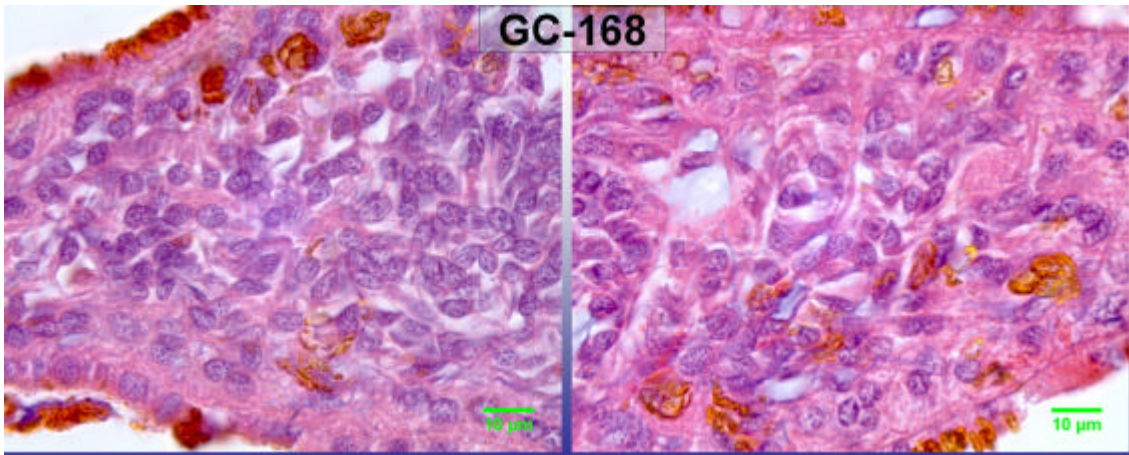


Figura 59– Fotomicrografias representativas do grupo GC no período experimental 168 h (H.E. 100x).

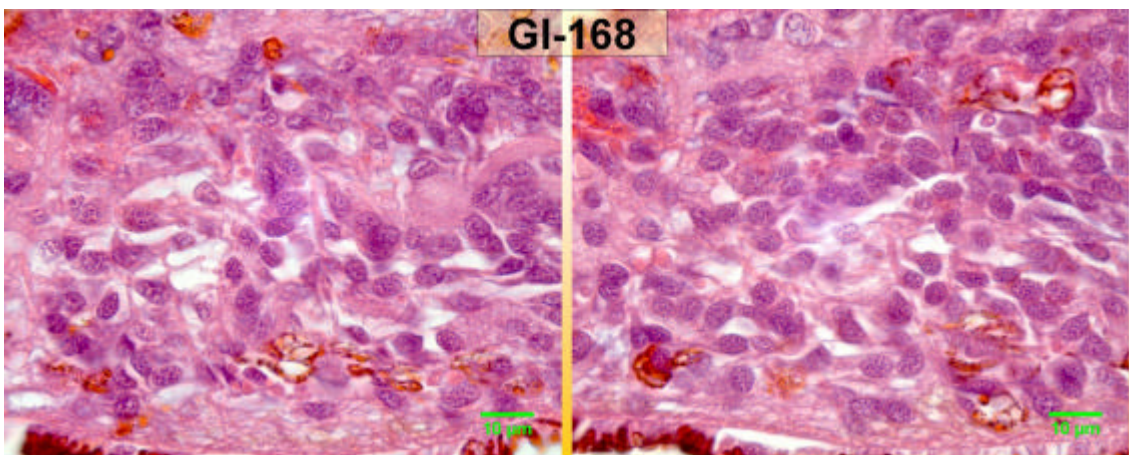


Figura 60 – Fotomicrografias representativas do grupo GI no período experimental 168 h (H.E. 100x).

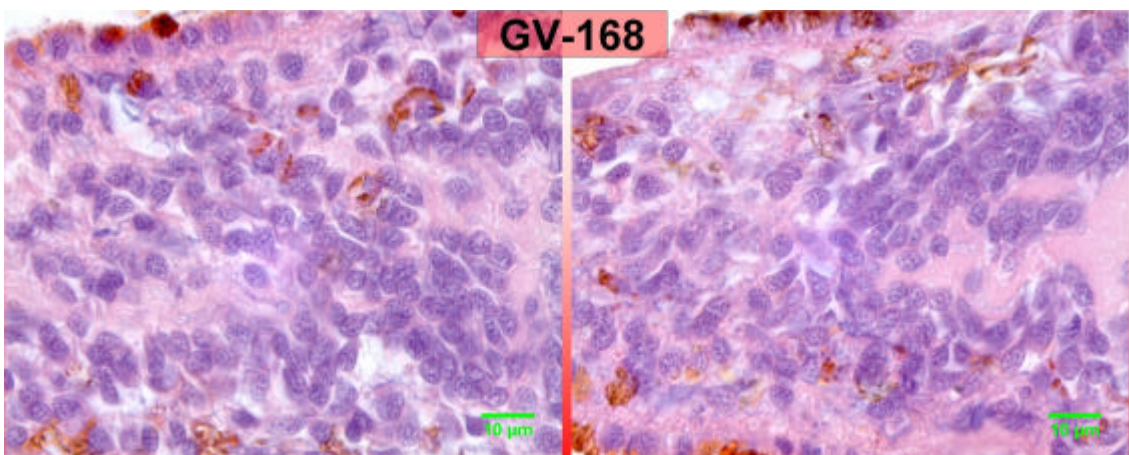


Figura 61 – Fotomicrografias representativas do grupo GV no período experimental 168 h (H.E. 100x).

5.1 Quantificação dos neoblastos

No período experimental 84 h, o gráfico comparativo da densidade de perfis por área dos neoblastos (Q_{Aneo}) entre os grupos GSL, GC, GI e GV (Figura 62), mostrou que o GV foi o grupo que apresentou a maior média de Q_{Aneo} entre todos os outros grupos experimentais (27582 neoblastos/mm²), enquanto os outros grupos apresentaram Q_{Aneo} menores neste mesmo período, 21558 neoblastos/mm² no GC, 20651 neoblastos/mm² no GI e 13172 neoblastos/mm² no grupo GSL. Os outros grupos apresentaram maior Q_{Aneo} médio em momentos distintos. O grupo GC no período experimental 72 h (22186 neoblastos/mm²) e o grupo GI no período experimental 96 h (22393 neoblastos/mm²), mas mesmo assim com valores médios inferiores ao apresentado pelo GV. É interessante observar que a Q_{Aneo} se desenvolve com alguma similaridade, mas em padrões distintos em cada grupo, apresentando vales e picos próximos, mas atrasados ou menos evidentes.

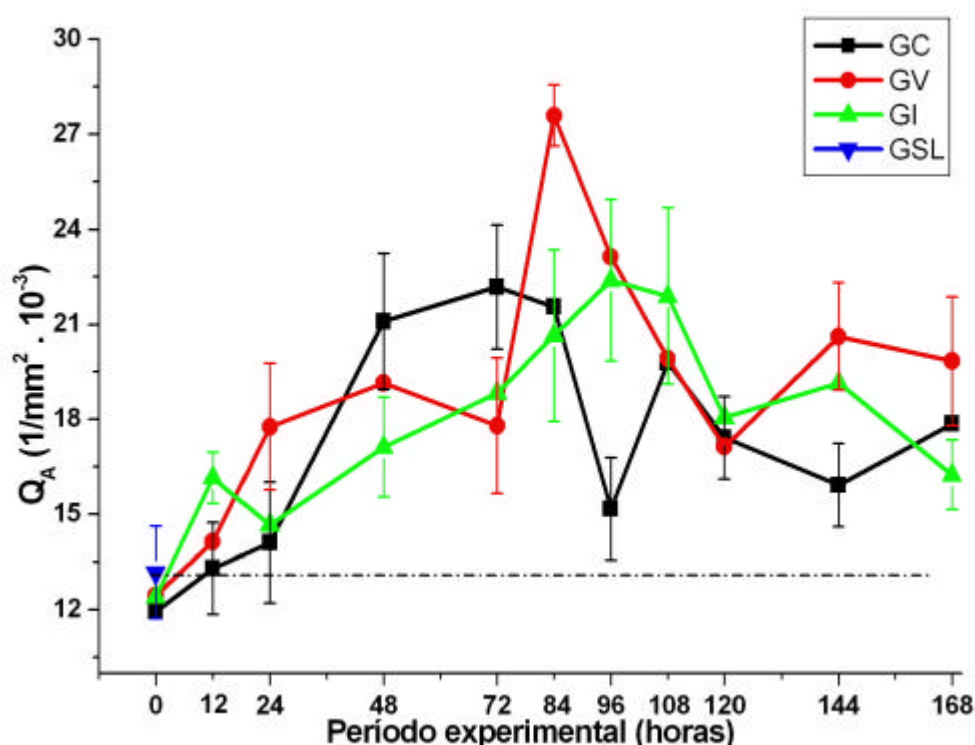


Figura 62 – Densidade de perfis por área dos neoblastos (Q_{Aneo}). A linha pontilhada equivale ao GSL, que é apresentado apenas no período experimental 0 h. As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.

Novamente no período experimental 84 h o gráfico dos grupos que

apresentam a V_V dos neoblastos (V_{Vneo}), o grupo GV (Figura 63) apresentou a maior média percentual volumétrica de neoblastos entre todos os grupos, com 49,52 %. O GC também apresentou maior resultado no mesmo dia (43,93 %), já o grupo GI obteve sua maior média no período experimental 96 h (40,30 %) e o GSL, que novamente serviu como linha base para todos os outros grupos, apresentou 27,93 %.

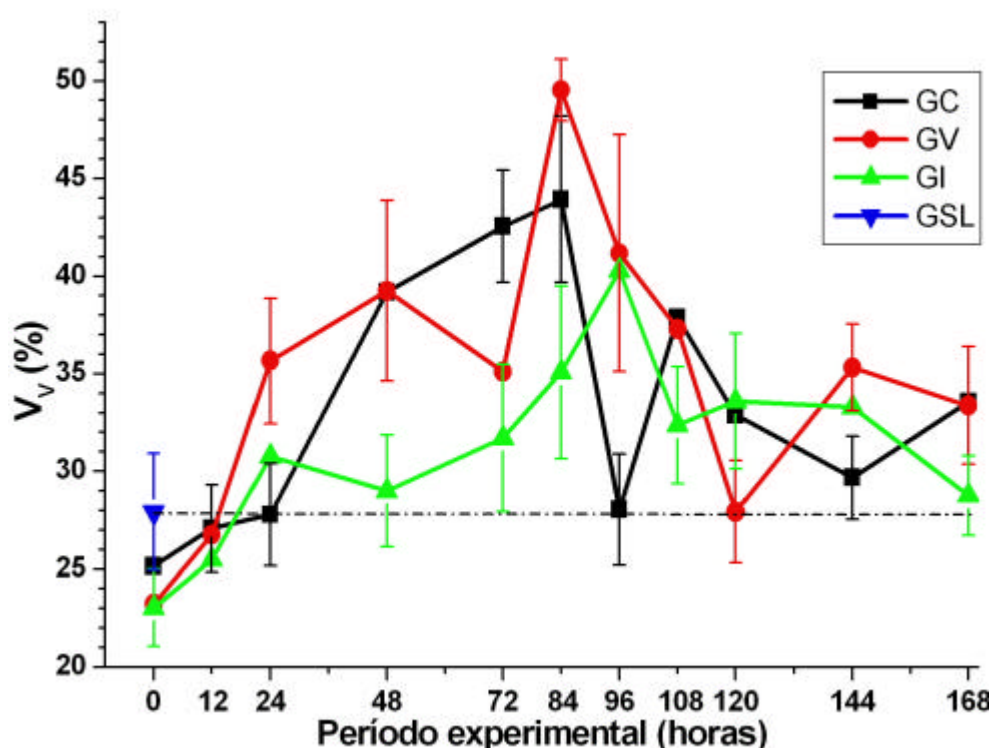


Figura 63 – Densidade volumétrica dos neoblastos (V_{Vneo}). O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.

Como Q_{Aneo} e V_{Vneo} foram utilizados para quantificar uma mesma estrutura (neoblastos), mas com diferentes critérios, através uma relação simples, podemos dividir V_{Vneo} por Q_{Aneo} (V_{Vneo}/Q_{Aneo}) possibilitando de maneira indireta, obter a área ocupada por cada neoblasto, ou seja, o tamanho do perfil de cada um em cada período experimental, como mostrado na Figura 64.

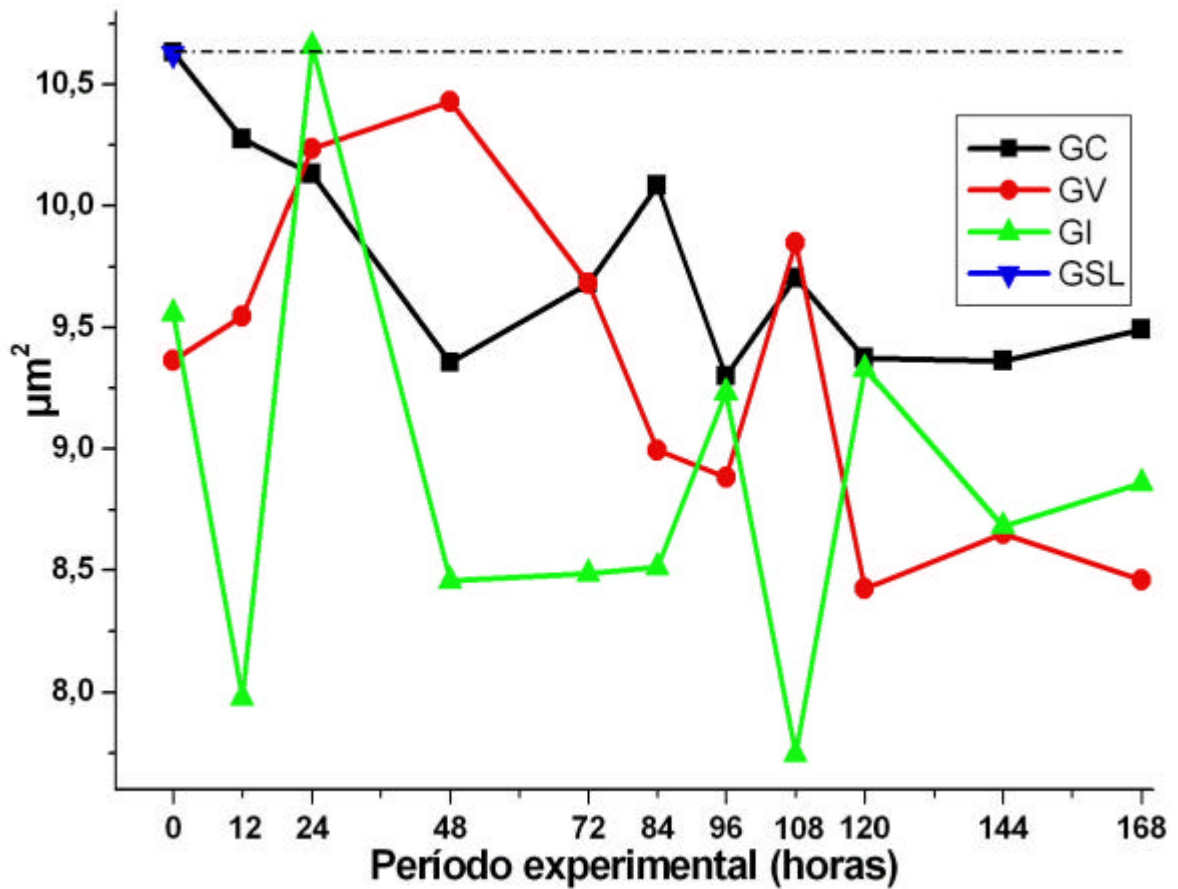


Figura 64 – Relação entre VV_{neo}/QA_{neo} entre os grupos GC, GSL, GV e GI.

5.2 Quantificação das fibras musculares

Na quantificação da V_V das fibras musculares das planárias (V_{Vmus}), todos os resultados são apresentados em um gráfico comparativo (Figura 65). O grupo GV mostrou ser o grupo com valores médios de V_{Vmus} mais variáveis entre os grupos, possuindo seu máximo nos períodos experimentais 0 h (6,67%), 108 h (6,56%) e valores similares para os períodos 48 h e 120 h (5,52% e 5,56% respectivamente), e com valor mínimo no período 72 h (1,44%). Já nos outros grupos, essa variação não foi tão evidente, ficando entre 1,70% (84h) e 5,37% (120 h) para o grupo GC, e entre 2,22% (período 144 h) e 4,59% (período 48 h) do grupo GI. Embora o GV apresentar maior variação no decorrer do experimento, a tendência criada entre os grupos são similares, com vales e picos próximos.

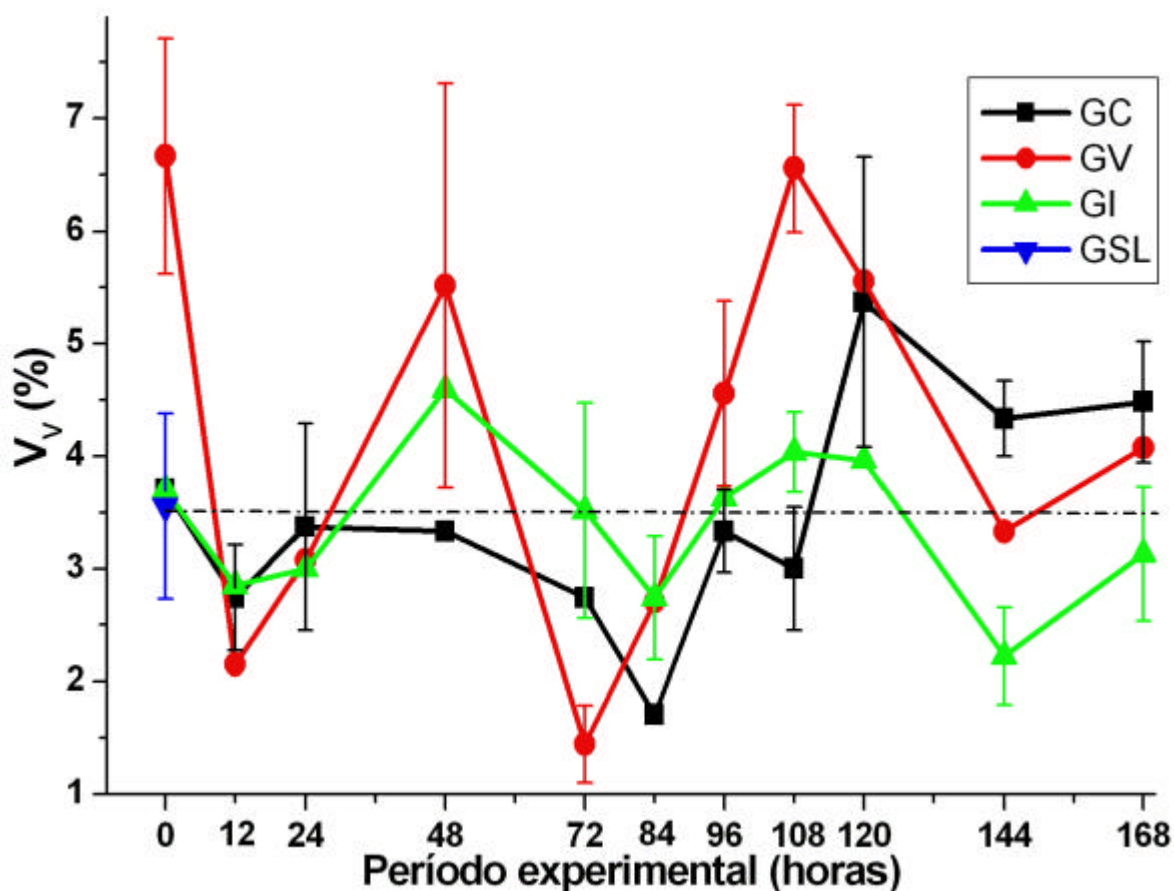


Figura 65 – Densidade volumétrica de fibras musculares. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.

5.3 Quantificação do estroma

A quantificação da V_V do estroma das planárias (V_{Vest}), apontou que esta foi a estrutura com maior volume na maioria das planárias, apresentando um valor médio acima de 50 % na maioria das vezes em todos os grupos e dias (Figura 66), sendo que até mesmo o grupo considerado como linha base, o GSL, apresentou 55,96 % de V_{Vest} .

Nos períodos experimentais 48 h e 84 h, os valores quantificados no GV (Figura 66) apresentaram os valores mais baixos em comparação aos outros grupos, com V_{Vest} 43,70 % e 43,96 % respectivamente. Enquanto o GC apresentou o valor mais alto entre os grupos, no período 0 h, com 63,04 %, e o grupo GI apresentou valores intermediários a estes.

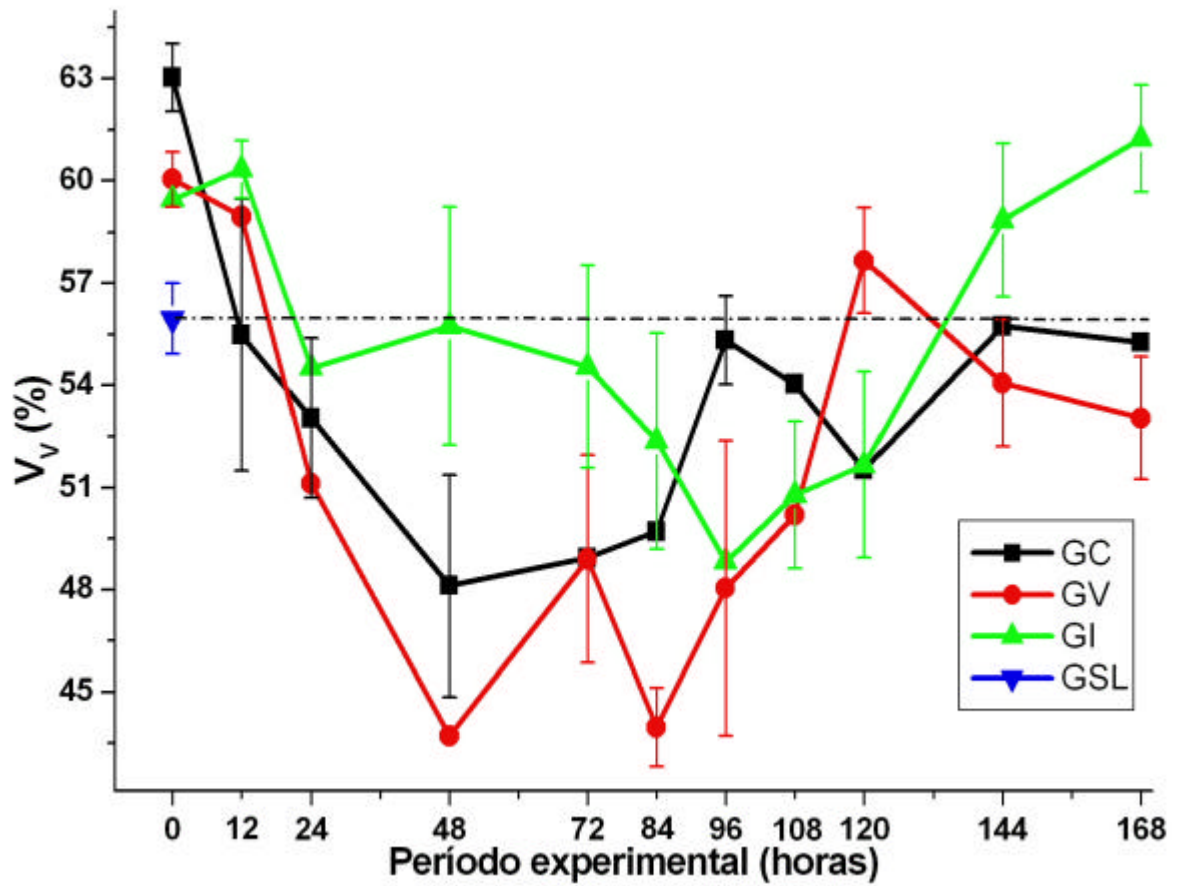


Figura 66 – Densidade volumétrica do estroma entre todos os grupos. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada). As barras de erro dos grupos em alguns períodos experimentais foram omitidas para melhor visualização do gráfico.

6 DISCUSSÃO

Um estudo pioneiro relatado por Souza *et al* [19] em planárias amputadas na região abaixo de suas aurículas e irradiadas com LBP vermelho ($\lambda=685$ nm) mostrou haver diferença importante, comparado ao grupo controle [19]. As doses de radiação utilizadas em nosso estudo foram semelhantes aos do trabalho citado. Entretanto, no que diz respeito aos grupos experimentais com LBP, no presente estudo foram utilizados um laser vermelho, em 680 nm, e outro no infravermelho, em 820 nm. Adicionalmente, foi incluído outro grupo experimental como controle, o GSL.

No presente trabalho, a inclusão de outro grupo laser se deve ao fato de que as respostas apresentadas pelos tecidos em diferentes comprimentos de onda, podem ser diferentes [48], devido às distintas biomoléculas fotoativadas pela absorção de cada comprimento de onda [91]. Assim poderíamos comparar os efeitos diretos entre os dois comprimentos de onda utilizados. O grupo GSL foi utilizado como parâmetro controle, por não sofrer nenhum tipo de agressão.

Os períodos experimentais, primeiramente foram selecionados tendo como base o artigo publicado por Souza *et al* [19], onde foram feitas quantificações de neoblastos ao 4º, 7º e 15º dias. No artigo citado, o grupo GV irradiado com laser ($\lambda=685$ nm) obteve melhor resultado ao quarto dia de experimento (96 h), apresentando contagem superior ao grupo controle, e ao sétimo dia (168 h) a contagem se igualava. Em outro trabalho realizado por Munin *et al* [85], com os mesmos parâmetros utilizados por Souza, [19] mas com períodos experimentais diferentes (24 em 24 horas por três dias), apontou haver um crescimento do número de neoblastos até o terceiro dia (72 horas) de experimento. Colaborando também com a escolha dos períodos de sacrifício, outro trabalho mostra que a atividade mitótica ocorre em períodos muito curtos pós-lesão, entre 4–12 horas e outro pico de atividade entre 48–96 horas [30]. Daí, em nosso trabalho, as quantificações foram realizadas de 24 em 24 horas, com exceção dos grupos do período experimental 12, 84 e 108 horas que foram sacrificados na metade do dia (12 horas), com o primeiro sacrifício ocorrendo justamente após a amputação (0 h).

Todo o experimento foi realizado simultaneamente nos mesmos dias, para se evitar diferenças com origens sazonais e de clima entre os grupos, mesmo todos permanecendo em ambiente com temperatura controlada. Devido ao grande número

de espécimes irradiados no primeiro dia de experimento, além dos animais já fixados em Bouin, se tornou inviável o acréscimo de um grupo no período experimental entre os períodos 0h e 12 h. Portanto o primeiro período experimental viável foi o de 12 horas, sendo praticamente imediato ao término da irradiação de todos os grupos.

Antes do início do experimento, as planárias deixaram de ser alimentadas por uma semana. Foi utilizado o mesmo procedimento utilizado por outros pesquisadores por dois fatos: como os alimentos estimulam a divisão dos neoblastos em planárias, não queríamos que sua alimentação pudesse trazer viés ao trabalho, mascarando os eventuais efeitos da radiação laser e também devido sua lenta digestão, fragmentos de fígado podem ser encontrados até 3 dias após sua alimentação [27].

Segundo Alberts et al [45] para haver divisão celular (mitose) é essencial um aumento da síntese de DNA e RNA, para que ocorra a duplicação deste material genético [44, 45, 46]. Essa síntese ocorre na intérfase, que é uma etapa anterior à mitose, e se subdivide em três fases: o período de intervalo 1 (G_1), o período de síntese (S) e o período de intervalo 2 (G_2). Os aumentos das sínteses de DNA e RNA estão entre os efeitos biológicos causados por alguns lasers, entre eles os utilizados em nosso trabalho [51], além de aumentar a proliferação de células em G_1 [92].

Os picos mitóticos observados nas planárias estão relacionados com as fases da intérfase que os neoblastos se encontram. O primeiro pico mitótico (4 – 12 horas) ocorre por neoblastos que estão na fase G_2 do ciclo mitótico, e o segundo pico mitótico (48 – 96 horas) ocorre devido ao restante dos neoblastos que estão passando pela fase G_1 e S, e posteriormente entrarão em G_2 e em mitose [30, 93].

Em testes experimentais realizados com planárias *Dugesia tigrina*, foi observado microscopicamente que o fixador mais eficaz utilizado foi a solução de Bouin, comparada ao formol e ao líquido de Helly [94].

A espessura dos cortes dos tecidos (3 μm) e a coloração (HE) foram obtidas experimentalmente para atender o objetivo principal do trabalho, o qual se apóia na observação e quantificação do número de neoblastos dos períodos experimentais pré-determinados, atendendo satisfatoriamente ao proposto, além de também permitir a coloração do tecido muscular e do estroma.

As análises foram realizadas por estereologia e nos resultados são sintetizados os contextos apresentados nas fotomicrografias. Além dos benefícios já

conhecidos pela estereologia (reprodutibilidade, rapidez e economia) [85], a quantificação realizada por estereologia, trouxe uma maior padronização na contagem celular, e permitiu que outras análises concomitantes fossem realizadas, como quantificações de outras estruturas além dos neoblastos (Q_{Aneo} e V_{Vneo}), como por exemplo o estroma (V_{Vest}) e fibras musculares (V_{Vmus}), já que inicialmente apenas a quantificação dos neoblastos estava prevista. Além disso, foi possível observar a alteração morfológica (área) nos neoblastos pela relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} .

Dinâmica celular dos tecidos e neoblastos de acordo com o período experimental

Período Experimental 0 hora

Para todos os grupos, Q_{Aneo} e V_{Vneo} apresentam valores semelhantes, embora GSL apresente V_{Vneo} superior aos outros grupos. Como o procedimento de fixação foi imediato à amputação e irradiação, nenhuma diferença foi esperada. Pode ser observado para este período experimental que, na relação entre V_{Vneo}/Q_{Aneo} , houve divisão entre os grupos irradiados (GI e GV) dos grupos não irradiados (GSL e GC), onde se observam que GV e GI apresentaram sua área menor ($9,36 \mu\text{m}^2$ e $9,56 \mu\text{m}^2$, respectivamente) que GSL e GC ($10,63 \mu\text{m}^2$ ambos), sugerindo que o efeito da radiação laser na conformação celular é imediato à sua irradiação.

Segundo Saló e Baguña [30] e Baguña, Saló e Auladell [29], os valores apresentados para a contagem de neoblastos no período experimental 0 hora é inferior ao apresentado pelo período experimental subsequente. O V_{Vest} apresentado pelos grupos GI (59,44 %), GV (60,04 %) e GC (63,04 %) foram respectivamente maiores que GSL (55,96 %). No V_{Vmus} , apenas GV apresentou resultado discrepante do restante dos grupos (6,67 %), enquanto o restante dos grupos apresentaram resultados similares, ficando entre 3,56 % (GSL) e 3,70 % (GI e GC).

Período Experimental 12 horas

Segundo Saló e Baguña [30], 12 horas após a amputação das planárias é o período correspondente ao final do primeiro pico mitótico, e apresenta contagem de neoblastos superior ao da fase inicial (0 h). Nesta fase todos os neoblastos avançam para a fase seguinte da divisão celular, os que se encontram em G_2 , na intérfase, passam a realizar mitose, aumentando o número de neoblastos em cada animal, e no mesmo período os neoblastos que estão em G_1 e S da intérfase, também passam para a fase seguinte, ou seja, os que estão em G_1 passam para a fase S e os que estão em S, passam para G_2 .

Este primeiro pico mitótico mostrado por Saló e Baguña [30], é correlato com os dados observados em nosso estudo, em que é possível observar um aumento na contagem de perfis de neoblastos (Q_{Aneo}) em todos os grupos. O GI apresentou a maior Q_{Aneo} média (16753 neoblastos/mm²), embora tenha apresentado menor V_{Vneo} médio (25,5 %), fazendo com que sua relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} diminuísse para 7,98 μm^2 , sugerindo que, pelo aumento do número de neoblastos, há diminuição do volume celular após a mitose.

O GC apresentou menor Q_{Aneo} médio (13297 neoblastos/mm²), mas apresentou maior V_{Vneo} médio (27,1 %), havendo queda em seu V_{Vneo}/Q_{Aneo} para 10,3 μm^2 .

Os valores apresentados pelo GV ficaram próximos ao GC, tanto em seu Q_{Aneo} médio (14141 neoblastos/mm²) como no V_{Vneo} médio (26,7 %), mas apresentou menor V_{Vneo}/Q_{Aneo} , com 9,55 μm^2 . Portanto, seus valores permaneceram intermediários aos valores dos grupos GI e GC e de modo geral, todos os grupos apresentaram valores muito próximos em V_{Vneo} .

Neste período experimental, todos os grupos mostram maior atividade mitótica que interfásica, com exceção do GV, que parece ter atividades equilibradas, com ligeira predominância da interfásica sobre a mitótica.

Os valores apresentados por V_{Vest} diminuiram no GC (55,5 %), se aproximando da linha base de GSL, enquanto os valores do GI (60,3 %) e GV (59,0 %) se mantiveram no mesmo patamar de antes.

No tecido muscular (V_{Vmusc}) o grupo GV foi o que apresentou maior queda em seus valores e também foi o que apresentou menor V_{Vmusc} (2,15 %), embora próximo dos valores dos outros grupos (GC = 2,74 % e GI = 2,85 %).

Período Experimental 24 horas

Segundo Saló e Baguñà [30] e Baguñà, Saló e Auladell [29], 24 horas após a amputação da planária, ocorre aumento do número de neoblastos referentes ao período inicial (0 hora), mas fica abaixo do primeiro pico mitótico, que se encontra 8 horas após amputação. Após este período ocorre aumento da quantidade de neoblastos. No grupo GI foi possível encontrar maior similaridade com tal fato, pois foi o único que diminuiu sua densidade de neoblastos, mas se mantendo acima do período inicial, enquanto os grupos GC e GV aumentaram sua densidade de neoblastos.

Neste período o grupo GV se destaca por apresentar o maior incremento e a maior Q_{Aneo} (17769 neoblastos/mm²) comparativamente ao período anterior, cerca de 25,6 %. Há também aumento da V_{Vneo} , 35,7 %, fazendo com que V_{Vneo}/Q_{Aneo} aumentasse para 10,2 μm^2 .

Até este período, o aumento apresentado por GC ocorreu linearmente, apresentando 14114 neoblastos/mm², praticamente a mesma Q_{Aneo} apresentada pelo GV no período anterior. Seu V_{Vneo} atingiu o mesmo patamar do GSL, obtendo 27,8 %, assim sua V_{Vneo}/Q_{Aneo} (10,1 μm^2) continua diminuindo linearmente.

Ao contrário dos outros grupos, GI apresentou decréscimo em seu Q_{Aneo} (14671 neoblastos/mm²), mas seu V_{Vneo} continuou aumentando, atingindo 30,8 %, fazendo sua V_{Vneo}/Q_{Aneo} aumentar a 10,7 μm^2 , ou seja, pouco mais de 33,6 %, chegando ao mesmo patamar do GSL.

Na observação dos outros tecidos (V_{Vest} e V_{Vmusc}), neste período experimental não mostram diferenças importantes e acompanham o GC, com queda de V_{Vest} , pelo constatado aumento da área ocupada pelos neoblastos; e aumento de V_{Vmusc} , pela suposta diferenciação neste tecido.

Segundo Junqueira e Carneiro [44] há o aumento do volume celular durante a intérfase e a diminuição após a mitose [45, 46]. Analisando o V_{Vneo}/Q_{Aneo} é sugerido que os grupos GV e GI estão em intérfase, enquanto que o grupo GC se encontra logo após a mitose.

Período Experimental 48 horas

Segundo Saló e Baguñà [30], 48 horas após a amputação das planárias, tem

início o segundo pico mitótico, dado pelos neoblastos que estavam em G₁ e S no momento da amputação (período experimental 0 hora), neoblastos estes que constituíam a maioria numérica no primeiro momento e que passaram para a fase seguinte até chegar à mitose.

Neste período experimental o aumento de Q_{Aneo} mais expressivo é dado pelo GC, com incremento de quase 50 % perante o período anterior, atingindo 21091 neoblastos/mm², coincidindo com o início do segundo pico mitótico, observado por Saló e Baguña [30]. Aumento semelhante também é observado no V_{Vneo}, que atinge 39,2 %, que também é um número expressivo comparado ao período anterior. Ambos os incrementos são proporcionais, fazendo com que a relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} diminua linearmente até este período, atingindo 9,36 μm². O grande aumento de V_{Vneo} e Q_{Aneo}, aliada a diminuição linear de V_{Vneo}/Q_{Aneo}.

O GV apresentou aumentos proporcionais de Q_{Aneo} e V_{Vneo} ante o período anterior, com 19152 neoblastos/mm² e 39,3 %, mantendo a tendência crescente de V_{Vneo}/Q_{Aneo}, atingindo 10,4 μm². Embora houvesse acréscimo de Q_{Aneo} e V_{Vneo}, ocorre a diminuição na relação V_{Vneo}/Q_{Aneo}.

O GI volta a aumentar em Q_{Aneo}, mas fica abaixo dos outros grupos, com 17122 neoblastos/mm², e seu V_{Vneo} diminui pela primeira vez, fazendo com que a relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} diminua para 8,46 μm².

Aqui pela primeira vez V_{Vest} e V_{Vmusc} se afastam, com o GI de V_{Vest} se aproximando da linha do GSL (55,7 %), e GC (48,1 %) e GV (43,7 %) apresentando V_{Vest} menores que 50 % da planária. Os grupos irradiados obtiveram maiores V_{Vmusc} (GI = 4,59 % e GV = 5,52 %), sugerindo o aumento da diferenciação dos neoblastos em tecido muscular perante o GC (3,33 %).

Devido a diminuição do V_{Vneo}/Q_{Aneo} em todos os grupos, é sugerido que esta redução tenha relação com o aumento de neoblastos que se encontram ao início da interfase, logo após a mitose, devido a diferença de volume celular, já que de acordo com Junqueira e Carneiro [44], Alberts et al [45] e Schrank et al [46] há o aumento do volume celular durante a intérfase e a diminuição após a mitose

Período Experimental 72 horas

Segundo Saló e Baguña [30], este período experimental (72 h) corresponde ao ápice do segundo pico mitótico, corroborando com os resultados do grupo GC

para este período experimental, já que GC apresenta seu maior Q_{Aneo} entre todos os períodos experimentais.

O GC descreve um incremento muito menor do Q_{Aneo} comparando o crescimento do período experimental 24 h para o 48 h, indicando uma redução da atividade mitótica, mantendo um Q_{Aneo} próximo do período anterior, embora mais elevado, apresentando 22186 neoblastos/mm², que foi a maior contagem apresentada por todos os períodos experimentais do GC. Também houve crescimento de V_{Vneo} (42,6 %), explicado pelo maior número de Q_{Aneo} apresentado. Aqui a relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} (9,70 μm^2) chama a atenção por ser a primeira vez, desde o primeiro período experimental, que esta razão inverte a tendência de decréscimo. O aumento verificado nos quantificadores de neoblastos (V_{Vneo} e Q_{Aneo}), é acompanhado da redução de V_{Vmusc} e aumento inexpressivo de V_{Vest} .

Até este período experimental, o GV mostrou dar sinais de ter alcançado uma saturação na atividade mitótica, já que os valores de Q_{Aneo} (17796 neoblastos/mm²), V_{Vneo} (35,1 %) e de V_{Vneo}/Q_{Aneo} (9,70 μm^2) diminuíram após sutil aumento do período de 24 h a 48 h. Outro motivo pelo qual os quantificadores de neoblastos (V_{Vneo} e Q_{Aneo}) tenham reduzido, é devido ao aumento de V_{Vest} . Por outro lado, V_{Vmusc} , apresentou o menor resultado do GV, com 1,44 %.

No GI, houve crescimento proporcional de Q_{Aneo} dos períodos experimentais 24 h para o 48 h, e do 48 h para o 72 h (18828 neoblastos/mm²), portanto um crescimento linear. Já V_{Vneo} aumenta para 31,7 %, ante a um decréscimo do período anterior, fazendo com que este crescimento seja proporcional, segundo a relação, em que o resultado apresentado neste período é praticamente igual ao do período anterior (8,49 μm^2). Neste período também, houve uma pequena diminuição de todos os outros indicadores.

Segundo Junqueira e Carneiro [44] Alberts et al [45] e Schrank et al [46] a variação do volume celular é devido ao estágio do ciclo celular ao qual a célula se encontra. O grupos GV e GC apresentaram V_{Vneo}/Q_{Aneo} semelhantes, mas para isso os valores de GV reduziram, enquanto os de GC aumentaram. O grupo GI apresentou valor semelhante ao período anterior.

Período Experimental 84 horas

Segundo Saló e Baguña [30], o período experimental 84 h corresponde às 12 horas finais preconizadas para o último pico mitótico, que se finaliza ao 4^o dia.

O GC apresenta divergência entre Q_{Aneo} e V_{Vneo} , já que Q_{Aneo} diminui para 21558 neoblastos/mm², enquanto V_{Vneo} aumenta para 43,9 %, fazendo com que a relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} aumente linearmente para 10,1 μm^2 . Analisando V_{Vest} e V_{Vmusc} deste grupo, há diminuição de V_{Vmusc} (1,70 %) e pouco aumento de V_{Vest} (49,70 %), que fica bem próximo do mínimo atingido pelo grupo no período experimental 48 h.

Após a formação de um ponto de saturação na atividade mitótica do GV, neste período experimental há acentuado aumento de Q_{Aneo} , atingindo 27582 neoblastos/mm², um incremento de 55 % frente ao período anterior, sendo o maior valor observado entre todos os grupos em qualquer período experimental, tal como o valor apresentado por V_{Vneo} (49,5 %). Estes valores fizeram com que V_{Vneo}/Q_{Aneo} diminuísse para 8,99 μm^2 . Os reduzidos valores obtidos por V_{Vest} (44,0 %) mostram que o espaço ocupado pelos neoblastos foi elevado, já que estes foram os menores valores apresentados por GC nos períodos experimentais, mesmo o valor de V_{Vmusc} (4,56 %) aumentando e sugerindo um possível aumento na diferenciação de neoblastos em tecido muscular.

O pico mitótico de neoblastos apresentado pelo grupo GV se apresentou atrasado em relação ao grupo GC e também ao apresentado por Saló e Baguña [30], mas foi evidenciado com valores bem acima destes. Segundo Vink et al [*109], a radiação vermelha causa maior proliferação celular de fibroblastos que culturas sem nenhuma radiação, sugerindo haver efeito similar em neoblastos.

O grupo GI permaneceu com aumento linear de Q_{Aneo} e V_{Vneo} , mas inferior ao grupo GV, atingindo 20651 neoblastos/mm² e 35,1 % respectivamente, mantendo V_{Vneo}/Q_{Aneo} praticamente inalterado e igual aos dois períodos anteriores. Os resultados apresentados por V_{Vest} e V_{Vmusc} , mostram que os espaços vem sendo ocupados por neoblastos, já que todos esses valores diminuem conforme V_{Vneo} aumenta.

Período Experimental 96 horas

Segundo Saló e Bagaña [30], este é período experimental ao qual finaliza o segundo e último pico mitótico dos neoblastos das planárias, com provável redução de Q_{Aneo} frente ao seu pico máximo.

O GC apresenta forte queda tanto em seu Q_{Aneo} como em seu V_{Vneo} , apresentando respectivamente 15174 neoblastos/mm² e 28 %, ou seja, uma redução de quase 30 % no Q_{Aneo} e com V_{Vneo} chegando ao mesmo nível que GSL, causando também a redução de V_{Vneo}/Q_{Aneo} para 9,30 μm^2 , chegando próximo ao valor dos outros grupos no mesmo período. A expressiva queda nestes indicadores é também resultado do aumento de V_{Vest} e V_{Vmusc} , chegando próximos da linha base de GSL. Com referência ao período anterior, houve aumento do V_{Vmusc} de quase 96 %, sugerindo aumento da diferenciação em tecido muscular.

Após apresentar elevado aumento de Q_{Aneo} e V_{Vneo} no período passado, o GV apresenta redução em ambos, com Q_{Aneo} permanecendo em 23138 neoblastos/mm² e V_{Vneo} em 41,2 %. Embora haja redução de Q_{Aneo} , esta permanece pouco superior aos maiores resultados apresentados pelos grupos GC (72 h) e GI (96 h). A relação V_{Vneo}/Q_{Aneo} se manteve praticamente igual à do período anterior, sugerindo que a queda dos valores dos neoblastos foi proporcional, ou seja, V_{Vneo} diminuiu devido ao valor de Q_{Aneo} , e que as atividades mitóticas e interfásicas permanecem elevadas. Outro motivo que levou a esta diminuição, é sugerido pelo aumento dos valores de V_{Vest} e V_{Vmusc} , onde o valor apresentado por V_{Vmusc} (4,56 %) chama a atenção para um possível aumento da diferenciação de neoblastos em tecido muscular.

Os resultados apresentados pelos grupos GC e GV neste período experimental, corroboram com os apresentados por Souza et al [19] durante o mesmo intervalo de tempo. Mesmo com métodos quantitativos diferentes, o GV apresentou maior resultado. Foram utilizadas as mesmas doses de radiação laser em ambos os trabalhos.

Mais uma vez, o GI mantém seu crescimento Q_{Aneo} linear desde o período 24 h, atingindo agora seu máximo resultado, 22393 neoblastos/mm², resultado próximo ao máximo de GC, mas com 24 h de atraso. Já o resultado apresentado por V_{Vneo} é um pouco mais agudo e atinge 40,3 %, fazendo com que a V_{Vneo}/Q_{Aneo} suba para 9,23 μm^2 , e se aproxime dos dois outros grupos, dando sinais da intérfase

ficar mais evidente, embora com elevada atividade mitótica. A $V_{V\text{musc}}$ também se eleva, chegando ao mesmo nível do período 72 h e do GSL, sugerindo aumento da diferenciação em tecido muscular. Já o $V_{V\text{est}}$ reduziu chegando a seu menor valor entre todos os períodos do GI.

O grupo GI apresenta sua máxima resposta proliferativa atrasada para os valores de $Q_{A\text{neo}}$, em relação aos grupos GV e GC. Este atraso pode estar relacionado às alterações que a radiação infravermelha causa no ciclo celular, como a maior permanência das células em G_1 , tal como Mognato et al [62] afirma. Este pico apresentado por GI, pode estar relacionado com este atraso durante o ciclo celular.

Período Experimental 108 horas

Após redução no GC, $Q_{A\text{neo}}$ volta a subir aproximadamente 30% sobre o período anterior, chegando a 19807 neoblastos/mm². O valor de $V_{V\text{neo}}$ também volta a aumentar, chegando a 37,9 % fazendo com que o valor apresentado por $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$ também se eleve para 9,70 μm^2 frente ao período anterior. Talvez os valores de $V_{V\text{neo}}$ e $Q_{A\text{neo}}$ não teriam incrementos tão elevados neste período, como já discutido sobre este grupo no período experimental anterior. Houve também leve redução de $V_{V\text{est}}$ (54,0 %) e $V_{V\text{musc}}$ (3 %).

O GV apresentou valores similares ao grupo GC nas quantificações dos neoblastos, apresentando $Q_{A\text{neo}}$ de 19917 neoblastos/mm², $V_{V\text{neo}}$ de 37,3 % e $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$ de 9,85 μm^2 . Os valores de $Q_{A\text{neo}}$ e $V_{V\text{neo}}$ apresentaram decaimentos lineares desde o período 84 h, o que é também observado pelo aumento de $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$. Houve grande aumento de $V_{V\text{est}}$ (50,2 %) e $V_{V\text{musc}}$ (6,56 %), sugerindo por este último que a diferenciação em tecido muscular tenha aumentado, chegando no mesmo patamar que este grupo se encontrava em 0 h, ou seja, o maior valor entre todos os períodos de todos os grupos.

O GI mostra sinais de estagnação mitótica, mantendo sua $Q_{A\text{neo}}$ (21899 neoblastos/mm²) no mesmo nível do período anterior, e com o maior resultado entre todos os grupos neste período. Devido a diminuição de $V_{V\text{neo}}$ (32,4 %), e a redução para 7,75 μm^2 de $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$, que foi o menor valor obtido entre todos os grupos em todos os períodos. Os valores de $V_{V\text{musc}}$ e $V_{V\text{est}}$ obtiveram leve aumento, com $V_{V\text{musc}}$ atingindo seu segundo maior valor, sugerindo

a manutenção da diferenciação de neoblastos em tecido muscular.

Período Experimental 120 horas

Neste período experimental ocorre um fato interessante com Q_{Aneo} , em que os valores apresentados por GV, GI e GC são similares, fato observado apenas no período 0h até então. Os valores desses três grupos reduziram frente ao período anterior, apresentando: GC – 17419 neoblastos/mm²; GV – 17149 neoblastos/mm²; e GI 18065 neoblastos/mm². Já nos valores apresentados por V_{Vneo} , apenas GC (32,9 %) e GI (33,6 %) apresentaram valores similares, enquanto GV apresentou 27,9 %. Esta mesma situação foi observada em V_{Vneo}/Q_{Aneo} , onde os valores de GC (9,37 μm^2) e GI (9,33 μm^2) ficaram próximos, enquanto houve menor valor apresentado por GV (8,43 μm^2).

Em V_{Vest} os valores de GC (51,5 %) e GI (51,7 %) ficaram mais próximos que o GV (57,7 %).

Em V_{Vmusc} , GI manteve valor similar desde o período 96 h, enquanto que, depois de uma acentuada elevação em GC (5,37 %) e uma leve queda de GV (5,56 %), os dois grupos apresentaram valores similares.

Período Experimental 144 horas

Após aproximação dos valores de Q_{Aneo} no período anterior, os valores voltam a se afastar, com o aumento de GV para 20624 neoblastos/mm², de GI para 19152 neoblastos/mm² e a diminuição de GC para 15919 neoblastos/mm². Essa mesma descentralização de valores ocorreu em V_{Vneo} , onde GV apresentou o valor de 35,3 %, GI 33,3 % e GC 29,7 %, deixando os grupos irradiados com valores mais elevados. Os valores de V_{Vneo}/Q_{Aneo} dos grupos irradiados se apresentaram similares, GV com 8,65 μm^2 e GI com 8,68 μm^2 , enquanto o GC apresentou resultado maior, 9,36 μm^2 .

Observando o GC, seu V_{Vest} subiu ao mesmo patamar do GSL. Já seu V_{Vmusc} apresentou redução, chegando a 4,33 %, que é seu segundo maior resultado, juntamente com o período seguinte, sugerindo diferenciação de neoblastos em tecido muscular.

Em V_{Vest} de GV, o valor apresentado diminuiu para 54,1 %, valor pouco

abaixo da linha base do GSL. A queda apresentada por $V_{V\text{musc}}$ foi mais acentuada, chegando a 3,33 %, valor próximo ao GSL, sugerindo diminuição da diferenciação dos neoblastos em tecido muscular.

O GI elevou seu valor de $V_{V\text{est}}$ para acima de GSL, obtendo 58,9 % chegando próximo de seu valor inicial em 0 h. Os valores de $V_{V\text{musc}}$ (2,22 %) foram os menores obtidos por este grupo entre todos os períodos experimentais, apontando, como nos outros grupos e principalmente pelo GV, acentuada redução na diferenciação de neoblastos em tecido muscular.

Período Experimental 168 horas

Os resultados de $Q_{A\text{neo}}$ observados nos grupos deste período foram superiores aos do período inicial (0 h). No GC o valor chegou a 17868 neoblastos/mm², resultado quase 50 % superior sobre o de 0 h; o GV apresentou 19843 neoblastos/mm², resultado quase 60 % superior ao de 0 h; e GI apresentou 16247 neoblastos/mm², resultado 30 % superior ao de 0 h. Os resultados de $V_{V\text{neo}}$ apresentaram proporcionalidade ao $Q_{A\text{neo}}$, mas com GC e GV apresentando valores similares (33,6 % e 33,4 %, respectivamente) e maiores que GI (28,8 %). Estes valores, mantiveram a $V_{V\text{neo}}/Q_{A\text{neo}}$ com valores similares ao período anterior, com GC apresentando 9,50 μm^2 , GV 8,46 μm^2 e GI 8,86 μm^2 ; sugerindo uma estabilização das atividades celulares.

Na observação de $V_{V\text{est}}$, o grupo GI foi o que apresentou resultado mais próximo de seu período inicial, com 61,2 %, enquanto o GC finalizou o período experimental com abaixo do inicial (0 hora), com 55,3 %, e GV finalizou com 53,0 %, também abaixo do período inicial.

Nos resultados observados de $V_{V\text{musc}}$, o GI foi novamente o grupo que mais se aproximou do período inicial, apresentando 3,13 %; seguido respectivamente por GC (4,48 %) e GV (4,07 %). Embora GI tenha apresentado o resultado mais aproximado do período inicial, ele ficou menor, da mesma maneira que o GV, sendo GC o único com resultado superior ao inicial.

Em linhas gerais, os resultados obtidos neste período foram diferentes dos encontrados no período inicial (0 h), pois os animais ainda se encontram em remodelamento, e voltam a seu estado normal em duas ou três semanas [2, 37, 38].

Os resultados neste período deveriam ficar acima do período inicial, já que as planárias envolvidas neste experimento permaneceram sete dias sem alimentação, e quando as planárias se encontram nesta situação, há uma diminuição alométrica de sua quantidade de células, [43, 27] e com sua amputação e também pela irradiação laser, há proliferação celular.

7 CONCLUSÃO

A estereologia se mostrou eficaz como método morfométrico nas análises realizadas, possibilitando observar que com os resultados obtidos foram notados comportamentos diferentes entre todos os grupos, inclusive entre os grupos irradiados por diferentes comprimentos de onda (680 nm e 820 nm). Esses resultados mostram haver efeitos na proliferação e morfologia celular, decorrentes de mecanismos físico-químicos não abordados na metodologia e objetivos do presente trabalho.

Os períodos de máxima resposta proliferativa são descritos nos resultados pela contagem de perfis por área (Q_A). O GC apresentou o máximo de Q_A nos períodos experimentais 48, 72 e 84 horas. O grupo irradiado pelo laser vermelho (GV) apresentou seu maior Q_A no período experimental 84 h, reduzindo no período seguinte (96 h), mas ainda assim foram os maiores resultados apresentados entre todos os períodos experimentais de todos os grupos. Para o grupo GI, o máximo de Q_A ficou entre 96 h e 108 h, sendo este o grupo que apresentou a sua máxima quantificação atrasado em relação aos outros grupos.

Os maiores resultados entre todos os grupos foram apresentados pelo grupo GV, enquanto GI e GC apresentaram valores máximos comparáveis, ocorrendo, porém em períodos distintos.

REFERÊNCIAS

1. LAFAILLE, R.; FULDER, S. **Towards a New Science of Health**. London: Routledge, 1993.
2. BECKER, R.O.; SELDEN, G. **The body electric—Eletromagnetism and the foundation of life**. New York: Morrow. Ed. Quill. 1985.
3. BJORDAL, J.M.; JOHNSON, M.I.; COUPPE, C. Physiological events in the repair of soft-tissue injuries. In: _____. **Clinical electrotherapy: Your guide to optimal treatment**. Norway: Norwegian academic press. 2001. p. 39-44.
4. RATHER, L.J. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. **Bull N Y Acad Med.** v.47, n.3, p.303–322. March,1971.
5. WEINEKC, J. Idade e esporte. In: _____. **Biologia do Esporte**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2005. Parte VI.
6. DAVENPORT, R.J. What do we know? What controls organ regeneration? **Science**, v. 309, p. 84, 2005.
7. TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, p.836-847, 2004.
8. PROMETHEUS. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Prometheus>> Acesso em: 14 jan. 2008.
9. SOUZA, M.H.L.; ELIAS, D.O. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. In: _____. **Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Centro de Estudos Alfa Rio – Perfusion Line. 2005. Cap. 3.
10. SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal brasileiro de Neurocirurgia**, v.16, n.1, p.13-19, 2005.
11. WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v.116, p.639–648, 2004.
12. ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, v.18, n.51, p. 247-256, 2004.
13. VIEIRA, I. [entrevista]. **Presidente do STF considera normais reações como a da Igreja contra células-tronco**. Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2008/03/05/materia.2008-03-05.8377363307/view>>. Acesso em 2 de jun 2008.
14. ZATZ, M. [entrevista]: É preciso salvar vidas. **Veja São Paulo**, v.41, n. 2050, p. 11, 14-15, 5 março de 2008.
15. JUNGSMANN, M. [entrevista]. **Celso de Mello vota pela liberação de pesquisas com células-tronco**. Disponível em: <<http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2008/05/29/materia.2008-05-29.2318905378/view>>. Acesso em: 30 maio 2008.

16. STEM CELL Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cells>. Acesso em: 15 jan. 2008.
17. BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 4. ed. São Paulo: Roca, 1990. p. 199-256.
18. SALÓ, E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). **BioEssays**, v.28, p. 546–559, 2006.
19. SOUZA, S.C.; MUNIN, E.; ALVES, L.P.; SALGADO, M.A.C.; PACHECO, M.T.T. Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.80, p. 203–207, 2005.
20. CEBRIÀ, F.; VISPO, M.; NEWMARK, P.; BUENO, D.; ROMERO, R. Myocyte differentiation and body wall muscle regeneration in the planarian *Giardia tigrina*. **Development Genes and Evolution**, v. 207, p.306–316, 1997.
21. INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM – ITIS. **Dugesia tigrina**. Disponível em: <http://www.cbif.gc.ca/pls/itisca/taxastep?king=Animalia&p_action=containing&taxa=dugesia+tigrina&p_format=&p_ifx=cria&p_lang=pt> . Acesso em 5 nov 2007.
22. NEWMARK, P.A.; ALVARADO, A.S. Regeneration in Planaria. In: ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. London: Nature Publishing Group, 2001. p.1-7
23. SARNAT, H.B.; NETSKY, M.G. The brain of planarian as the ancestor of the human brain. **Canadian journal of neurological sciences**, v.12, p.296–302, 1985.
24. ALVARADO, A.S. The case for comparative regeneration: Learning from simpler organisms how to make new parts from old. **E-Biomed**, v.1, p. 31-36, 2000.
25. PETER, P.; GSCHWENTNER, R.; SCHÜRMAN, W.; RIEGER, R.M.; LADURNER, P. The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. **Journal of Applied Biomedicine**, v.2, p. 21–35, 2004.
26. HAYASHI, T.; ASAMI, M.; HIGUCHI, S.; SHIBATA N.; AGATA, K. Isolation of planarian X-ray-sensitive stem cells by fluorescence-activated cell sorting. **Develop. Growth Differ.**, v.48, p.371–380, 2006.
27. BAGUÑÀ, J.; ROMERO, R. Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. **Hydrobiologia**, v.84, p. 181-194. 1981.
28. NEWMARK, P.A.; ALVARADO, A.S. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. **Nature reviews & genetics**, v.3, p.210-219, 2002.
29. DASHEIFF, B.D.; DASHEIFF, R.M. Photonegative Response in Brown Planaria (*Dugesia tigrina*) Following Regeneration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.196-199, 2002.
30. SALÓ, E.; BAGUÑÀ, J. Regeneration and pattern formation in planarians: I. The

- pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia (G) tigrina*, and new proposal for blastema formation. **Journal of embryology and experimental morphology**, v.83, p. 63-80, 1984.
31. BAGUÑÀ, J.; SALÓ, E.; AULADELL, C. Regeneration and pattern formation in planarians. III. Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. **Development**, v.107, p.77-86, 1989.
 32. REDDIEN, P.W.; BERMANGE, A. L.; MURFITT, K. J. JENNINGS, J. R.; ALVARADO, A. S. Identification of Genes Needed for Regeneration, Stem Cell Function, and Tissue Homeostasis by Systematic Gene Perturbation in Planaria. **Developmental Cell**, v.8, p. 635–649, 2005.
 33. SALÓ, E.; BAGUÑÀ, J. Regeneration and pattern formation in planarians: II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. **Development**, v.107, p.69-76, 1989.
 34. ALVARADO, A.S.; NEWMARK, P.A. The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, p.413-420, 1998.
 35. REDDIEN, P.W.; ALVARADO, A.S. Fundamentals of planarian regeneration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p.725–57, 2004.
 36. INOUE, T.; KUMAMOTO, H.; OKAMOTO, K.; UMESONO, Y.; SAKAI, M.; ALVARADO, A.S.; AGATA, K. Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. **Zoological Science**, v.21, p.275-283, 2004.
 37. ALVARADO, A.S. Regeneration in metazoans: Why does it happen? **BioEssays**. v.22, n.6, p. 578-590. 2000.
 38. BOWEN, I.D.; DEN HOLLANDER, J.E.; LEWIS, G.H. Cell death and acid phosphatase activity in the regenerating planarian *Polycelis tenuis* Iijima. **Differentiation**, v.21, n.3, p.160-7, 1982.
 39. ALVARADO, A.S.; NEWMARK, P.A. Regeneration and scientific terminology. (Correspondence). **BioEssays**, v.9, n. 6, p. 535, 1997.
 40. AGATA, K.; SAITO, Y.; NAKAJIMA, E. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. **Develop. Growth Differ.**, v.49, p.73–77, 2007.
 41. ROMERO, R.; BUENO, D. Disto-proximal regional determination and intercalary regeneration in planarians, revealed by retinoic acid induced disruption of regeneration. **Int. J. Dev. Biol.**, v.45, p. 669-673, 2001.
 42. ALVARADO, A.S.; NEWMARK, P.A.; ROBB, S.M.C.; JUSTE, R. The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. **Development** . v.129, p.5659 - 5665. 2002
 43. OVIEDO, N.J.; NEWMARK, P.A.; ALVARADO, A.S. Allometric Scaling and Proportion Regulation in the Freshwater Planarian *Schmidtea mediterranea*. **Developmental dynamics**, v.226, p.326–333, 2003.
 44. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
 45. ALBERTS, B.; BRAY, D. LEWIS, J. JOHNSON, A. RAFF, M. ROBERTS, K.

- WALTER, P HOPKIN, K. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2007.
46. SCHRANK, A.; FERREIRA, H.B.; SCHRANK, I.S.; RODRIGUES, J.J.S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R.; RAUPP, R.M.; SILVA, S.C.; GAIESKY, V.L.V.; ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. 3. ed . Porto alegre: Mercado aberto, 2003.
 47. CSELE, M. **Fundamentals of light sources and lasers**. New Jersey: Wiley-Interscience. 2004.
 48. REDDY, G.K. Comparison of the Photostimulatory Effects of Visible He-Ne and Infrared Ga-As Lasers on Healing impaired Diabetic Rat Wounds. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.33, p.344–351, 2003.
 49. APOLLO - Apache Point Observatory Lunar Laser-ranging Operation. Disponível em <<http://physics.ucsd.edu/~tmurphy/apollo/>>. Acesso em 18 fev 2008.
 50. KOLÁROVÁ, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of laser light into the skin in vitro. **Lasers in surgery and medicine**, v. 24, p. 231-235, 1999.
 51. LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LAVIE, R. Photobiostimulation as a function of diferent wavelengths. *Laser therapy*. v.12, p.38-41. 2000.
 52. KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Eletronics**, v. 23, n. 10, p. 1703- 1717, 1987.
 53. KARU, T. Basics of the action of monochromatic visible and near IR (laser) radition on cells. 2hd International Conference on Bioeletromagnetism. Fev, Melbourne, Austrália, 1998.
 54. GRECO, M.; VACCA, R.A.; MORO, L.; PERLINO, E.; PETRAGALLO, V.A.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. Helium-Neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and stimulate c-fos expression in Ca²⁺-dependent manner. **Lasers in surgery and medicine**, v.29, p.433-441, 2001.
 55. VLADIMIROV, Yu. A.; OSIPOV, A.N.; KLEBANOV, G.I. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. **Biochemistry** (Moscow), v. 69, n. 1, p. 81-90, 2004.
 56. NICOLAU, R. A. **Efecto de los Láseres de Arseniuro de Galio-Aluminio (655 y 830 nm) a Baja Potencia sobre la Neurotransmisión en la Unión Neuromuscular**. 2005. 120 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universitat Rovira I Virgili, Reus, 2005. Disponível em: <http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_URV/AVAILABLE/TDX-0922105-140431//TesisDoctoralRenata.A.Nicolau_Marzo2005.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2007.
 57. KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of photochemistry and photobiology**. B: Bilology. v. 49, p.1-17, 1999.
 58. KARU T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDO, G.S. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. **Photochem.Photobiol.Sci**. v. 3, p. 211–216, 2004.

59. BORTOLETTO, R.; SILVA, N.S.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; da MATTA, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Mitochondrial membrane potential after low-power laser irradiation. **Lasers in medical science**. v.18, p.204-206, 2004.
60. KUJAWA, J.; ZAVODNIK, I.B.; LAPSHINA, A. LABIENIEC, M.; BRYCZEWSKA, M. Cell survival, DNA, and protein damage in B14 cells under low-intensity near-infrared (810nm) laser irradiation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 22, n. 6, p. 504-508, 2004.
61. VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLERCQ, H.A.; CAMBIER, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**. v. 18, p. 95-99, 2003.
62. MOGNATO, M.; SQUIZZATO, F.; FACCHIN, F.; ZAGHETTO, L.; CORTI, L. Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 6, p. 523-526, 2004.
63. AMAT, A.; RIGAU, J.; NICOLAU, R.; AALFERS, M.; FENOLL, M.R.; van GEMET, M.; TOMÀS, J. Effect of red and near-infrared laser light on adenosine triphosphate (ATP) in the luciferine-luciferase reaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 168, p. 59–65, 2004.
64. GÜR, A.; KARAKOC, M.; NAS, K.; CEVIK, R.; SARAC, A.J.; ATAOGU, S. Effects of low power laser and low dose amitriptyline therapy on clinical symptoms and quality of life in fibromyalgia: a single-blind, placebo-controlled trial. **Rheumatology International**, v. 22, p. 188–193, 2002.
65. LIN, Y.S.; HUANG, M.S.; CHAI, C.Y.; YANG, R.C. Effects of Helium-Neon Laser on Levels of Stress Protein and Arthritic Histopathology in Experimental Osteoarthritis. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 83, n. 10, p.758–765, 2004.
66. KULEKCIOGLU, S.; SIVRIOGLU, K.; OZCAN, O.; PARLAK, M. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. **Scandinavian Journal Rheumatology**, v. 32, n.2, p 114–118, 2003.
67. BEN-DOV, N.; GAVRIELLA, S.; IRINICHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1448, p.372-380, 1999.
68. MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G.A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L.; GIARDINO, R. Muscular Trauma Treated with a Ga-Al-As Diode Laser: In Vivo Experimental Study. **Lasers in Medical Science**, v.13, p.293–298, 1998.
69. ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblast proliferation using different irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.29, p.179-184, 2001.
70. KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Low Level 809 nm Diode Laser-Induced In Vitro Stimulation of the Proliferation of Human Gingival Fibroblasts. **Lasers in Surgery and**

- Medicine**, v.30, p.365–369, 2002.
71. VINK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLER, H.A.; CAMBIER, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v.18, p. 95–99, 2003.
 72. PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.4, p.307-313, 2003.
 73. JIA, Y.L.; GUO, Z.Y. Effect of Low-Power He–Ne Laser Irradiation on Rabbit Articular Chondrocytes In Vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.34, p.323–328, 2004.
 74. GATSURA, S. V.; GLADKIKH, S. P.; TITOV, M. N. Effect of Low-Energy Laser Irradiation on the Area of Experimental Myocardial Infarction, Lipid Peroxidation, and Hemoglobin Affinity for Oxygen. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.137, n. 4, p. 355-357, 2004.
 75. YAAKOBI, T.; SHOSHANY, Y.; LEVKOVITZ, S.; RUBIN, O.; HAIM, S.A.B.; ORON, U. Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion in the rat heart. **Journal of applied physiology**, v. 90, p. 2411-2419, 2001.
 76. STADLER, I.; EVANS, R.; KOLB, B.; NAIM, J.O.; NARAYAN, V.; BUEHNER, B.; LANZAFAME, R.J. In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, p.255-261, 2000.
 77. MARTIN, R. Laser-accelerated inflammation / pain reduction and healing. **Practical Pain Management**, v.3, n.3, Nov / Dec 2003.
 78. SERAFIM, F.; TEODOROSKI, R.C.C. Gallium-arsenide laser (Ga-As) in the treatment of pains provoked for the temporomandibular disorder: pilot study. **Fisioterapia Brasil**. v.4, n. 1, jan/fev, 2003.
 79. CARVALHO, Regiane Albertini de. **Análise do mecanismo de ação de laseres de baixa potência, na região do visível-vermelho, em inflamação aguda induzida por carragenina**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Biomédica, Departamento de Ipd, Univap, São José Dos Campos, 2006.
 80. HOPKINS, J.T.; MCLODA, T.A. SEEGMILLER, J.G. BAXTER, G.D. Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. **Journal of Athletic Training**, v.39, n.3, p.223–229, 2004.
 81. WOODRUFF, L.D.; BOUNKEO, J.M.; WINDY, M.B.; DAWES, K.S.; BARHAM, C.D.; WADDEL, D.L.; ENWEMEKA, C. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of literature. **Photomedicine and laser surgery**, v. 22, n. 3, p. 241-247, 2004.
 82. BARUSHKA, O.; YAAKOBI, T.; ORON, U. Effect of Low-Energy Laser (He-Ne) Irradiation on the Process of Bone Repair in the Rat Tibia. **Bone**, v. 16, n. 1, p.47-55, 1995.
 83. NICOLAU, R.A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; REIS, L.M.; ZÂNGARO, R.A. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure

- and cell activity: an experimental animal study. **Lasers in Medical Science**, v.18, p. 89–94, 2003.
84. MORRONE, G.; GUZZARDELLA, G.A.; ORIENTI, L.; GIAVARESI, G.; FINI, M.; ROCCA, M.; TORRICELLI, P.; MARTINI, L.; GIARDNO, R. Muscular Trauma Treated with a Ga-Al-As Diode Laser: In Vivo Experimental Study. **Lasers in Medical Science**, v. 13, p.293–298, 1998.
 85. MUNIN, E.; GARCIA, N.M.R.; BRAZ, A.G.; SOUZA, S.C.; ALVES, L.P.; SALGADO, M.A.C.; PILLA, V. The use of planarians as in vivo animal model to study laser biomodulation effects. In: JACQUES, S. L.; ROACH, W. P. (ed.). **Optical Interactions with Tissue and Cells XVIII**. Bellingham: SPIE Optical Engineering Press, 2007. (Proceedings of SPIE Volume: 6435)
 86. GARCIA, N.M.R.; BRAZ, A.G.; ALVES, L.P.; PACHECO, M.T.T.; MUNIN, E. Tempo de formação de ocelos em regenerantes de *Dugesia tigrina*: estudo prospectivo em organismos submetidos à radiação laser. In: XX CBEB - **Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica - II CBEClin - Congresso Brasileiro de Engenharia Clínica**, 2006, São Pedro - SP. Anais do CBEB. , 2006.
 87. MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.
 88. MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995.
 89. JAMES, N.T. Stereology. In: MEEK, G.A.; ELDER, H.Y. **Analytical and quantitative methods in microscopy**. Cambridge: Cambridge University Press, 1977.
 90. RUSS, J.C.; DEHOFF, R.T. **Practical stereology**. 2. ed. New York, NY: Plenum Press, 1999.
 91. KITCHEN S.; BAZIN S. **Eletroterapia de Clayton**. 10. ed. Manole, São Paulo, 1998.
 92. KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**. v.56, n.5, p. 691-704, 1989.
 93. NEWMARK, P.A.; ALVARADO, A.S. Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. **Developmental Biology**. v.220, p.142–153, 2000.
 94. SOUZA, S.C.; ALVES, L.P.; MUNIN, E.; SALGADO, M.A.C. Comparação entre Três Fixadores Histológicos na Fixação de Platelminhos (Planária). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7 e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 3, 2003, São José dos Campos. **Anais...**, São José dos Campos: Univap, 2003.
 95. NEWMARK, P.A.; ALVARADO, A.S. Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. **Developmental Biology**. v. 220, p.142–153, 2000.
 96. EDELMAN, J.R.; LIN, Y.J. Differential staining of *Dugesia tigrina* sister chromatids. **Cytobios**, v.78, p. 123-128, 1994.
 97. ASANO, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIDA, S.; AZUMA, K.; SHINOZAWA, T.

- Rhodopsin-like proteins in planarian eye and auricle: detection and functional analysis. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1263–1271, 1998.
98. FERNANDES, M.C.; ALVARES, E.P.; GAMA, P.; SILVEIRA, M. Serotonin in the nervous system of the head region of the land planarian *Bipalium kewense*. **Tissue & Cell**, v.35, p.479–486, 2003.
 99. RAFFA, R.B.; MARTLEY, A.F. Amphetamine-induced increase in planarian locomotor activity and block by UV light. (Short communication). **Brain Research**, v.1031, p.138–140, 2005.
 100. RAFFA, R.B.; STAGLIANO, G.W.; UMEDA S. k-Opioid withdrawal in Planaria. **Neuroscience Letters**, v.349, p.139–142, 2003.
 101. UMEDA, S.; STAGLIANO, G.W.; RAFFA, R.B. Cocaine and n-opioid withdrawal in Planaria blocked by D-, but not L-, glucose. **Brain Research**, v.1018, p. 181–185, 2004.
 102. RAWLS, S.M.; RODRIGUEZ, T.; BARON, D.A.; RAFFA, R.B. A nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) attenuates abstinence-induced withdrawal from both cocaine and a cannabinoid agonist (WIN 55212-2) in Planaria. **Brain Research**, v.1099, p.82–87, .2006.
 103. RAFFA, R.B.; DESAI, P. Description and quantification of cocaine withdrawal signs in Planaria. (Short communication). **Brain Research**, v.1032, p.200–202, 2005.
 104. KITAMURA, Y.; INDEN, M.; SANADA, H.; TAKATA, K.; TANIGUCHI, S.S.; ORII, H.; MOCHII, M.; AGATA, K.; WATANABE, K. Inhibitory Effects of Antiparkinsonian Drugs and Caspase Inhibitors in a Parkinsonian Flatworm Model. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 92, p.137–142, 2003.
 105. CEBRIÀ, F.; KOBAYASHI, C.; UMESONO, Y.; MASUMI, N.; MINETA, K.; IKEO, K.; GOJOBORI, T.; ITOH, M.; TAIRA, M.; ALVARADO, A.S.; AGATA, K. FGFR-related gene *nou-darake* restricts brains tissues to the head region of planarians. **Nature**, v. 419, p.620-624, 2002.
 106. CEBRIÀ, F.; NEWMARK, P.A. Planarian homologs of netrin and netrin receptor are required for proper regeneration of the central nervous system and the maintenance of nervous system architecture. **Development**, v.132, p.3691-3703, 2005.
 107. LANE, N.J. Invertebrate neuroglia-junctional structure and development. **Journal of Experimental Biology**, v. 95, p. 7-33, 1981.

APÊNDICE A: Anatomia das planárias

Sistema digestório

Seu sistema digestório possui três ramificações principais (por isso o nome Tricladida), uma anterior e duas posteriores, que se unem ventralmente, medialmente e anteriormente à boca e faringe (Figura 67). Os ramos principais de seu sistema digestório, apresentam ramificações secundárias laterais, conhecidos como divertículos laterais, que também se ramificam, permitindo assim que a superfície de contato dos divertículos com o corpo aumente, facilitando a digestão, transporte e absorção (Figura 68) [22].

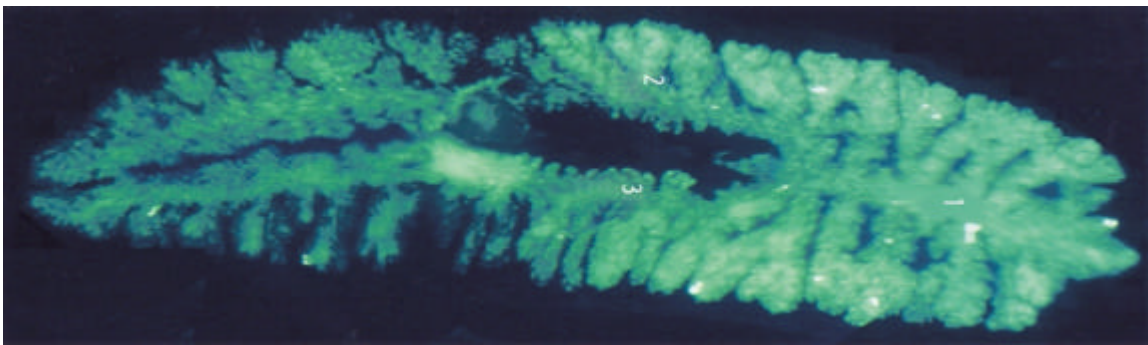


Figura 67 – Imagem por fluorescência do sistema digestório de uma planária. Ramos principais dos intestinos: (1) anterior, (2 e 3) posteriores.

Fonte: Newmark, Alvarado [22], modificada por Braz (2008)

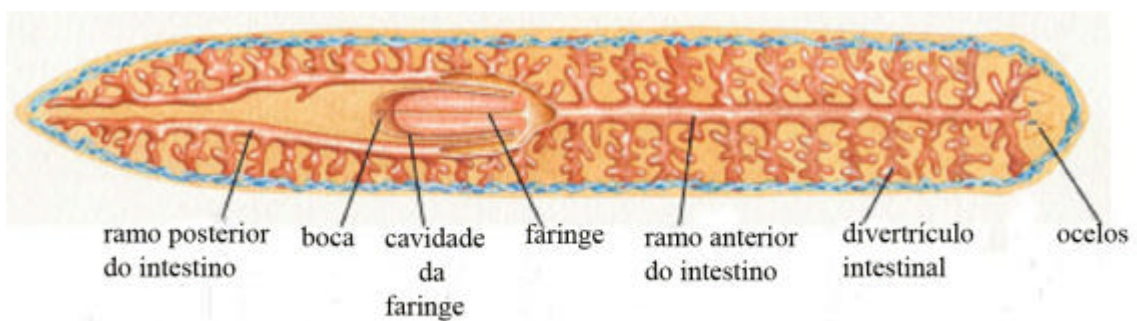


Figura 68 – Ilustração mostrando a distribuição e composição do sistema digestório de uma planária.

Fonte: Saló [18], modificada por Braz (2008)

Em sua linha médio-ventral, existe uma cavidade interna chamada de cavidade faringiana, por acomodar sua faringe. Esta faringe é formada por algumas camadas musculares lisas, e tem a capacidade de se protrar da cavidade faringiana por um orifício que a comunica com o meio externo chamado de boca, para alcançar o alimento.

Possui hábito alimentar carnívoro, alimentando-se de pequenos insetos, larvas, protozoários e pequenos crustáceos, além de ser necrófago (se alimenta de animais mortos). É recomendado que planárias mantidas em cativeiro sejam alimentadas com fígado bovino cru [30, 95, 42], gema de ovos cozidos [6, 29], tubifex (pequenos anelídeos aquáticos) ou artêmias.

A faringe das planárias acessa o interior de animais e detritos ao qual se alimenta, por endopeptidases produzidas em glândulas faringianas, que liquefazem os alimentos e dão início à digestão extracorpórea. Os alimentos são impulsionados por movimentos peristálticos da faringe até o intestino, onde a digestão ocorre por endopeptidases fornecidas por células do próprio intestino. Os fragmentos dos alimentos ingeridos são fagocitados e digeridos intracelularmente.

A excreção dos metabólitos residuais e do nitrogênio protéico (em forma de amônia), dos alimentos absorvidos é feita por difusão geral na superfície do corpo, sem um local específico.

Por serem animais de morfologia achatada, e de pequenas dimensões, é possível haver a difusão de gases (oxigênio e gás carbônico) através de sua própria pele [22].

Sistema nervoso

O sistema nervoso das planárias é bem desenvolvido. Ele é composto por um gânglio cefálico (um tipo de cérebro primitivo) que se apresenta em forma de dois lóbulos bilaterais, formados por córtex e medula que contém respectivamente células e fibras nervosas. Estas fibras nervosas formam dois cordões nervosos e percorrem longitudinalmente e lateralmente todo seu corpo. Os dois cordões são ligados equidistantemente por fibras nervosas transversais, dando um aspecto de escada ao seu sistema nervoso. Na parte superior, dos gânglios cefálicos emergem até a epiderme, duas estruturas nervosas fotossensíveis em forma de taça, que tem a capacidade de detectar a intensidade de luz graças a uma proteína chamada *rhodopsin-like protein (RLP)*, chamadas de ocelos, considerados olhos primitivos (Figura 69). [23, 97] As planárias têm comportamento fotonegativo, ou seja, na presença de uma fonte de luz intensa, elas se afastam da fonte ou param de se movimentar aderindo em alguma superfície. A luz é apenas detectada dentro do espectro de 400 nm até 600 nm, com pico de sensibilidade em 505 nm. [29] Seu

sistema nervoso também lhe fornece dados sensoriais a partir de quimiorreceptores e receptores táteis, que interagem com seus reflexos e sistema motor. [22, 23, 97]

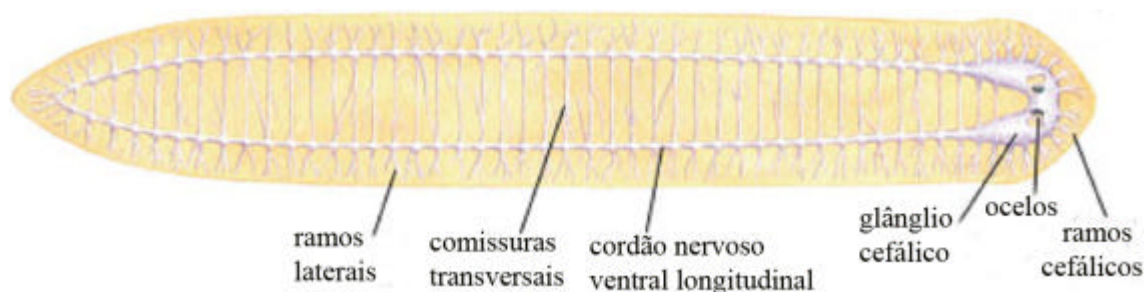


Figura 69 – Ilustração mostrando os ramos do sistema nervoso de uma planária.
Fonte: Saló [18], modificada por Braz (2008).

O sistema nervoso das planárias é considerado um ancestral do sistema nervoso dos mamíferos [23], devido à similaridade de neurotransmissores, tal como a serotonina [98], similaridades neuromorfológicas, eletrofisiológicas e em respostas farmacológicas [23]. Tais similaridades foram benéficas e bem observadas em trabalhos realizados com planárias no estudo sobre o uso de drogas, tal como anfetaminas [99] e a abstinência de drogas tais como, (Figura 70) opióides, canabinóides e cocaína [100, 101, 102] e os sintomas relacionados à abstinência [103]. Também foram estudados medicamentos para o tratamento do Mal de Parkinson, [104] e para a manutenção, regeneração e formação de seu sistema nervoso [105, 106].

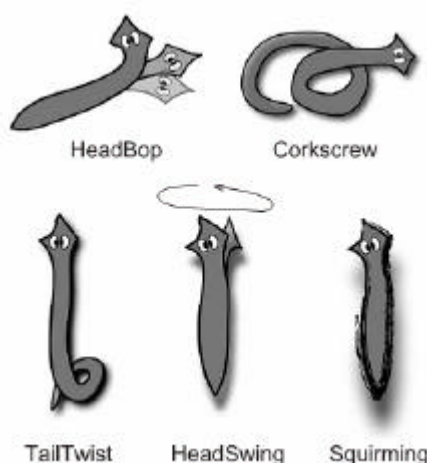


Figura 70 – Ilustração mostrando os comportamentos apresentados por planárias com abstinência de cocaína.

Fonte: Raffa e Desai [103], modificada por Braz (2008).

Microscopicamente, seu sistema nervoso é formado por células da glia relativamente pequenas e com pouco citoplasma, que mesmo assim contém retículo

endoplasmático (liso e rugoso), ribossomos, mitocôndrias, complexo de golgi e microtúbulos [16, 23, 107].

Sistema reprodutor

As planárias se reproduzem tanto assexuada como sexuada, pois possui sistema reprodutor masculino e feminino completo (são hermafroditas), tal como apresentado na Figura 71 [22].

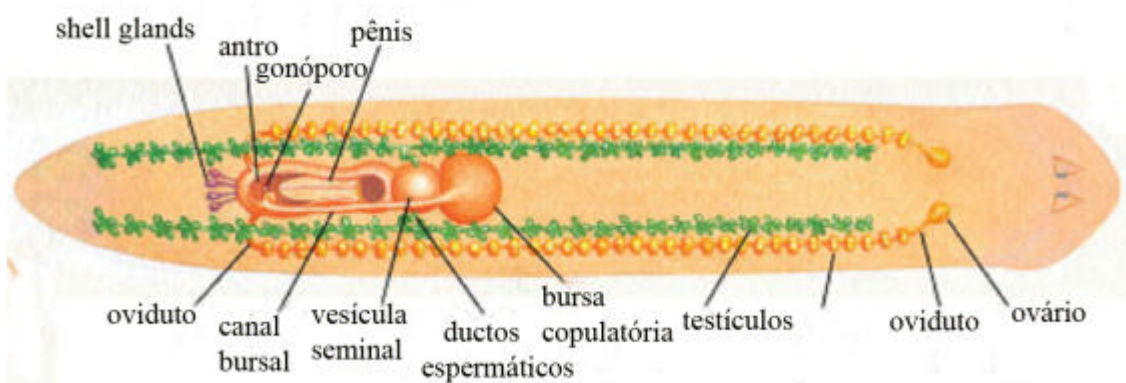


Figura 71 – Ilustração mostrando o sistema reprodutor de uma planária.
Fonte: Saló [18], modificada por Braz (2008)

Na reprodução assexuada ocorre uma fissão transversal de seu corpo, normalmente anteriormente à faringe, podendo fragmentar várias partes de seu corpo (arquitomia). Cada fragmento de seu corpo gera um novo ser, por meio de processo regenerativo. Este mesmo tipo de regeneração ocorre quando, mesmo que acidentalmente ou devido ao ataque de predadores elas são fragmentadas, sendo que cada parte de seu corpo se torna um novo ser [16]. Sexuadamente, a reprodução das planárias ocorre por cópula e fecundação interna. O sistema reprodutor masculino é constituído por vários testículos, que produzem os espermatozóides que são transportados até uma vesícula seminal (armazenamento de espermatozóides) por ductos espermáticos. Da vesícula seminal, os espermatozóides são levados até a parte feminina da planária parceira por um pênis [16].

No sistema reprodutor feminino, os espermatozóides são levados a uma bursa copulatória por um gonóporo (vagina) e a um receptáculo seminal para seu

armazenamento, até que os ovos produzidos pelos ovários (pareados) sejam levados até o gonóporo pelo oviduto, para que os ovos sejam fecundados pelos espermatozóides. Quando os ovos são fecundados, eles são encobertos com uma cápsula dura amarronzada, por glândulas chamadas *shell glands*, e são ligados a rochas, galhos e outros tipos de substratos, por uma fina haste que dá a impressão aos ovos de serem pequenos balões, que eclodem em poucas semanas [16].

Durante a cópula, as planárias se unem ventralmente, já que seus órgãos copulatórios se localizam ventralmente, elevam a parte traseira e afastam a parte dianteira.

APÊNDICE B: Interpretação dos gráficos estatísticos

A representação gráfica adotada é conhecida como *box chart*, e neste tipo de análise, cada conjunto de dados é representado como um *box* separado. As linhas horizontais no *box* denotam o 25^o, 50^o, 75^o valores percentuais. As barras de erro denotam o 5^o e 95^o valores percentuais. O ponto sólido dentro do *box* denota a média dos dados analisados.

APÊNDICE C: Gráficos estatísticos referentes à quantificação dos neoblastos

Observando os gráficos da Q_A dos neoblastos (Q_{Aneo}), o GV (Figura 72) foi o grupo que apresentou a maior média de neoblastos comparando a todos os outros períodos de experimento e também aos grupos GC (Figura 73), GI (Figura 74) e GSL. A contagem expressiva do grupo GV ocorreu no período experimental 84h pós-lesão, apresentando aproximadamente 27500 neoblastos/mm², enquanto neste período outros grupos a média foi de 21500 neoblastos/mm² no GC, 20600 neoblastos/mm² no GI enquanto a contagem base do GSL ficou em 13200 neoblastos por mm².

Em contrapartida, os outros grupos apresentaram maior contagem em momentos distintos, como por exemplo, o grupo GC (Figura 73) no período experimental 72 h – e o grupo GI (Figura 74) no período experimental 96 h, mas mesmo assim com números inferiores ao apresentado pelo GV, apresentando um valor médio de 22200 neoblastos/mm² e 22400 neoblastos/mm² respectivamente.

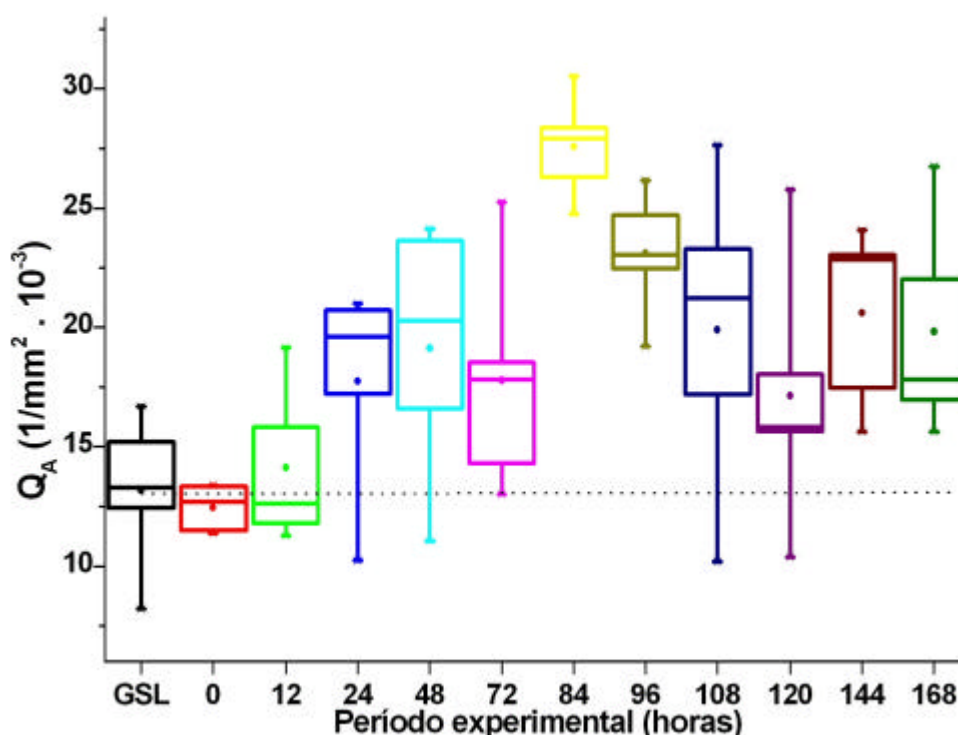


Figura 72 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

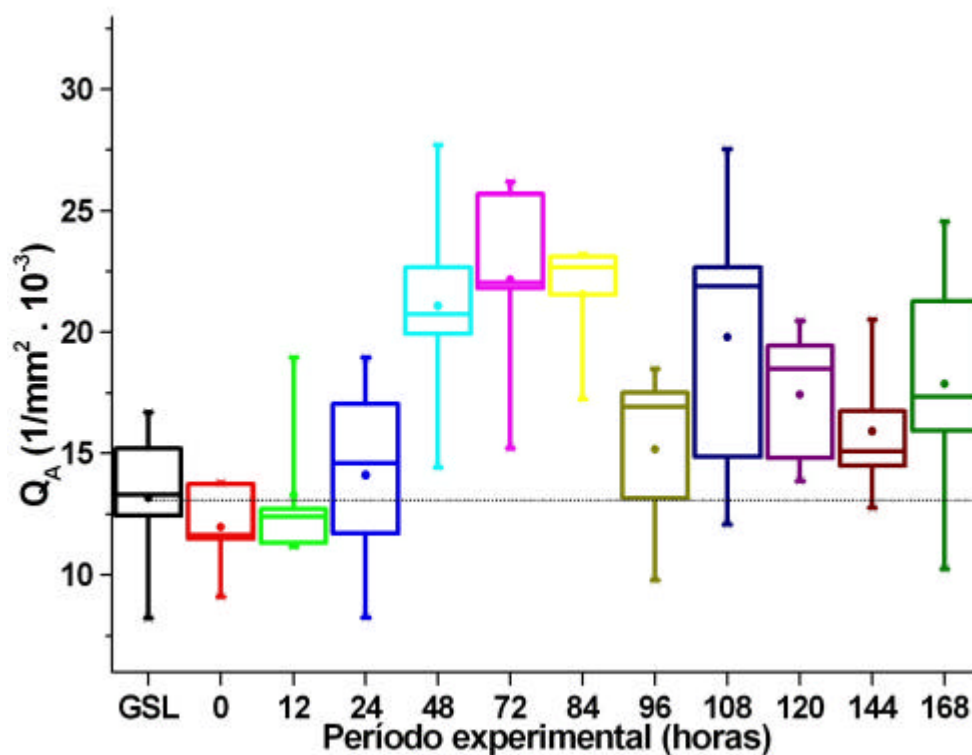


Figura 73 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

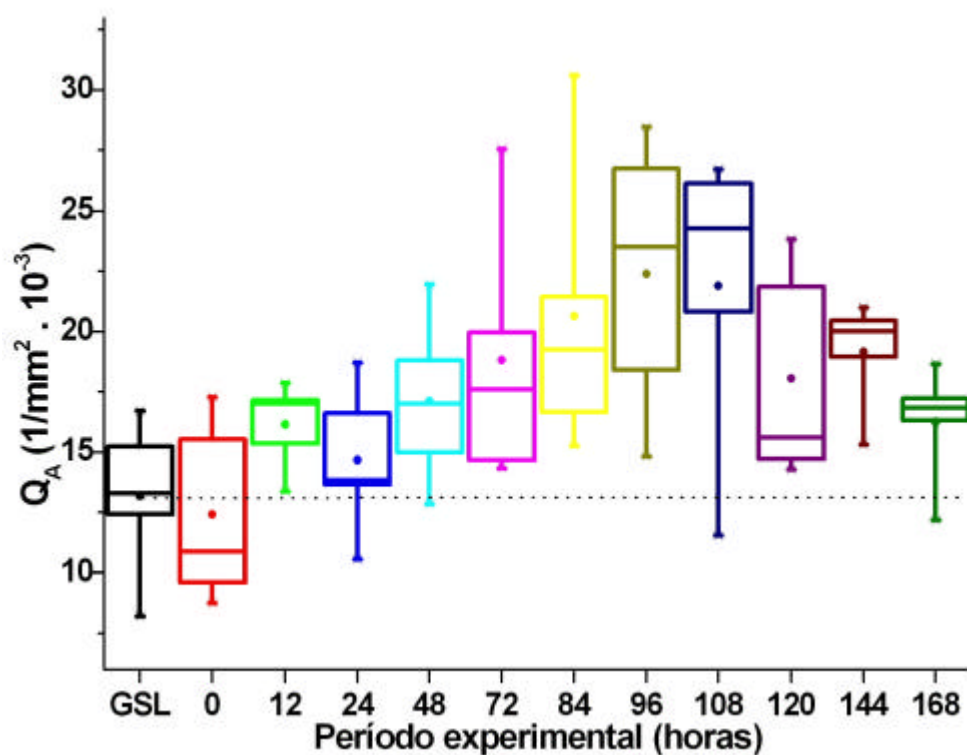


Figura 74 – Gráfico estatístico para a densidade de perfis por área dos neoblastos do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

Nos gráficos da V_V dos neoblastos (V_{Vneo}), o GV (Figura 75) foi novamente o grupo que apresentou a maior média percentual volumétrica de neoblastos do período experimental 72 h, com 49,5 % no período 84h, seguido do GC (Figura 76) com 43,9 % no mesmo dia. Já o grupo GI (Figura 77) obteve sua maior média percentual volumétrica de neoblastos no período experimental 96 h, com 40,3 % e o GSL, que novamente serviu como linha base para todos os outros grupos, apresentou 27,9 %.

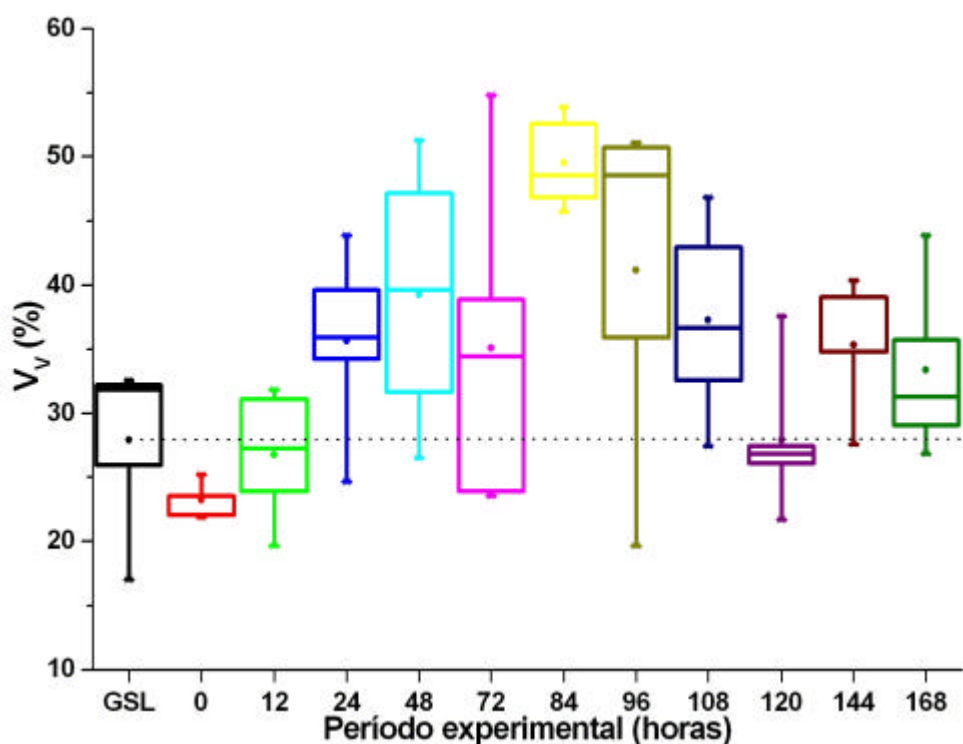


Figura 75 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

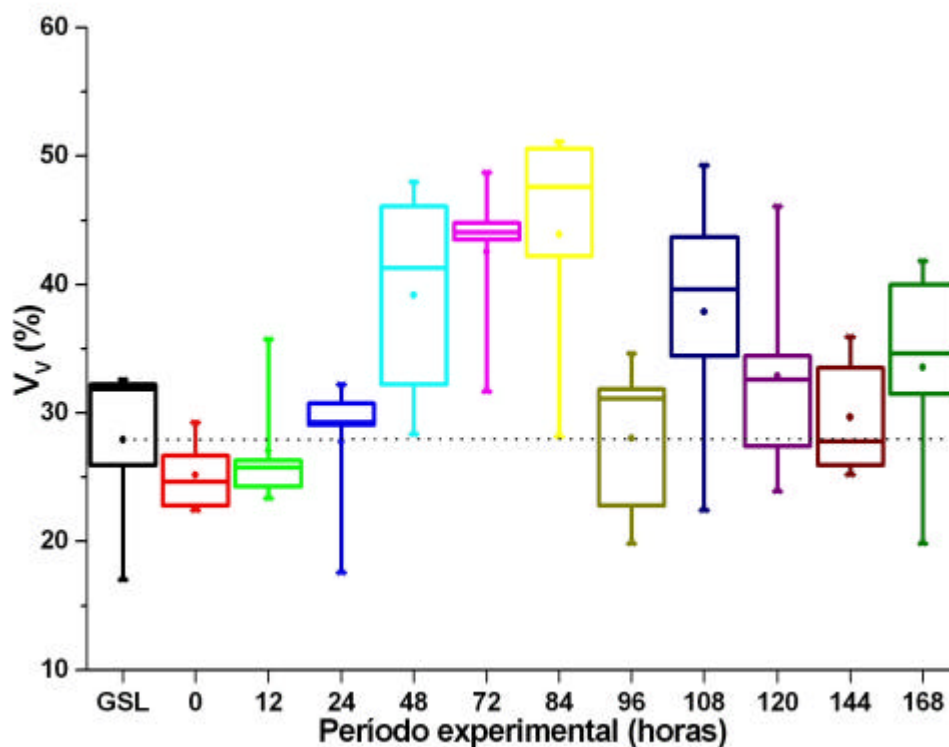


Figura 76 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

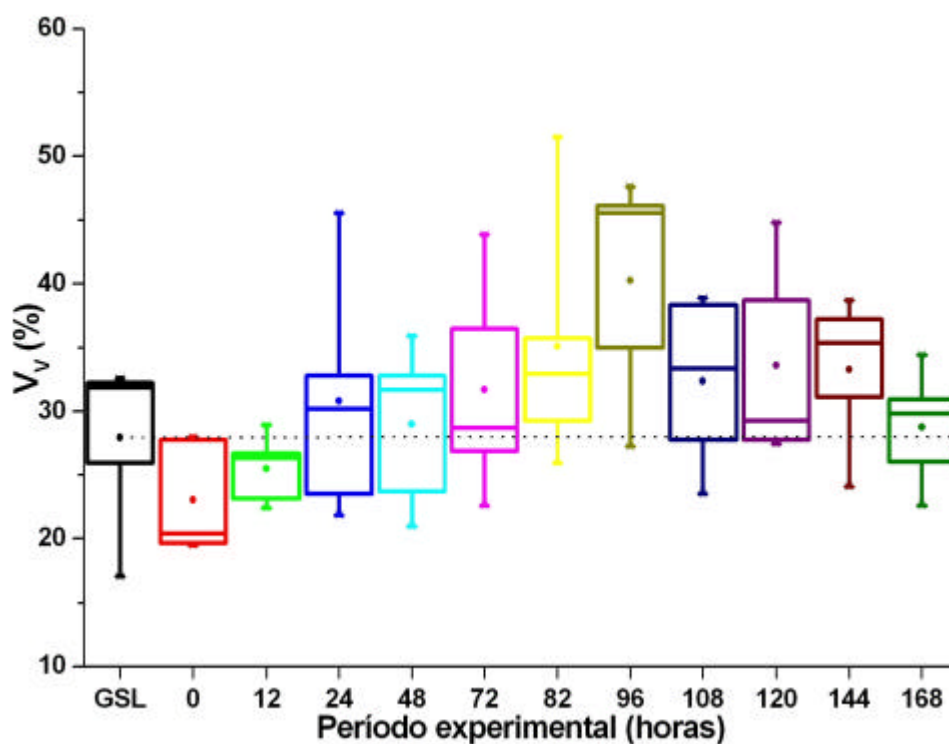


Figura 77 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica dos neoblastos do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

APÊNDICE D: Gráficos estatísticos referentes à quantificação do tecido muscular

Na quantificação da V_V do tecido muscular das planárias (V_{Vmus}), o grupo GV (Figura 78) mostrou ser o grupo com valores médios mais variáveis entre os grupos, possuindo seu máximo nos períodos experimentais 0h (6,67 %) e 108 h (6,56 %) e seu mínimo no dia 72 h (1,44%). Já nos outros grupos, essa variação não foi tão evidente, ficando entre 1,70 % (período 84 h) e 5,37 % (período 120 h) para o grupo GC (Figura 79), e entre 2,22 % (período 144 h) e 4,59 % (período 148 h) do grupo GI (Figura 80).

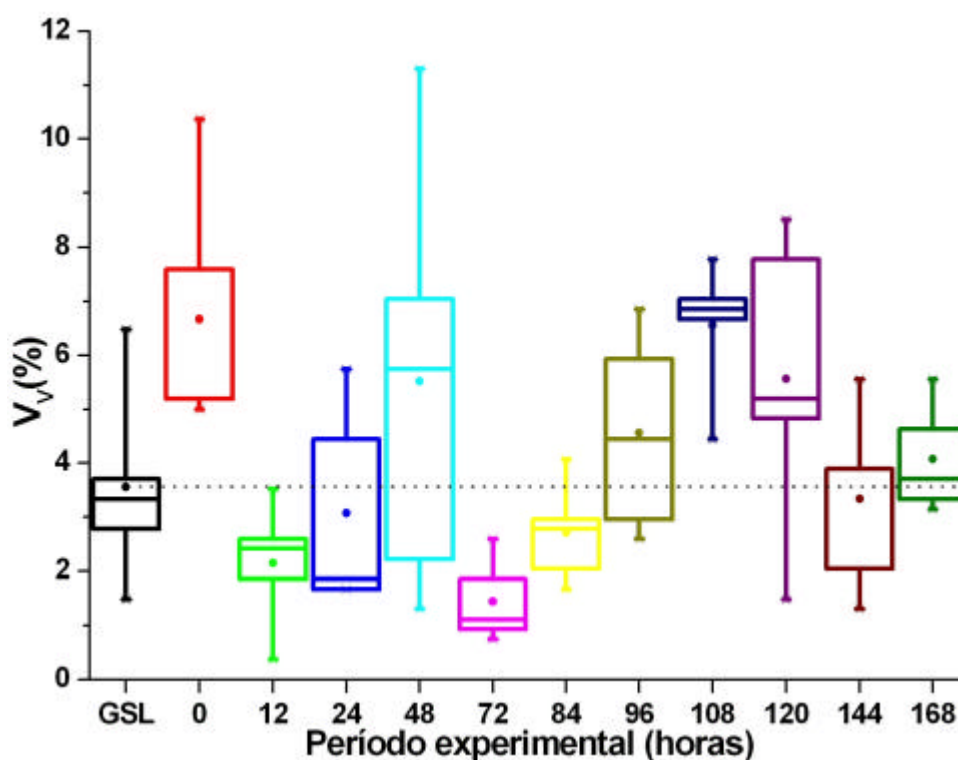


Figura 78 – Gráfico do grupo da densidade volumétrica da musculatura do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

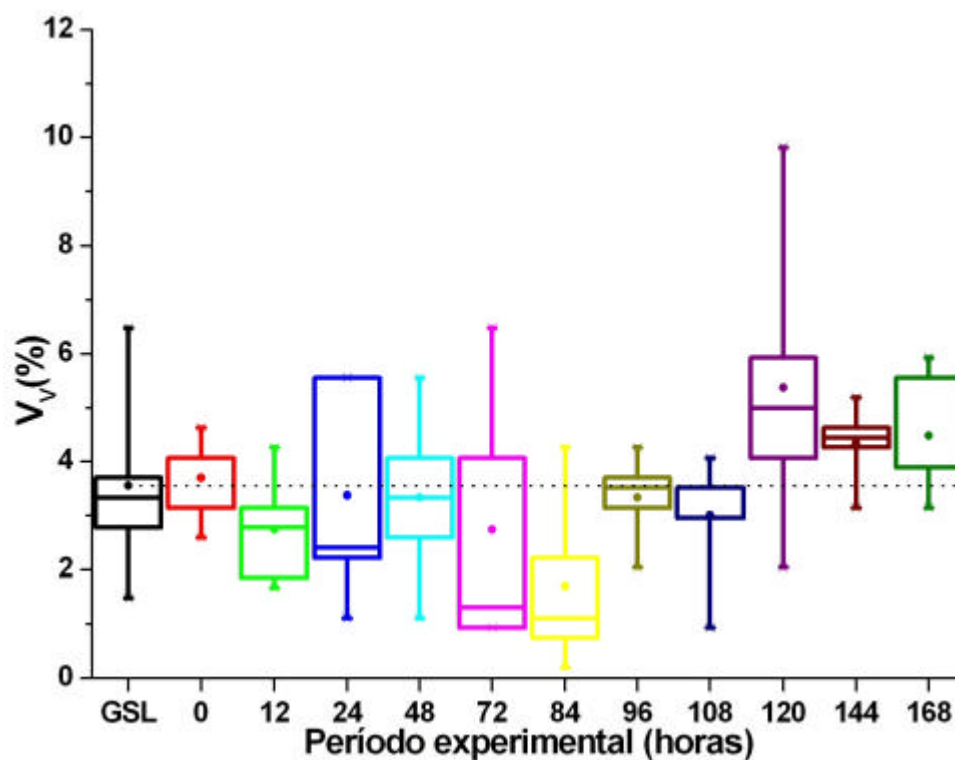


Figura 79 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica da musculatura do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

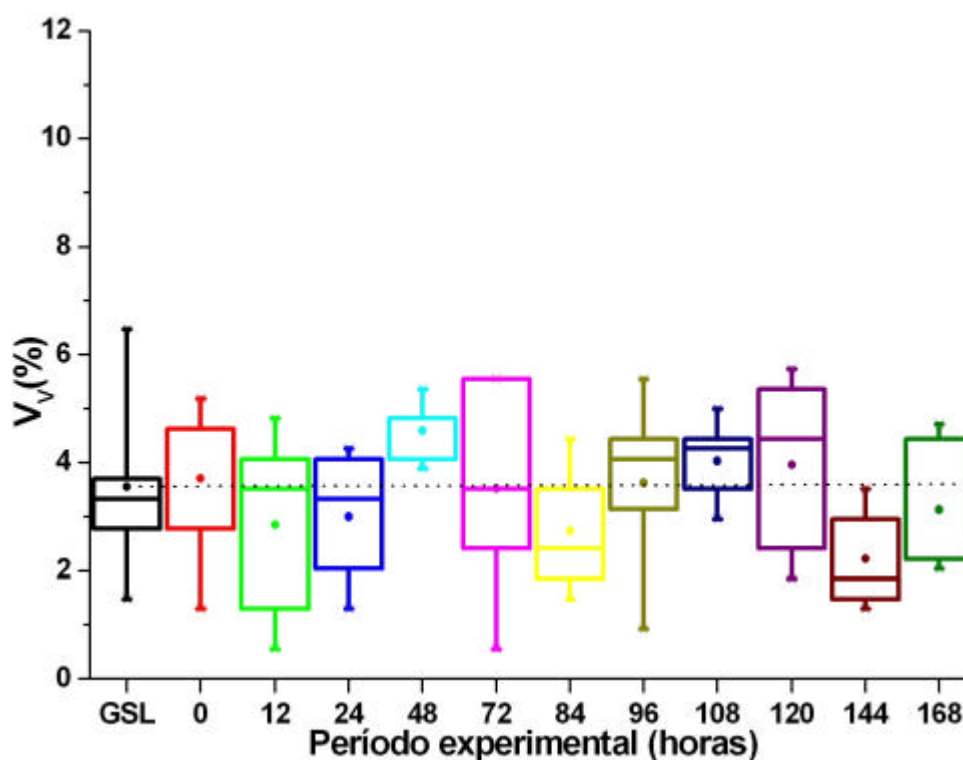


Figura 80 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica da musculatura do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

APÊNDICE E: Gráficos estatísticos referentes à quantificação do estroma

Foi observado na quantificação da V_V do estroma das planárias (V_{Vest}), que esta foi estrutura que apresentou maior volume na maioria das planárias, apresentando um valor médio acima de 50 % na maioria das vezes em todos os grupos e dias, sendo que até mesmo o grupo considerado como linha base, o GSL, apresentou 55,96 % de V_{Vest} .

Os valores quantificados no GV (Figura 81) apresentaram os valores mais baixos em comparação aos outros grupos, nos períodos experimentais 48 h e 84 h, com V_{Vest} 43,70 % e 43,96 % respectivamente. Enquanto o GC (Figura 82) apresentou o valor mais alto entre os grupos, no período 0 h, com 63,04 % V_{Vest} , e o grupo GI (Figura 83) apresentou valores intermediários a estes.

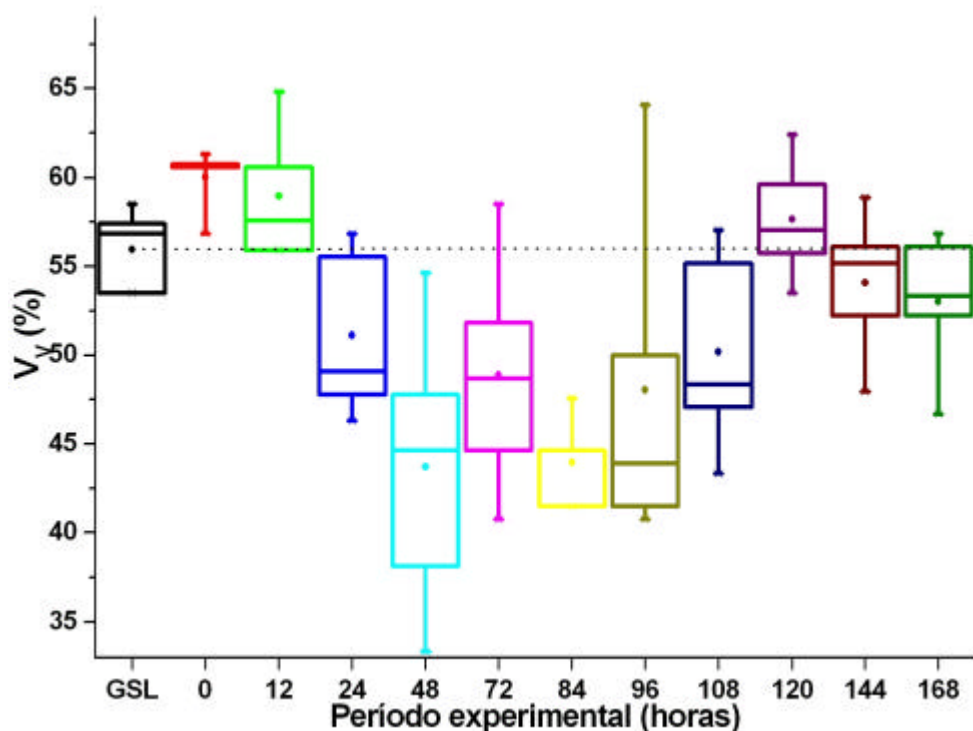


Figura 81 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GV apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

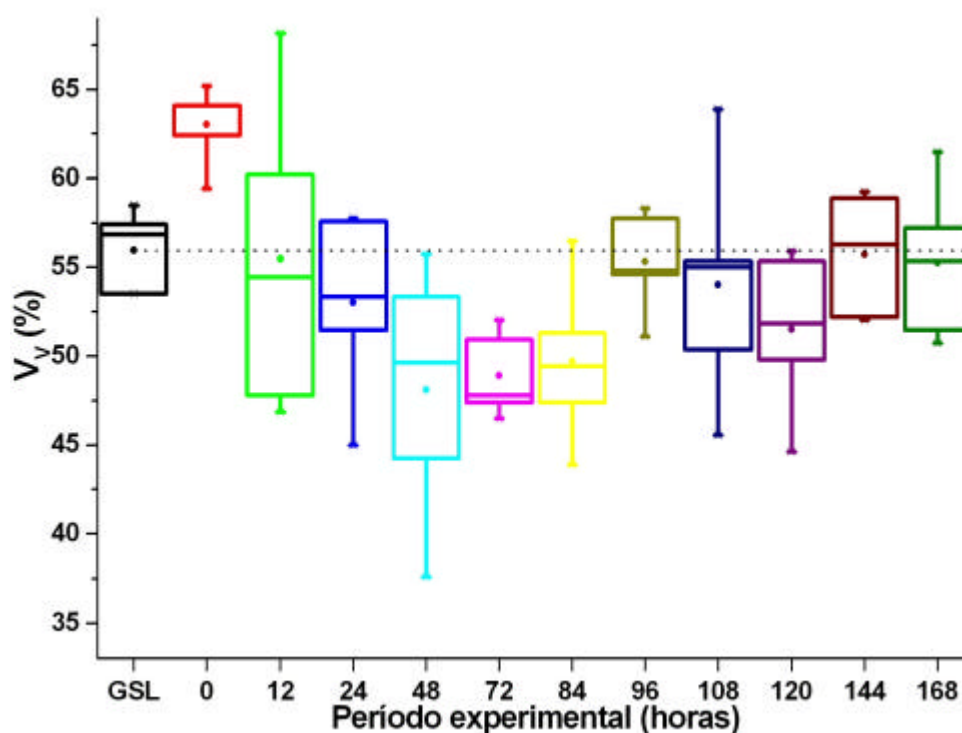


Figura 82 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GC apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.

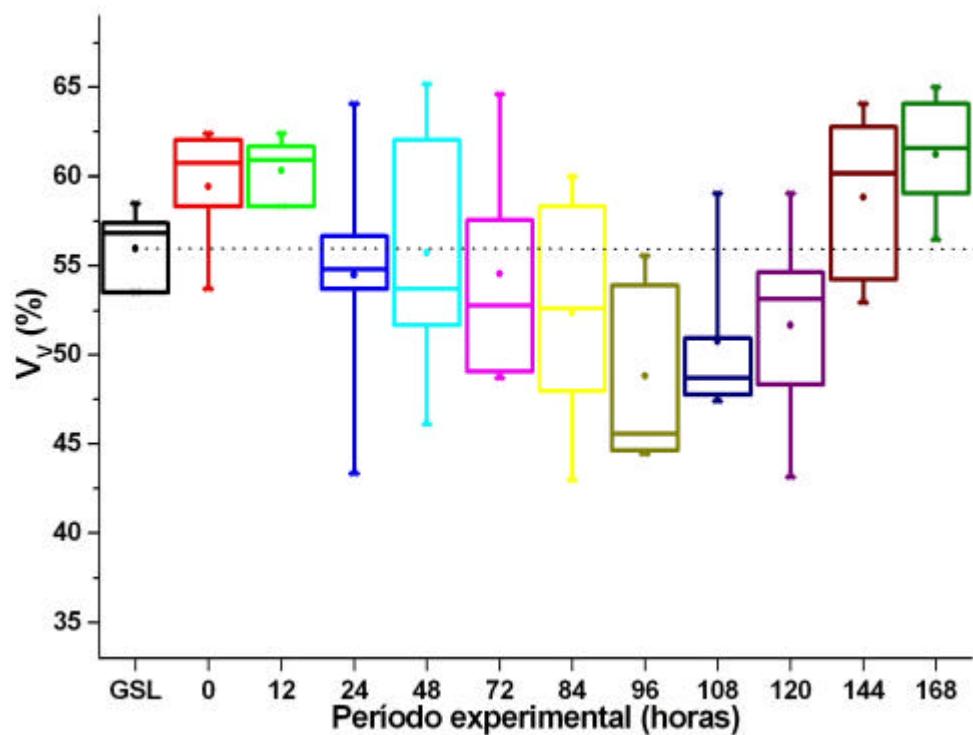


Figura 83 – Gráfico estatístico para a densidade volumétrica do estroma do GI apresentando os dados quantificados no experimento. O GSL foi utilizado como linha base de comparação (linha pontilhada) entre o restante do grupo.