

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

Neila Maria Rocha Garcia

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM PLANÁRIAS SUBMETIDAS À  
RADIAÇÃO LASER NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE REGENERAÇÃO  
TECIDUAL

São José dos Campos, SP  
2007

Neila Maria Rocha Garcia

**PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO EM PLANÁRIAS SUBMETIDAS À  
RADIAÇÃO LASER NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE REGENERAÇÃO  
TECIDUAL**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadores: Prof. Dr. Egberto Munin  
Prof. Dra. Viviane Pilla  
Prof. Dr. Miguel A. C. Salgado

São José dos Campos, SP

2007

G21p

Garcia, Neila Maria Rocha

Proliferação de células-tronco em planárias submetidas à radiação laser nos estágios iniciais de regeneração tecidual / Neila Maria Rocha Garcia; Orientador Egberto Munin. São José dos Campos, 2007.

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, 2007.

1. Planárias 2. Lasers 3. Regeneração tecidual 4. Neoblastos I. Munin, Egberto,, Orient. II. Título

CDU: 595.123

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

Assinatura do aluno:



DATA: 25/03/08

**NEILA MARIA ROCHA GARCIA**

**“PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EM PLANÁRIAS  
SUBMETIDAS À RADIAÇÃO LASER NOS ESTÁGIOS INICIAIS DE  
REGENERAÇÃO TECIDUAL”**

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:

Profª. Dra. **VIVIANE PILLA** (UNIVAP)

*Viviane Pilla*

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

*Egberto Munin*

Prof. Dr. **MIGUEL ANGEL CASTILHO SALGADO** (UNIVAP)

*Miguel Angel Salgado*

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 25 de março de 2008.

**Aos meus pais *Nely Rocha França* e *Nilson de Almeida França*, a minha tia *Lecy Rocha*, que me ensinaram valiosas lições do decorrer da minha vida, meus filhos *Juliana*, *Leonardo* e *Karina* que tem sido uma benção para mim, ao meu marido *Marcelo Garcia* pelo seu amor e paciência. Com certeza este trabalho não seria feito sem a ajuda de vocês.**

**AMO VOCÊS!!!**

**Com Carinho, meus agradecimentos especiais:**

**A DEUS**

Pela inspiração e graça de elaborar e executar esta dissertação.

**“Obrigado senhor, pelo dom precioso da vida, esta vida que, generosamente nos deste e que pela qual nos sentimos responsáveis. Obrigado por todos que fizeram parte desta história. Obrigada por esta etapa vencida. Receba Senhor, toda alegria e eterna gratidão. E que tua constante presença nos ilumine.”**

## **Agradeço**

À **CAPES** pelo apoio financeiro a este projeto de pesquisa.

Ao diretor do IP&D, Prof. Dr. **Marcos Tadeu Tavares Pacheco** pela confiança, oportunidade, apoio e incentivo. Muito Obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Egberto Munin**, pela colaboração, orientação, dedicação e paciência.

Ao meu co\_orientador, Prof. Dr. **Miguel A. C. Salgado**, pela colaboração, orientação, disponibilidade, apoio e por sempre estar disposto a contribuir para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

A minha co\_orientadora Prof<sup>ª</sup> Dra. **Viviane Pilla**, pelo incentivo e colaboração para realização deste trabalho.

Ao meu amigo e colega **Leandro Procópio Alves** pela fundamental ajuda, apoio e colaboração.

Ao meu amigo e colega **Allison Gustavo Braz**, por toda colaboração e ajuda.

Aos **professores do Curso de Mestrado em Engenharia Biomédica da UNIVAP** pela incansável dedicação ao ensino.

A professora e amiga. Prof<sup>ª</sup> Dra. **Emília Angela Loschiavo Arisawa** e sua equipe pelo apoio técnico.

A **Walter Cruz**, técnico do Laboratório de Histologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP – São José dos Campos.

Ao meu marido **Marcelo Garcia** e meus filhos **Juliana, Leonardo e Karina** pela compreensão e colaboração, pelas horas de ausência, por sempre

estarem ao meu lado me incentivando e acreditando que eu seria capaz de grandes conquistas.

A minha tia **Lecy Rocha**, pela leitura crítica.

A minha irmã **Vanessa França Bayer**, pela ajuda nas traduções dos textos desta dissertação.

As minhas amigas **Ivone Paranaíba Vilela Monteiro** e **Valéria Maeda Alves da Silva** que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando.

**E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação.**

Muito obrigada.



Proliferação de células-tronco em planárias submetidas à radiação laser nos estágios iniciais de regeneração tecidual

**RESUMO**

Uma variedade de efeitos é atribuída à foto estimulação de tecidos, como efeitos analgésicos e antiinflamatórios, estimulação da proliferação de células de diferentes origens e estimulação de reparo de ossos. Algumas pesquisas que fazem avaliações qualitativas, como cura de ferida e avaliação de dor e edema, podem ser efetuadas em humanos. Entretanto pesquisas mais profundas dos mecanismos de ação do estímulo de luz e outros trabalhos quantitativos que requerem biópsias ou análise invasivas têm que ser feitas em modelo animal ou em culturas de células. Este trabalho propõe o uso de planárias da espécie *Dugesia tigrina* como um modelo para estudar a interação laser-tecido, devido a sua notável capacidade regenerativa. A regeneração de partes amputadas de seu corpo envolve células indiferenciadas chamadas neoblastos. O estudo desse trabalho foi realizado com o objetivo de associar o efeito bioestimulador do laser da baixa potência ao processo regenerativo das planárias. Foram selecionados 52 animais, com o comprimento entre 1,0 e 1,4 cm, sendo todos seccionados na região entre cabeça e corpo, logo abaixo das aurículas. Os animais foram separados em dois grupos: um grupo controle não irradiado e um grupo irradiado por um minuto a cada 24 horas, utilizando laser com comprimento de onda de 660 nm. A regeneração cefálica foi analisada nos seguintes períodos: 0, 24, 48 e 72 horas, por meio de cortes histológicos na região sagital do animal em processo regenerativo. Foi observado que a radiação laser induziu um crescimento exponencial de neoblastos, comportamento este não observado no grupo controle.

Palavras-chave: Lasers; Planária; Regeneração tecidual; Neoblastos.

Stem cells proliferation in planarians exposed to laser radiation in the  
early regeneration stages

**ABSTRACT**

A variety of effects is attributed to the photo-stimulation of tissues, such as analgesic and anti-inflammatory effects, stimulation of proliferation of cells of different origins and stimulation of bone repair. Some of the research works which make qualitative evaluations, such as wound repair, and study of pain and edema, can be applied to humans. However, investigations to study the mechanisms of action of the light therapy and other quantitative works which requires biopsies or destructive analysis must be made in animal models or in cell cultures. In this work, the use of planarians as a model to study laser – tissue interaction is proposed, in view of the expressive regeneration ability of such animals. In those organisms, the regeneration of lost body parts involves undifferentiated cells called neoblasts. This work aims to investigate the effects of the low power laser light in the regenerative process of planarians. An amount of 52 worms were selected and cut in a transversal plane between the head and the body, next to the auricles. The animals were separated in two study groups: a non-irradiated control group and a group treated with laser radiation in daily sections of 1 minute, with a diode laser wavelength at the 660 nm wavelength. Sagittal histological cuts of the regenerating organisms were performed and neoblast cells counted for the experimental periods of zero, 24, 48 and 72 hours after animal amputation. It was found that laser radiation induced an exponential growth of neoblast cells, a behavior not found in the control group.

Keywords: Lasers; planarians; Tissues regenerations; Neoblast.

## Lista de figuras

Figura 1: Distribuição filogenética de regeneração em organismos multicelulares. Os animais que possuem capacidade regenerativa estão sombreados. Os animais não marcados, não possuem capacidade regenerativa ou sua presença é desconhecida.....	19
Figura 2: Representação evolutiva, destacando os Platelmintos, como um ponto de transição. ....	23
Figura 3: Fotografia de uma planária <i>Dugesia tigrina</i> usada neste trabalho de pesquisa.....	26
Figura 4: a) Esquema do Sistema nervoso central, b) Sistema digestivo, c) Sistema reprodutivo e d) Corte transversal da <i>Schmidtea mediterrânea</i> .....	27
Figura 5: Ilustração original do trabalho de Randolph e de Morgan que mostra a extraordinária plasticidade das planárias. (a) Corte transversal, (b) Corte longitudinal, (c) Corte em oito fragmentos e os números indicam a ordem de amputações, (d) Fragmento pouco visível a olho nu, e) Restauração de proporção apropriada para fragmentos regenerantes. Os numerais romanos de I a V indicam a amputação dos fragmentos descritos a esquerda. O período de observação é indicado para cada coluna com o fragmento I acima e o fragmento V abaixo. ....	33
Figura 6: Fotomicrografia de corte histológico da planária <i>Dugesia tigrina</i> . Seta aponta para o núcleo de um neoblasto (objetiva 40x, HE). ....	36
Figura 7: Alguns espécimes que foram objetos de estudo desse trabalho, acondicionados em placa de Petri. ....	47
Figura 8: Seleção de espécies de acordo com morfologia e tamanho. ....	48
Figura 9: Lupa estereoscópica acoplada a um monitor de vídeo. ....	48
Figura 10: Representação esquemática do local do corte. ....	49
Figura 11: Sistema utilizado para acondicionamento dos espécimes com as respectivas rotulações dos grupos. ....	50
Figura 12: a) Dispositivo fixado em uma lupa estereoscópica. b) Instrumental para seccionamento.....	51
Figura 13: Espécime após corte.....	52
Figura 14: Laser de diodo, da empresa MM Optics LTDA, modelo Twin Laser. ....	52
Figura 15. Fotomicrografia, aspectos morfológicos, da região cefálica regenerada da planária <i>Dugesia tigrina</i> , no período de 72hs. dos grupos (a) controle e (b) irradiado, (Objetiva 10x), e (c) Fotomicrografia, aspectos histológicos, evidenciando a região cefálica regenerada (quadrado) e a faringe (seta) da planária <i>Dugesia tigrina</i> , no período de 72 horas. do irradiado (Objetiva 5x).....	55
Figura 16: a) Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 0 hora para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x).....	56
Figura 17: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 24 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x).....	56
Figura 18: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 48 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x).....	57
Figura 19: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 72 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado 72 horas (Objetiva 100x). ....	57

Figura 20: Fotomicrografia de uma planária tratada com radiação laser, no tempo experimental de 72 hs após a amputação. A seta mostra um núcleo do neoblasto. (objetiva 100x, HE).....	58
Figura 21: Curva representativa da distribuição dos neoblastos nos diferentes grupos e nos períodos estudados.....	58

## Lista de tabelas

Tabela 1: Modelo do sistema de regeneração. ....	24
Tabela 2: Grupos experimentais, número de animais por grupo e períodos experimentais. ....	50
Tabela 3: Parâmetros que foram utilizados na irradiação. ....	53
Tabela 4: Solução de Bouin.....	53
Tabela 5: Contagem absoluta de neoblastos do grupo controle.....	69
Tabela 6: Contagem absoluta de neoblastos do grupo irradiado.....	69
Tabela 7: Densidade de neoblastos do grupo controle.....	70
Tabela 8: Densidade de neoblastos do grupo irradiado. ....	70

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AlGaInP - Fosfeto de Gálio-Alumínio-Índio

ATP – adenosina trifosfato

cm – centímetro

eV – eletron-volt

GaAs – Arseneto de Gálio

HE - Hematoxilina – Eosina

He-Ne – Hélio Neônio

Hz – Hertz

LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

LBP – Laser de baixa potência

ml – mililitro

mm – milímetro

mW – miliwatt

Nd:YAG – Cristal de  $Y_3Al_5O_{12}$  dopado com Neodímio

nm – nanometro

P – Potência

s – segundo

V – Volt

$\mu\text{m}$  – micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Regeneração .....	19
2.2 A Planária como um Organismo Modelo.....	21
2.2.1 Taxonomia .....	25
2.2.2 Planária Dugesia Tigrina .....	25
2.2.3 Morfologia e Anatomia .....	26
2.2.4 A Regeneração em Planárias.....	32
2.2.5 Neoblastos .....	35
2.3 Laser .....	38
2.3.1 Histórico.....	38
2.3.2 Características Físicas da Radiação Laser .	40
2.3.3 Efeitos Primários da Interação Laser com a Matéria	41
2.3.4 Laser de Baixa Potência.....	41
<b>3 OBJETIVO.....</b>	<b>46</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 Local da Pesquisa .....	47
4.2 Obtenção de Amostras .....	47
4.3 Seleção das Amostras e Condições Laboratoriais	48
4.4 Grupos Experimentais .....	49
4.5 Seccionamento das Amostras e Irradiação.....	50
4.5.1 Irradiação .....	52
4.5.2 Parâmetros de Irradiação.....	53
4.6 Histologia .....	53
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ao final do século passado e início deste, os avanços nas pesquisas visaram, de uma maneira geral, a compreensão de diferentes modalidades terapêuticas investigando a possibilidade de melhorar as condições do organismo enfermo, combatendo doenças com técnicas não invasivas.

Recentemente, tem-se observado grande interesse científico na interação da radiação óptica com sistemas biológicos vivos. A laserterapia vem sendo utilizada com muito sucesso no tratamento de vários processos patológicos, particularmente na cicatrização de feridas e reparo tecidual [1, 2, 3]. A terapia laser modula vários sistemas biológicos envolvidos no processo de reparação tecidual, promovendo modificações bioquímicas e elétricas, dentre outras.

O reparo tecidual é um fenômeno de fundamental importância para os organismos vivos, podendo ser considerado como um dos mecanismos primários de sobrevivência. Assim, novos conhecimentos sobre a capacidade de regeneração tecidual abrem caminhos para sua utilização no reparo de tecidos e órgãos lesados.

O conhecimento da regeneração de partes perdidas ou danificadas é de fundamental importância para a compreensão e controle deste processo e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da engenharia tecidual, medicina regenerativa, biotecnologia dentre outras.

Nos dias atuais, uma surpreendente soma de recursos materiais e humanos é destinada ao estudo das células-tronco e do seu potencial na regeneração de tecidos ou de órgãos irremediavelmente lesados por doenças ou congenitamente malformados.

As pesquisas realizadas com células-tronco, também denominadas células-mãe, pela sua capacidade de originar novas células, permitiram explorar uma via terapêutica alternativa, baseada na reposição de tecidos ou órgãos danificados por trauma ou por qualquer tipo de injúria, seja de natureza química, física, metabólica, infecciosa ou funcional. A reconstituição anatômica (histológica) e funcional de determinados órgãos já é uma realidade no caso da medula óssea e constitui uma grande promessa no caso do miocárdio e de outros órgãos e tecidos nobres, a partir do emprego de células-tronco.

Os estudos desenvolvidos a partir das células-tronco representam um grande avanço do conhecimento relacionado ao modo pelo qual um organismo complexo se



desenvolve a partir de uma única célula. Representam também um enorme progresso na observação de que células saudáveis podem substituir células danificadas nos organismos adultos.

Hoje se sabe que um bom número de tecidos possuem células-tronco de reposição, uma espécie de reserva que o organismo utiliza para tomar o lugar de células maduras desgastadas ou quando ocorre lesão ou remodelação de tecidos.

Pesquisas com as células-tronco suscitam questões de naturezas variadas, para as quais ainda não há respostas satisfatórias. Os resultados são muitas vezes expressivos, mas ainda não se conseguiu explicar o que realmente acontece.

Embora a maioria dos interesses em medicina regenerativa focalizem os benefícios potenciais do embrião ou de células-tronco adultas, existem outros pesquisadores que utilizam uma abordagem diferenciada para o problema. Estes pesquisadores acreditam, embora células-tronco possam oferecer alguns benefícios para um futuro relativamente próximo, será necessária uma outra abordagem para compreender todo o processo regenerativo. Para a busca desses conhecimentos, deve-se primeiro aprender como a natureza já tem resolvido o problema da regeneração e então usar esta informação para realçar a capacidade regenerativa em mamíferos. Estes estudos buscam entender a biologia da regeneração, especialmente os mecanismos celular e molecular que governam os processos regenerativos.

Durante o século dezenove e por quase todo o século vinte, pesquisas sobre regeneração focalizaram principalmente o processo regenerativo e suas bases celulares. Muitas descobertas importantes foram feitas e conduziram, em parte, para a conclusão geral de que células progenitoras são necessárias para a maioria dos processos regenerativos. Entretanto, a origem dessas células progenitoras varia entre sistemas regenerativos.

Alejandro, Sanchez, Alvarado e Emili Saló que trabalham na regeneração natural dos organismos argumentam que evidências moleculares obtidas a partir de suas pesquisas podem ajudar os cientistas no desenvolvimento de terapias celulares em humanos [5, 6, 7, 8].

Sabe-se hoje que alguns organismos, como as planárias e as hydras, conservam populações de células-tronco durante sua vida, e que são mobilizadas quando necessárias. Diferente das células-tronco “adultas” encontradas em tecidos humanos e mamíferos, que tem uma capacidade relativamente restrita para

desenvolvimento em diferentes tipos de células, as células daqueles animais conservam a habilidade de regenerarem muitos dos tecidos do corpo. Em ambos os tipos de organismos, planárias e hydras, procura-se identificar o local em que as células envolvidas adquirem suas instruções, e também quais são os genes e as proteínas que estão envolvidas no processo regenerativo.

As planárias de água doce têm se apresentado como excelente modelo animal experimental devido à sua capacidade regenerativa, capacidade esta que, ao contrário da maioria dos outros animais, está presente em todo ciclo vital. As células-tronco quiescentes estão distribuídas ao longo do seu corpo e quando um dano acontece, as células próximas ao local danificado realizam reparos específicos neste local.

Se para humanos, as lesões do sistema nervoso deixam pouca esperança de recuperação, para as planárias, um organismo capaz de regenerar um indivíduo inteiro a partir de um pequeno fragmento, lesões e amputações são os menores dos problemas. Por isso, tornam-se alvo de interesse para diversos estudos, pela busca de respostas às questões que envolvem a origem, o desenvolvimento e reestruturação de seus tecidos perdidos.

Esta questão apresenta uma intrigante possibilidade: pesquisas em planárias devem revelar como reativar seletivamente os genes e proteínas que conduzem o início do desenvolvimento dos mamíferos, e então induzir a regeneração em tecidos humanos danificados ou perdidos.

Embora muitos dos estudos contêm apenas hipóteses sobre os eventos celulares e / ou moleculares relacionados às experiências específicas, muitas das observações são ainda fundamentais ao entendimento do processo da regeneração. Porém, é interessante notar que, mesmo depois de mais de 250 anos de estudos, a maioria das perguntas biológicas sobre a regeneração permanece sem resposta.

Diversos trabalhos científicos relatam o uso do Laser de Baixa potência (LBP) em tecidos biológicos. A aplicação do laser de baixa potência ao estudo com animais que podem se regenerar completamente ainda necessita de referências na literatura científica. Associar a luz laser com estes animais pode ser o caminho para desenvolvimentos importantes na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa [1]. Desta forma, neste trabalho estudamos a interação laser-tecido em planárias da espécie *Dugesia tigrina* com o objetivo de quantificar o processo regenerativo cefálico desses organismos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Regeneração

A regeneração é a organização tecidual com substituição das células mortas ou lesadas por novas células, idênticas às originais, promovendo a restituição da integridade anatômica e funcional do tecido. É um atributo fundamental de quase todos os seres vivos, mesmo que seja apenas uma restauração simples do tecido ou a recolocação completa das partes perdidas do corpo tais como os membros, cauda, ou cabeça [4].

Os diversos modos pelos quais a regeneração é realizada são muito interessantes quanto à sua distribuição entre os diversos grupos taxonômicos. Sabe-se que é um processo altamente conservado ao longo da evolução, ou seja, se visualizar a escala evolutiva pode se observar que em todos os filos há organismos com capacidade de regeneração, embora essa capacidade regenerativa seja variável entre os diferentes seres vivos [5] (Figura 1).

Espécies mais primitivas na escala evolutiva têm, em geral, maior capacidade de regeneração que os mais diferenciados. Fragmentos de alguns celenterados colocados na areia em água do mar formarão animais completos. Quando uma planária é cortada em pedaços, cada um destes se regenera, formando um novo animal. Estrelas-do-mar e outros equinodermas regeneram braços ou outras partes perdidas. Extremidades pares de caranguejos e outros crustáceos e a cauda de algumas salamandras e lagartos podem soltar-se do corpo quando sob tensão e posteriormente o animal regenera a parte perdida.

Os mamíferos exibem habilidades regenerativas limitadas em comparação com a de outros filos, considerando a alta reestruturação celular destes. A cada dia estima-se que o corpo humano substitui mais de 10 bilhões de células perdidas por ferimento ou por tarefas domésticas celulares ordinárias. O fígado humano, por exemplo, tem a habilidade de regenerar até 70 % de seu tecido. Mais dramáticas, as salamandras, as planárias, e as hydras, dentre outros organismos, crescem partes do corpo inteiramente novas quando estas são perdidas por ferimento ou amputação [6].

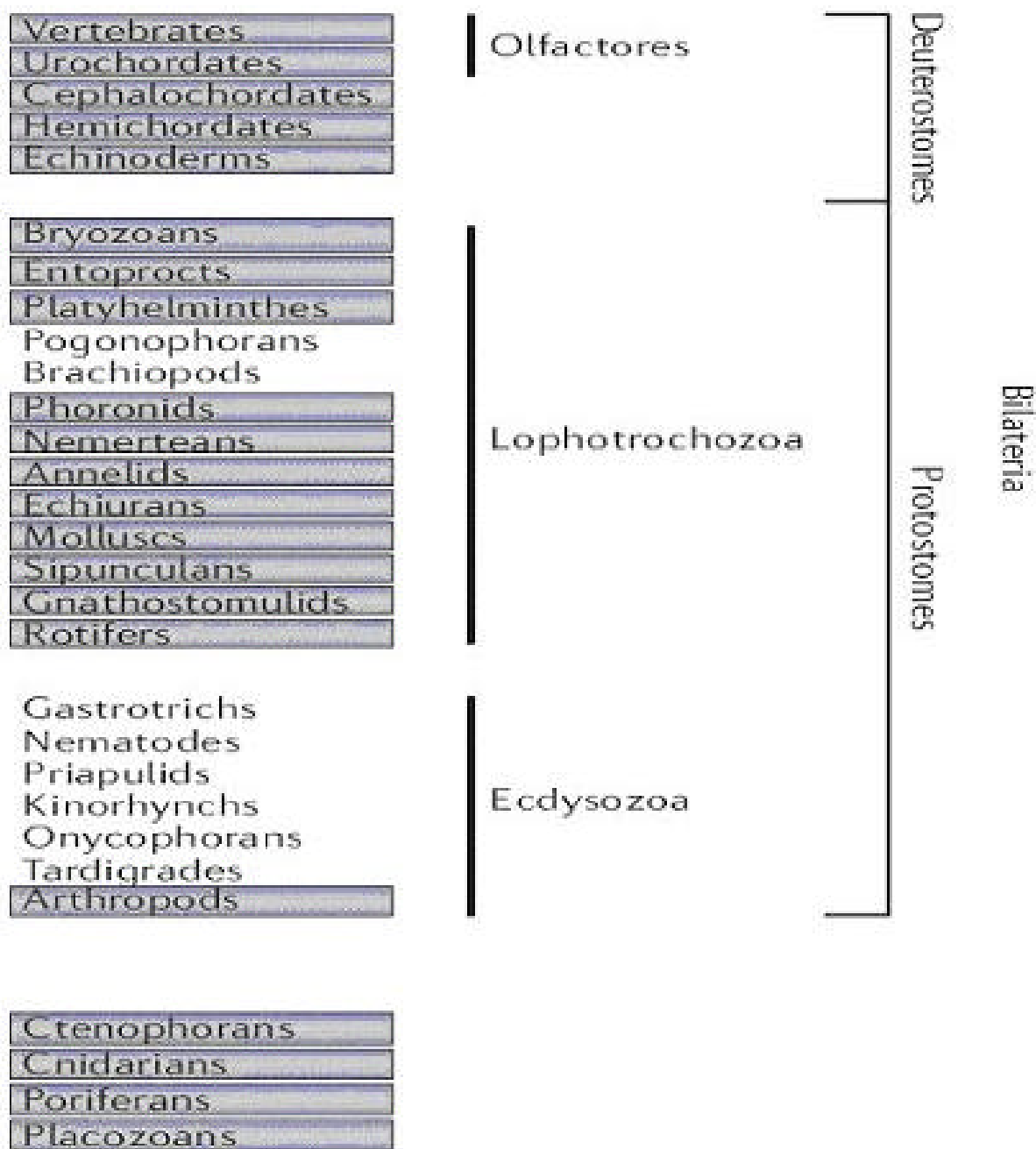


Figura 1: Distribuição filogenética de regeneração em organismos multicelulares. Os animais que possuem capacidade regenerativa estão sombreados. Os animais não marcados, não possuem capacidade regenerativa ou sua presença é desconhecida.

Fonte: [5]

Desde a época da Grécia antiga a regeneração de uma parte perdida do corpo e órgãos danificados tem sido objetos de atenção. A profunda origem dessa precoce fascinação pode ser vista na mitologia grega. As muitas cabeças de Hydra quase derrotaram o herói Hercules por crescer duas novas cabeças por cada uma que ele cortava, e o fígado de Prometeu, devorado por uma águia voraz toda noite, regenerava-se todas as manhãs. Aristóteles, que viveu de 384 -322 AC, notou que

as caudas de lagartos e cobras, assim como os olhos de andorinhas, podiam regenerar [9].

Alguns invertebrados, que estendem suas cabeças e outras partes do corpo a partir de tubos e buracos projetores e as retraem rapidamente são, com freqüência, mordidos por predadores de passagem. A cicatrização dos ferimentos e a regeneração dos órgãos perdidos são comuns entre estes seres e tais perdas de partes corporais tipicamente não resultam em morte e quase sempre se regeneram. Estas criaturas notáveis podem carregar informações importantes para investigadores que desenvolvem terapias celulares humanas, mas as conexões só estão começando agora a serem feitas. Surpreendentemente, sabe-se pouco sobre os mecanismos moleculares que suportam este fenômeno notável. Na realidade, de todos os problemas biológicos existentes há muito, a regeneração é um dos que menos se conhece.

O mecanismo de regeneração vem sendo estudado há mais de dois séculos, conforme demonstrado nos relatos de Abraham Trembley em 1740 em seus estudos com a hydra, onde observou que estes animais quando decapitados poderiam regenerar cabeças inteiras [6, 9, 10], experiência que foi considerada por muitos como o nascimento da biologia experimental. Peter Simon Pallas em 1766 em seus estudos com planárias [6, 9, 7, 11], Lazzaro Spallanzani em 1768 que publicou que a hydra poderia formar dois organismos inteiros quando divididas ao meio, girinos de anfíbios eram capazes de regenerar suas caudas e que salamandras podem regenerar as suas mandíbulas, membros, rabos e olhos respectivamente [9, 12].

Em 1901, após a publicação de 12 artigos sobre regeneração em planária, Thomas Morgan chegou à definição clássica: "Regeneração é o processo biológico que consiste no reparo do tecido após uma lesão" e considerou a regeneração uma propriedade fundamental dos seres vivos, permitindo a eles sobreviver às "agressões" ambientais e se manterem fisiológica e estruturalmente. [6 - 9, 13, - 19].

## 2.2 A Planária como um Organismo Modelo

As planárias de água doce têm sido usadas como modelo experimental clássico para o estudo do processo de desenvolvimento e regeneração. Sua elevada capacidade regenerativa, com a presença de células-tronco totipotentes,

capazes de se diferenciar em qualquer tecido no sistema dos metazoários, fornece um modelo ideal para o estudo de regeneração, sendo mais apropriadas que os outros modelos experimentais tradicionais (insetos, nematelmintos, peixes, anfíbios e mamíferos).

Do ponto de vista evolutivo, os platelmintos representam um ponto de transição, um divisor de águas decisivo (**Figura 2**). Possuem inovações determinantes no caminho da evolução. As planárias mostram-se mais evoluídas que os animais dos filos poríferas e coelenterata por terem simetria bilateral, com diferenciação antero-posterior e dorsoventral; com o corpo organizado com uma extremidade anterior ou cabeça, onde se concentram os órgãos sensoriais e o sistema nervoso, capazes de coordenar movimentos e comportamentos simples, com gânglios cerebróides anteriores dilatados de onde partem cordões nervosos que se estendem ao longo do corpo, mesoderma como um terceiro folheto germinativo produzindo músculos e outros órgãos entre o ectoderma e endoderma, camadas e feixes de músculos possibilitando movimentos variados, gônadas internas com ductos reprodutores permanentes e órgãos copuladores. Em outras palavras, as planárias possuem características anatômicas, morfológicas e estrutural chaves que poderiam ter sido plataformas para a evolução dos tecidos e órgãos altamente organizados encontrados em organismos mais evoluídos [6, 20, 21].

Por sua vez, a planária está sempre em processo contínuo de reposição de células, de crescimento tanto no volume quanto no comprimento dependendo das circunstâncias externas, estando sempre pronta para restaurar-se completamente ou mesmo que seja um fragmento minúsculo de seu corpo. Pode se dizer que, ao contrário da maioria dos outros animais, o mecanismo de modelação das planárias é sempre ativo enquanto o animal estiver vivo [5, 6, 8] (Tabela 1).

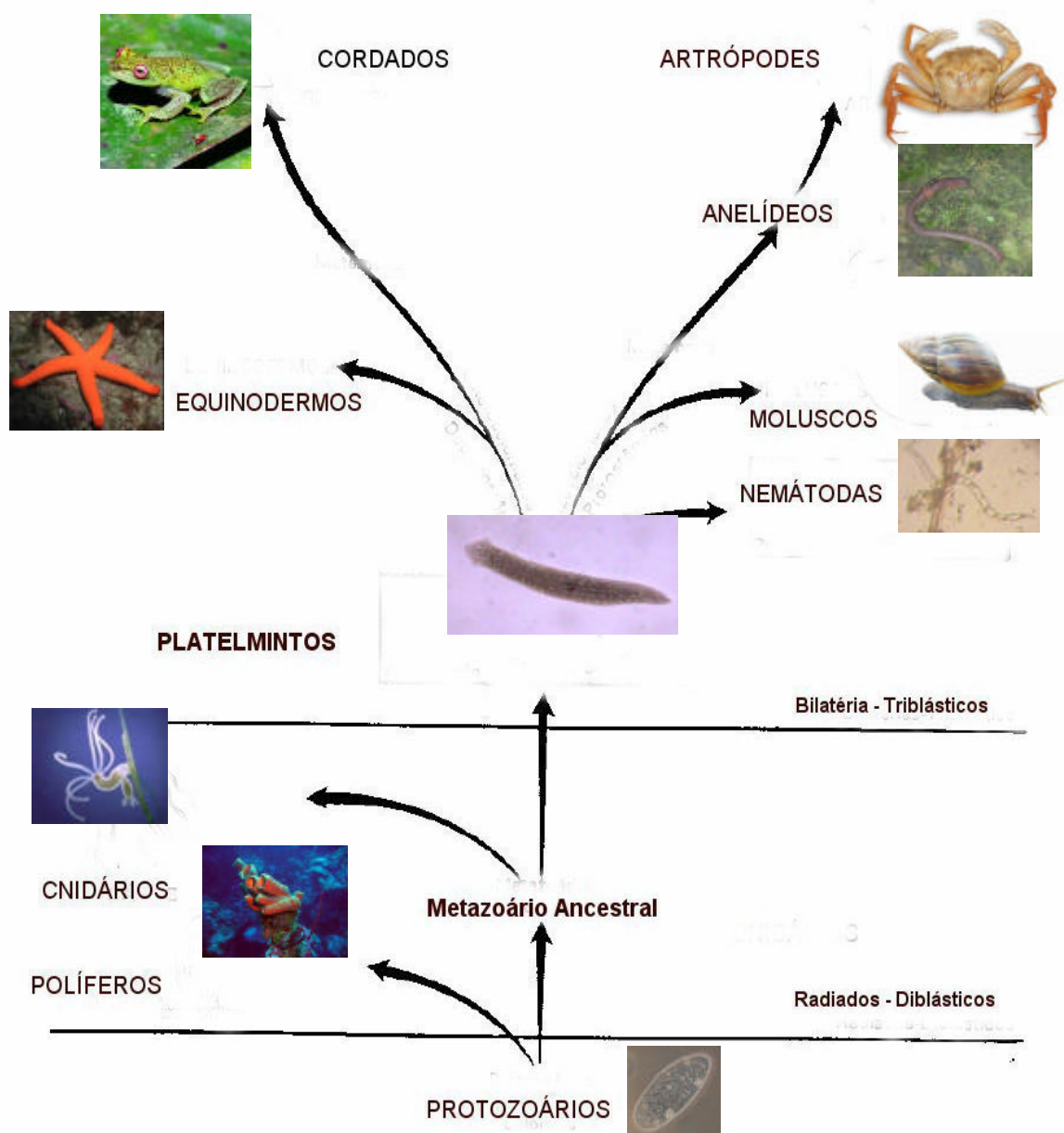


Figura 2: Representação evolutiva, destacando os Platelmintos, como um ponto de transição.

Tabela 1: Modelo do sistema de regeneração

<b>Espécies ou Grupos</b>	<b>Capacidade Regenerativa</b>	<b>Genoma Sequenciado</b>
<b>INVERTEBRADOS</b>		
Hydras	Todos tecidos e órgãos.	Não
Planárias	Todos tecidos (neurônios, músculos, epitélios) e órgãos (Sistema digestivo, muscular).	Sim
Ascídios	Todos tecidos e órgãos.	Sim
<b>VERTEBRADOS</b>		
Salamandras	Membros, caudas, coração, olhos, medula espinhal, mandíbula, retina, células de pêlo da orelha interna.	Não
Axolotís	Membros, cauda, coração, medula espinhal, cérebro.	Não
Rãs	Membros pré-metamórficos, calda, retina, células de pêlo da orelha interna.	Sim
Zebrafish	Barbatanas, cauda, coração, fígado, cordão espinhal, células de pêlo da orelha interna, linha lateral.	Sim
Pintainhos	Células de pêlo da orelha interna.	Sim
Camundongos	Fígado, digitais dos dedos.	Sim

Fonte: [5].

A escolha das planárias como um modelo animal para o estudo de regeneração baseia-se na sua notável plasticidade, na rapidez de sua resposta regenerativa, na população de células-tronco que lhes dá capacidade regenerativa e na facilidade de serem cultivadas em laboratório.

A maioria das espécies de planárias habita o mar e a água doce, mas existem algumas espécies que ocorrem em solos úmidos, rochas e gravetos, apresentando preferência por locais sombreados. São membros comuns da fauna intersticial.

Várias espécies de planária receberam maior atenção, dentre elas a *Dugesia japonica* e *Schmidtea mediterranea* [5, 6]. A *Dugesia japonica* tem sido usada para o estudo da regeneração na última década e tem gerado grande avanço, principalmente dos processos ativados durante a regeneração do sistema nervoso após decapitação [21, 22, 23], no estudo de presença de proteínas nos olhos e aurículas [24], no estudo do sistema muscular [25], na regeneração espontânea de ocelos supernumerários [26], na utilização da imunohistoquímica [27], dentre outros. Alvarado e Newmark têm estudado a *Schmidtea mediterranea* e já caracterizaram um grande número de genes, e a conclusão do genoma está próximo, o que pode sinalizar os principais caminhos usados na embriologia destes animais. O desenvolvimento de técnicas para reprodução de *Schmidtea mediterranea* em condições de laboratório pode proporcionar uma oportunidade sem igual permitindo



uma nova compreensão da embriogênese destes organismos, o que pode ajudar nas investigações de processos regenerativos em Metazoários [16].

### 2.2.1 Taxonomia

Os Platyhelminthes são considerados por muitos por ocupar uma posição importante na evolução dos Metazoários [20].

As Planárias de água doce pertencem ao Filo: Platyhelminthes, atualmente considerados, como um grupo Lophotrochozoa [6, 9, 13, 16, 19, 21, 28 - 32] por possuírem simetria bilateral, o grupo principal do Protostomes, o blastóporo orifício da gástrula formará a boca [6, 9, 21, 30, 33]; da classe Turbellaria por ser um organismo de vida livre; da ordem Tricladida por possuir faringe tubular, direcionada posteriormente e sistema intestinal dividido em três ramos [14, 20, 28, 30, 31, 33]; sub-ordem Paludicola [10] referente ao habitat em que ocupa, Família: Dugesiidae [11], Gênero: *Dugesia* (Girard, 1851) e Espécie: *Girardia tigrina* (Girard, 1850), também conhecida como *Dugesia tigrina*.

### 2.2.2 Planária *Dugesia Tigrina*

As planárias, *Girardia tigrina* (Girard, 1850), também conhecida como *Dugesia tigrina* (Ball, 1974) (**Figura 3**), são animais pequenos de vida livre, que habitam locais de água rica em matéria orgânica, incluindo córregos, lagos e rios, onde aderem à superfície inferior de plantas submersas, como as raízes de macrófitas (por exemplo, *Eichornia sp*), rochas e gravetos, sempre evitando a luz. Estão mundialmente distribuídas.



Figura 3: Fotografia de uma planária *Dugesia tigrina* usada neste trabalho de pesquisa

### 2.2.3 Morfologia e Anatomia

A *Dugesia tigrina* é um verme achatado, esguio e mole, tem o comprimento variando de 3 a 15 mm, com extremidade anterior ou “cabeça” em forma de triângulo obtuso e um corpo afilado que vai do cinza a vários tons de marrom com manchas de pigmento escuro. São metazoários de vida livre, simetria bilateral [33 - 36], possuem uma região anterior, uma posterior, uma dorsal e uma ventral, apresentam o corpo alongado e achatado, com aspecto de uma fita. São animais triblásticos (formam três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma), todavia ainda se mostram acelomados, o espaço existente entre a musculatura e os órgãos internos são preenchidos pelo parênquima, de origem mesodérmica [8, 33, 34, 36].

O sistema esquelético é inexistente [β] e a única estrutura de suporte é a membrana basal elástica situada abaixo da epiderme (**Figura 4**). O esqueleto intracelular é uma camada em forma de teia de filamentos de actina (teia terminal) dentro da própria epiderme, camada que aparentemente ajuda a suportar os estresses na epiderme.

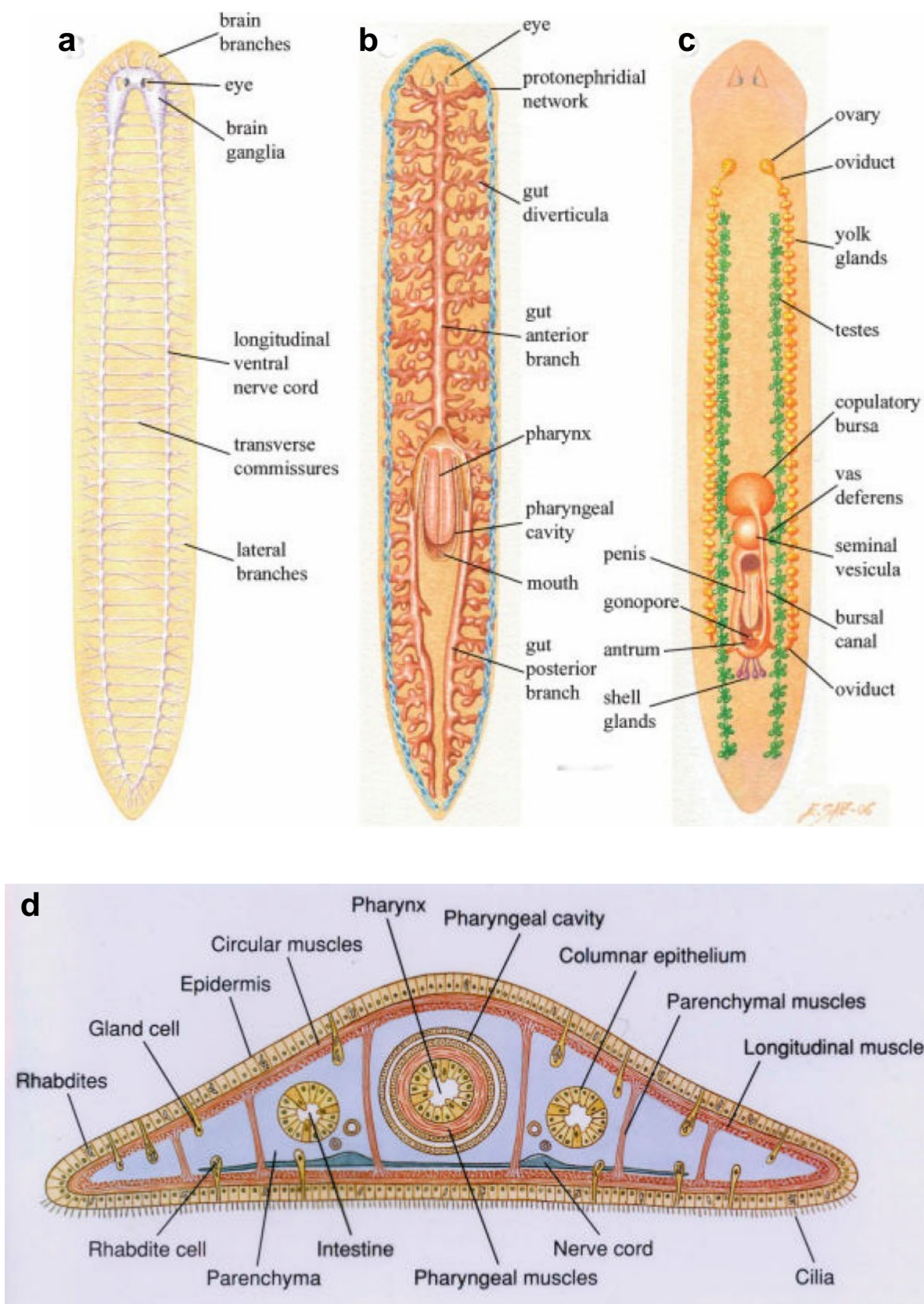


Figura 4: a) Esquema do Sistema nervoso central, b) Sistema digestivo, c) Sistema reprodutivo e d) Corte transversal da *Schmidtea mediterranea*.

Fonte: [8].

O corpo é revestido pela epiderme constituída de uma única camada de células cubóides, que repousa em uma membrana basal elástica que se constitui de três elementos estruturais, uma zona eletroluscente, uma camada limitante e uma camada microfibrilar [11, 37]. A epiderme ventral é em grande parte revestida com cílios que servem para locomoção (**Figura 4**). Uma característica importante é a presença de numerosas células glandulares, que podem encontrar-se completamente na epiderme ou submersas no interior ou abaixo das camadas musculares, com somente o colo das glândulas penetrando na epiderme. Tais glândulas têm função de adesão, secreção de muco. O muco produzido por estas glândulas exerce um papel muito importante, pois reveste o substrato por cima do qual o animal rasteja e ajuda na captura e deglutição das presas [6, 8].

Abaixo da membrana basal há camadas de fibras musculares circulares, longitudinais, diagonais e também dorsoventrais (**Figura 4**). A mais externa é circular, a mediana é diagonal e a mais interna é longitudinal, atravessando o parênquima, nota-se ainda os feixes musculares que compõem a musculatura dorsoventral [7, 8, 11, 25, 34], que não são usadas para locomoção, que é feita pelo epitélio ventral ciliado [7, 8].

As células parenquimais são diversas, sendo as mais importantes as células de reposição epidérmicas (células que migram do parênquima para a superfície corporal e repõe quaisquer células epidérmicas danificadas ou destruídas, meio necessário em virtude de ausência de mitose na epiderme), as células formativas livres, os neoblastos (populações de células totipotentes que são fundamentais na cicatrização e na regeneração dos ferimentos, sendo as responsáveis pela formação do blastema celular que originará os tecidos perdidos acidentalmente ou por amputação), as células parenquimais fixas e algumas células pigmentares [21].

O sistema digestivo compreende boca, faringe protráctil e intestino e a falta de ânus caracteriza o sistema digestivo incompleto (**Figura 4**). A boca, situada na superfície ventral e mediana, é o orifício de saída da faringe. A faringe tubular é pregueada, com paredes musculares, e direcionada posteriormente podendo ser estendida para capturar alimentos. A faringe é utilizada tanto para ingestão como para egestão de alimentos. A cavidade digestiva, ou intestino, é tipicamente um saco cego e muito ramificado, assim nenhuma célula está muito longe do tubo digestivo, aumentando a área de digestão e a distribuição eficaz dos alimentos. Sua parede tem camada única e é composta de células fagocitárias e glandulares, constituída

por um epitélio simples cilíndrico de origem endoblástica, e se divide em três ramos principais, um anterior e dois posteriores e cada um desses ramos, por sua vez, tem muitos divertículos laterais. O ramo anterior percorre medialmente o corpo terminando na cabeça, os dois outros ramos se encurvam para trás, ladeiam a bolsa faríngea e terminam na extremidade posterior. Os três ramos emitem numerosas ramificações irregulares e terminam em fundo cego [7, 8, 11] (**Figura 4**).

As planárias são animais carnívoros e necrófagos, ingerindo pequenos animais, vivos ou mortos. Quando famintas locomovem-se ativamente, reunindo-se rapidamente em torno do alimento, seja ele pequenos crustáceos, larvas de insetos ou mesmo pequenos animais em decomposição. Quando uma começa a se alimentar, outras são logo atraídas, por substâncias difundidas do alimento ou pelos sucos digestivos. O alimento é aprisionado em muco por elas secretado e então, a faringe muscular é protraída na direção do alimento, que através de movimentos de sucção e ação de enzimas secretadas por células glandulares permitem a penetração progressiva nos alimentos. As partículas alimentares são levadas ao intestino que também funciona como cavidade gastrovascular, desde que serve para a circulação dos alimentos. A digestão é dupla: extracelular e intracelular. A digestão extracelular ocorre na luz intestinal e decompõe apenas as gorduras. As substâncias protéicas e os hidratos de carbono são fagocitados e digeridos por células da parede do intestino, responsáveis pela digestão intracelular. Os produtos da digestão passam, gradualmente, por difusão para os demais tecidos. Os materiais não digeridos são eliminados pela própria boca, pois não possuem ânus. De acordo com as condições ambientais, como por exemplo durante períodos de fome prolongada, planárias reduzem o seu tamanho [20, 35, 38]. Esta mudança em tamanho de corpo é devida a uma redução global em número total de células, ao invés de uma redução em tamanho das células, certos órgãos degeneram e são utilizados como fonte de energia para o organismo.

As planárias são desprovidas de sistema circulatório [8], a distribuição dos nutrientes é realizada pela ramificações do intestino, por difusão nas células da parede intestinal [6, 11]. Não existe também sistema respiratório [8], a respiração é aeróbia, as trocas gasosas ocorrem diretamente entre a epiderme e o meio externo, e grande parte dos resíduos metabólicos, como a amônia, é eliminada por difusão, pela superfície corporal.

As planárias são os primeiros animais da escola zoológica que apresentam um sistema excretor, que é constituído por duas redes de túbulos situados no parênquima, percorrendo lateralmente o corpo. As últimas ramificações dos túbulos terminam nas células flama, enquanto outros túbulos atingem a superfície dorsal, onde se abrem através de minúsculos poros excretores. As células flama ou solenócitos são elementos fundamentais do sistema excretor [6]. É uma célula alongada, percorrida por um canalículo no qual existe um tufo de cílios vibráteis [8]. A porção terminal da célula é alongada e contém o núcleo. O solenócito absorve catabólitos e o excesso de água, funcionando, portanto, também como elemento de equilíbrio osmótico. O batimento dos cílios provoca correntes líquidas que enviam as substâncias coletadas para o sistema de túbulos e finalmente poros excretores. Funcionam ainda como elementos excretores as células endodérmicas que revestem o intestino.

Quanto ao sistema nervoso, este é bem desenvolvido, sendo os primeiros organismos da escala zoológica dotados de sistema nervoso central. Quando comparada com um celenterado, mostra muito mais coordenação na ação de suas partes. Isto resulta do desenvolvimento superior do sistema nervoso, auxiliado pelas estruturas sensitivas espalhadas na epiderme, particularmente na região cefálica. A complexidade das fibras musculares, dirigidas pelo sistema nervoso, possibilita maior variedade de movimentos. O sistema nervoso é do tipo ganglionar e mais diferenciado do que o primitivo sistema difuso dos celenterados. Possuem a tendência evolutiva de agrupar células nervosas na região anterior do corpo, nos gânglios cerebrais, conhecida como cefalização. Na região cefálica, "cabeça", distingue-se um cérebro primitivo constituído por dois gânglios cerebróides, fusionados, entre duas manchas oclares pretas, médio-dorsais, os "olhos", e de cada gânglio sai um cordão nervoso ventral longitudinal. Os dois cordões nervosos ligam-se transversalmente através de comissuras nervosas e emitem numerosos nervos periféricos (Figura 4). Estudos realizados evidenciam uma grande capacidade de responder a estímulos luminosos (fototactismo); corrente de águas (reotactismo); alimentos (quimiotactismo) e a estímulos mecânicos (tigmotactismo) [7, 11, 19, 21, 35].

Os estímulos externos são recebidos por células sensoriais finas e alongadas, os fotorreceptores, situadas no lado ventral do corpo entre as células epidérmicas. Os órgãos sensoriais mais típicos são os olhos rudimentares e do tipo "cálice

invertido", denominados ocelos, estruturas compostas por células fotorreceptoras, responsáveis pelo comportamento fotonegativo das planárias. Os ocelos consistem de duas células: uma célula de nervo bipolar com uma haste transparente com uma estrutura fotorreceptora e uma estrutura em forma de "xícara" que contém as células de pigmento. A célula bipolar conecta diretamente com o gânglio cefálico por uma fibra do nervo que cruza parcialmente o gânglio contrário e produz um cruzamento ótico parcial. Não existe cristalino (lente ocular), a epiderme que recobre o olho não é pigmentada, facilitando a passagem da luz, mas não formam imagens [19, 24, 25, 26, 39].

Podem apresentar três tipos de estratégia reprodutiva: assexuada, sexuada ou ambas. Reproduzem-se assexualmente por fissões transversais ou sexualmente por fecundação cruzada [7, 11, 20, 40]. A reprodução assexual acontece através de fendimento transversal, normalmente posterior à faringe e os pedaços perdidos são regenerados, por outro lado, são hermafroditas, reproduzem sexualmente por fecundação cruzada. Algumas espécies combinam estas duas modalidades, podendo alternar entre reprodução sexual e assexual durante estações climáticas e sazonais, enquanto outros utilizam um único modo de reprodução [11]. Os órgãos sexuais só aparecem no animal adulto, formados a partir das "células formativas" do parênquima. O genital masculino consta de centenas de testículos pequenos e esféricos, distribuídos em dois grupos laterais. Dos testículos partem canalículos, denominados vasos eferentes que desembocam nos dois grandes vasos deferentes que percorrem longitudinalmente e lateralmente o corpo. Dos vasos deferentes saem os dois ductos deferentes de maior calibre, que se unem e formam a vesícula seminal, para guardar espermatozóides. Da vesícula sai o pênis, um tubo muscular situado no átrio genital, uma espécie de bolsa que envolve a porção terminal dos sistemas genitais e se comunica com o exterior através do poro genital. O genital feminino compreende um par de ovários esféricos situados anteriormente, na base da cabeça. Cada ovário liga-se a um oviduto que percorre o corpo ventralmente. Durante o seu longo trajeto, os dois ovidutos recebem numerosas glândulas vitelogênicas que produzem as células vitelínicas que acompanham o óvulo; os dois ovidutos terminam na vagina, mediana e ligada a uma dilatação, o receptáculo seminal. A abertura da vagina também se dá no átrio genital [8] (Figura 4).

No processo sexuado ocorre a troca de gametas masculinos entre os dois animais, com deposição de cápsulas de ovos após a fecundação dos gametas

femininos. As cápsulas são fixas ao substrato através de um pedúnculo que termina em um disco adesivo. Não há nenhuma fase larval, conseqüentemente, o resultado da embriogênese são pequenas planárias no casulo [11, 40].

#### 2.2.4 A Regeneração em Planárias

Há muito tempo os biólogos perceberam que as planárias possuem um desenvolvimento excepcional que permite a estes metazoários simples se regenerar completamente quando cortadas tanto transversal como longitudinalmente ou mesmo em fragmentos minúsculos. Elas possuem propriedades regenerativas notáveis que lhes fazem um dos modelos clássicos para o estudo de regeneração, sua habilidade de recompor um corpo inteiro de um punhado de células parece quase milagrosa, já é conhecida por quase dois séculos, mas há uma compreensão limitada de como ocorre.

Os estudos do processo de regeneração datam do trabalho do naturalista alemão Peter Simon Pallas (1741-1811) que, em 1766, foi o primeiro a descrever como um pedaço de cabeça dissecado de uma planária poderia se regenerar em um organismo completo. Esta observação foi confirmada poucos anos depois por Shaw e por Draparnaud, que notaram a habilidade destes animais de se reproduzir assexuadamente por fissão. Porém, a análise experimental de regeneração em planárias começa com o trabalho de Dalyell em 1814 e Johnson em 1822, que infligiram incisões parciais ou completas para averiguar a capacidade regenerativa destes animais [11, 19]. Os resultados destas experiências levaram Dalyell a concluir que planárias poderiam ser consideradas “imortais debaixo do fio de uma lâmina”. Em 1897 Harriet Randolph [41], mostrou uma variedade de modos nos quais cortou as planárias, para desafiar as suas habilidades de regeneração. Randolph cortou os animais transversalmente, longitudinalmente, transversalmente e longitudinalmente e transversalmente em oito partes, em a maioria dos casos, cada um dos pedaços obtidos foi capaz de regenerar animais completamente normais e que um pedaço pouco visível ao olho nu poderia regenerar uma planária completa. Morgan em 1898 usou as experiências de Randolph como ponto de partida para seu próprio trabalho e mostrou que um fragmento  $1/279^{\circ}$  de tamanho do organismo original é competente para regenerar um animal inteiro, o que corresponde a aproximadamente a 10.000



células, confirmando assim e estendendo os resultados de Randolph (Figura 5). [6, 9, 11, 14, 42]

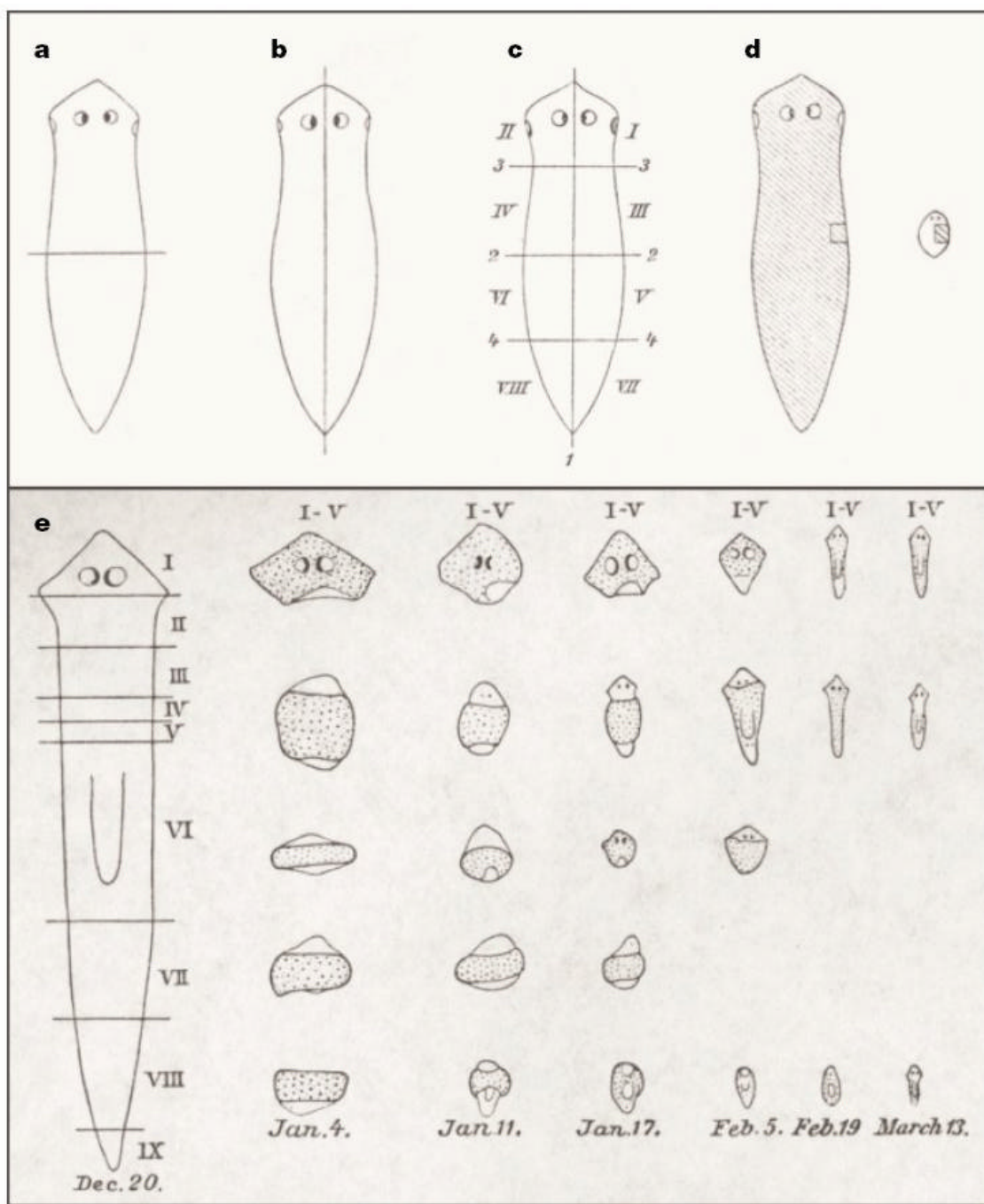


Figura 5: Ilustração original do trabalho de Randolph e de Morgan que mostra a extraordinária plasticidade das planárias. (a) Corte transversal, (b) Corte longitudinal, (c) Corte em oito fragmentos e os números indicam a ordem de amputações, (d) Fragmento pouco visível a olho nu, (e) Restauração de proporção apropriada para fragmentos regenerantes. Os numerais romanos de I a V indicam a amputação dos fragmentos descritos a esquerda. O período de observação é indicado para cada coluna com o fragmento I acima e o fragmento V abaixo.

Fonte: [6].

Esta capacidade de regeneração deriva de uma população de células que permanece mitoticamente ativas ao longo da vida. Estas células são

chamadas de neoblastos, são as únicas células mitóticas destes organismos na fase adulta, e servem para substituir células perdidas durante o curso de vida e manter o animal intacto.

Sabe-se hoje que quando uma planária é cortada ou ferida, a epiderme adjacente avança sobre o ferimento e o sela. Esta massa em forma de domo de células não-especializadas (neoblastos), chamada blastema de regeneração, é um broto regenerativo sem pigmentação, que se forma debaixo da epiderme. Finalmente, as partes perdidas do corpo se diferenciam a partir destas células no interior do blastema [8, 19, 29, 36].

Não há certeza quanto à origem do blastema, mas algumas hipóteses são aceitas, uma delas é que suas células indiferenciadas podem surgir de células diferenciadas, tais como as células musculares, por meio de um processo de reversão da célula ao seu estado indiferenciado embrionário totipotente; uma outra hipótese sugere que se origina a partir de um conjunto permanente de células indiferenciadas totipotentes, tais como os arqueócitos das esponjas ou as células intersticiais dos cnidários; ou ainda há quem acredite na combinação dos dois processos [7].

Até a década de 50, acreditava-se que a primeira hipótese não poderia ser possível, a célula, uma vez diferenciada, não teria como desdiferenciar. Mas hoje já não se pensa mais assim, por várias razões, e uma delas seria o processo de clonagem, que foi feito com a ovelha Dolly. Neste caso, foi utilizado um núcleo somático de uma célula adulta, de uma ovelha adulta, uma célula de uma glândula mamária e ao fazer o transplante do núcleo desta célula para um ovócito que foi enucleado fez com que genes que estavam inativos voltassem a ser ativados em uma certa seqüência de tal forma que produziu uma ovelha adulta.

Por razões descritas anteriormente, a biologia da planária favorece a hipótese da desdiferenciação. A evidência da desdiferenciação é baseada em estudos histológicos e de microscopia eletrônica onde células perdem a sua morfologia e participam da regeneração, entretanto outros estudos usando métodos similares falharam. Além disso, estudos de diferenciação em planárias têm sido complicados pelas limitações metodológicas que causam dificuldades na interpretação dos resultados. Possivelmente o argumento mais forte para a ocorrência de desdiferenciação é fornecido pelo trabalho de Gremigni *et al* [7, 8, 22, 43].

Para Hori, 1998, a regeneração do blastema consiste de três tipos de células: as indiferenciadas, as regenerativas e as diferenciadas. Mudanças quantitativas s destas células dentro do blastema oferecem importantes indícios sobre o processo de regeneração [44].

É interessante notar que, nas planárias, as partes regeneradas já surgem com a forma padrão encontrada no animal íntegro, assemelhando-se a uma "miniatura" da parte original perdida. Com o decorrer do tempo, as regiões em regeneração crescem, atingindo as dimensões originais e proporcionais ao restante do corpo. Formam-se, portanto, dois novos organismos de tamanho e formato similares ao que lhes deram origem.

#### 2.2.5 Neoblastos

Já faz algum tempo que os embriologistas se interessam pelo estudo das células indiferenciadas que estão distribuídas por todo o corpo de planárias adultas e outros platelmintos, especialmente porque a proliferação celular, tanto em planárias inteiras como em amputadas, é restrita a esta pequena população de células indiferenciadas chamadas de neoblastos [45, 46].

Wagner 1890, Lehnert 1891, Keller 1894 já mostravam um grande interesse por estas pequenas células (5–10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), que são extremamente distintas, altamente indiferenciadas, com um grande núcleo e muito pouco citoplasma, conhecidas como neoblastos, um termo primeiramente usado por Harriet Randolph (1897) [41] para descrever um tipo de células particular no anelídeo *Lumbriculus*, e posteriormente adotado para descrever células similares em planárias (Figura 6).

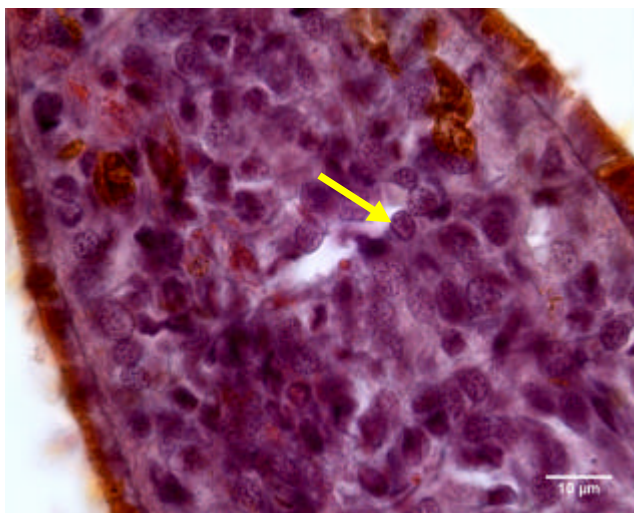


Figura 6: Fotomicrografia de corte histológico da planária *Dugesia tigrina*. Seta aponta para o núcleo de um neoblasto (objetiva 40x, HE).

Os neoblastos são os responsáveis pelo potencial regenerativo das planárias. Em resposta a um ferimento são sinalizados para dividir-se e/ou diferenciar-se, deste modo substituindo as células perdidas. Eles constituem 25-30% de todas as células das planárias e podem-se diferenciar em epiderme, músculos, neurônios e células germinativas, entre outros [7, 8, 10, 15].

Sabe-se que neoblastos são células indiferenciadas que se dividem nas planárias, são células-tronco totipotentes, são as únicas células mitóticas que servem como fonte celular durante a regeneração, e que após a amputação, são sinalizadas para proliferar localmente, e seu aumento dá origem ao blastema de regeneração [15]. Um botão regenerativo formado por uma massa celular sem características próprias, que após algum tempo, sofre modificações e dá origem às partes perdidas dos animais, mas ainda não está claro como a amputação pode ativar a resposta proliferativa, já que existem poucos marcadores específicos e sua morfologia relativamente uniforme torna difícil determinar a extensão da heterogeneidade que pode existir nesta população de células [47]. Experimentos com o marcador BrdU revelam importantes aspectos da dinâmica da população de neoblastos [6, 7, 8, 13, 47], como por exemplo, que uma grande sub-população de células na fase G2 (segunda fase de crescimento, em preparação para a divisão celular) não existe no organismo intacto. Tal sub-população foi usada no passado para explicar a antecipação do pico mitótico que acontece entre 5-12 hs iniciais da regeneração [7, 13]. Porém, ainda não está claro, como a amputação pode ativar a resposta proliferativa dos neoblastos. Além disso, até mesmo em animais intactos,

uma média de 6 % de todos o neoblastos são marcados com uma única aplicação de BrdU, sugerindo a presença de neoblastos na fase S (fase em que o DNA é replicado) [7]. Embora experiências com o marcador BrdU começassem a esclarecer os parâmetros de ciclo dos neoblastos, este só não pode elucidar se a proliferação dessas células nas planárias é composta de um ou múltiplos tipos de células-tronco. É ainda possível que a totipotência aparente dos neoblastos possa refletir na combinação de atividades de tipos múltiplos de células-tronco.

Os neoblastos têm muito pouco citoplasma, e é difícil pensar que tais células se movem ativamente em resposta para sinais de ferida. De fato, tem sido proposto que os movimentos dos neoblastos são resultados de uma difusão lenta e indireta causada por um movimento casual vinculado a proliferação de células. Entretanto, células com uma morfologia similar aos neoblastos têm sido observadas migrando para uma área em frente dos fotoreceptores e a faringe, sugerindo que os próprios neoblastos poderiam ser capazes de migração apesar de não estar diferenciado morfológicamente. Além disso, migração de células-tronco com uma morfologia similar a neoblastos tem sido observada em outros organismos, assim como o movimento de células-tronco hematopoéticas da medula óssea até a corrente sanguínea. Dubois & Wolff executaram uma série de engenhosos experimentos no final dos anos 40 envolvendo irradiação parcial de planárias que suprem a mais obrigatória evidência para datar que neoblastos podem migrar [48, 49].

*Kato et al* do RIKEN Centro de Desenvolvimento biológico em Kobe, Japão, mostraram que os neoblastos de planárias se baseiam em sinais provenientes de tecidos vizinhos àqueles danificados para definir sua localização – e conseqüentemente fazer os reparos necessários. Neoblastos de uma *Dugesia japonica* foram mortos utilizando-se raio X. Uma fatia do espécime irradiado foi transplantada de forma invertida para um segundo espécime, substituindo-se a parte correspondente deste. Neoblastos intactos presentes nas vizinhanças do tecido enxertado se aproximaram do tecido transplantado e produziram nestes, células que eram consistentes com a orientação invertida do segmento inserido. Os resultados convencerem que indicadores provenientes de células diferenciadas, presentes no meio local, são essenciais para instruir os neoblastos a se regenerarem corretamente [50].

Quando uma planária é amputada transversalmente, são gerados dois fragmentos que são capazes de regenerar através do blastema de regeneração que

se diferenciara dorso-ventral, antero-posterior e polaridade apropriada. O termo polaridade tem sido usado para descrever o fato de que a região da cabeça regenera a cauda e a região caudal regenera uma cabeça, segundo Morgan: "Algo no próprio fragmento determina que uma cabeça irá desenvolver em uma superfície anterior do corte e uma cauda em uma superfície posterior do corte". Este "algo" é chamado polaridade" [7, 15].

## 2.3 Laser

Os efeitos de luz coerente e não-coerente em tecidos biológicos e células vêm chamando a atenção de investigadores ao redor do mundo. Os efeitos fotoquímicos podem ser benéficos ou destrutivos em células e tecidos.

Os lasers tiveram sua aplicação inicial na área científica, no setor bélico, comunicações e foram rapidamente introduzidos na área médica. As aplicações em oftalmologia e dermatologia foram as que primeiro incorporaram a tecnologia laser.

Vários estudos demonstraram que a irradiação com laser não cirúrgico, na região visível e infravermelha do espectro, contribui para a biomodulação positiva nos tecidos biológicos. Pesquisas relatam efeitos positivos da terapia laser no reparo de lesões em tecidos como: musculares; nervosos; ósseo e cutâneo [2, 3, 51, 52, 53]. Pesquisas *in vitro* foram feitas utilizando fibroblastos, células cancerosas e bactérias [54 - 57].

Desde a sua concepção, os lasers encontraram uma aplicação imediata na medicina, e particularmente na cirurgia, porém em estudos mais recentes, os pesquisadores voltaram-se para as possíveis aplicações clínicas das interações atômicas da luz do laser com os tecidos [58].

### 2.3.1 Histórico

Durante muito tempo o sol foi à única fonte de luz intensa de que se tinha conhecimento. Vários séculos de evolução da ciência, bem como muitos estudos a respeito do mecanismo de interação entre luz e matéria, foram necessários para que, com base no postulado de Einstein sobre a emissão estimulada de radiação, fosse obtido, por um processo puramente físico, um raio colimado, de alta precisão e

de grande potência, o raio LASER (do inglês: "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation").

A base científica do Laser teve início em 1900, com a teoria Quântica proposta por Max Planck, a qual analisava as relações entre a quantidade de energia liberada durante processos atômicos. Em 1917, Einstein discorreu sobre a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação eletromagnética para absorção e emissão de radiação, concluindo que a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico, culminando em seu postulado da "Emissão Estimulada" de radiação.

Somente em 1953, com base na teoria de Einstein e os princípios discutidos por Nikolay Basov e Alexander Prokhorov, do Lebedev Institute of Physics, foi construído por Townes, o primeiro aparelho de emissão estimulada, um oscilador que operava na banda de ondas milimétricas, que foi chamado de MASER, "Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation" [58].

Em 1958, Schawlow publicou os princípios da amplificação de microondas por emissão estimulada da radiação que originou pela primeira vez os conceitos de monocromaticidade e coerência [59].

Schawlow e Townes propuseram o desenvolvimento do "maser óptico", porém o primeiro a construí-lo foi Theodore Maiman, em 1960, enquanto trabalhava no laboratório Hughes em Malibu, Califórnia, USA, produzindo um raio de luz vermelha a partir de um cristal de rubi, com um comprimento de onda de 694,3 nm, com características diferentes da luz do sol ou de lâmpada incandescente [60]. Desde então, uma infinidade de lasers tem sido inventada, mas apenas um pequeno número foi viabilizado para aplicações práticas na ciência, indústria, comércio, e militares.

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

Em 1962, Patel desenvolveu o laser de Hélio-Neônio (He-Ne), primeiro laser de onda contínua, com comprimento de onda de 632,8 nm [61]. O que foi considerado apenas um objeto de muita curiosidade, posteriormente descobriu-se ter uma infinidade de aplicações. Da pesquisa básica até o uso em medicina, atualmente o laser faz parte de nosso cotidiano.

### 2.3.2 Características Físicas da Radiação Laser

O laser possui algumas características que diferem da radiação gerada por outras fontes (por exemplo, lâmpadas comuns), são elas:

- **Monocromaticidade:** que quer dizer “uma só cor”, a luz emitida possui, idealmente, um único comprimento de onda. O comprimento de onda determina os efeitos terapêuticos específicos da laserterapia, portanto este parâmetro determina quais são as biomoléculas específicas que absorverão a radiação, ocasionando uma interação fotobiológica;
- **Colimação:** Os fótons que compõem o laser caminham paralelamente entre si; é também chamada de unidirecionalidade. Esta propriedade é responsável pela elevada densidade de potência do feixe de luz laser;
- **Coerência:** ocorre o sincronismo entre o tempo (coerência temporal) e o espaço (coerência espacial) dos fótons emitidos pelo laser. Porém ao penetrar nos tecidos, esta propriedade se perde nos primeiros estratos. Isso ocorre devido ao caráter fortemente espalhador da luz nas estruturas biológicas. Apesar da perda de coerência da radiação luminosa no interior dos tecidos, esta é absorvida pelas células gerando alterações no seu metabolismo tanto em tecidos superficiais como profundos;

Estas características permitem que grande quantidade de energia seja focalizada em uma área diminuta, obtendo-se uma elevada densidade de potência e intensidade, o que permite procedimentos terapêuticos precisos e sem força mecânica para destruir o tecido, sendo esta a propriedade básica da utilização do laser, como instrumento terapêutico e cirúrgico.

A radiação laser pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada pelo tecido. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos, com resposta afim a um ou a vários comprimentos de onda, fenômeno conhecido como ressonância a uma determinada frequência. Cada comprimento de onda, portanto, terá um tipo diferente de interação segundo o tecido alvo.



Os lasers podem ser divididos em Laser de Alta Potência (cirúrgico) e Laser de Baixa Potência (não-cirúrgico), e pode trabalhar com diferentes meios ativos: sólido, líquido, gasoso ou semicondutor (diodo).

### 2.3.3 Efeitos Primários da Interação Laser com a Matéria

Efeito Bioquímico: o laser pode provocar a liberação de substâncias pré-formadas como a histamina, a serotonina e a bradicinina, bem como modificar reações enzimáticas normais, tanto acelerando como retardando essas reações.

Efeito Bioelétrico: a radiação laser proporciona aumento na produção de ATP, o que promoveria um aumento na eficiência da bomba sódio-potássio, com isso a diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior da célula é mantida com melhores resultados.

Efeito Bioenergético: defende-se que o aporte energético da radiação laser tem capacidade de normalizar o contingente energético que coexiste com o contingente físico dos indivíduos.

### 2.3.4 Laser de Baixa Potência

Lasers de baixa potência (LBP) são lasers que possuem baixa energia, sem potencial fototérmico, sendo utilizados para biomodulação. Os mais usados estão na faixa do vermelho e infravermelho próximo (632 a 830 nm), com fótons de energia inferior a 2,0 elétron-volt (eV), portanto, inferior à energia da ligação das moléculas biológicas e do DNA, não podendo quebrar ligações químicas e não sendo capazes de induzir mutação e carcinogênese.

A possibilidade de focalização em pequenas áreas e a alta densidade de energia presente no feixe fazem do laser um instrumento de grande interesse e importância para aplicações nas áreas biomédicas, tanto no diagnóstico como na terapia.

O efeito produzido pela irradiação com LBP se baseia na capacidade de modulação de diversos processos metabólicos em diferentes sistemas biológicos, mediante a conversão da energia luminosa aportada pelo laser através de processos bioquímicos e fotofísicos, os quais transformam a luz laser em energia útil para a célula, sendo sua ação terapêutica, na reparação tecidual, bastante complexa pela

indução de efeitos locais e sistêmicos. A radiação óptica penetra no interior dos tecidos, é absorvido pelas células, provoca reações nas mitocôndrias, com um aumento do metabolismo celular a partir do nível de ATP produzido pela mitocôndria, aumento do consumo de glicose celular, aumento dos teores de cálcio intracelular e do número de mitocôndrias celular [62]. Acredita-se que existem foto-receptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, que, ao absorverem fótons, desencadeiam reações químicas. Desta forma o LBP acelera, em curto prazo, a síntese de ATP e em longo prazo a transcrição e replicação do DNA. Portanto, a biomodulação positiva causada pela luz ocorre em nível molecular e seu efeito é dependente do comprimento de onda e da dosimetria.

O laser de baixa intensidade estimula a síntese de colágeno, de fatores de crescimento, o aumento da vascularização tecidual, a proliferação de macrófagos, o aumento do número e de granulação de mastócitos, aumento da mitose de fibroblastos, melhora da epitelização e da proliferação celular. A literatura relata ausência de efeito térmico e presença de efeito sistêmico no estímulo à cicatrização de tecidos [58].

As primeiras aplicações clínicas com laser operando em baixa potência foram relatadas em 1966 por Mester, de Budapeste - Hungria, que apresentou os primeiros relatos de casos clínicos sobre "Bioestimulação com Laser" de úlceras crônicas de membros inferiores usando lasers de rubi e de argônio. Ele produziu um grande volume de trabalhos científicos, clínicos e experimentais, tendo o laser de He-Ne, como tema central [54].

Em 1973, seguindo a mesma linha de Mester, Heinrich Plogg de Fort Coulombe - Canadá, apresentou um trabalho sobre "O uso do laser em acupuntura sem agulhas", para atenuação de dores [58]. A partir do final dessa década, a tecnologia de lasers de semicondutores recebeu grande impulso. As vantagens destes sobre o laser de He-Ne é que, além da menor dimensão, apresenta maior penetração no tecido biológico. Outra vantagem é que este dispositivo pode operar de forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só opera em modo contínuo.

A partir dos anos 90, diferentes materiais semicondutores foram introduzidos para obtenção de diodos laser gerando uma larga faixa de comprimentos de onda. Com estes dispositivos têm-se hoje aparelhos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com baixa frequência de manutenção além do baixo custo.

O laser operando com baixa potência tem sido utilizado com muito sucesso nos mais diversos tipos de tratamentos de vários processos patológicos, visando sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos, principalmente por seus efeitos na reparação tecidual, melhorando a regeneração e cicatrização de tecidos, tanto em feridas crônicas ou agudas. Seu efeito pode gerar manifestações bioquímicas, fisiológicas e proliferativas de diversas enzimas, células nos tecidos, além da síntese de colágeno, liberação de fatores de crescimento das células [54] em diferentes órgãos do organismo, dependendo do comprimento de onda, dosimetria e intensidade do feixe [63].

O comprimento de onda é fator determinante na interação laser-tecido. Corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa, sendo medida em nanômetros (nm) e a frequência de suas oscilações em Hertz (Hz). Geralmente, é o meio ativo, que dá o nome ao laser, determina sua pureza espectral e seu comprimento de onda, conferindo características diferentes de emissão e de possível ação biológica.

A energia entregue ao tecido altera, através de diversas reações bioquímicas, o metabolismo usual da região tratada. A exposição dos tecidos à radiação laser na região do vermelho aumenta a taxa de formação do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, como também o tamanho e o número de mitocôndrias. Somando-se a isso, existe um acúmulo de material fibrilar no citoplasma de fibroblastos. Estas mudanças estão associadas à ativação do metabolismo e a síntese protéica, acelerando a cicatrização [54].

A energia laser tem sido investigada como alternativa de tratamento nos processos de regeneração dos tecidos biológicos. Diversas pesquisas desenvolveram-se perante a evidente necessidade de se reduzir o tempo de reparação dos tecidos, principalmente em doenças consideradas incapacitantes.

A aceleração do processo cicatricial foi o primeiro efeito benéfico do laser de baixa potência que foi estudado, por isso o efeito ficou inicialmente conhecido como bioestimulação. Entretanto como se percebeu que poderia haver tanto estimulação como também inibição da atividade celular, mudou-se a terminologia; o termo bioestimulação foi substituído por biomodulação, enfatizando o mecanismo não térmico [54].

Os lasers de baixa potência, cada dia mais estão ampliando o seu campo de atuação em terapias tanto para os seres humanos como para os animais. Possuem

um efeito eminentemente analgésico, antiinflamatório e bioestimulante, sendo utilizados nos casos de aftas, eczemas, herpes labial, cicatrizes, quelóides, necroses, artroses, bronquites, asma, edemas, tendinites, pré e pós cirúrgico, queilite angular, trismos, parestesias, hipersensibilidade dentinária, pós-intervenções endodônticas, gengivites, periodontites, sinusites, dores em geral. Têm seu comprimento de onda variando na região do espectro visível e infra-vermelho próximo, destacando-se os lasers de He-Ne (632,8nm), AlGaAs (630 – 670 nm) e GaAs (904 nm) como os mais usados [64].

Com a crescente utilização do laser de baixa intensidade na área clínica visando reduzir o tempo de reparo em lesões dermatológicas como úlceras e lesões abertas, sendo estas condições patológicas incapacitantes, as pesquisas buscam condições e parâmetros mais favoráveis e comprimentos de ondas mais adequados para o tratamento destas condições patológicas. Isso motivou diversos trabalhos experimentais visando descrever os efeitos do laser utilizando diversos parâmetros e lasers para promover uma melhor resposta no processo de reparação tecidual.

Entretanto resultados conflitantes a respeito da eficácia da laserterapia na reparação foram descritos por diversas pesquisas. Uma das justificativas encontradas vai ao encontro das afirmações de Rigau, pois estes estudos indicam que devido à escolha de parâmetros ópticos variados, utilizando-se de fluências baixas ou extremamente elevadas podem ter causado os efeitos indesejados nos achados [65].

O fator primário do mecanismo de ação do Laser é a estimulação da mitocôndria. Estudos em cultura de célula têm verificado que foto-receptores (citocromos, flavo-proteínas) absorvem a energia do Laser, a qual estimula a síntese de ATP via fosforilação oxidativa.

A laserterapia é indicada principalmente naqueles quadros patológicos onde se pretende obter melhor qualidade e maior rapidez do processo reparacional (quadros de pós-operatório, reparação de tecido mole, ósseo e nervoso), quadros de edema instalado (em que se busca uma mediação do processo inflamatório), ou nos quadros de dor (crônicas e agudas).

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, sendo os fibroblastos um dos tipos celulares diretamente envolvidos nesse complexo processo.

As alterações resultantes da ação Laser nos processos de regeneração ainda constituem objeto de pesquisa, e, portanto, os mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos.

### **3 OBJETIVO**

Estudar a proliferação de células-tronco em planárias regenerantes submetidas à ação da radiação laser de baixa potência, em 660 nm, nos estágios iniciais do processo regenerativo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local da Pesquisa

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofotônica e Óptica não Linear do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da UNIVAP - São José dos Campos e no Laboratório de Histologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da UNESP – São José dos Campos.

### 4.2 Obtenção de Amostras

As amostras da espécie *Dugesia tigrina* (**Figura 7**) foram coletadas pelo processo de lavagem de raízes de plantas aquáticas de água doce em um lago situado na cidade de Paulínia /SP.



Figura 7: Alguns espécimes que foram objetos de estudo desse trabalho, acondicionados em placa de Petri.

### 4.3 Seleção das Amostras e Condições Laboratoriais

Cada espécime foi selecionado de acordo com a perfeita morfologia apresentada, sendo descartados aqueles nos quais houvesse qualquer tipo de fragmentação do corpo ou sinais que evidenciassem regeneração, tais como sinais ou marcas de alterações morfológicas, padronizando sempre o comprimento entre 1,0 e 1,4 cm, aproximadamente, conforme **Figura 8**.

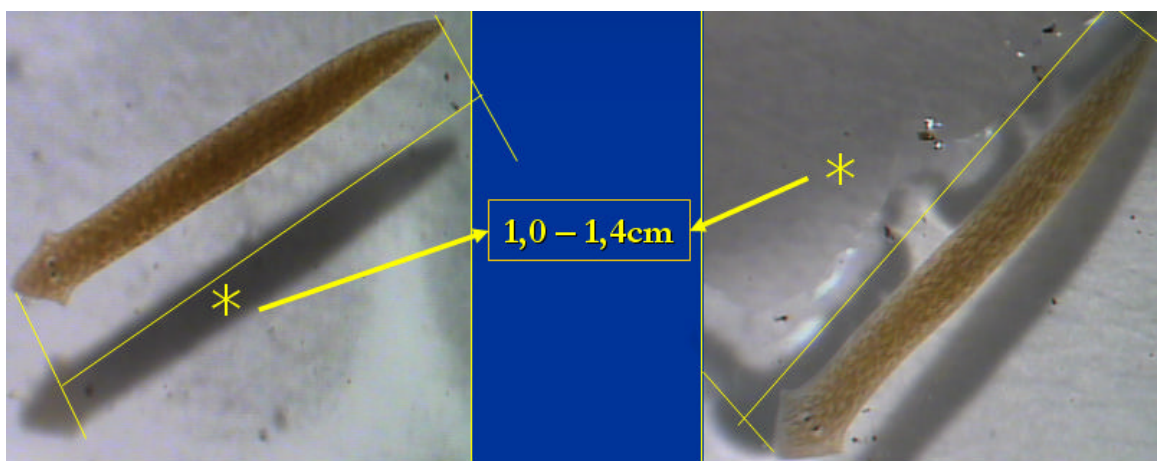


Figura 8: Seleção de espécies de acordo com morfologia e tamanho

Para a observação dos animais foi utilizada uma lupa estereoscópica com fator de magnificação de 30x e cada animal foi acondicionado em placa de Petri com 3 ml de água não clorada, utilizando-se para a manipulação das amostras pincéis de pêlo de marta (**Figura 9**).

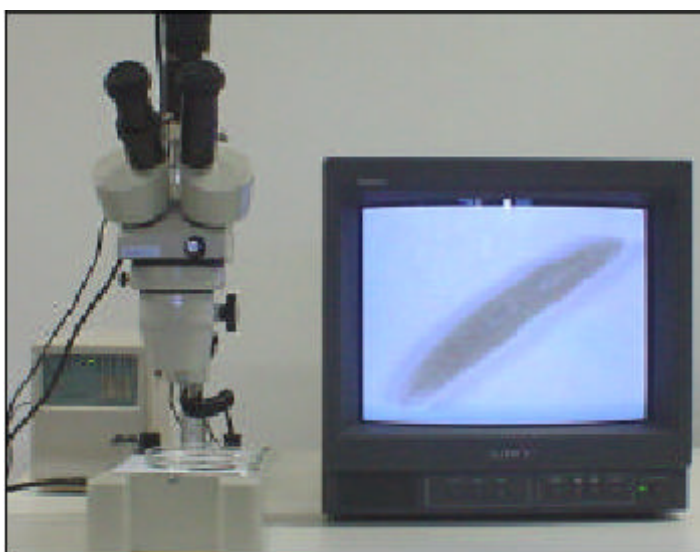


Figura 9: Lupa estereoscópica acoplada a um monitor de vídeo



As amostras foram mantidas em laboratório com temperatura controlada, que variou entre 19° e 21°C, separadas individualmente em recipientes plásticos abertos, contendo água não clorada. As amostras ficaram protegidas da incidência direta de radiação luminosa durante o experimento.

A alimentação foi realizada com fígado bovino fresco fragmentado uma vez por semana, e foi suspensa uma semana antes do seccionamento dos animais, conforme protocolo utilizado usualmente em experimentação com planárias [43].

#### 4.4 Grupos Experimentais

Foram utilizados 52 animais sendo todos seccionados na região entre a cabeça e a faringe, logo abaixo das aurículas, para procederem à regeneração (**Figura 10**), seguindo protocolo utilizado em trabalho anterior publicado pelo nosso grupo de pesquisa [1].



Figura 10: Representação esquemática do local do corte

Os espécimes foram separados aleatoriamente e colocados em recipientes plásticos individuais (**Figura 11**), contendo água, e estes foram acondicionados em estantes apropriadas para separação dos grupos que permaneceram em ambiente com ausência de luz.

Foram constituídos dois grupos experimentais, um grupo controle (C) não irradiado e um grupo irradiado (I), separados de acordo com o protocolo experimental, conforme **Figura 11**.



Figura 11: Sistema utilizado para acondicionamento dos espécimes com as respectivas rotulações dos grupos

Os animais do grupo irradiado (I) foram irradiados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após o seccionamento.

Após cada período experimental os animais foram sacrificados conforme Tabela 2.

Tabela 2: Grupos experimentais, número de animais por grupo e períodos experimentais

Grupos	<b>PERÍODOS EXPERIMENTAIS</b>			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
CONTROLE	5	5	5	5
IRRADIADO	8	8	8	8

#### 4.5 Seccionamento das Amostras e Irradiação

A mais comum das técnicas de anestesia nestes espécimes é o uso de placas de gelo cobertas por papel absorvente, onde o gelo reduz a temperatura, imobilizando-o, e o papel absorvente impede a aderência dos espécimes na placa de gelo.

O principal problema no uso de placas de gelo durante a manipulação é a perda da planicidade da placa com o tempo de manipulação e temperatura do

ambiente. A manipulação do espécime em um mesmo local da placa de gelo durante poucos segundos provoca derretimento com formação de cavidades que ficam recobertas com a água proveniente do gelo, dificultando a estabilização da amostra durante o procedimento e conseqüentemente prejudicando a padronização do experimento. A condição ideal para anestesia e manipulação destes animais seria uma superfície plana e pouco rugosa que mantivesse as características iniciais e com controle de temperatura.

Visando alcançar a condição ideal foi utilizado um dispositivo que simula a técnica acima descrita, especialmente para este fim e fixado em uma lupa estereoscópica acoplada a um monitor de vídeo (Figura 12).

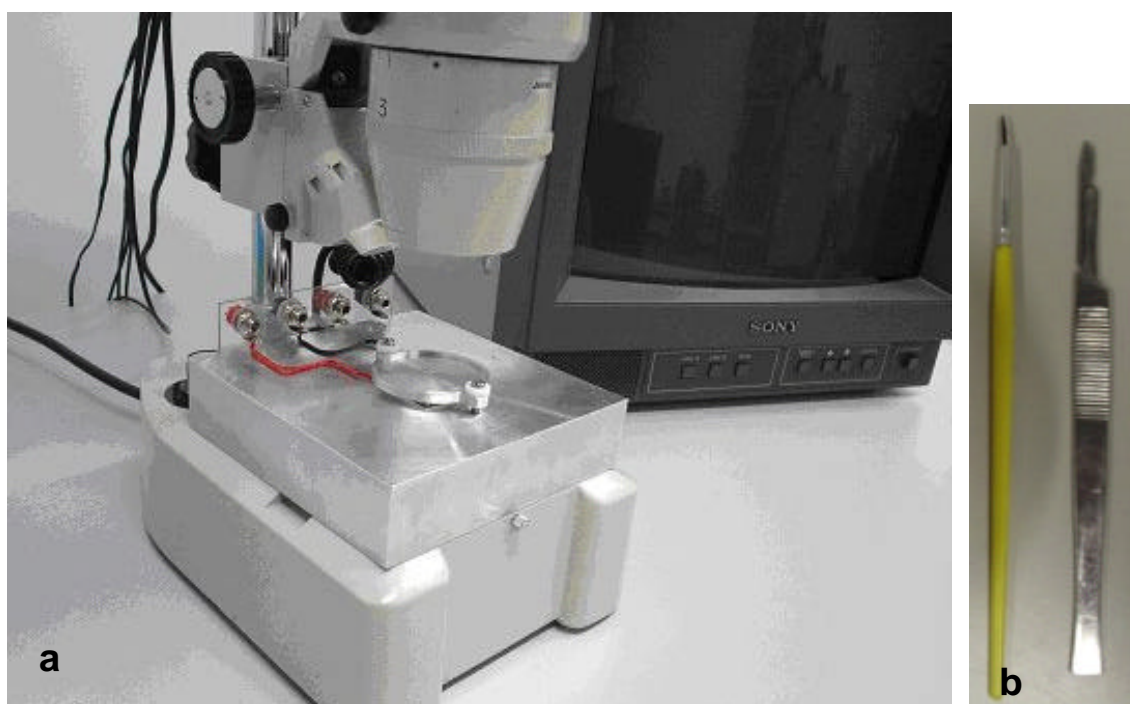


Figura 12: a) Dispositivo fixado em uma lupa estereoscópica. b) Instrumental para seccionamento

Com o auxílio de um pincel, cada animal foi colocado no dispositivo de resfriamento sobre um papel filtro umedecido com água e seccionado na região cefálica determinada no protocolo experimental, conforme descrito anteriormente no tópico 4.4 com um bisturi (**Figura 13**).

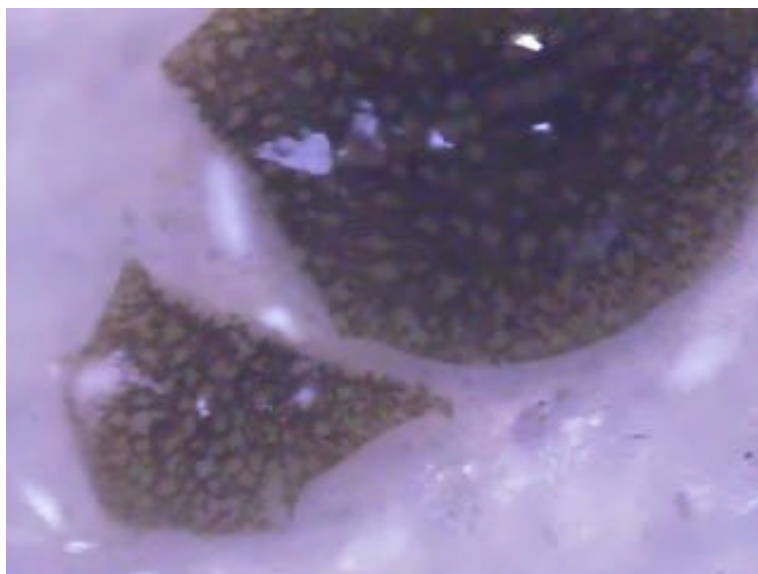


Figura 13: Espécime após corte

#### 4.5.1 Irradiação

O laser utilizado na irradiação foi um laser de diodo (AlGaInP), da empresa MM Optics LTDA, modelo Twin Laser, comprimento de onda em 660 nm (Figura 14).

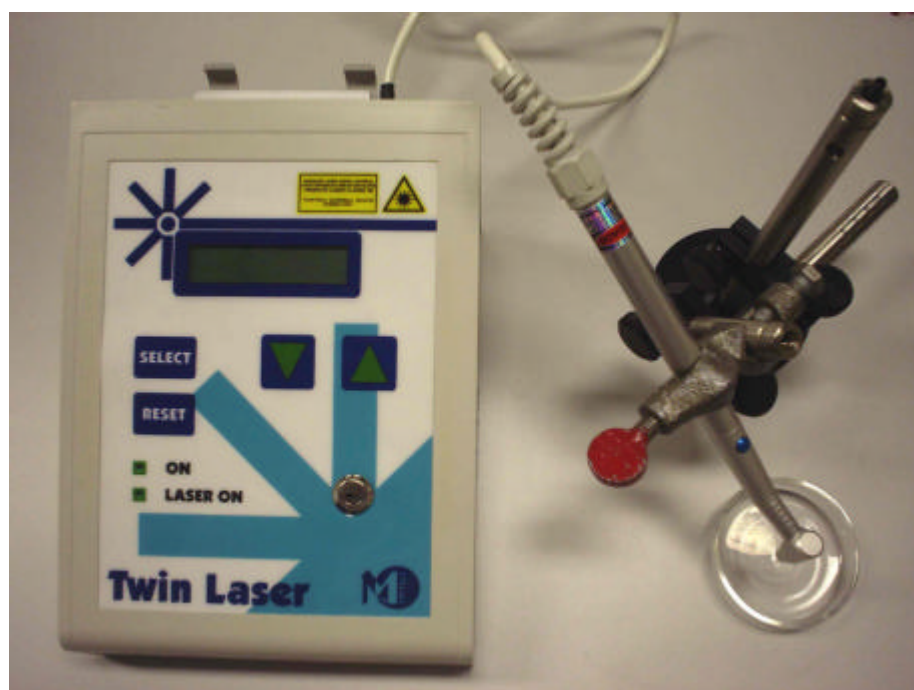


Figura 14: Laser de diodo, da empresa MM Optics LTDA, modelo Twin Laser

#### 4.5.2 Parâmetros de Irradiação

Os parâmetros da irradiação foram definidos conforme descrito por *Souza et al* [1], os quais estão reproduzidos na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros que foram utilizados na irradiação

$\lambda$ (nm)	P (mW)	Área (cm <sup>2</sup> )	Tempo (s)
660±1	35±1	0,385±0,05	60

Imediatamente após cada período experimental procedeu-se a fixação histológica dos espécimes. Assim no grupo 0 horas, 5 espécimes do grupo controle (C) foram imediatamente fixados após o corte e 8 animais do grupo irradiado (I) foram submetidos à irradiação com laser vermelho, com comprimento de onda de 660 nm por um período de um minuto e logo após procedeu-se a fixação histológica, procedimento que se repetiu a cada 24 horas durante o período experimental determinado.

#### 4.6 Histologia

Para a realização do estudo histológico, utilizamos a técnica modificada por *Souza et al* em que houve uma alteração dos tempos utilizados rotineiramente [66]

Como procedimento inicial da técnica histológica, realizou-se a fixação dos espécimes com solução de Bouin, sem previa anestesia, preparada conforme Tabela 4.

Tabela 4: Solução de Bouin

SOLUÇÃO DE BOUIN	Volume (ml)
Solução saturada de Ácido Pícrico	75
Formaldeído	25
Ácido Acético Glacial	5

Em seguida os exemplares foram desidratados adotando-se banhos sucessivos de ordem crescente de concentração do Álcool etílico (70%, 95% e 100%) por 15 minutos cada e diafanizados em xilol por 10 minutos. A inclusão em blocos de resina Paraplast (Oxford Labware, EUA) aconteceu após um período de impregnação de três horas em estufa a 60 °C. Posteriormente, foram feitos cortes seriados, obtidos através de um micrótomo MICROM, modelo HM 325, com espessura de 3 µm e corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

Os cortes histológicos assim obtidos foram estudados com auxílio de um microscópio de luz (Leica, DM LB2) usando como referência a presença da faringe.

Foi estudada a região cefálica regenerada a partir do fragmento corpo. Nesta região foi quantificada a presença de neoblastos. Para a quantificação de neoblastos foi selecionado um campo da região em regeneração na imagem do corte histológico, obtida por câmera de vídeo CCD e registrada pelo software LEICA QWIN®, utilizando-se a objetiva de maior aumento (x100). Essa análise foi realizada em cada grupo estudado, em cada período experimental.

## 5 RESULTADOS

No presente trabalho foram analisados cortes histológicos da região cefálica regenerada a partir do fragmento do corpo de planárias *Dugesia tigrina*, em que foi quantificada a presença de neoblastos. A análise foi realizada através de fotodocumentação dos cortes histológicos.

A **Figura 15** mostra o aspecto morfológico da região cefálica em processo de regeneração de planárias *Dugesia tigrina* após 72 horas para os grupos (a) controle e (b) irradiado. Foram feitos cortes histológicos sagitais, latero-laterais, da região mediana do animal, tendo sido estudada a região cefálica sob processo de regeneração a partir do fragmento do corpo, tomando como referência a faringe mediana.

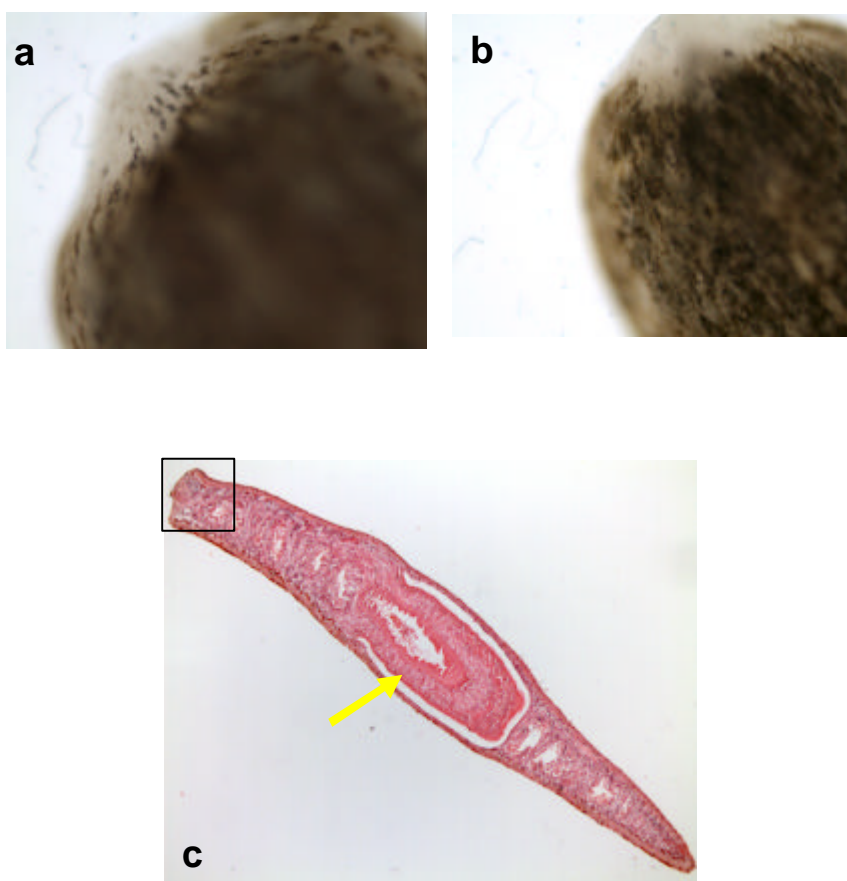


Figura 15: Fotomicrografia, aspectos morfológicos, da região cefálica regenerada da planária *Dugesia tigrina*, no período de 72hs. dos grupos (a) controle e (b) irradiado, (Objetiva 10x), e (c) Fotomicrografia, aspectos histológicos, evidenciando a região cefálica regenerada (quadrado) e a faringe (seta) da planária *Dugesia tigrina*, no período de 72 horas. do irradiado (Objetiva 5x).

Nas Figuras 16 a 19 são apresentados os registros histológicos representativos de cada grupo, registradas com a objetiva de 100x de magnificação para caracterização histomorfométrica.

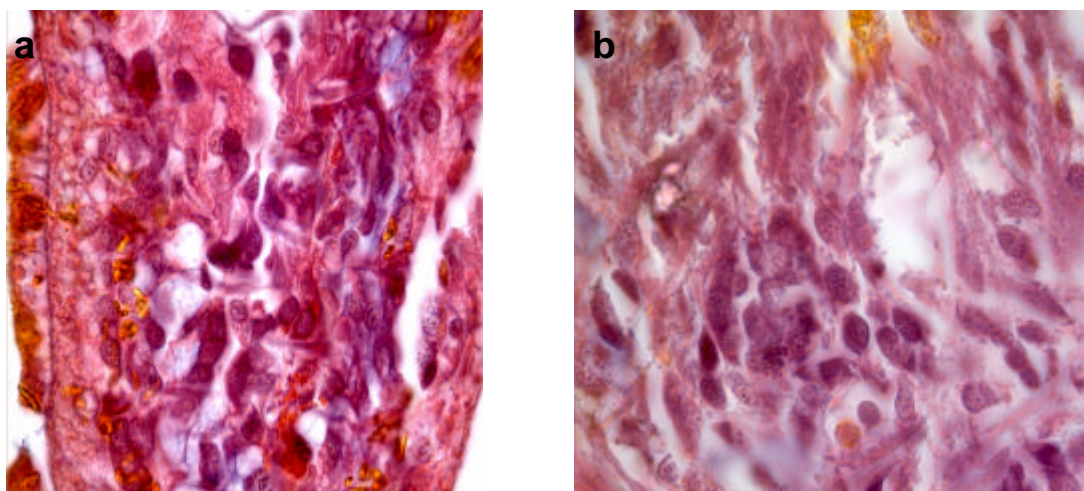


Figura 16: a) Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 0 hora para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x)

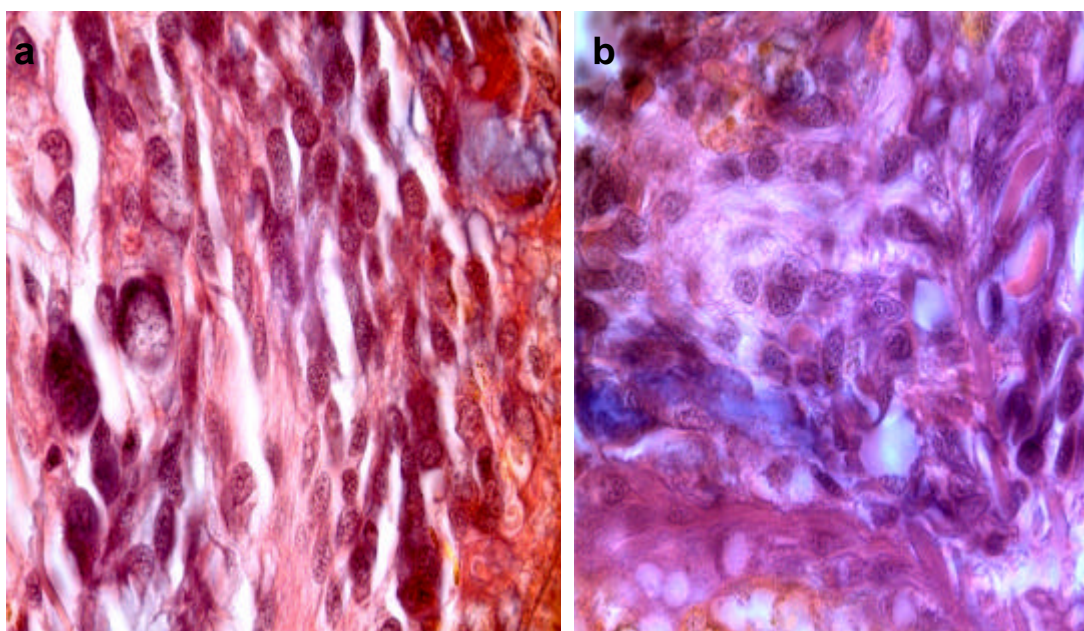


Figura 17: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 24 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x)



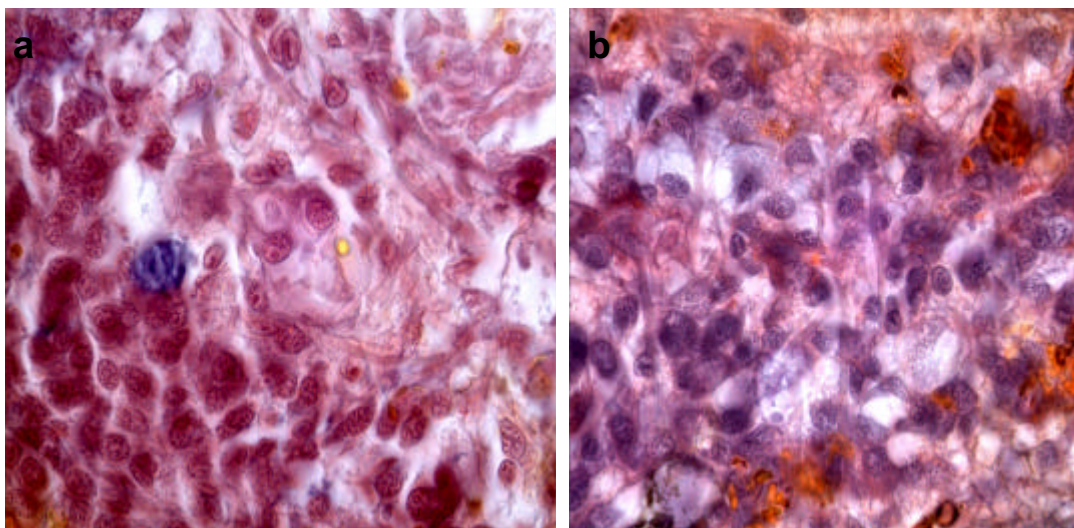


Figura 18: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 48 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado (Objetiva 100x)

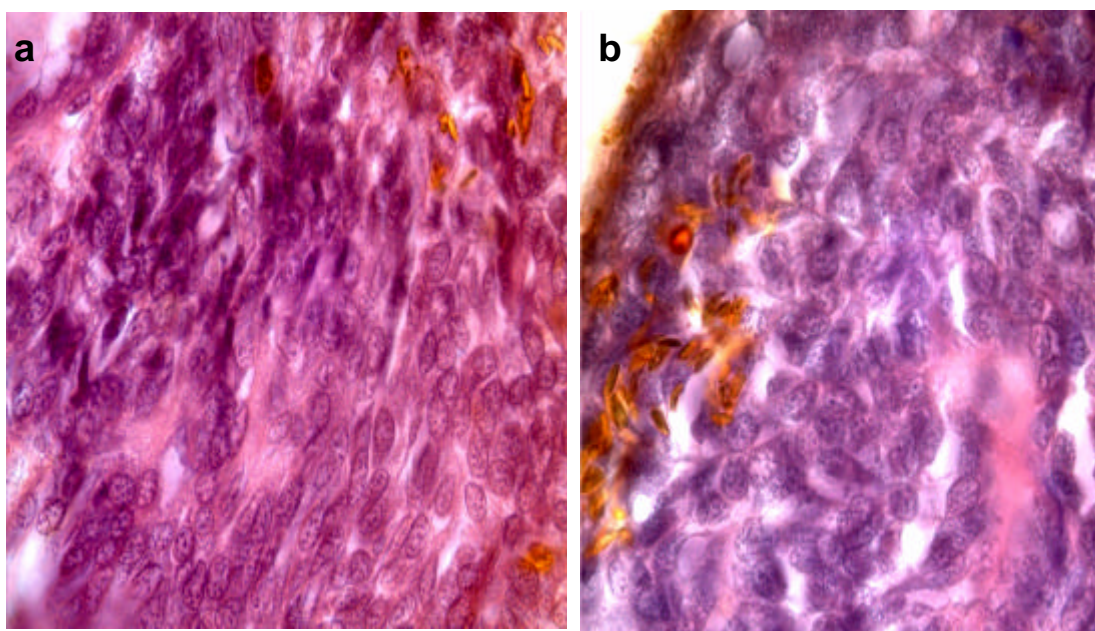


Figura 19: Fotomicrografia da região regenerante, correspondente a 72 horas para a espécime do grupo (a) controle e (b) irradiado 72 horas (Objetiva 100x)

Na **Figura 20**, pode-se observar os neoblastos presentes, células indiferenciadas com um núcleo muito grande, que adquire cor azulada quando coradas com H-E.

Os cortes histológicos evidenciaram na região cefálica em processo regenerativo grande número de neoblastos com núcleo vesiculoso que apresenta basofilia fraca e cromatina finamente granulada.

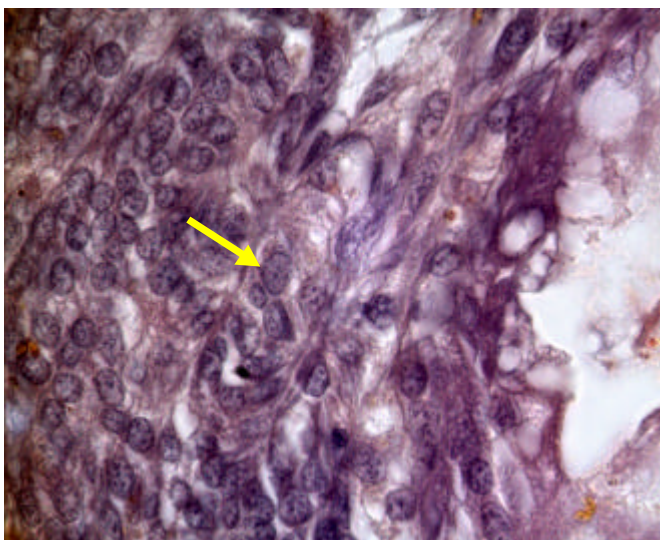


Figura 20: Fotomicrografia de uma planária tratada com radiação laser, no tempo experimental de 72 hs após a amputação. A seta mostra um núcleo do neoblasto. (objetiva 100x, HE)

Para comparação dos resultados foi realizada a contagem absoluta dos neoblastos de cada imagem registrada (Tabela 6 e 7, Apêndices). Foi mensurada a área contendo tecido para cada campo de contagem e, por esta, foi dividido o valor absoluto de neoblastos encontrado para cada imagem, resultando assim em uma densidade de neoblastos (Tabela 8 e 9, Apêndices).

Os resultados obtidos para a contagem de neoblastos no período experimental estudado estão mostrados na Figura 21 obtido pelo software Microcal Origin. Os pontos experimentais para o grupo controle estão unidos por uma linha do tipo *spline*. E a linha sólida, relativa aos dados do grupo irradiado, corresponde a uma função exponencial simples, do tipo:

$$n = A + Be^{t/C}, \quad (1)$$

onde  $n$  é a contagem de neoblastos nos tempos experimentais  $t$ .  $A$ ,  $B$  e  $C$  são os parâmetros de ajuste da função [63]. Para os resultados da Figura 21,  $A=0,716$ ,  $B=5,97$  e  $C=3,09$ .

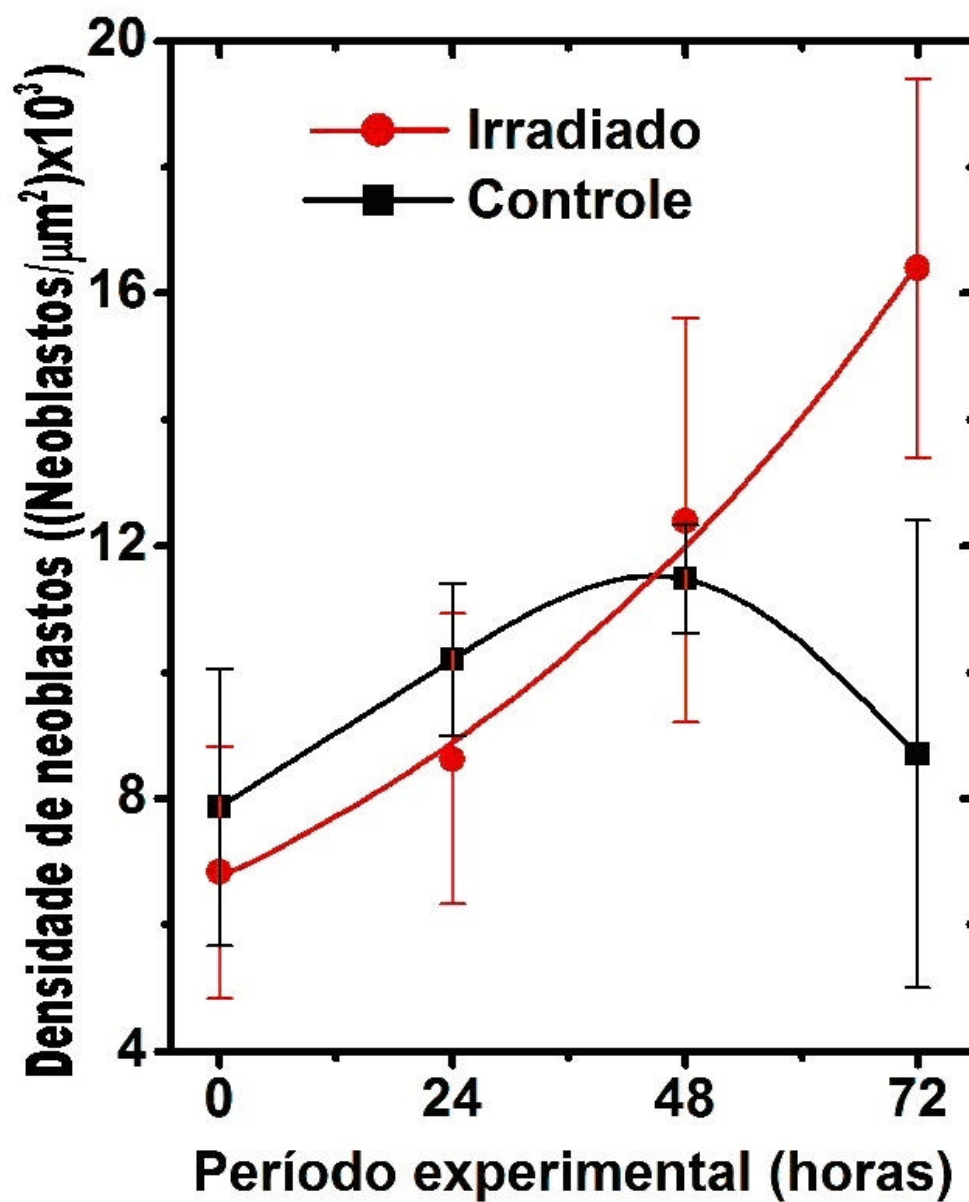


Figura 21: Curva representativa da distribuição dos neoblastos nos diferentes grupos e nos períodos estudados

## 6 DISCUSSÃO

Quando uma planária é cortada ou ferida, a epiderme adjacente se espalha sobre o ferimento e o sela, esta massa em forma de domo, rica em células não-especializadas, conhecidas por neoblastos, é chamada blastema de regeneração, um broto regenerativo sem pigmentação, que se forma por baixo da epiderme, onde as partes perdidas do corpo se diferenciam [β, 19, 29, 36]. Estas células que se fazem presentes no blastema de regeneração, os neoblastos, são extremamente distintas, altamente indiferenciadas, com um grande núcleo e muito pouco citoplasma [7]. Experimentos com o marcador BrdU mostram informações chaves na dinâmica da população de neoblastos [6, 7, 8, 13, 47]. Kato *et al* mostraram que as células-tronco de planárias se baseiam em sinais provenientes de tecidos vizinhos àqueles danificados para definir sua localização e conseqüentemente fazer os reparos necessários [50].

A laserterapia vem sendo utilizada com muito sucesso no tratamento de vários processos patológicos, particularmente na cicatrização de feridas e reparo tecidual [1, 2, 3]. A energia entregue ao tecido altera, através de diversas reações bioquímicas, o metabolismo usual da região tratada. A exposição dos tecidos à radiação laser na região do vermelho aumenta a taxa de formação do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, como também o tamanho e o número de mitocôndrias [54].

O estímulo observado na proliferação celular, sob a ação do laser, pode ser explicado frente aos princípios aceitos na literatura de que a radiação laser tem a capacidade de modulação de diversos processos metabólicos em diferentes sistemas biológicos, mediante a conversão da energia luminosa aportada pelo laser através de processos bioquímicos e fotofísicos, os quais transformam a luz laser em energia útil para a célula, sendo sua ação terapêutica, na reparação tecidual, bastante complexa pela indução de efeitos locais e sistêmicos [58].

As aplicações do Laser na biomedicina têm-se intensificado nos últimos anos. Diversos tipos de lasers com diferentes comprimentos de onda vêm sendo estudados, promovendo várias reações fototérmicas nos tecidos biológicos. Vários estudos foram feitos “in vivo” e “in vitro”, mas falta modelos e métodos que possam ser facilmente e freqüentemente reproduzíveis.

A maior parte dos estudos desenvolvidos em modelos experimentais sugerem que o laser de baixa potência desenvolve processos celulares e fisiológicos promovendo a regeneração de diferentes tecidos biológicos. A Planária permite a obtenção de resultados em períodos de tempo curtos, devido ao seu metabolismo bastante acelerado e é um modelo animal “in vivo” de fácil manipulação em ambiente de laboratório.

Neste trabalho foi feita a contagem do neoblastos, em dois grupos experimentais, com objetivo de investigar a dinâmica de proliferação de neoblastos em planárias regenerantes submetidas à ação da radiação laser de baixa potência nos estágios iniciais do processo regenerativo.

Os resultados mostrados na Figura 21 evidenciam que a dinâmica de proliferação de neoblastos em *Dugesia tigrina* apresenta expressiva diferença quando os espécimes são submetidos à ação da radiação laser em 660 nm. Outras pesquisas também relatam efeitos positivos da terapia laser no reparo de lesões em tecidos como: musculares; nervosos; ósseo, cutâneo [2, 3, 51, 52, 53]. Estudos “in vitro” foram relatados utilizando fibroblastos, células cancerosas e bactérias [54 - 57]. *Souza et al*, *Albertini et al* e *Mello et al* também encontraram diferenças significativas em estudos de reparação tecidual associado à radiação laser [1, 2, 3].

Neste trabalho no grupo controle ocorre um aumento inicial na contagem, atinge um máximo em 48 horas de experimentação e regride em 72 horas, no grupo irradiado observa-se um contínuo aumento em todo o período estudado, conforme verificado por *Souza* [1]. No atual momento da pesquisa não se tem ainda uma explicação para o efeito biológico que resulta na reversão da curva de proliferação celular para o grupo não submetido à radiação laser. Estudos adicionais são necessários para dar suporte a quaisquer hipóteses que possam ser feitas.

É interessante observar que a curva de proliferação celular para o grupo irradiado segue um modelo exponencial de crescimento, com um bom coeficiente de correlação:  $R^2=0.996$  (coeficiente fornecido pelo software Microcal Origin).<sup>1</sup>

O estímulo observado na proliferação celular, sob a ação do laser, pode ser explicado frente aos princípios aceitos na literatura de que a radiação laser tem a capacidade de modulação de diversos processos metabólicos em diferentes

---

<sup>1</sup> Coeficiente de correlação é um fator que descreve o quão perfeito é o ajuste do modelo teórico aos pontos experimentais. Quanto mais próximo de 1 melhor é a concordância entre a curva teórica exponencial e os pontos experimentais.

sistemas biológicos, mediante a conversão da energia luminosa aportada pelo laser através de processos bioquímicos e fotofísicos, os quais transformam a luz laser em energia útil para a célula, sendo sua ação terapêutica, na reparação tecidual, bastante complexa pela indução de efeitos locais e sistêmicos. A radiação óptica absorvida pelas células provoca reações foto-induzidas nas mitocôndrias, levando a um aumento no metabolismo celular com conseqüente aumento na síntese de ATP [62].

O único trabalho científico relatando os efeitos da radiação laser na proliferação de células-tronco em planárias aponta uma contagem celular máxima no quarto dia experimental [1]. Entretanto, como no referido trabalho o intervalo experimental entre as análises foi longa (4<sup>º</sup>, 7<sup>º</sup>, e 15<sup>º</sup> dias), ainda não existe uma exata determinação do período em que ocorre a máxima resposta proliferativa. O presente trabalho teve como objetivo estudar a dinâmica de proliferação de neoblastos apenas no estágio inicial de regeneração tecidual. Trabalhos estão em andamento em nosso grupo de pesquisa no sentido de melhor determinar o tempo para máxima resposta proliferativa destas células indiferenciadas.

As planárias se apresentam como um modelo animal *in vivo* de fácil manipulação em ambiente de laboratório para investigar os mecanismos de ação do laser de baixa potência e a resposta fotobiológica em organismos vivos. A avaliação da velocidade de regeneração naqueles organismos submetidos à radiação laser não foi o objetivo do presente trabalho, mas esta pode ser uma questão interessante a ser estudada. Em adição à fácil manipulação em ambiente de laboratório, as planárias não possuem nenhum estágio definido em seu ciclo de vida em que ocorram os principais eventos de formação e estão sempre em processo contínuo de reposição celular, e do ponto de vista evolutivo possuem inovações determinantes, como simetria bilateral, presença de mesoderma, sistema nervoso central, digestivo e excretor, os quais representam um ponto de transição na evolução para organismos mais complexos.

Nossos achados sugerem que o efeito biomodulador da radiação óptica pode ser de grande interesse para os pesquisadores que trabalham no campo de células-tronco, bem como para aqueles que estudam a biologia dos processos regenerativos em planárias.

## 7 CONCLUSÕES

Em conclusão, a dinâmica de proliferação de células - tronco em planárias *Dugesia tigrina* foi determinada para o estágio inicial do processo regenerativo. Os resultados indicaram que o laser induz um crescimento exponencial na quantidade de células na região sob regeneração, durante o período estudado (até o terceiro dia após a amputação dos espécimes).

## REFERÊNCIAS

1. SOUZA, S. C., MUNIN, E., ALVES, L. P., SALGADO, M. A. C. and 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.
2. ALBERTINI, R., VILLAVERDE, A. B., AIMBIRE, F., SALGADO, M. A. C., BJORDAL, J. M., ALVES, L. P., MUNIN, E. and COSTA, M. S. Anti-inflammatory Effects of Low Level Laser Therapy (LLLT) with two different Red Wavelengths (660 and 684 nm) in Carrageenan-induced Rat Paw Edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v.89, p.50-55, 2007.
3. MELLO, E. D. A., PAGNONCELLI, R. M., MUNIN, E., SANT'ANA FILHO, M., MELLO, G. P. S., ARISAWA, E. A. L. and OLIVEIRA, M. G. Comparative histological analysis of bone healing of standardized bone defects performed with the Er:YAG laser and steel burs. **Lasers in Medical Science**, v.22, p.00-08, 2008.
4. CORRÊA L, NOVELLI M. D., Apostila da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartergeral/>>. Acesso em: 01 mar. 2008.
5. ALVARADO, A. S. and TSONIS P. A. Bridging the Regeneration Gap: Genetic Insights from Diverse Animal Models **Nature Reviews Genetics**, v.7, p.873-884, 2006.
6. NEWMARK, P. A. and 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.
7. REDDIEN P. W. and ALVARADO, A. S. Fundamentals of Planarian Regeneration **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. 20:725-757, 2004.
8. SALÓ E. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). **BioEssays**, v.28, n.5, p. 546-559, 2006.
9. ALVARADO, A. S. Regeneration in the Metazoans: Why Does it Happen? **BioEssays**, v.22, p.578-590, 2000.
10. ALVARADO A. S. and 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.
11. NEWMARK, P. A. and ALVARADO, A. S. Regeneration in Planarian. IN: **ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES**. Utah: University of Utah; Nature Publishing Group, 2001. Disponível em: <[http://planaria.neuro.utah.edu/publications/PN\\_ELS01.pdf](http://planaria.neuro.utah.edu/publications/PN_ELS01.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2007
12. BROCKES, J. P.; KUMAR, A. and VELOSO, C. P. Regeneration as a evolutionary variable. **J. Anat.** v.199, n.1-2, 2001.
13. ALVARADO, A. S. Multicellularity, stem cells, and the neoblasts of the planarian *Schmidtea mediterranea* **Exp. Cell Res.**, v.306, p.299-308, 2005.



14. NEWMARK, P. A. and ALVARADO, A. S. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. **Developmental Biology**, v.96, p.5049–5054, 1999.
15. 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.
16. ALVARADO, A. S. The freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*: embryogenesis, stem cells and regeneration **Current Opinion in Genetics and Development**, v.13, p.438-444, 2003.
17. ALVARADO, A. S. Planarian Regeneration: Its End is Its Beginning. **Cell**, v. 124, n.2, p.241-245, 2006.
18. NEWMARK, P. A. and ALVARADO, A. S. Regeneration and scientific terminology. **BioEssays**, v.19, p.535, 1997.
19. REDDIEN, P. W.; BERMANGE, A. L.; KICZA, A. M. and ALVARADO, A. S. BMP signaling regulates the dorsal planarian midline and is needed for asymmetric regeneration. **Development**, v.134, p.4043-4051, 2007.
20. ALVARADO, A. S.; NEWMARK, P. A.; ROBB, S. and JUSTE, R. The *Schmidtea mediterranea* database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. **Development**, v.129, p.5659-5665, 2002.
21. MINETA, K.; NAKAZAWA, M.; CEBRIÀ, F.; IKEO, K.; AGATA, K. and GOJOBORI, T. Origin and evolutionary process of the CNS elucidated by comparative genomics analysis of planarian ESTs. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, p. 7666–7671, 2003.
22. CEBRIA, F.; VISPO, M. Dissecting planarian central nervous system regeneration by the expression of neural-specific genes. **Develop. Growth Differ.** v. 44, p. 135–146, 2002.
23. ASAMI, M.; NAKATSUKA, T.; HAYASHI, T.; KOU, K.; KAGAWA, H. and AGATA, K.; et al. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). **Zoological Science**, v.19, p.1257-1265, 2002.
24. 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– 1267, 1998.
25. ORII, H.; ITO, H. and WATANABE, K. Anatomy of the planarian *Dugesia japonica*. The muscular system revealed by antisera against myosin heavy chains. **Zool. Sci.**, v.19, p. 1123-1131, 2002.
26. SAKAI, F.; AGATA, K.; ORII, H. And WATANABE, K. Organization and regeneration ability of spontaneous supernumerary eyes in planarians – eye regeneration field and pathway selection by optic nerves. **Zoological Science, Sapporo**, v.17, p. 375-381, 2000.
27. ITO, H.; SAITO, Y.; WATANABE, K. and ORII, H. Epimorphic regeneration of the distal part of the planarian pharynx. **Dev. Genes Evol.**, v.211, n.1, p2-9, 2001.

28. PINEDA, D.; GONZALEZ\_LINARES, J.; MARSAL, M. and SALÓ, E. Functional analysis of the eye genetic network in planarian regeneration. **Int. J. Dev. Biol.**, v.45, p.123-S124, 2001.
29. REDDIEN, P. W.; BERMANGE, A. L.; MURFITT, K. J. and ALVARADO, A. S. Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planarian. **Developmental Cell**, v.8, p.635-649, 2005.
30. SALÓ, E.; TAULER, J.; JIMENEZ, E.; BAYASCAS, J. R.; GONZALEZ\_LINARES, J.; GARCIA\_FERNANDEZ, J. and BAGUNA, J. Hox and paraHox genes in flatworms: Characterization and expression. **AMER. ZOOL.**, v.41, p.652-663, 2001.
31. PINEDA, D.; GONZALEZ, J.; CALLAERTS, P.; IKEO, K.; GEHRING, W. J. and SALÓ, E. Searching for the prototypic eye genetic network: Sine oculis is essential for eye regeneration in planarians. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.97, n.9, p. 4525-4529, 2000.
32. NOGI, T. and WATANABE, K. Position-specific and non-colinear expression of the planarian posterior (Abdominal-B-like) gene. **Develop. Growth Differ**, v.43, p.177-184, 2001.
33. CARRANZA, S., BAGUÑÀ, J. and RIUTORT, M. Are the Platyhelminthes a Monophyletic Primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. **Mol. Biol. Evol.**, v.14, p.485-497, 1997.
34. CEBRIÀ, F. and VISPO, M. Myocyte differentiation and bodywall muscle regeneration in the planarian *Girardia tigrina*. **Dev. Genes Evol.**, v. 207, p.306–316, 1997.
35. OVIEDO, N.; NEWMARK, P.A. and ALVARADO, A. S. Allometric scaling and proportion regulation in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea*. **Dev. Dyn.**, v.226, p.326-333, 2003.
36. NEWMARK, P. A. and ALVARADO, A. S. Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians. **Developmental Biology**, v.220, p. 142-153, 2000.
37. HORI, I. Localization of laminin in the subepidermal basal lamina of the planarian *Dugesia japonica*. **Biol. Bull.**, v.183, p.78-83, 1992.
38. EGGER, B.; LADURNER, P.; NIMETH, K.; GSCHWENTNER, R. and RIEGER, R. The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano*—on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. **Dev Genes Evol.** v.216(10), p.565-577, 2006.
39. INOUE, T.; KUMAMOTO, H.; OKAMOTO, K.; UMESONO, Y.; SAKAI, M.; ALVARADO, A. S. and ÁGATA, K. Morphological and functional recovery of the planarian photosensing system during head regeneration. **Zoological Science**, v. 21, p. 275-283, 2004.
40. ZAYAS, R.M.; HERNÁNDEZ, A; HABERMANN, B.; WANG, Y.; STARY, J.M. and NEWMARK, P. A. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.102, p.18491-18496, 2005.

41. RANDOLPH, H. Observations and experiments on regeneration in Planarians. **Development Genes and Evolution** v.5, p.352-372, 1897.
42. PEARSON H., The regeneration gap. **Nature.**, v.414, p.388-390, 2001.
43. BAGUNA, J.; SALÒ E. and AULADELL, C. Regeneration and pattern formation in planarians. **Development**, v.107, p.77-86, 1989.
44. HORI, I. and KISHIDA Y. A fine structural study of regeneration after fission in the planarian *Dugesia japonica*. **Hydrobiologia**, v.383, p. 131-136, 1998.
45. GSCHWENTNER, R.; LADURNER, P.; NIMETH, K. and RIEGER, R. Stem cells in a basal bilaterian. S-phase and mitotic cells in *Convolutriloba longifissura* (Acoela, Platyhelminthes). **Cell Tissue Res.**, v.304, p. 401-408, 2001.
46. LADURNER, P., RIEGER, R. and BAGUÑA, J. Spatial distribution and differentiation potential of stem cells in hatchlings and adults in the marine platyhelminth *Macrostomum* sp.: a bromodeoxyuridine analysis. **Dev. Biol.**, v. 226, p. 231-241, 2000.
47. ROSSI, L.; SALVETTI, A.; MARINCOLA, F. M.; LENA, A.; DERI, P.; MANNINI, L.; BATISTONI, R.; WANG, E. And GREMIGNI, V. Deciphering the molecular machinery of stem cells: a look at the neoblast gene expression profile. **Genome Biology**, doi: 10.1186/gb-2007-8-4-r62, v.8, n.4, Article R62, 2007.
48. DUBOIS, F. Contribution à l'étude de la migration des cellules de régénération chez les Planaires dulcicoles. **Bull. Biol. Fr. Belg.** v.83 p.213-283, 1949.
49. WOLFF E., DUBOIS F. Sur la migration des cellules de régénération chez les planaires. **Rev. Suisse Zool.** v.55 p.218-227, 1948.
50. KATO K., ORII H., WATANABE K. & AGATA K. *Dev. Biol.* 233, 109–121 (2001).
51. WEISS, N. and ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat. Embryol**, v.186, p. 497-503, 1992.
52. LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHAIAH, S.; SOARES, N. and SALGADO, M. A. C. Infrared Laser Photobiomodulation (? 830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.25, p.96-101, 2007.
53. NICOLAU, R.A.; JORGETTI, V.; RIGAU, J.; PACHECO, M.T.T.; REIS, L.M. and ZÂNGARO, R.A. ; Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study, **Lasers Méd Sci**, v.18, p.89-94, 2003.
54. ALMEIDA- LOPES, L.; RIGAU, J.; ZÂNGARO, R. A.; GUIDUGLI NETO, J. and JAEGER, M. M. M. Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.29, p.179-184, 2001.
55. VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; DECLERCQ, H.A. and CAMBIER, D.C. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation, **Lasers Med Sci** , v.18, p.95- 99, 2003.
56. SCHAFFER, M.; SROKA, R.; FUCHS, C.; SCHRADER-REICHARDT. P.M. SCHAFFER, M BUSCH, and DÜHMKE, Biomodulative effects induced by 805 nm

- laser light irradiation of normal and tumor cells, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.40, p.253-257, 1997.
57. NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L. and MAZZULLI, T. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bacteria: Comparison of continuous wave and frequency modulated light, **Lasers in Surgery and Medicine**, v.31, p.343-351, 2002.
  58. BAXTER, G. D. Therapeutic lasers – theory and practice. Singapore: Churchill Livingstone, 1994. p. 1-21. Disponível em: <[http://books.google.com/books?hl=ptBR&lr=&id=MoKeDwK4DGkC&oi=fnd&pg=PP9&dq=BAXTER,+G.+D.+Therapeutic+laser+s+%E2%80%93+theory+and+practice&ots=VVvG2EvTV9&sig=vd31QRtx4Wh1mD20kHU-LQ\\_ek4g#PPP1,M1](http://books.google.com/books?hl=ptBR&lr=&id=MoKeDwK4DGkC&oi=fnd&pg=PP9&dq=BAXTER,+G.+D.+Therapeutic+laser+s+%E2%80%93+theory+and+practice&ots=VVvG2EvTV9&sig=vd31QRtx4Wh1mD20kHU-LQ_ek4g#PPP1,M1)>. Acesso em: 01 nov. 2007
  59. SCHAWLOW, A, L, and TOWNES, C. H. Infrared and Optical Masers. **Physical Review**, v.112, n.6, p.1940-1949, 1958.
  60. MAIMAN, T.H. Simulated optical radiation in ruby. **Nature**, v.187, p.493-494, 1960.
  61. PÖNTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a Medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, 1992.p.13-17.
  62. LOPES, C. O.; RIGAU, J. and Zângaro, R. A. Prevenção da xerostomia e da mucosite oral induzidas por radioterapia com o uso de laser de baixa potência. **Radiol Bras**. v.39, n.2, p.131-136, 2006.
  63. KARU T. Photobiological fundamentals of low power laser therapy, **IEEE Journal Quantum Electron**. QE-23, p.1703-1717, 1987.
  64. SCHAFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; SCHAFER, P.M.; BUSCH, M.; REISER, M. and DÜHMKE, E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent TI-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI), **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.54, p.55-60, 2000.
  65. RIGAU, Josepa. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular**. Reus-Tarragona, 1996. 208f. Tese (Doutorado em Medicina). Universitat Rovira í Virgili.
  66. SOUZA, S. C.; ALVES, L. P.; MUNIN, E.; SALGADO, M. A. C.. Comparação entre Três Fixadores Histológicos na Fixação de Platelmentos (Planária). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 7., ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 3., 2003, São José dos Campos. **Anais de Trabalhos Completos ...** São José dos Campos: UniVap, 2003.
  67. THE CALCULUS WITH ANALYTIC GEOMETRY. 2nd Edition. New York:Louis Leithold. Harper e Row Publisher.

## Anexo

Tabela 5: Contagem absoluta de neoblastos do grupo controle

<b>CONTROLE</b>	<b>0 hora</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
Corte 1	36	61	85	83
Corte 2	38	51	97	57
Corte 3	43	49	106	53
Corte 4	35	61	102	64
Corte 5	44	102	93	71
Corte 6	67	81	105	63
Corte 7	58	90	103	57
Corte 8	61	82	96	52
Corte 9	81	84	90	50
Corte 10	79	79		
Corte 11	83	64		
Corte 12	73			
Corte 13	79			
Média	59,8	73,1	97,4	61,1
Desvio Padrão	19	17	7,2	10

Tabela 6: Contagem absoluta de neoblastos do grupo irradiado

<b>IRRADIADO</b>	<b>0 hora</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
Corte 1	44	93	137	95
Corte 2	43	112	127	104
Corte 3	55	102	86	77
Corte 4	43	58	78	81
Corte 5	51	70	79	90
Corte 6	62	62	95	92
Corte 7	47	92	132	89
Corte 8	44	63	91	92
Corte 9	43	53	86	52
Corte 10	39	53	58	73
Corte 11	44	42	44	89
Corte 12	55	34	97	71
Corte 13	53	37	54	98
Corte 14	49	33	75	105
Corte 15	59	46	103	97
Corte 16	41	40	94	90
Corte 17	36	62	75	97
Corte 18	30	68	83	109
Corte 19	41	49	80	89
Corte 20	30	44	63	92
Corte 21	33	53	76	79
Corte 22	47	52	71	110
Corte 23	36	51	76	107
Corte 24	50	38		99
Corte 25	52	43		121
Corte 26	45	45		98
Corte 27	51	45		78
Corte 28	70	66		92
Corte 29	51			86
Corte 30	48			92
Corte 31				87
Corte 32				88
Corte 33				93
Corte 34				80
Média	46,4	57,4	85,2	91,0
Desvio Padrão	9,0	20	23	12

Tabela 7: Densidade de neoblastos do grupo controle

<b>CONTROLE</b>	<b>0 hora</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
Corte 1	5,405446	12,5458	9,993005	18,7089
Corte 2	4,566435	9,532092	11,38117	10,02471
Corte 3	6,112522	10,77483	12,54332	7,151057
Corte 4	4,531231	9,992506	12,08799	6,760325
Corte 5	6,028074	10,19996	11,04739	7,611011
Corte 6	8,141245	9,497247	12,43809	8,529215
Corte 7	7,20411	8,704108	12,30172	7,588195
Corte 8	8,130645		11,45962	7,029045
Corte 9	9,864912		10,75079	6,510319
Corte 10	9,734219			7,04395
Corte 11	10,27887			
Corte 12	10,00141			
Corte 13	10,57471			
Média	7,73	10,2	11,6	8,69
Desvio Padrão	2,2	1,2	0,86	3,7

Tabela 8: Densidade de neoblastos do grupo irradiado.

<b>CONTROLE</b>	<b>0 hora</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
Corte 1	5,594946	12,58986	19,70126	16,77417
Corte 2	5,37584	14,06579	17,90132	16,199
Corte 3	7,213711	12,53649	12,75968	15,03988
Corte 4	5,913221	7,439694	12,75996	14,24006
Corte 5	6,816177	9,370578	10,75	13,62423
Corte 6	8,60011	9,021357	13,05049	12,85917
Corte 7	6,191853	14,49396	18,64183	13,56453
Corte 8	6,620265	9,719717	15,02506	13,80718
Corte 9	6,402516	9,365314	11,63121	11,36946
Corte 10	6,619931	10,30379	8,316092	13,0332
Corte 11	7,207455	5,930925	6,878213	18,34238
Corte 12	9,666998	9,548848	15,36872	13,29185
Corte 13	8,412565	9,426168	9,46724	14,31995
Corte 14	8,190624	6,792499	10,4705	15,18502
Corte 15	9,028986	6,801743	13,53436	16,60115
Corte 16	6,772035	8,191464	12,10646	15,30316
Corte 17	6,007449	7,693662	10,29571	16,01014
Corte 18	4,304414	7,737284	11,9812	17,33094
Corte 19	6,000582	6,660964	11,82832	14,81657
Corte 20	-0,09298	6,248156	9,050957	14,48636
Corte 21	6,426522	7,613028	11,80933	13,76486
Corte 22	7,158436	6,910924	9,741828	19,84109
Corte 23	5,192992	9,110234	10,8474	19,168
Corte 24	7,545792	7,300577		15,01661
Corte 25	6,959436	7,691977		18,77191
Corte 26	7,568177	6,690681		19,79602
Corte 27	8,655246	6,148686		20,24496
Corte 28	10,75522	9,182003		19,7758
Corte 29	8,322753			15,8537
Corte 30	10,05305			16,37713
Corte 31				23,83255
Corte 32				23,02875
Corte 33				20,0393
Corte 34				17,97539
Média	6,98	8,73	12,4	16,5
Desvio Padrão	2,0	2,3	3,2	3,0