

FERNANDO JOSÉ DIAS

**Influência de densidades do laser de baixa intensidade sobre
o músculo masseter de ratos *Wistar***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, do Programa de Odontologia (Reabilitação Oral).

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iyomasa

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Dias, Fernando José

Influência de densidades do laser de baixa intensidade sobre o músculo masseter de ratos *Wistar*. Ribeirão Preto, 2010.

94 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Odontologia: Reabilitação Oral - Área de Concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Iyomasa, Mamie Mizusaki.

1. Laser de baixa intensidade.
2. Músculo Masseter.
3. NADH.
4. SDH.
5. ATPase.
6. Microscopia Eletrônica de Transmissão.
7. Microscopia de luz.
8. HE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: DIAS, Fernando José

Título da Dissertação: Influência de densidades do laser de baixa intensidade sobre o músculo masseter de ratos *Wistar*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Odontologia (Reabilitação Oral).

Área de concentração: Biologia Oral

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (USP) – área de concentração Biologia Oral, em sessão pública realizada em...../Maio/2010, considerou o candidato.....

BANCA EXAMINADORA

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

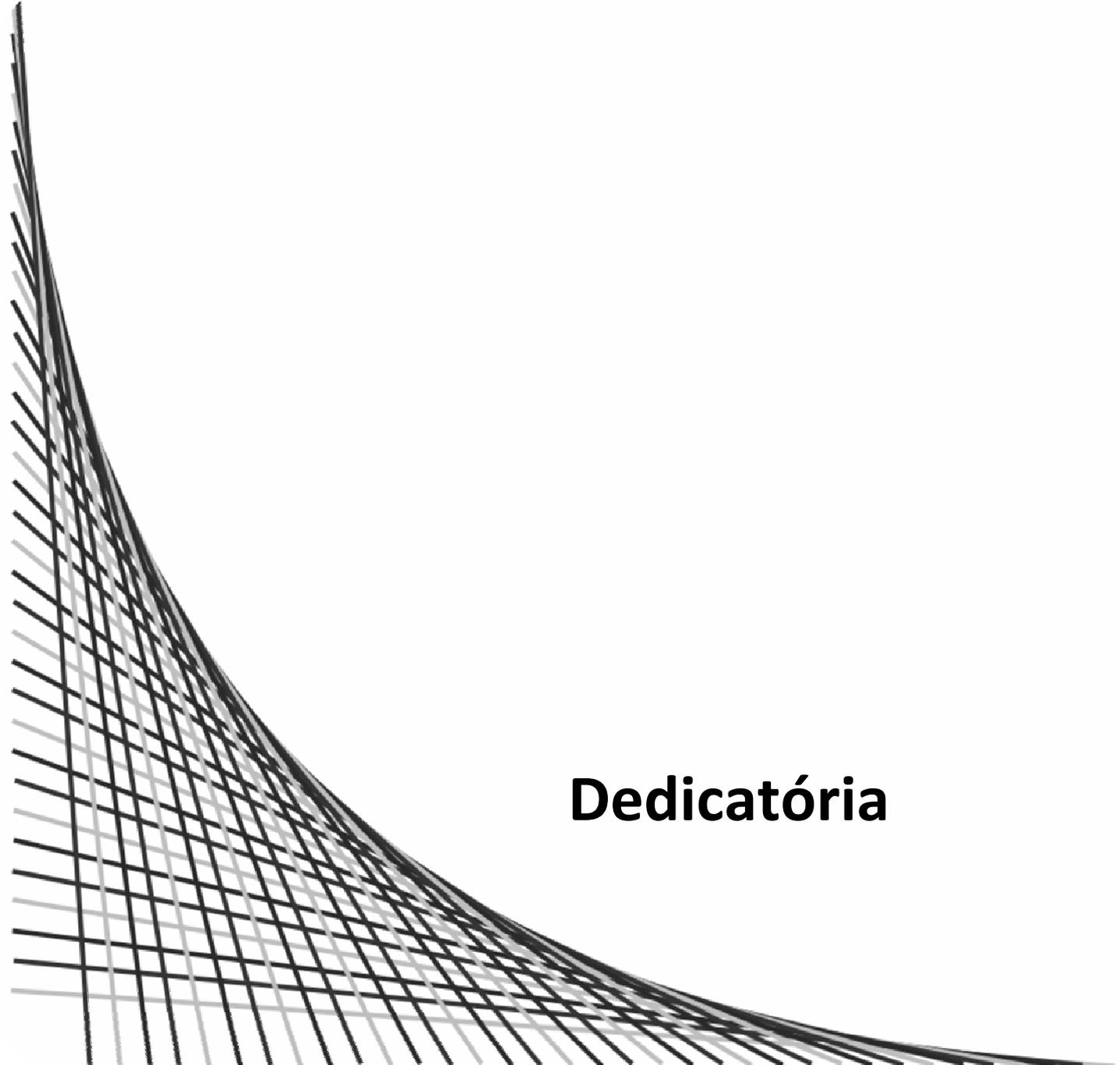
Assinatura: _____ Julgamento: _____

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

Assinatura: _____ Julgamento: _____

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

Assinatura: _____ Julgamento: _____



Dedicatória

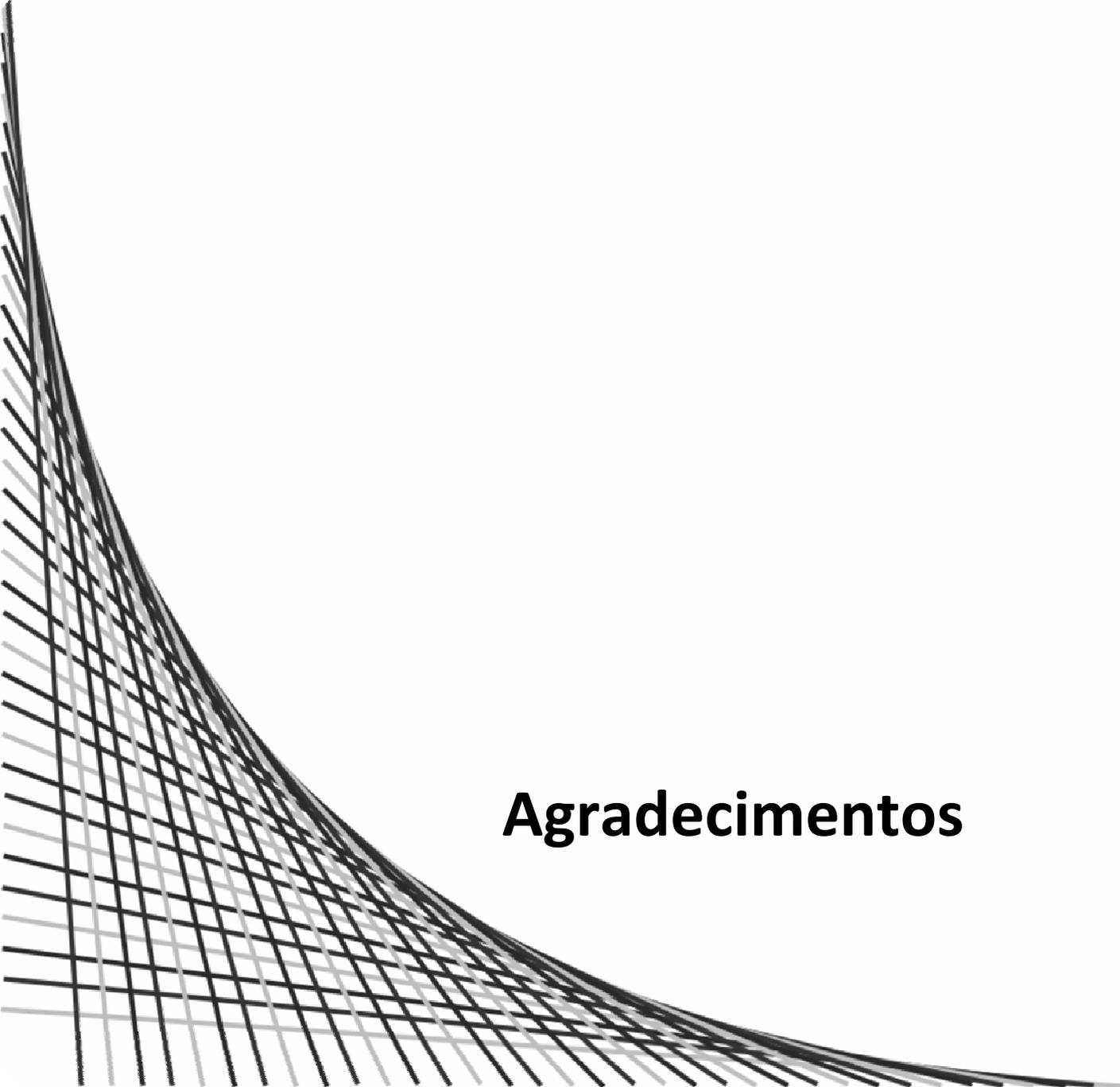
Dedico este trabalho:

Aos meus pais, **Antonio de Jesus Dias e Maria Watanabe Dias**, pela educação e valores transmitidos, e também pelo apoio em todas as minhas decisões que me permitiram chegar a mais essa etapa do meu caminho.

À minha irmã, **Paula Elisa Dias**, pelo convívio, pela inteligência, e pelas salutares discussões de idéias que tanto me fez crescer.

À minha namorada, **Ana Paula Amorim Barbosa**; pelo amor e carinho que me ajudaram durante essa etapa da minha vida.

E a uma força maior que acostumei a chamar de **DEUS**, que me deu suporte nos momentos mais difíceis e não me deixou parar pelo caminho.

A decorative graphic on the left side of the page, consisting of a dense, overlapping grid of thin, curved lines. The lines are arranged in a way that they appear to be part of a larger, curved structure, possibly a stylized letter or a geometric shape. The lines are black and grey, and they create a sense of depth and movement. The overall effect is a complex, layered pattern that tapers off towards the right.

Agradecimientos

Agradecimentos Especiais:

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iyomasa**, que foi praticamente uma “mãe” durante o decorrer desse projeto, transmitindo valores científicos, profissionais e pessoais; sempre solícita para ajudar, nem que para isso fossem necessárias viagens desgastantes e finais de semana sem descanso; confiando em minha capacidade; dando-me liberdade de escolher meus caminhos durante o mestrado; e principalmente me deixando aprender com erros e acertos.

Agradecimentos Especiais:

À **Prof^a. Dr^a. Simone Cecílio Hallak Regalo**, ex-orientadora da iniciação científica, por ter confiando e acreditado no meu potencial e, por todo o apoio durante esse caminho.

Aos **Profs. Drs. Selma Siéssere, Marisa Semprini e Mathias Vitti**, pela confiança e oportunidade de aprendizado.

Aos técnicos de laboratório e amigos, **Nilce Oliveira Wolga e Dimitrius Leonardo Pitol**, pelos conhecimentos técnicos, pela acolhida no laboratório e convivência salutar e divertida.

Ao especialista de laboratório e amigo, **Luiz Gustavo de Sousa**, pelo vasto conhecimento, pelo grande lado humano e pela enorme criatividade sempre disponível durante esse período.

Ao especialista de laboratório e amigo, **Paulo Batista de Vasconcelos**, pela amizade, pelos conhecimentos e valores transmitidos, pela agradável convivência e paciência, sempre disponível a ajudar no que fosse preciso, seja nas últimas horas do expediente ou nos finais de semana.

Agradecimentos:

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, representada pelo seu Diretor **Prof. Dr. Osvaldo Luiz Bezzon** e Vice-Diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**, pela minha formação, estrutura e apoio no desenvolvimento do projeto.

À **Profa. Dra. Iara Augusto Orsi**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação da Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela atenção e apoio.

A todos os **Professores** do curso de Mestrado, pelas exigências e transmissão de conhecimentos que enriqueceram a minha formação.

Às Cirurgiãs-Dentistas, **Juliane Caroline Leão** e **Élen Camargo Rizzi** pela compreensão e ajuda em várias etapas do trabalho.

Ao **Dr. João Paulo Mardegan Issa** aluno de Pós-Doutorado, pelos conhecimentos e convívio salutar.

Aos colegas, **Bruno Alves de Toledo**, **Glauce Crivelaro Nascimento**, **Jerônimo Manço de Oliveira Neto**, **Ana Paula Terossi de Godoi**, **Rômulo Rocha Regis**, **Yamba Carla Lara Pereira**, **Flávia Cecílio Argentato**, **Marcelo Palinkas** e **Richard Honorato de Oliveira** pelo convívio e principalmente paciência.

À analista acadêmica, **Clélia Aparecida Celino**, pelo convívio e cooperação constante.

Aos auxiliares técnicos **Túlio Roberto Vasconcelos de Paula Lopes** e **Roger Rodrigues Fernandes**, pelo apoio e convívio.

Ao **Prof. Dr. Ii-Sei Watanabe**, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

Aos técnicos de laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, **Sônia R. Yokomizo e Sebastião A. Boleta**, pelos conhecimentos técnicos e ajuda no desenvolvimento do projeto.

Ao grande amigo **João Eduardo Magalhães**, praticamente um irmão e companheiro nos melhores momentos da minha vida.

Às funcionárias da seção de Pós-Graduação, **Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilloto**, pela cordialidade e atenção.

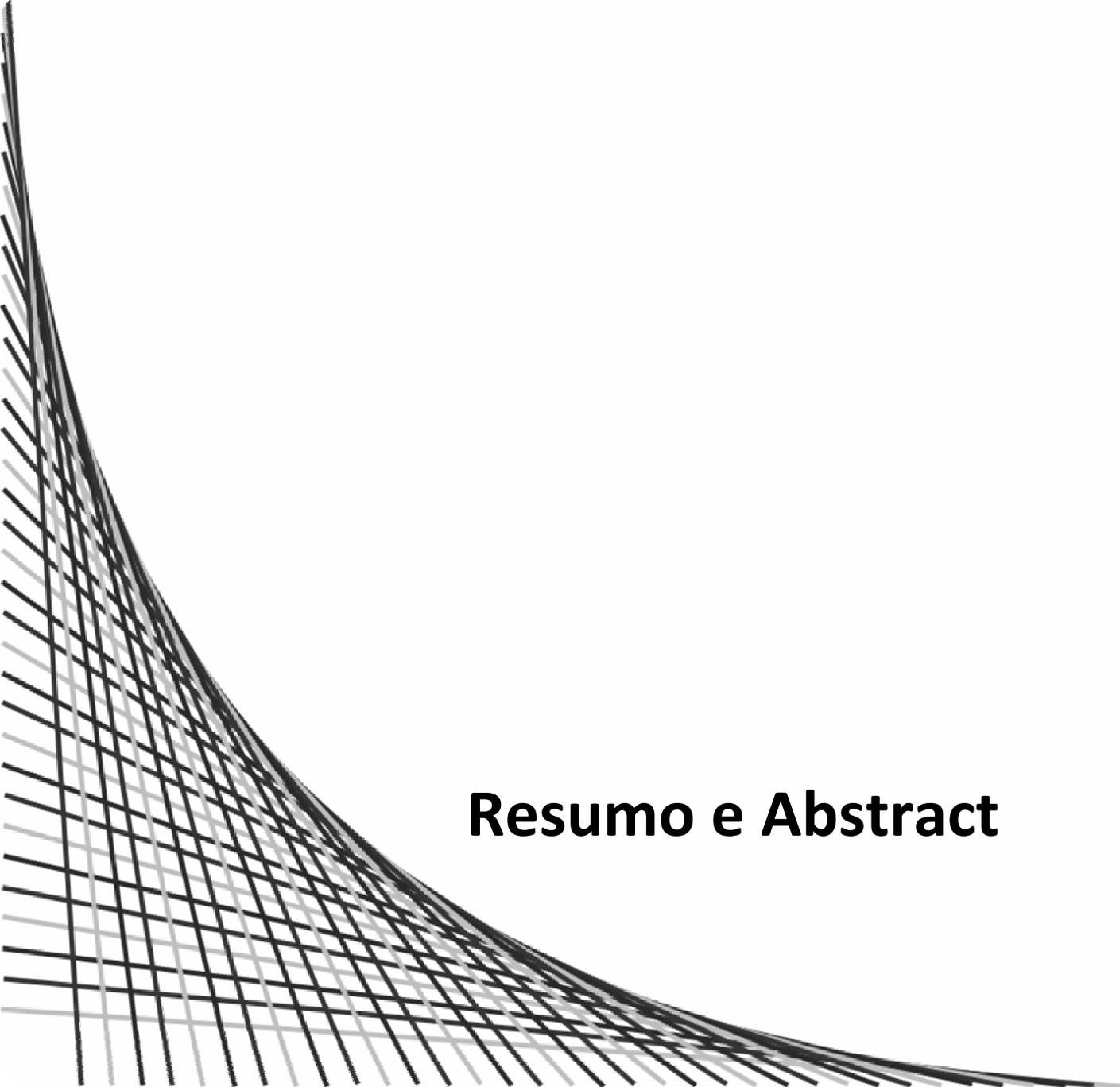
À Secretária da Pós-Graduação do Programa de Reabilitação Oral, **Regiane de Cássia Tirado Damasceno**, pela dedicação e disponibilidade.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Rosângela Aparecida da Silva Troca Nascimento, Adalberto Toneto e Lucimeire Resende Ribeiro**, pela atenção e paciência.

Aos **animais** utilizados nesse estudo, que tiveram suas vidas tiradas para que esse trabalho pudesse ser realizado.

À **FAPESP**, que concedeu fomento e possibilitou o andamento desta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta Dissertação, expresso aqui minha gratidão.



Resumo e Abstract

RESUMO

DIAS, F.J. Influência de densidades do laser de baixa intensidade sobre o músculo masseter de ratos *Wistar*. 2010. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

A laserterapia tem sido muito utilizada como tratamento alternativo em pacientes com dores crônicas relacionadas às disfunções temporomandibulares. Isso se deve aos efeitos: analgésico, antiinflamatório, miorelaxante, de redução da fadiga durante as contrações tetânicas, aumento da força de mordida e diminuição da dor orofacial. Embora sejam observados resultados clínicos, ainda não é bem compreendido o seu efeito em nível celular. Assim, este estudo tem como objetivo analisar os efeitos das diferentes densidades (doses) de irradiação do laser de baixa intensidade (LLLI), em nível celular, sobre o músculo masseter de ratos *Wistar*.

Os animais foram alocados aleatoriamente em 6 grupos (n=10), receberam 10 irradiações do laser (GaAlAs, 780nm, 5mW e spot 0,04cm²) sobre o músculo masseter esquerdo variando a densidade de energia (I. 0; II. 0,5; III. 1,0; IV. 2,5; V. 5,0 e VI. 20 J/cm²). Após as 10 irradiações os músculos masseteres foram obtidos dos animais sob anestesia para análises: 1. Histoenzimológicas para atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo diaforase (NADH), succinato desidrogenase (SDH) e adenosina trifosfatase (ATPase), 2. Microscopia de luz (HE), 3. Microscopia eletrônica de transmissão e 4. Imunohistoquímica para fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o receptor 2 para VEGF (VEGFR-2).

A atividade do NADH nos grupos IV, V e VI (30±1,26; 33,47±2,15; 31,67±1,77 - fibras intermediárias) apresentou um aumento significativo (p>0,05) no metabolismo oxidativo em relação aos demais grupos. Na atividade do SDH, o aumento foi discreto, com aumento significativo (p>0,05), apenas no grupo V (32,2±1,61 – fibras intermediárias), com o padrão de aumento metabólico muito parecido nas reações de NADH e SDH. A atividade da ATPase não revelou diferenças entre os grupos tanto em meio ácido como no alcalino. A microscopia de luz revelou fibras musculares arredondadas e núcleos periféricos achatados, os quais tornaram mais arredondados com as densidades maiores de energia. Ultraestruturalmente as irradiações com as maiores densidades de energia revelaram mitocôndrias de tamanhos e formas variadas e cisternas do retículo sarcoplasmático dilatadas entre as miofibrilas. As análises qualitativas mostraram um padrão de aumento da expressão do VEGF e VEGFR-2 proporcionais à densidade de energia do laser usada. Conclui-se que o laser com densidades maiores foi capaz de aumentar o metabolismo oxidativo, sem alterar a capacidade contrátil, aumentar o volume do núcleo, modificar a ultraestrutura das fibras musculares e as expressões do VEGF e VEGFR-2.

Palavras-chave: Laser de baixa-intensidade, metabolismo oxidativo, NADH, SDH, ATPase, VEGF, VEGFR-2, ultraestrutura, microscopia de luz.

ABSTRACT

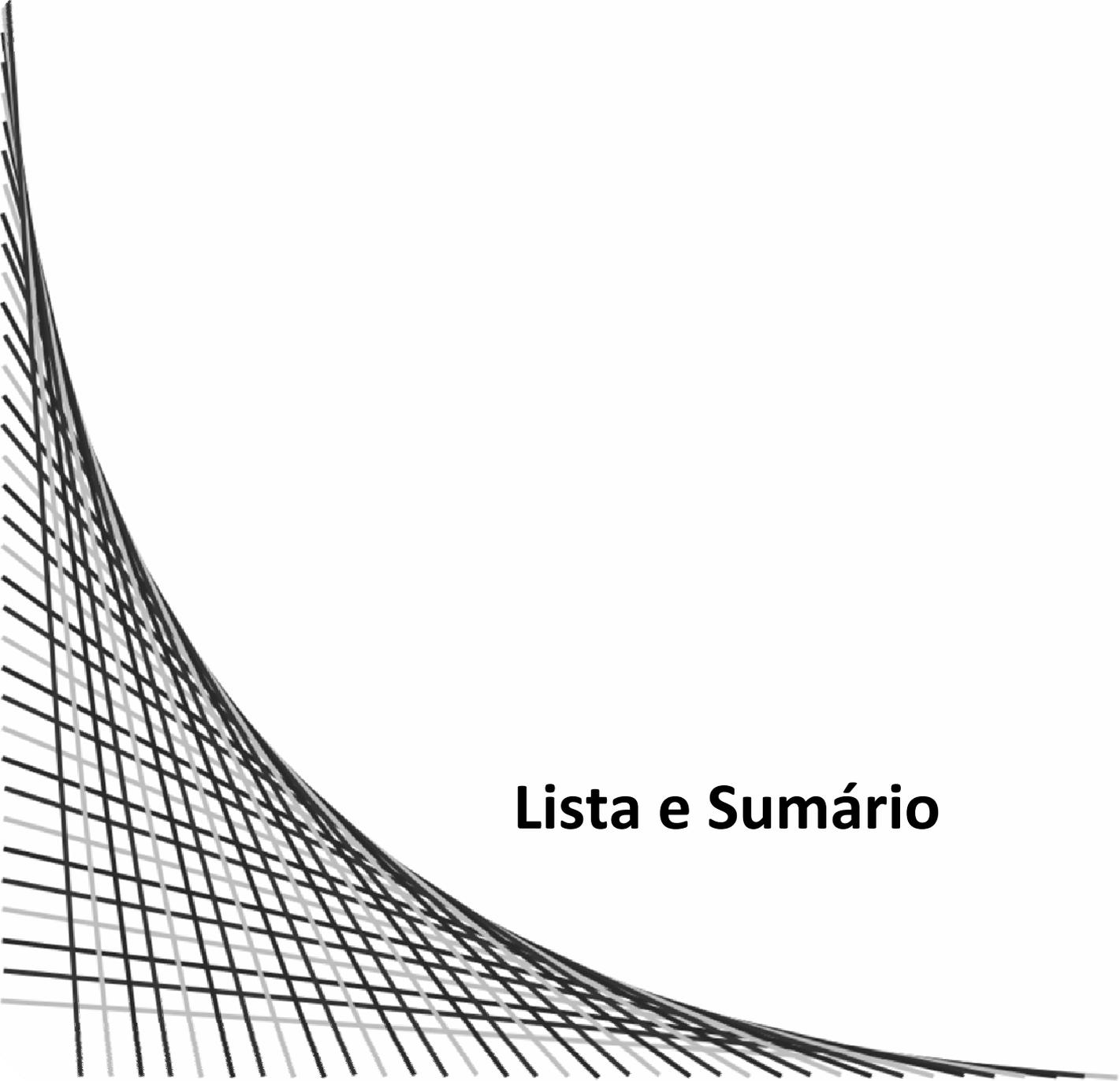
DIAS, F.J. Influence of densities of low level laser on the masseter muscle of rats Wistar. 2010. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

The laser therapy has been widely used as an alternative treatment in patients with chronic pain related to temporomandibular disorders. This is due to the effects: analgesic, anti inflammatory, muscle relaxant, reducing fatigue during tetanic contractions, increased bite strength and decrease in orofacial pain. Although clinical results are observed, is not well understood its effect on the cellular level. This study aims to analyze the effects of different densities (doses) irradiation of low level laser therapy (LLLI) on cellular level, on the masseter muscle of rats.

The animals were randomly assigned to 6 groups (n=10), received 10 laser irradiation (GaAlAs, 780nm, 5mW spot and 0.04 cm²) on the left masseter muscle by varying the energy density (I. 0; II. 0.5; III. 1.0; IV. 2.5; V. 5.0 and VI. 20 J/cm²). After 10 irradiations the masseter muscles were obtained from animals under anesthesia for analysis: 1. Histoenzimologic for nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), succinate dehydrogenase (SDH) and adenosine triphosphatase (ATPase), 2. Light microscopy (HE), 3. Transmission electron microscopy and 4. Immunohistochemistry for vascular endothelial growth factor (VEGF) and receptor 2 for VEGF (VEGFR-2).

The activity of NADH in groups IV, V and VI (30±1,26; 33,47±2,15; 31,67±1,77 - intermediate fiber) increased significantly (p> 0.05) in oxidative metabolism in relation to other groups. The activity of SDH showed a slight increase, only the group V (32,2±1,61 – intermediate fiber) increased significantly (p> 0.05), but the pattern of metabolic increase was very similar in both reactions. The ATPase activity showed no differences between groups nor in acid or alkaline. The qualitative analysis showed a pattern of increased expression of VEGF and VEGFR-2 directly proportional to the energy density of laser. Light microscopy showed rounded muscle fibers and peripheral flattened nuclei, which become more rounded with the highest energy densities. Ultrastructurally the irradiation with higher energy densities showed mitochondria of different sizes and shapes and dilated cisterns of sarcoplasmic reticulum between the myofibrils. It is concluded that higher densities of laser was able to increase the oxidative metabolism without altering the contractile capacity, increasing nuclei volume, modify ultrastructure of muscle fibers and the expressions of VEGF and VEGFR-2.

Keywords: Low-level laser therapy, oxidative metabolism, NADH, SDH, ATPase, VEGF, VEGFR-2, ultrastructural, light microscopy.



Lista e Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATPase – Adenosina Trifosfatase

BSA – *Bovine serum albumin* - Soro fetal bovino

DTM – Disfunção Temporomandibular

GaAIAs - Arseneto de gálio alumínio, meio semicondutor do laser

GaAs - Arseneto de gálio, meio semicondutor do laser

GaAlInP - Fosfeto de índio, gálio e alumínio, meio semicondutor do laser

HE – Hematoxilina e eosina

HeNe – Hélio Neônio, meio semicondutor gasoso do laser.

J – Joule, unidade de medida de energia do laser

J/cm² - Joule por centímetro quadrado, unidade de medida da densidade de energia (dose) do laser

LED – Luz emitida por diodo, tipo de luz fria.

LLLI- *Low-level laser Irradiation* – Irradiação do laser de baixa intensidade

PBS - *Phosphate buffered saline* - Tampão fosfato de sódio

mW – Milliwatts, unidade de medida de intensidade do laser

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo

RER – Retículo endoplasmático rugoso

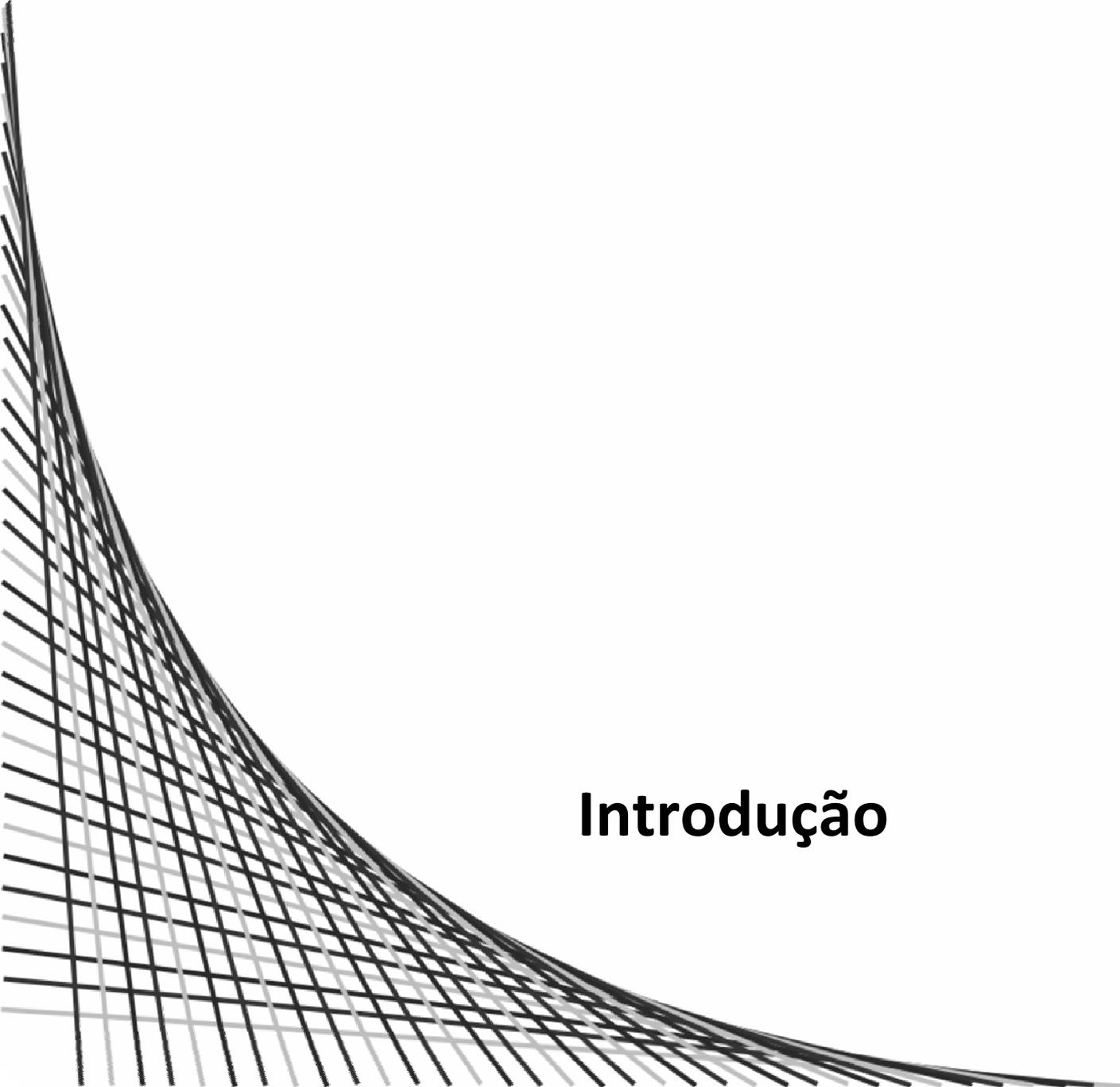
SDH- Succinato desidrogenase

VEGF- fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR-2- Receptor 2 para fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

	PÁG.
I. INTRODUÇÃO	17
II. JUSTIFICATIVA	21
III. REVISÃO DA LITERATURA	23
IV. PROPOSIÇÃO	37
V. MATERIAL E MÉTODO	39
1. Animais	39
1.1. Tratamento dos animais	40
1.2. Obtenção das amostras para cortes congelados	41
2. Processamento das amostras para Análise histoenzimológica	41
2.1. Técnica para demonstração das enzimas oxidativas	42
2.1.1. Técnica de demonstração da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH).....	42
2.1.2. Técnica de demonstração da Succinato desidrogenase (SDH)	42
2.2. Técnica para demonstração da Adenosina Trifosfatase (ATPase)	43
2.2.1. Técnicas para reações com ATPase alcalina:	43
2.2.2. Técnicas para reações com ATPase ácida:	43
3. Técnica de coloração com hematoxilina e eosina – Microscopia de luz.....	43
4. Técnica de microscopia eletrônica de transmissão para análise do músculo	44
5. Análise imunohistoquímica para VEGF e VEGF R2	45
6. Análise quantitativa dos músculos	46
7. Análise Estatística	47
VI. RESULTADOS	49
1. Histoenzimologia – Técnica para demonstração das enzimas oxidativas	49
1.1. Nicotinamida adenina dinucleotídeo – NADH	49
1.2. Succinato desidrogenase – SDH.....	53
2. Adenosina Trifosfatase - ATPase	57
2.1. ATPase ácida	58
2.2. ATPase alcalina.....	59
3. Histologia ao microscópio de Luz	60
3.1. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)	60
4. Microscopia eletrônica de transmissão	62
5. Imunohistoquímica	70
5.1. Fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF	70
5.2. Receptor de fator de crescimento do endotélio vascular – VEGFR-2.....	72
VII. DISCUSSÃO	76
VIII. CONCLUSÕES	82
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE	94

An abstract geometric pattern consisting of a dense grid of intersecting lines. The lines are arranged in a way that they form a smooth, curved shape that tapers from left to right. The lines are black and grey, and the overall effect is a complex, textured surface that resembles a stylized letter 'C' or a similar curve.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

Há muito tempo a luz é utilizada com finalidades terapêuticas. Como mostra a história, os gregos usavam a helioterapia; os chineses tratavam com a luz solar algumas doenças cutâneas, câncer e até a alguns casos de psicose; e os povos indianos utilizavam a luz em fotoquimioterapia, empregando fotossensibilizador exógeno extraído de plantas por volta de 1400 a.C. (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998). Todas essas modalidades de tratamento estão respaldadas na relação que a luz tem com as funções biológicas, e com a saúde dos seres vivos. É bem conhecida que a importância da luz na síntese de substâncias vitais para os animais, e na fotossíntese dos vegetais, da qual provem grande parte da energia orgânica existente no planeta. A luz tem a capacidade de destruir microorganismos patogênicos, e por outro lado pode induzir doenças como o câncer de pele, e as queimaduras. O laser com todas as suas similaridades e diferenças da luz convencional também tem o efeito de modificar funções biológicas positiva ou negativamente.

O laser é uma energia formada por fótons com propriedades específicas, caracterizada por mesmo comprimento de onda eletromagnética, direção, frequência e cor (MAIMAN, 1960), cujas características conferem a essa luz as propriedades de monocromaticidade, colimação e coerência que acrescentam benefícios aos procedimentos em que é associado (GOODMAN; KAUFMAN, 1997). O laser é um complemento que precisa ser estudado e compreendido na prática clínica (MIYASHITA; FONSECA, 2004), já que o seu uso nas diversas áreas da medicina e odontologia cresceu vertiginosamente nas últimas décadas, e ainda é muito escasso por parte dos profissionais, o conhecimento básico de seu funcionamento, principalmente daqueles que não foram treinados especificamente (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

Sabe-se que os lasers são capazes que levar uma grande quantidade de energia aos tecidos com extrema precisão, é uma radiação altamente concentrada, podendo resultar em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares. Cada meio-ativo resulta num tipo diferente de radiação, com efeito determinado sobre os tecidos. É uma forma de energia não ionizante e não-invasiva, muito bem tolerada pelo organismo. Atualmente os lasers terapêuticos não possuem efeito mutagênico e podem ser usados sem riscos (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

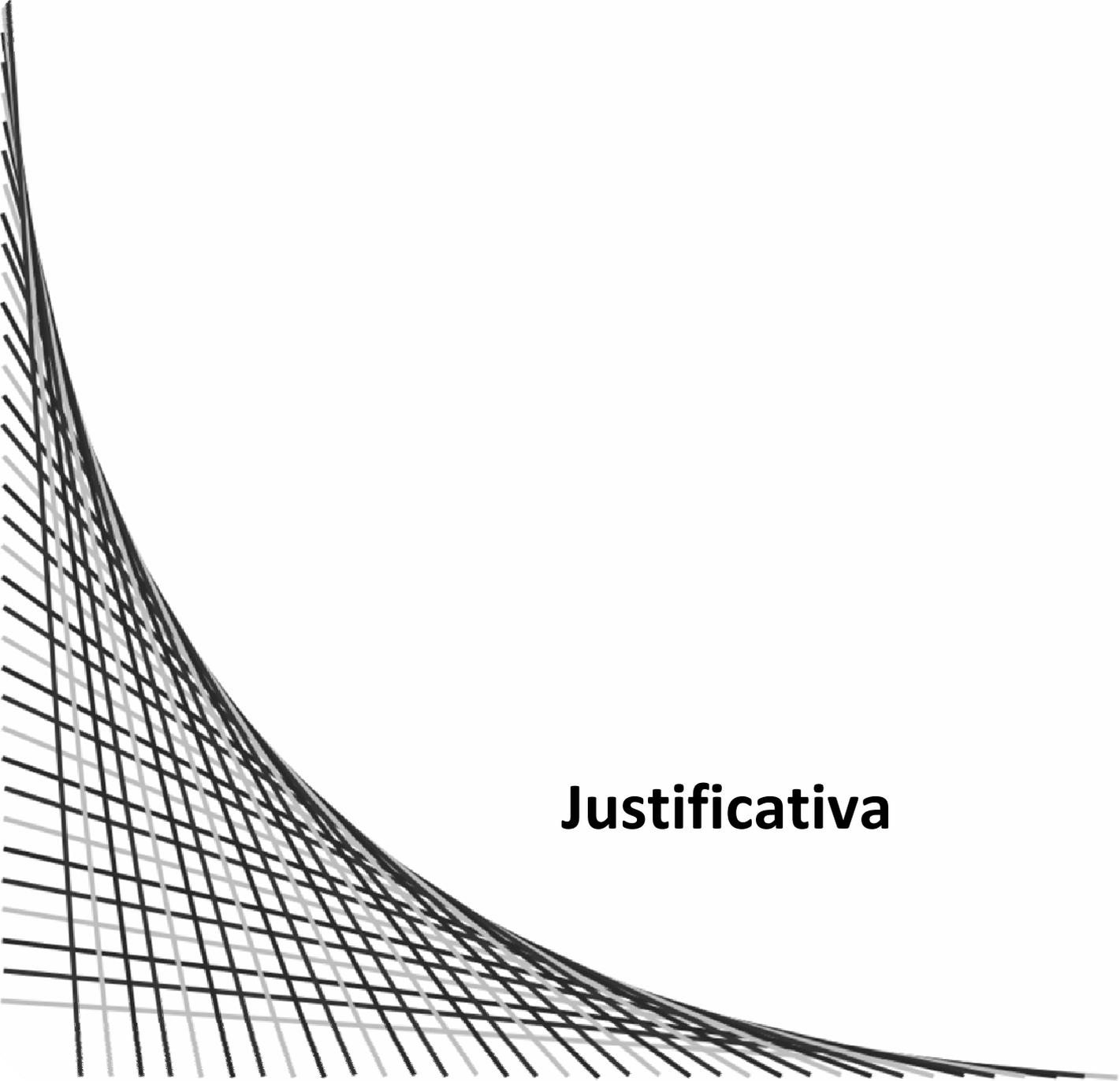
Na odontologia especificamente o laser é muito utilizado em pacientes com disfunções temporomandibulares (DTM), que podem apresentar problemas nas estruturas articulares, nos músculos mastigatórios, e também manifestar dores que irradiam para a face, para o pescoço e para o ombro (FRICTON, 2004). Considera-se que a insuficiência de oxigênio aumenta o ácido lático por hiperatividade ou fadiga muscular, desencadeando a

inflamação, a qual sensibiliza os nociceptores e causa a hiperalgia. As disfunções temporomandibulares (DTMs) podem gerar dores crônicas, recebendo como uma das alternativas de tratamento a aplicação do laser. A literatura revela que o laser de baixa intensidade (LLLI) tem efeito analgésico e antiinflamatório, promove relaxamento muscular (NUNEZ et al., 2006), reduz a fadiga muscular durante as contrações tetânicas (LOPES-MARTINS et al., 2006), além disso aumenta a força de mordida e diminui a dor orofacial (MEDEIROS; VIEIRA; NISHIMURA, 2005). O laser também é utilizado na odontologia para tratamentos da síndrome da dor miofascial (SHIRANI et al., 2009); reparo tecidual, trismo e edema pós-exodontia (ARAS; GÜNGÖRMÜŞ, 2009), efeito anti-inflamatório e analgésico pós-cirúrgico; no tratamento de estomatite aftosa, lesões de herpes labial, mucosite oral, parestesia pós-cirúrgicas (SIMÕES, 2007).

Esse estudo utilizou as técnicas de reação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), succinato desidrogenase (SDH) para demonstrar a capacidade oxidativa do músculo masseter. Nessas técnicas o Nitroblue tetrazolium entra em contato com os substratos, agindo como um importante acceptor de hidrogênios. Os produtos dessas reações resultam em precipitados pigmentados de coloração azul, a formazana que é insolúvel. Assim, conforme a intensidade de coloração das fibras musculares, clara, intermediária e escuras tal como ocorreu nas observações de Maxwell, Faulkner e Lieberman (1973) foi possível examinar o efeito das aplicações das densidades de energia do laser de baixa intensidade 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 20 J/cm² sobre a capacidade oxidativa do músculo masseter. A técnica da ATPase possibilita observar a atividade contrátil do músculo conforme a pré-incubação do tecido muscular em soluções com os pH ácido e alcalino (BROOKE; KAISER, 1970; SIECK et al., 1986; GUTH; SAMAHA, 1969). As técnicas imunohistoquímicas para demonstrar a atividade do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), uma proteína localizada na região subsarcolemal das fibras musculares, na musculatura lisa e paredes de capilares (HUDLICKA; BROW, 2009) um potente estimulante angiogênico (EHRBAR et al., 2004; INFANGER et al., 2005); e o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2), que dentre os tipos de receptores do VEGF é o que induz a proliferação e aumenta a migração e invasão das células endoteliais, contribuindo com a angiogênese (BYRNE; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2005). E por fim as análises morfológicas pela microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, metodologias pouco utilizadas nos estudos sobre laser de baixa intensidade.

A fototerapia ainda não é uma modalidade terapêutica muito bem estabelecida embora, o seu uso tenha crescido vertiginosamente na medicina e na odontologia (PINHEIRO et al., 2002). Apesar dos efeitos benéficos da laserterapia na clínica, ainda não é bem compreendido o seu efeito biológico devido aos diferentes tipos de laser e a variação dos seus parâmetros tais como: potência, intensidade, densidade de energia, comprimento

de onda, meio condutor, tipo de impulso, orientação e distância de aplicação, energia total depositada, entre outros. Essas variações entre as pesquisas dificultam a comparação e a compreensão dos efeitos biológicos da laserterapia. Associado a esses aspectos, o grande problema é a utilização terapêutica do laser pelos profissionais da saúde sem treinamento adequado e o devido conhecimento básico de seu funcionamento. Isto pode tornar o laser, algo idealizado para ajudar em um instrumento que pode atentar contra a integridade dos pacientes, justificando mais estudos para a compreensão dos efeitos e divulgação do uso do laser para concretizar seu benefício.



Justificativa

II. JUSTIFICATIVA

Há um grande enigma que rodeia a laserterapia, devido à variação nos parâmetros envolvidos, tais como: tipo de aparelho, meio semiconductor, comprimento de onda, densidade de energia, potência, tempo de exposição, número de aplicações e duração total do tratamento. Portanto, os resultados deste projeto têm por finalidade contribuir com os profissionais no que se refere ao custo benefício dessa terapia, a determinação da segurança para a aplicação do laser e a compreensão dos seus efeitos biológicos, no nível celular, contribuindo assim para a ciência e sociedade. Além disso, são poucos os trabalhos na literatura que utilizam a laserterapia em tecido sadio e também escassos os que utilizam o laser sobre os músculos do sistema estomatognático. Esse trabalho busca então avaliar por meio de técnicas histoquímicas, histológicas, ultraestruturais e imunohistoquímicas os efeitos da irradiação do laser de baixa intensidade sobre o tecido de grande importância na odontologia, lembrando que ao se irradiar uma lesão ou um tecido alterado, ela também atinge tecidos sadios e pode ter efeitos ainda não elucidados.



Revisão da Literatura

III. REVISÃO DA LITERATURA

Laser na área da saúde e biologia

Enquanto a laserterapia é um fenômeno relativamente novo, o uso da luz como uma modalidade terapêutica pré-data os registros mais antigos. A prática da helioterapia em tempos antigos era baseada em crenças religiosas e superstições. O homem pré-histórico deificava o Sol e a luz solar, como algo sagrado, que era capaz de expulsar espíritos malignos que se acreditava causar doenças. Os antigos deuses “Sol”, Baal para os hebreus e Helios para os gregos, eram considerados deuses da saúde e cura. A admiração do sol não foi exclusiva da pré-história, sobrevivendo quase 4 séculos como uma religião monoteísta antes de finalmente ser assimilada ao Cristianismo Ortodoxo no começo do “Sagrado Império Romano”. Para os gregos e romanos os banhos de sol eram considerados saudáveis e meio de prevenção de doenças (BAXTER, 1997).

O laser é uma energia formada por fótons com propriedades específicas, caracterizada como uma onda eletromagnética com o mesmo comprimento de onda, direção frequência e cor (MAIMAN, 1960). Tais características conferem a essa luz as propriedades de monocromaticidade, colimação e coerência que permitem acrescentar benefícios aos procedimentos em que é associado (GOODMAN; KAUFMAN, 1997). As aplicações dos lasers são inúmeras, porém, a maioria das pessoas os relaciona à “raios da morte” de ficção científica, ficando de fato o contato diário limitado aos leitores de códigos de barra em supermercados, leitores de CD e DVD, pointers de apresentação e luzes de shows (BAXTER, 1997).

Os usos e aplicações do laser de baixa intensidade têm crescido entre grupos clínicos incluindo fisioterapeutas e dentistas. Entretanto, enquanto essa terapia é cada vez mais aceita na Europa e na Ásia, nos EUA isso não ocorre. Porém novas pesquisas e os benefícios da terapia cada vez mais claros podem ajudar com a popularidade do laser também nos EUA (BAXTER, 1997). A laserterapia crescente nas últimas décadas tanto na medicina quanto na odontologia exige que esse complemento terapêutico seja mais estudado e compreendido na prática clínica (MIYASHITA; FONSECA, 2004), pois o conhecimento básico de seu funcionamento ainda é muito escasso por parte dos profissionais, principalmente aqueles que não foram treinados especificamente (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

Sabe-se que os lasers são capazes de levar grande quantidade de energia aos tecidos, com extrema precisão, é uma radiação altamente concentrada, podendo resultar em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares. Cada meio-ativo resulta num tipo diferente de

radiação, com efeito determinado sobre os tecidos. É uma forma de energia não ionizante e não-invasiva e muito bem tolerada pelo organismo. Atualmente os lasers terapêuticos não possuem efeito mutagênico e podem ser usados sem riscos (BRUGNERA-JR; PINHEIRO, 1998).

A medicina a laser se desenvolveu rapidamente desde a final da década de 60, em paralelo com as mais recentes inovações dessa tecnologia em todas as áreas. Entre os muitos usos do laser de baixa intensidade na medicina estão promover o reparo de tecidos e a redução da dor, os aparelhos utilizados nessas aplicações usualmente geram luzes infravermelhas ou vermelhas, e diferente das maioria dos lasers cirúrgicos, são essencialmente atérmicos, não produzindo significativo aquecimento no tecido como resultado da irradiação (BAXTER, 1997).

Como a eficácia da bioestimulação do laser ainda não foi demonstrada sem equívocos com experimentos clínicos propriamente controlados, ainda existe um considerável ceticismo sobre o conceito de fotomodulação na comunidade médica. Nessa área clínica uma das maiores dificuldades com a pesquisa é a falta de mecanismos experimentalmente suportáveis para comprovar os efeitos fotobiomodulatórios dos lasers (YU et al., 1997).

Laser de baixa intensidade e a musculatura

A aplicação do laser de He-Ne sobre o músculo lesado de sapos promoveu a neoformação de vasos sanguíneos (BIBIKOVA; BELKIN; ORON 1994; AMIR et al., 2000), e estimulou o processo de regeneração do músculo irradiado, sugerindo a proliferação e/ou diferenciação das células musculares recrutadas no processo de regeneração (BIBIKOVA; ORON, 1995). Em camundongos, o laser HeNe com a densidade de energia de $1,6\text{J}/\text{cm}^2$ aumentou a área das fibras musculares e densidade mitocondrial (AMARAL; PARIZOTTO; SALVINI; 2001). O laser de baixa intensidade pode aumentar a proliferação de células satélites, aquelas precursoras de células musculares em processo de regeneração e neoformação muscular (BEN-DOV et al., 1999), assim como inibir sua diferenciação "in vitro" (SHEFER et al., 2001; 2002). SHEFER et al. (2003) verificaram que o laser de HeNe intensificou novas sínteses protéicas pelos mioblastos da musculatura esquelética.

O laser de arseneto de gálio (GaAs), aplicado sobre músculos traumatizados de ratos, reduz a resposta inflamatória, bloqueia os efeitos das espécies oxigênio reativas (ROS) liberadas e, ativa o fator nuclear kappa B (NF-kappa B) (RIZZI et al., 2006). Esse tipo de laser também preveniu a degeneração do músculo esquelético após lesão por isquemia-reperfusão em ratos. Essa prevenção pode ser por indução da síntese de antioxidantes e outras proteínas citoprotetoras, visto que, quando aplicado em músculos intactos, há um

aumento de antioxidantes (AVNI et al., 2005). A irradiação também aumentou a proliferação celular acelerando a reparação do tecido muscular esquelético (GAL et al., 2006).

Segundo Podbielski, Otrocka-Domagala e Rotkiewicz (2006) o efeito do laser de baixa intensidade acelera a proliferação de células miogênicas e, o processo de regeneração muscular, sugerindo uma fagocitose mais eficiente de células sanguíneas extravasadas e fibras musculares necrosadas. Medrado et al. (2003) observaram que a irradiação à laser com o comprimento de onda de 670nm e densidade de energia de 4J/cm² diminuiu a reação inflamatória, aumentando a deposição de colágeno e a proliferação de miofibroblastos em feridas cutâneas experimentais no dorso de ratos *Wistar*.

Cressoni et al. (2008) utilizaram o laser de diodo (GaAlInP), comprimento de onda 785nm, 75mW aplicando 2,7J de energia, 24 horas após a lesão induzida no músculo tibial anterior de ratos. Essa irradiação acelerou a regeneração do tecido por redução do infiltrado inflamatório e aumento de fibroblastos e miofibroblastos.

Sussai et al. (2009) observaram que a irradiação com laser de baixa intensidade sobre o músculo gastrocnêmio de ratos, após o exercício de nado de resistência, influenciou o perfil metabólico dos animais submetidos à fadiga, baixando os níveis séricos de creatina-quinase desses músculos. Sugerindo que os lasers podem prevenir contra a apoptose celular experimentada durante exercícios físicos pesados.

Leal-Junior e colaboradores (2010) irradiaram músculos de ratos pré-exercitados e com contrações tetânicas, usando laser de 904 nm e aplicando 0; 0,1; 0,3; 1,0 e 3,0 J de energia. Observaram que as forças de contração e a média de trabalho realizado foram significativamente melhores nos dois grupos irradiados com as maiores doses. Os níveis de lactato sanguíneo foram significativamente menores nos grupos irradiados, assim como os níveis de creatina-quinase, exceto no grupo de 3J. De modo que a dose de 1,0J apresentou o melhor efeito sobre a musculatura retardando a fadiga muscular e diminuindo os níveis de lactato e creatina-quinase pós-exercício significativamente.

Hou et al. (2008) investigaram a influência do laser de baixa potência sobre as células tronco mesênquimais da medula óssea de ratos *in vitro*, não observaram alterações de citotoxicidade, e o laser ainda estimulou a proliferação, aumentou a secreção de fatores de crescimento e facilitou a diferenciação miogênica das células tronco mesenquimais, sugerindo ser essa uma nova abordagem para o condicionamento dessas células *in vitro* antes do transplante.

Em humanos os estudos clínicos, embora ainda escassos, revelam os efeitos positivos da laserterapia de baixa intensidade sobre a musculatura esquelética. A irradiação do músculo de atletas, antes de uma bateria de exercícios com um laser de baixa potência, comprimento de onda de 830 nm, energia depositada de 15 a 20 J (distribuído em 5 pontos) acelerou a recuperação pós-exercício da musculatura esquelética (LEAL-JUNIOR et al.,

2009a). Em outro estudo, duplo-cego, 12 atletas profissionais receberam aplicações prévias de laser, com comprimento de onda de 655nm, densidade de energia de $500\text{J}/\text{cm}^2$, com um total de 20J de energia ao longo do bíceps braquial distribuído em quatro pontos por sessão. Essa irradiação antes dos músculos serem submetidos ao grande número de movimentos repetitivos retardou o aparecimento da fadiga muscular e a exaustão por um mecanismo local, apesar dos níveis de lactato no sangue terem aumentado (LEAL-JUNIOR et al., 2008). Dessa vez Leal-Junior et al. (2009b) usaram o laser de comprimento de onda de 830 nm, com intensidade de energia de 100mW, aplicado por 200s distribuídos em 4 pontos do músculo bíceps braquial de atletas profissionais jovens e saudáveis, num estudo duplo-cego com grupo placebo. A média de movimentos repetitivos voluntários foi significativamente maior no grupo previamente tratado, enquanto os níveis de lactato embora tenham aumentado a diferença estatística não foi significante entre os grupos. Deste modo, a terapia com laser de baixa intensidade retardou o aparecimento da fadiga muscular nos exercícios de alta intensidade.

No entanto, Gorgey, Wade e Sobhi (2008), não conseguiram atenuar a fadiga muscular, aplicando o laser com 500 mW de intensidade, 808 nm de comprimento de onda e, 7J ou 3J de energia depositada, antes da indução da fadiga no músculo extensor do joelho por meio de estimuladores neuromusculares elétricos. E Leal-Junior et al. em 2009c comparando a laserterapia convencional (LLLI) com a multi-terapia de LED agregado (LEDT) na recuperação do músculo reto-femoral de jovens atletas. Não observaram melhoras no desempenho, nem na redução de lactato dessa musculatura com ambas terapias aplicadas.

Estudos relacionando dor muscular com o laser de baixa potência em pacientes revelaram que a dor miofascial diminuiu em pacientes tratados com os dois tipos de laser: de comprimento de onda de 660 nm, com a densidade de energia $6,2\text{J}/\text{cm}^2$, emissão contínua, e de 890 nm, $1\text{J}/\text{cm}^2$, frequência de 1500 hz, em comparação ao grupo controle (SHIRANI et al., 2009). Em 2007, Fikácková et al. irradiando as densidades de energia 0,1 (controle), 10 e $15\text{J}/\text{cm}^2$, com laser de diodo (GaAlAs) 830nm, 400 mW de potência em grupos de pacientes portadores de disfunção temporomandibular (DTM) observou que ambos os grupos irradiados tiveram uma melhora significativa na dor da DTM quando comparados com o grupo controle, porém não houve diferença entre as doses aplicadas.

Histoenzimologia - NADH, SDH e ATPase

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é um importante carreador de elétrons que participa de reações de oxirredução e especializada em transportar elétrons e átomos de hidrogênio de alta energia, atuando em muitas reações biossintéticas importantes

(ALBERTS et al., 2004). Esse carreamento de elétrons pela NADH compõe o complexo I da cadeia respiratória, que é um dos cinco complexos de enzimas do sistema oxidativo nas mitocôndrias dos mamíferos (YAGI et al., 2006), sendo esse o maior complexo enzimático multi-proteína da cadeia de transferência de elétrons da mitocôndria (TRIEPELS et al., 2001; SMEITINK et al., 2004). O monitoramento dos níveis da NADH nos tecidos fornece a mais importante informação do estado metabólico na mitocôndria em termos de produção de energia e níveis de oxigênio intracelular, sendo importante na interpretação de situações fisiológicas e patológicas (MAYEVSKY; BARBIRO-MICHAELY, 2009). Porém a NADH não é específica da cadeia respiratória ela também atua em outras reações energéticas, como por exemplo, a glicólise (ALBERTS et al., 2004).

A succinato desidrogenase (SDH), compõe o complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, é uma flavoproteína ligada à membrana interna mitocondrial que intervém no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória, o SDH contém um FAD (dinucleótido de flavina e adenina) unido covalentemente (en.wikipedia.org). O SDH é específica à cadeia respiratória, atuando na “etapa 6” do ciclo de Krebs, em que ocorre a terceira oxidação (ALBERTS et al., 2004).

Um dos principais produtos da cadeia respiratória e da glicólise é o trifosfato de adenosina (ATP) que é o mais versátil e importante carreador ativado na célula, funcionando como um depósito de energia, que possibilita uma grande variedade de reações químicas nas células (ALBERTS et al., 2004). É geralmente aceito que a contração dos músculos ocorre pelas interações da actina, miosina e ATP (BÁRÁNY, 1967). Uma importante propriedade da miosina é hidrolisar ATP, uma atividade enzimática que fornece energia necessária para a contração. A taxa dessa hidrólise de ATP pode ser a reação determinante da velocidade de contração muscular (GUTH; SAMAHA, 1969). Os membros das famílias de proteínas conhecidas como miosinas, que compõe os músculos consistem em uma cabeça contendo uma ATPase e uma longa cauda (KIERSZENBAUM, 2008).

Correlacionando a reação adenosina trifosfatase (ATPase) miosínica com outras características Brooke e Kaiser (1970) classificaram as fibras musculares em: Tipo I – coradas com intensidade mais clara após a pré-incubação em meio alcalino, encontradas em unidades motoras de “contração-lenta”, as quais revelaram coloração mais escura para as enzimas oxidativas. Tipo IIA – fibras musculares que exibiram suas atividades ATPásicas no pH 4,9 e abaixo, porém não foram completamente inibidas até a pré-incubação no pH 3,9 ou abaixo, nas quais a reação de coloração oxidativa é intermediária. Tipo IIB - fibras musculares que coram mais escuras em reação para a ATPase pré-incubada em meio alcalino, encontradas em unidades motoras de “contração-rápida”, as quais desenvolvem um mínimo de reação uma enzima oxidativa.

Conforme Peter et al. (1972) as fibras musculares foram classificadas nos seguintes tipos: a) contração rápida glicolítica, predominantemente anaeróbica, possuindo alta concentração de glicogênio e fosforilase alta. Sua capacidade aeróbica é muito limitada manifestada pela baixa atividade da succinato desidrogenase, assim como pela baixa concentração de citocromo e mioglobina. b) contração rápida oxidativa-glicolítica com capacidade de metabolismo aeróbico mais alto por causa da atividade succinato desidrogenase, e concentrações mais altas de citocromo e mioglobina. c) contração lenta oxidativa com um metabolismo aeróbico predominante, concentração baixa de glicogênio e fosforilase baixa.

Mudanças adaptativas foram demonstradas na capacidade oxidativa do músculo esquelético por técnicas histoquímicas como a atividade do succinato desidrogenase (SDH). Os 3 tipos de fibras classificadas como vermelhas, intermediárias e brancas foram analisadas com base nas atividades da SDH ou da nicotinamida adenina dinucleotídeo diaforase (NADH-D). As fibras brancas apresentaram baixas taxa oxidativa e foram identificadas pela ausência de significantes depósitos de diformazana subsarcolemal. As fibras intermediárias caracterizaram pela dispersão uniforme dos grânulos de diformazana de pequenos tamanhos, enquanto as fibras vermelhas apresentam grande atividade nas regiões subsarcolemais e com os depósitos de diformazana maiores (MAXWELL; FAULKNER; LIEBERMAN, 1973). Uma relação negativa entre a área de secção do músculo esquelético e a atividade do SDH foi observada. O tamanho da fibra e sua atividade de SDH podem estar funcionalmente relacionados por causa das limitações da difusão do substrato energético. Deve-se enfatizar que a localização da atividade do SDH na superfície da fibra muscular pode ser um fator que tem considerável efeito na fadiga (SIECK et al., 1986).

Cebasek et al. (2007) avaliaram se a relação do comprimento dos capilares com a área e o volume muscular reflete a transformação do tipo de fibra acompanhado pelas mudanças no metabolismo oxidativo, em músculo esquelético de ratos. Os músculos foram analisados 2 semanas após os nervos serem cortados e, 4 semanas após serem esmagados e observaram reações positivas para o SDH e o NADH-TR por técnicas de quantificação estereológica da área das fibras musculares.

Carmo-Araújo e colaboradores (2007) observaram histoquimicamente o efeito da isquemia por um período de 4h e posterior reperfusão sanguínea, conforme os tempos de 0, 1, 24 e 72h, sobre o músculo esquelético de ratos. Por meio das reações de SDH e NADH-TR observaram colorações: moderadamente intensa em todas as fibras no grupo de 0h, moderadas a fracas no grupo com 1 h, assim como no grupo com 24 h de reperfusão, fracas ou quase inexistentes no grupo com 72h de reperfusão. Sugeriram que a isquemia seguida de reperfusão induz dano histológico progressivo.

Karu (1999) relata que a mitocôndria é sensível à irradiação com luzes monocromáticas visíveis e próximas do infravermelho, como é o caso do laser. A irradiação da mitocôndria do fígado de ratos com esse tipo de luz aumentou: a síntese de ATP, o consumo de O_2 , o potencial de membrana e, o gradiente de próton das mitocôndrias. Além disso, ocasionou mudanças visíveis nessas organelas, alterando algumas reações ligadas a NADH-desidrogenase e aumentando a taxa de troca de ADP/ATP. Postulou 4 teorias relacionadas com essas alterações. Primeiro, um possível processo envolve a aceleração da transferência de elétrons na cadeia respiratória devida a alteração nas propriedades de redução dos carreadores, seguido de fotoexcitação nos seus estados eletrônicos. Segundo, durante a excitação pela luz dos estados elétricos, uma fração notável de energia excitada é inevitavelmente convertida em calor, causando um aumento de temperatura local absorvida pelo cromóforo. Terceiro, a principal utilização do oxigênio na cadeia respiratória envolve a redução de 4 elétrons para água. Em processos metabólicos normais assim como no número de reações biológicas não-enzimáticas ambas as reduções univalente e bivalente da molécula de oxigênio também ocorrem. Quarto, certas moléculas fotoabsorventes como porfirinas e flavoproteínas podem ser reversivelmente convertidas para fotosensibilizadoras. É bem conhecido que muitas reações bioquímicas nas células ocorrem horas, até mesmo dias após a irradiação, as chamadas reações secundárias. Sugere que a especificidade de ação da luz se deve a absorção de quanta pelo fotoceptor, citocromo C oxidase, discutindo a possibilidade da NADH-deidrogenase ser um possível fotoceptor. Baseado nisso, propuseram que a absorção da luz pelos componentes da cadeia respiratória, causa uma ativação da cadeia respiratória e oxidação do NADH, cuja oxidação muda o estado de redução na mitocôndria e no citoplasma. A ativação da cadeia de transporte de elétrons também resulta no aumento da força motora do próton, do potencial elétrico da membrana mitocondrial, quantidade de ATP, e acidificação do citoplasma.

Tafur e Mills (2008) evidenciaram em sua revisão, que o laser de baixa intensidade interage com certas células e tecidos não-fotossintéticos, induzindo efeitos específicos conforme o comprimento de onda, frequência, densidade de energia e intensidade participando em processos como o reparo tecidual e a modulação de inflamação crônica. Sugeriram que essa tecnologia pode atuar em algum aspecto específico da fisiologia endógena, sendo a fotossensibilidade do transporte de elétrons uma nova visão da biologia. Relacionaram a cadeia para transporte de elétrons mitocondrial com a cadeia fotossintética de transporte de elétrons, a qual é fundamental para a vida na Terra. Evidenciaram a similaridade funcional entre a mitocôndria e o sistema fotossintético, e sugeriram em certos tipos de células, que os sistemas de transporte de elétrons compartilham propriedades tornando-as sensível a luz visível e próxima a visível.

Yu et al. (1997) observaram em fígado de rato que a irradiação do laser de baixa intensidade argon-dye com as doses de 0,6 e 1,2 J/cm² aumentaram o consumo de oxigênio e as doses de 0,6; 1,2; 2,4 e 4,8J/cm² aumentaram a atividade do NADH mitocondrial.

Silveira, Streck e Pinho (2007) irradiaram com laser de baixa intensidade AsGa (904nm), potencias de 15 a 30 mW e dose de 3J/cm², feridas do dorso de ratos. O laser melhorou o reparo da lesão, além de aumentar a atividade dos complexos II (succinato-ubiquinona oxidoreductase) e IV, sem afetar a atividade da SDH.

Silveira et al. (2009) observaram que o laser aumentou de modo significativo a atividade dos complexos I, II, III, IV na cadeia respiratória mitocondrial, assim como a atividade do SDH, em músculos lesados por contusão. Sugeriram que a laserterapia aumenta a síntese do ATP e acelera o processo de reparo da musculatura.

Wilden e Karthein (1998) relataram que a transferência de energia de moléculas nutritivas, como o piruvato, para as estruturas moleculares mitocondriais da cadeia respiratória é um fluxo de elétrons de alta energia. As explicações não são consistentes para alguns passos intermediários envolvidos nesse fluxo. Descreveram esses passos intermediários na transferência energética como ocorrências caóticas sem qualquer precisão sinérgica. Esse movimento vibratório e rotatório bem-direcionado dos componentes, até a tunelização da mecânica quântica de elétrons pelas barreiras moleculares é devido à rápida transferência de elétrons e a frequência de colisões aleatórias entre os carreadores de elétrons difusíveis e os complexos de enzimas (cada complexo doa e recebe elétrons uma vez a cada 5 a 20 milissegundos) como a NADH. Postularam que a transferência ordenada de elétrons é devido à especificidade de interações funcionais entre os componentes da cadeia respiratória, de modo que a presença ou ausência de radiação de uma especial frequência, comprimento de onda, intensidade, difusão, ou polarização nas células é um fator decisivo para a realização de determinadas reações.

A irradiação de 460 J/m² do laser He-Ne (632,8 nm) sobre cultura de levedura acelerou a proliferação celular, ativou as enzimas da cadeia respiratória (citocromo c oxidase e NADH desidrogenase) (MANTEIFEL; KARU, 2005).

Wataha et al. (2004) observaram o efeito de 3 fontes de luz usadas em odontologia Alógena de Quartz e tugnstênio (QTH), plasma-arc(PAC) e laser, sobre função celular de fibroblastos de camundongos *in vitro*. As exposições de 5J/cm² do laser a 15J/cm² das luzes PAC e QTH suprimiram irreversivelmente a atividade do SDH. As exposições de 3,5 J/cm² de PAC e QTH também suprimiram irreversivelmente a atividade do SDH. Quando energias equivalentes à 1 J/cm² foram irradiadas, não houve supressão da atividade SDH para o laser e QTH, mas suprimiu 50% da atividade de SDH para a fonte PAC, indicando uma diferença de resposta biológica dependendo da fonte luminosa.

Em 2006 Amat e colaboradores relataram que a luz altera o potencial da membrana mitocondrial, sendo um estímulo para a síntese do ATP, cujo mecanismo pode estar relacionado com o campo elétrico induzido pela luz. A síntese de ATP extra-mitocondrial pode ser aumentada pela irradiação da luz, assim como a cinética da reação de hexoquinase quando o metabolismo celular está em condições anaeróbicas. Destacaram ainda que a quebra do ATP irradiado no citoplasma mudará a concentração de ADP livre e as médias de ATP/ADP, sendo um estímulo para a síntese de ATP.

A fototerapia é capaz de alterar a proliferação e a viabilidade celular tanto de células normais como células lesadas. De maneira geral, o laser em menores doses causa o aumento da proliferação e a viabilidade celular pelo aumento da atividade da ATPase, em fibroblastos humanos normais e lesados (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006). Quando irradiadas em altas doses o laser de baixa intensidade altera a morfologia dos fibroblastos, danifica, lisa, fragmenta, diminui a atividade mitocondrial, além de causar perigo ao DNA e à membrana plasmática destas mesmas células (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005; 2006).

Gordienko (1999) relata em seu estudo que a aplicação de laser com miramistin (detergente que aumenta a permeabilidade celular) normaliza a atividade da SDH no tecido inflamado, sugerindo seu uso em terapias complexas com complicações purulentas.

Karu (1989) em sua revisão descreve a biomodulação como um fenômeno fotobiológico, onde os fotorreceptores primários são componentes da cadeia respiratória, explicando assim, a universalidade dos efeitos do laser de baixa potência. Destaca que baixas doses da luz causam regulação de redox do metabolismo celular, enquanto em altas doses os danos fotodinâmicos prevalecem. Explica a necessidade de baixas doses e intensidades devido ao fato do quantum de luz ser um gatilho que regula o metabolismo celular. Como a magnitude do efeito bioestimulatório depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação, a bioestimulação nem sempre é possível.

Karu (2008a) evidenciou a existência de uma via de sinalização celular (sinalização retrógrada na mitocondrial) em que o citocromo C oxidase atua como um gerador de sinal após a absorção da luz e como um transdutor de sinal. Sugeriu que o óxido nítrico, um inibidor fisiológico da citocromo C oxidase que se liga ao seu centro catalítico dissocia-se desse centro quando a enzima é reduzida pela irradiação. Isso poderia transitoriamente aliviar o bloqueio no citocromo C oxidase causando a sinalização reversa. Explica ainda que essa nova via de sinalização pode ser a base dos efeitos universais de vários comprimentos de onda próximas ao vermelho e infra-vermelho, na fototerapia.

Em 2008b, Karu relatou que existem todas as razões para acreditar na sinalização mitocondrial retrógrada, em células irradiadas, pois os elementos da modulação da dessa via, como o $\Psi\Delta m$, ROSm e Ca^{2+} , está muito bem documentada. Além disso, as respostas à irradiação ocorridas no núcleo (aumento na síntese de DNA e RNA, expressão de genes de

várias categorias funcionais) estão definitivamente documentadas, apesar de ainda serem obscuras as vias da transdução dos sinais de luz entre esses dois extremos. Destacou as novas estratégias terapêuticas relacionadas com os elementos de sinalização mitocondrial $\Psi\Delta m$, ATP e ROS no que dizem respeito à cardio e neuroproteção, bem como de pré-condicionamento isquêmico. Notou-se que a irradiação a laser tem sido utilizada com sucesso em todos esses casos, e não apenas em animais, mas também na clínica. A irradiação a laser pode ter algumas limitações na prática clínica devida à dificuldade de penetração em tecidos profundos, por outro lado evita efeitos colaterais de drogas de ação mitocondrial.

Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e o receptor 2 para VEGF (VEGFR-2)

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma proteína localizada na região subsarcolemal das fibras musculares esqueléticas, na musculatura lisa vascular além da parede de capilares, sendo que neste último local é onde exerce um efeito sobre a proliferação da célula endotelial. (HUDLICKA; BROW, 2009). Byrne, Bouchier-Hayes e Harmeý (2005) descreveram que o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é uma super-família de fatores de crescimento, em que o VEGF-A está envolvido com a angiogênese mediando os sinais de alta afinidade com os receptores de tirosina-quinase. O VEGF apresenta 5 isoformas, dentre elas o VEGF₁₆₅ é predominante e o mais potente na estimulação da formação vascular, podendo inclusive se ligar à heparina e a matriz extracelular. Os receptores para o VEGF foi inicialmente localizado sobre as células endoteliais, distinguindo-se 3 tipos: VEGFR-1, VEGFR-2 e o VEGFR-3, os dois primeiros são encontrados principalmente sobre o endotélio vascular, e o último sobre o endotélio linfático. Dentre eles o VEGFR-2 é o mediador primário da sinalização do VEGF capaz de, promover sobrevivência, induzir proliferação e aumentar a migração e invasão das células endoteliais, as quais contribuem para a angiogênese. Essas funções são reguladas pela interação com seus receptores tirosina-quinase para transmitir sinais às várias proteínas. As principais ações do VEGF são: reparar feridas; induzir plaquetas ativadas à liberarem várias citocinas incluindo o VEGF, sobre a injúria; participar da resposta inflamatória atraindo neutrófilos circulantes, monócitos, queratinócitos e células endoteliais; aumentar a permeabilidade das células endoteliais levando à formação do tecido de granulação. A ativação de receptores pelo VEGF resulta então na proliferação e migração de células endoteliais, aumentando a angiogênese (por brotamento a partir de vasos pré-existentes), e a vasculogênese ao recrutar células endoteliais progenitoras da medula óssea para a

formação de endotélio vascular. O VEGF se mostra um estimulante angiogênico potente (EHRBAR et al., 2004; INFANGER et al., 2005).

Exercícios físicos aumentam a transcrição do VEGF, mRNA e proteínas no cérebro (apenas no hipocampo), pulmões e músculo esquelético, mas não no fígado ou coração. A hipóxia aumenta a expressão de VEGF apenas no cérebro (córtex, hipocampo e estriato). Novas transcrições parecem principalmente reguladas pelos exercícios-induzidos que aumentam a expressão do VEGF nos músculos, pulmões, fígado e cérebro. A expressão do VEGF foi o único componente do exercício resposta recapturado pela hipóxia (TANG et al., 2009).

A administração combinada de VEGF e fator de crescimento de insulina 1 (Insulin-like growth factor - IGF1) em roedores resultou em angiogênese, reinervação e miogênese; ativação e proliferação de células satélites; proteção das células contra apoptose; fim da resposta inflamatória; e formação de tecido muscular altamente funcional. Em contrapartida, a administração isolada desses fatores não demonstrou nenhum benefício em termos de neoangiogênese e perfusão e teve efeito mínimo na regeneração muscular (BORSELLI et al., 2010).

Em ratos com infarto do miocárdio induzido irradiados com o laser de baixa potência ocorreu um aumento significativo do (VEGF) e da expressão do indutor de síntese de óxido nítrico (iNOS) em comparação com os animais não irradiados (TUBY; MALTZ; ORON, 2006).

Silva et al. (2010) verificaram que com o uso de um laser infra-vermelho (780nm, 70mW e 35J/cm²) e um laser vermelho visível (660nm, 40mW e 5J/cm²) durante a cicatrização pós-cirúrgica na língua de ratos, influenciou a expressão do VEGF-A₁₆₅.

Richter e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do VEGF associado à irradiação com laser de baixa potência na sobrevivência de um enxerto de pele, como um modelo de reparo de lesões em condições isquêmicas. O lado esquerdo do dorso de cada animal foi irradiado por quatro semanas, em seguida induziram uma lesão no local e, fizeram um enxerto com o dorso contra lateral íntegro sobre leito previamente aplicado com a proteína VEGF ou a solução salina. As análises macroscópicas da área de necrose do enxerto e da densidade vascular, em cortes corados com hematoxilina e eosina, revelou que o VEGF exógeno administrado pode melhorar o efeito do enxerto de pele sobre o leito tecidual irradiado.

Tuby, Matz e Oron (2008) implantaram células-tronco mesenquimais, previamente irradiadas com laser de baixa potência, em corações infartados de ratos. Esses corações mostraram um aumento na densidade celular de 5 a 6,3 vezes maior quando comparados aos animais que receberam o mesmo tipo celular implantado, porém, não irradiados. Apresentaram também um aumento significativo de 1,4 e 2 vezes o nível de angiogênese e atividade do VEGF, respectivamente.

Laser de baixa intensidade e morfologia

Fung e colaboradores (2003) estudaram o efeito do laser no reparo de tendão de ratos controle (sem lesão e sem tratamento), controle (com lesão sem tratamento), tratado com $63,2\text{J}/\text{cm}^2$ e tratado com $31,6\text{J}/\text{cm}^2$. Observaram ultraestruturalmente um aumento na média dos diâmetros na região central dos grupos tratados em relação aos controles apenas lesados, indicando a maturação do colágeno neo-formado no começo do processo de remodelação. A aplicação única da laserterapia aumentou o tamanho da fibra de colágeno no reparo de tendão de ratos.

Pourzarandian et al. (2005) investigaram o efeito do laser Er:YAG pulsado ($1,68$ a $5\text{J}/\text{cm}^2$) sobre culturas de células de fibroblastos gengivais humanos. As culturas irradiadas apresentaram rápido crescimento celular. As observações da microscopia eletrônica de transmissão mostraram o núcleo estimulado sem dano na membrana celular. Após 3 dias do tratamento, as células apresentaram envoltas por uma rede de fibras de colágeno, com aumento do número de células. Os fibroblastos metabolicamente ativos revelaram um desenvolvido complexo de Golgi estreitamente ligado com abundantes cisternas do retículo endoplasmático rugoso (RER) cheias de conteúdo amorfo secretório, além de pronunciadas mitocôndrias. A LLLI estimulou a proliferação da cultura celular de fibroblastos gengivais. E a densidade de energia “ótima” foi a de $3,37\text{J}/\text{cm}^2$.

Araújo et al. (2007) investigaram a capacidade fotobiomodulatória do laser de HeNe ($632,8\text{nm}$, $1\text{J}/\text{cm}^2$) sobre a reparação de lesões da pele em camundongos. As lesões irradiadas mostraram rápida reepitelização, maior número de fibroblastos ativos e colágeno citoplasmático com fagossomos. Em nível ultraestrutural, após o oitavo dia da irradiação os grandes fibroblastos revelaram núcleo conspícuo, retículo endoplasmático rugoso com lúmen dilatado preenchido com material eletrôn-denso, e grande quantidade de fagossomos contendo fibras colágenas, estavam normalmente rodeados por uma frouxa matriz extracelular. No 15º dia pós-irradiação os fibroblastos grandes continham RER bem desenvolvido. Após 22 dias numerosos miofibroblastos foram observados mostrando muitas projeções citoplasmáticas orientadas paralelamente à superfície da pele. Sugerindo que o laser pode acelerar o reparo de feridas cutâneas em camundongos.

Reis et al. (2008) investigaram as funções dos elementos da matriz extra-celular durante o processo de reparo com a irradiação do laser de baixa intensidade ($4\text{J}/\text{cm}^2$, 9mW , 670nm) e administração de dexametasona em ratos. O grupo tratado com laser demonstrou aumento do conteúdo de colágeno e melhor arranjo da matriz extracelular. Os fibroblastos aumentaram em número e exibiram robustos RERs, e complexos de Golgi como achados ultraestruturais. A laserterapia por si só acelerou o reparo de tecido pós-cirúrgica, reduziu o edema e o infiltrado polimorfonuclear inclusive na presença da dexametasona.

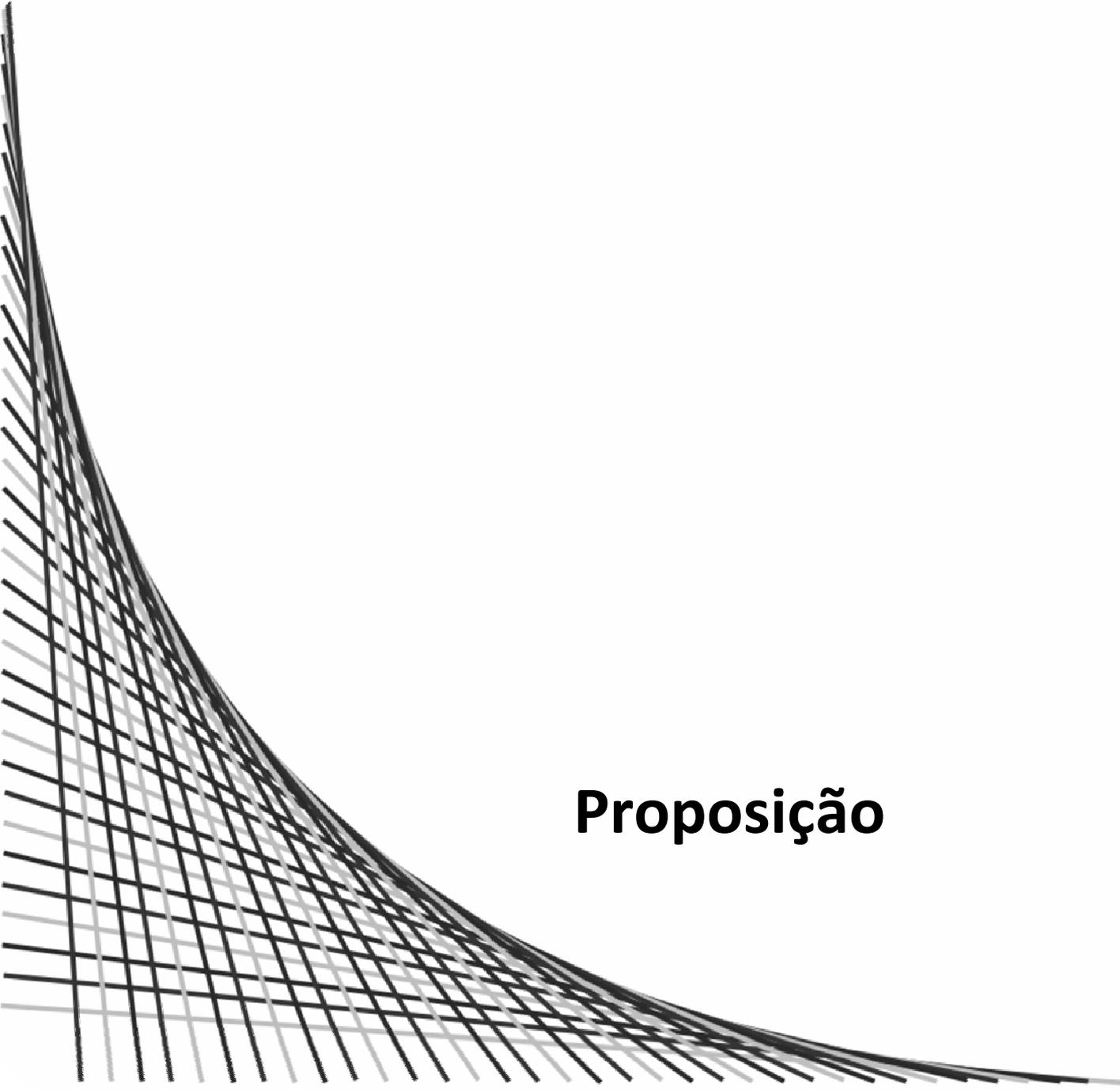
A irradiação laser ($460\text{J}/\text{m}^2$) alterou a microestrutura da mitocôndria gigante, dilatando as regiões estreitas do tubo mitocondrial (sem sinal de dano), com a área da crista aumentada ativou a respiração e síntese de ATP. Aumentou também o número de associações entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático, refletindo em absorção alta de Ca^{++} pela mitocôndria. Tais alterações da mitocôndria podem aumentar a eficiência tanto nas transferências de energia quanto na distribuição de Ca^{++} no citoplasma (MANTEIFEL; KARU, 2005).

Usando o laser (HeNe) com a densidade de energia de 5 e $10\text{J}/\text{cm}^2$ sobre o músculo tibial anterior lesado em gerbis, Iyomasa et al. (2009) observaram em nível ultraestrutural fibras musculares com poucas miofibrilas alteradas, contornos mitocondriais regulares com espaços intermembranosos amplos e cristas mitocondriais dilatadas. Notaram ainda uma substância intercelular clara com numerosas fibras colágenas e, capilares com múltiplos processos abluminais, protrusões intraluminais e várias vesículas pinocíticas nas células endoteliais. Concluíram que essas densidades de energia eleitas aumentaram a atividade mitocondrial, ativaram os fibroblastos e os macrófagos e estimularam a angiogênese.

Em culturas de fibroblastos e queratinócitos o laser diodo de GaAlAs, potência entre 5-100mW e duração de aplicação de 10 à 120 segundos não representaram efeito bioestimulatório (POGREL; CHEN; ZHANG, 1997).

Medrado et al. (2003) avaliaram o efeito do laser de baixa intensidade (9mW, 670nm) no reparo tecidual, analisando o papel dos elementos da matriz extracelular em ratos Wistar. Ultraestruturalmente os fibroblastos mostraram ricos RERs com cisternas dilatadas, proeminente complexos de Golgi e número aumentado de mitocôndrias. Algumas dessas células exibiam grandes gotículas de gordura no citoplasma. Nos animais irradiados, o tamanho do edema e o número de células inflamatórias estavam reduzidos e a quantidade de colágeno e fibras elásticas pareciam ligeiramente aumentadas. No geral o tratamento com $4\text{J}/\text{cm}^2$ foi melhor do que com $8\text{J}/\text{cm}^2$.

Ainda existe considerável ceticismo e ignorância sobre o uso e a eficácia dos lasers. Isso se deve, pelo menos em parte, à baixa qualidade das publicações científicas nessa área, em que os autores desconhecem os parâmetros do laser ou ainda criam desenhos experimentais falhos (BAXTER, 1997). O uso de diferentes tipos de laser, parâmetros e modelos experimentais dificulta as comparações dos resultados. Estudos mais recentes revelam algumas preocupações em relação a esses fatores usados nas pesquisas, mas mesmo assim não se observa a padronização esperada. Portanto, a laserterapia ainda requer esforços na padronização de parâmetros e estudos para compreender melhor seu efeito biológico sobre os tecidos, apesar da eficácia clínica.

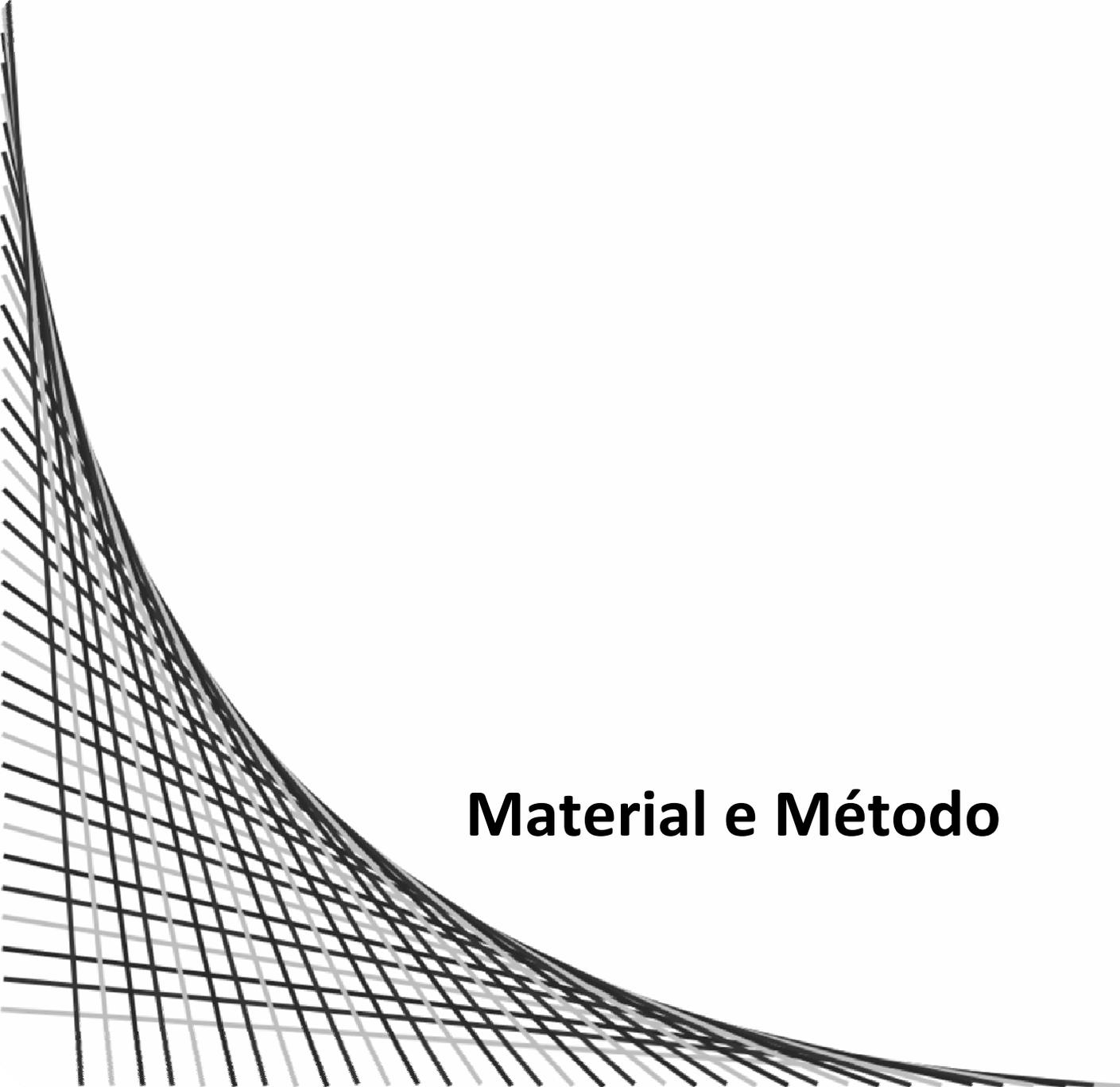


Proposição

IV. PROPOSIÇÃO

Analisar o efeito das densidades de energia (doses) do laser de baixa potência sobre o feixe superficial do músculo masseter esquerdo dos ratos *Wistar* por meio de:

1. Histoenzimologia para atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), succinato desidrogenase (SDH) e adenosina trifosfatase (ATPase);
2. Histológica ao microscópio de luz, coloração de hematoxilina e eosina (HE);
3. Microscopia eletrônica de transmissão;
4. Imunohistoquímica para fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator 2 para o VEGF (VEGF-R2).



Material e Método

V. MATERIAL E MÉTODO

Neste estudo foi utilizado o aparelho Twin Laser – Mm Optics (Fig. 1) com as seguintes especificações: frequência de 50/60 Hz, voltagem de 100 ~240 V, potência óptica máxima de 70 mW, dosagem máxima de 315J/cm², comprimento de onda de 780nm, laser infravermelho, meio semiconductor de diodo arseneto de gálio-alumínio (GaAlAs), com a ponta de aplicação com área de 0,04 cm² e diâmetro de 5 mm do laboratório de eletromiografia do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia adquirido com o auxílio FAPESP nº. 2006/55567-1.

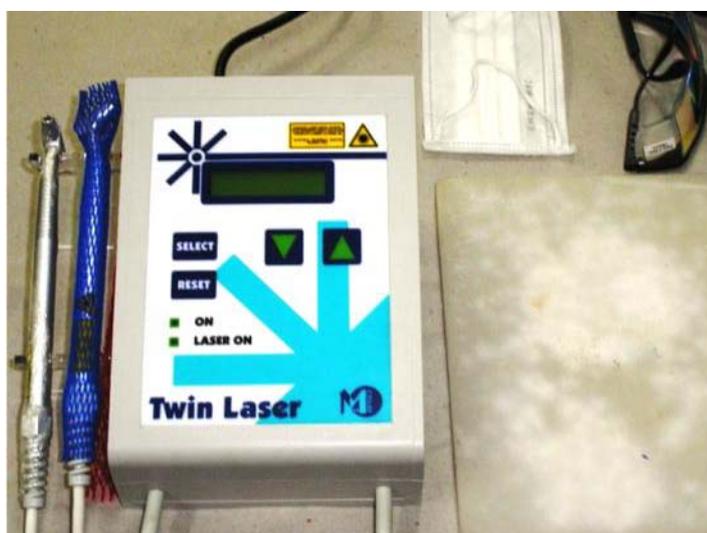


Fig. 1 – Aparelho Twin Laser - MMOptics

1. Animais

Foram utilizados 60 ratos *Wistar*, machos, jovens pesando aproximadamente 300-400g, alocados de forma aleatória em 6 grupos com 10 animais, cada um desses 6 grupos foi dividido em outros 2 grupos, totalizando 12 grupos com 5 animais, assim 6 desses grupos menores (n=5) foram destinados as análises histoquímicas, imunohistoquímica e coloração de hematoxilina e eosina (HE) e os outros 6 grupos para a microscopia eletrônica de transmissão. Os animais, procedentes do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, foram mantidos em número de quatro animais por caixa de polietileno medindo altura=15 cm, largura=31 cm e comprimento=37 cm, num volume total aproximado de 17,2 litros, em temperatura ambiente controlada entre 22 a 24°C, com *timer* programado para 12 horas de iluminação diária e 20 trocas de ar por hora. Os animais receberam regime de ração e água “*ad libitum*”.

1.1. Tratamento dos animais



Fig. 2 – Anestesia intramuscular



Fig. 3 – Tricotomia pré-irradiação



Fig. 4 – Aplicação do laser



Fig. 5 – Aplicação do laser

A ponta do aparelho laser foi previamente envolta por filme de PVC, com apenas uma camada do filme bem esticada e limpa, evitando assim perdas de energia pela refração ou absorção da luz. Em cada sessão, os animais anestesiados com quetamina (75mg/Kg) e xilazina/10mg/Kg) por via intramuscular (Fig.2), foram submetidos a tricotomia na região massetéica esquerda (Fig.3) para a aplicação do laser (Fig. 4 e 5) também com o intuito de minimizar possíveis as perdas de energia. A potência de 5mW e intensidade de potência 125mW/cm² foram mantidas constantes, variando o tempo conforme a densidade de energia (dose) (LOPES-MARTINS et al., 2006; RIZZI et al., 2006; MEIRELES, 2005). A ponta do aparelho foi colocada perpendicularmente em contato com a superfície da região massetéica para evitar perdas significantes de energia por reflexão (LIZARELLI, 2005), distribuída em dois pontos (anterior e posterior do músculo) de modo que cada ponto recebeu metade da dose indicada. Cada grupo de animais recebeu 10 sessões com a freqüência semanal de 3 irradiações (MACIEL et al., 2006), conforme a tabela1.

Tabela 1. Densidade de energia e tempo de irradiação por sessão.

Grupos	Densidade de energia	Tempo (sessão)	Tempo total (10 sessões)
GI (controle)	0 J/cm ²	0 s	0 s
GII	0,5 J/cm ²	4 s	40 s
GIII	1,0 J/cm ²	8 s	80 s
GIV	2,5 J/cm ²	20 s	200 s
GV	5,0 J/cm ²	40 s	400 s
GVI	20 J/cm ²	160 s	1600 s

Desta forma os grupos receberam energia total depositada na região massetéica em J correspondente à tabela 2.

Tabela 2. Energia depositada na região massetéica.

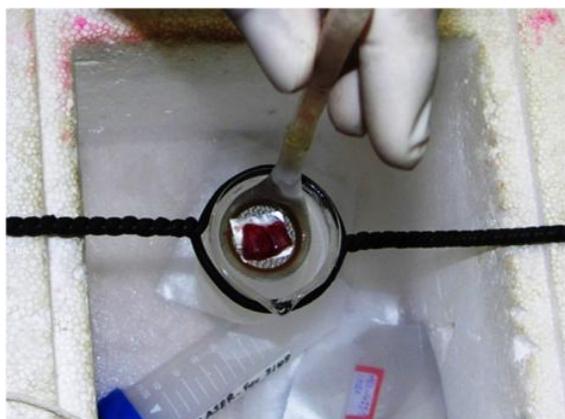
Grupos	Energia (sessão)	Energia total (10 sessões)
GI (controle)	0 J	0 J
GII	0,02 J	0,2 J
GIII	0,04 J	0,4 J
GIV	0,1 J	1,0 J
GV	0,2 J	2,0 J
GVI	0,8 J	8,0 J

Os animais do grupo I (controle) foram submetidos ao mesmo protocolo, porém sem a irradiação.

1.2. Obtenção das amostras para cortes congelados

Após as 10 aplicações os animais foram anestesiados com quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg), decapitados e tiveram os feixes superficiais do músculo masseter esquerdo dissecados.

2. Processamento das amostras para Análise histoenzimológica

**Fig. 6** – Congelamento dos músculos**Fig. 7** – Câmara micrótomo criostato

O feixe superficial do músculo masseter foi fragmentado e aderido a uma folha de alumínio, congelado rapidamente em isopentano previamente resfriado, contido em um becker suspenso em nitrogênio líquido (-150° C) (Fig. 6).

Os fragmentos dos músculos congelados foram transferidos para a câmara do micrótomo criostato (-20°C) (Fig.7), e aderido com uma gota de OTC (Tissue Tek Compound) sobre o suporte metálico, orientando-o convenientemente. Os cortes seriados com 10 µm de espessura foram aderidos à superfície da lâmina, para serem submetidos às reações e colorações propostas.

2.1. Técnica para demonstração das enzimas oxidativas

As enzimas oxidativas (desidrogenases) são enzimas que oxidam o substrato removendo hidrogênios e passando-os a um aceptor, que poderá ser o NAD, NADP ou uma flavoproteína (FAD) (PETER et al., 1972).

Na demonstração das desidrogenases da cadeia respiratória mitocondrial, foram utilizados sais de tetrazólio. Os tecidos musculares congelados, não fixados, incubados na presença de um aceptor (NAD) e de um sal de tetrazólio promovem a precipitação do sal na sua forma reduzida, formando microcristais de formazana, originando um composto colorido e insolúvel em água.

Os tetrazólios presentes no meio de incubação interceptam o elétron, captando-o em determinada altura, ao longo da cadeia respiratória.

2.1.1. Técnica de demonstração da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH)

O termo diaforase é aplicado à enzima capaz de oxidar o NADH ou NADPH à custa de um aceptor artificial de hidrogênio, tal como o sal de tetrazólio.

Foram incubadas as lâminas contendo os cortes de músculo com a coenzima NAD e o sal de tetrazólio a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, elas foram lavadas em água destilada, fixadas em formol 5% tamponado pH 7,0 por 5 minutos, novamente lavadas em água destilada e montadas com xarope de Apaty.

2.1.2. Técnica de demonstração da Succinato desidrogenase (SDH)

A succinato desidrogenase é uma enzima essencial no ciclo dos ácidos tricarboxílicos do Ciclo de Krebs. Encontra-se firmemente aderida à membrana interna da mitocôndria, e possui um aceptor (FAD) ligado à própria molécula. Sua demonstração foi realizada em lâminas contendo cortes de músculos utilizando sais de tetrazólio e incubando-

as a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com água destilada, fixadas em formol Cálcio Baker por 5 minutos, novamente lavadas com água destilada, e por fim montadas com xarope de Apaty.

2.2. Técnica para demonstração da Adenosina Trifosfatase (ATPase)

O princípio para demonstrar a atividade da enzima adenosina trifosfatase consiste em colocar à sua disposição, o substrato adenosina trifosfato (ATP). A enzima hidrolisa ésteres orgânicos fosfatados, resultando desta reação os íons fosfatos, os quais combinando com o cálcio formam o produto primário da reação (PPR), insolúvel, porém, invisível à microscopia óptica. Ao reagir com íon sulfeto, forma-se o precipitado no local da atividade da enzima, visível pela cor negra. Esse precipitado é o produto secundário da reação (PSR) visível da ATPase miofibrilar (GUTH; SAMAHA, 1969; BROOKE; KAISER, 1970).

2.2.1. Técnicas para reações com ATPase alcalina:

As secções foram pré-incubadas em solução tampão pH 9,4, temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, recobertas com o meio de incubação, e levadas à estufa a 37°C por 40 minutos. Após a lavagem em solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% por 5 minutos, as secções foram recobertas com a solução de cloreto de cobalto por 3 minutos, lavadas com água destilada, e submetidas à reação com sulfeto de amônio por 20 a 30 segundos até enegrecer, e por fim montadas em xarope de Apaty.

2.2.2. Técnicas para reações com ATPase ácida:

As secções foram pré-incubada em solução tampão pH 4,6 à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram levadas à estufa (37°C) recobertas por meio de incubação, por 40 minutos. Após a lavagem em solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% por 5 minutos, foram cobertas com a solução de cloreto de cobalto, e depois de 3 minutos, lavadas novamente com água destilada e submetidas à reação com sulfeto de amônio por 20 a 30 segundos até enegrecer e finalmente foram montadas em xarope de Apaty.

3. Técnica de coloração com hematoxilina e eosina – Microscopia de luz

As lâminas para a coloração de hematoxilina e eosina foram cortadas em criostato Leica, da mesma forma que descrita para a histoenzimologia, (10µm) e colocadas sobre as

lâminas, coradas seguindo o protocolo convencional, montadas com xarope de Apaty e fotografadas no microscópio Leica DM4000 B com a câmera Leica EC3.



Fig. 8 – Microscópio Leica DM4000 B & câmera Leica EC3

4. Técnica de microscopia eletrônica de transmissão para análise do músculo



Fig. 9 – Perfusão intracardíaca

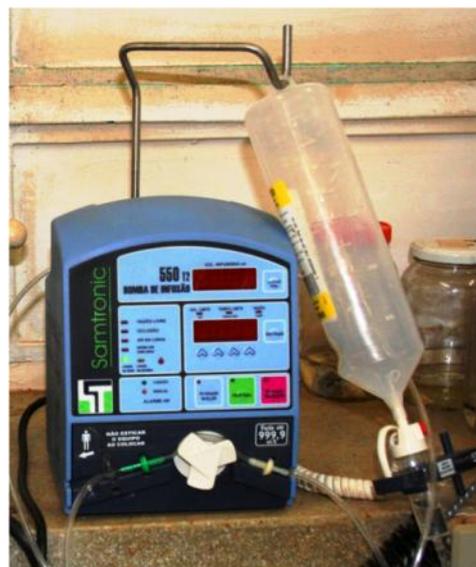


Fig. 10 – Bomba de infusão

Após 10 aplicações do laser os animais previamente anestesiados com quetamina (75mg/Kg) e xilazina (10mg/kg), tiveram o diafragma rompido para a perfusão intracardíaca (Fig.9). Nesse procedimento usou-se uma bomba de infusão 550 T2 – SAMTRONIC (Fig.10), com controle de tempo e velocidade para a infusão da solução de Karnovsky modificada. O músculo masseter foi dissecado e pequenos fragmentos do seu feixe superficial foram

imersos em glutaraldeído a 2%, por 2 horas. A pós-fixação foi feita em solução de tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas a 4°C, em seguida foram contrastados em uranila a 2,5%.

As peças foram desidratadas em série crescente de alcoóis, passadas pelo óxido de propileno por duas vezes, durante 20 minutos cada uma, em seguida submetidas a infiltração na mistura de 1:1 de óxido de propileno e resina epóxi 812 e incluídas em resina. As peças foram mantidas em estufa à 60°C até a polimerização (± 36 horas). Os blocos foram trimados e montados no ultramicrotomo para a obtenção de cortes semi-finos de 1-3 μm , os quais foram corados com azul de metileno para a identificação da área de interesse. Os cortes ultra-finos de $\pm 90\text{nm}$ foram obtidos em ultramicrotomo Reichert, Ultra-Cut e coletados em telas de 200 "mesh", contrastados com soluções de uranila (WATSON, 1958) e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão, JEOL 1010 (Fig. 11).



Figura 11 – Microscópio Eletrônico de Trasnmissão JEOL 1010

5. Análise imunohistoquímica para VEGF e VEGF R2

As lâminas dessas análises foram confeccionadas da mesma maneira que para a histoenzimologia, em criostato Leica, cortes com 10 μm de espessura. A imunomarcção para VEGF e VEGFR-2 foi feita utilizando os seguintes anticorpos: anti VEGF (Abcam), anti-VEGFR-2 (Abcam) e Kit EnVision + System-HRP - DAB (Dako – K4011).

Os cortes das lâminas foram cobertos com peróxido de hidrogênio (10 volumes) para bloqueio da peroxidase endógena e das ligações inespecíficas com PBS/BSA 2% (soro fetal

bovino/tampão fosfato de sódio) por 1h cada. Para recuperação antigênica os cortes foram mergulhados em solução tampão de citrato pH 6,0 em banho-maria à 95°C. Após o resfriamento e lavagem em PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 18h à 4-8°C. A seguir, os cortes foram lavados em PBS e incubados a 4-8°C por 03 horas com o anticorpo secundário. A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (0,5mg/ml) e peróxido de hidrogênio líquido (0,005ml/100ml) em PBS por 10 minutos. Os cortes foram lavados em PBS, contracolorados com hematoxilina de Mayer, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).



Fig 12 – Reação de VEGF

6. Análise quantitativa dos músculos

Os cortes histológicos foram fotografados com microscópio Leica DM4000 B com a câmera Leica EC3 (fig. 8) e armazenados no computador para as análises de quantificação da área relativa dos tipos de fibras pela técnica de contagem de pontos e fração numérica dos tipos de fibras dentro do sistema teste com o auxílio do *software* livre “*ImageJ*” (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) tomando os cuidados necessários para não superestimar o número de fibras contadas, sendo que aquelas fibras cortadas pela linhas limites (vertical e horizontal) não foram consideradas.

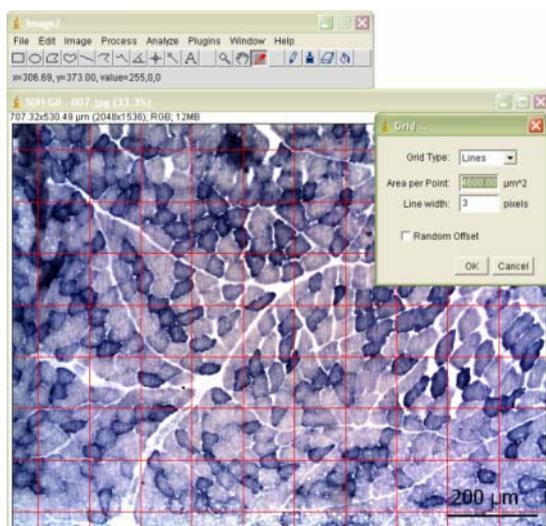


Fig. 13 – ImageJ, sistema teste

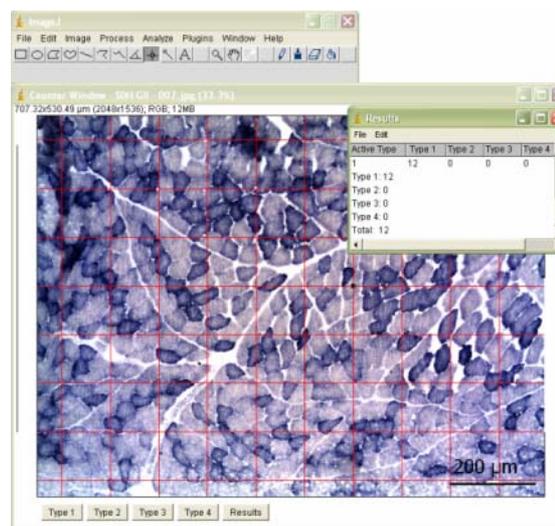
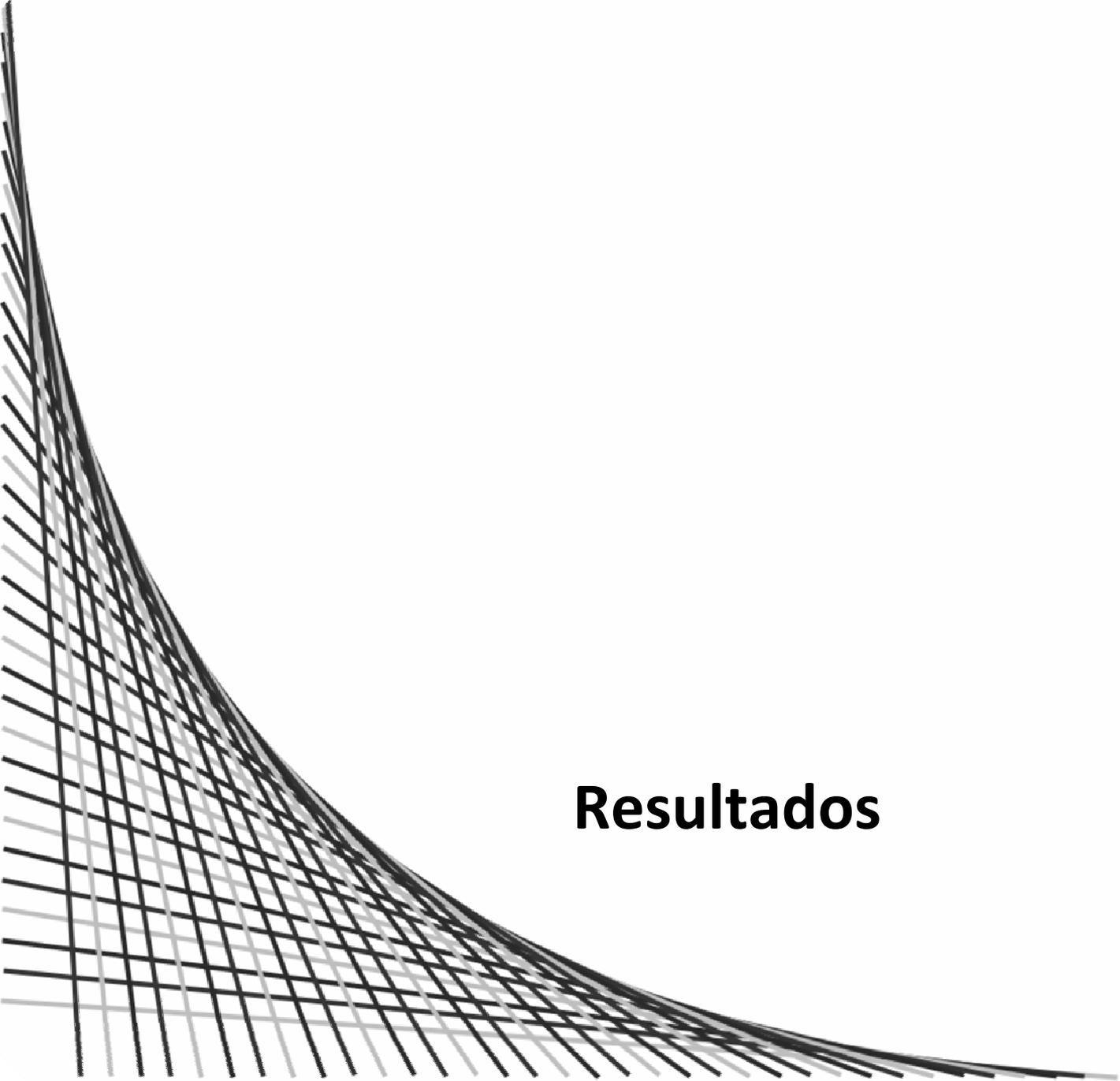


Fig. 14 – ImageJ, contagem de pontos

7. Análise Estatística

Os dados de quantificação dos testes histoquímicos de NADH e SDH foram informados como média \pm SD e foram submetidos à análise estatística utilizando o *software* SPSS versão 12.0 para Windows (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). O teste de escolha foi o ANOVA devido à distribuição normal dos dados.



Resultados

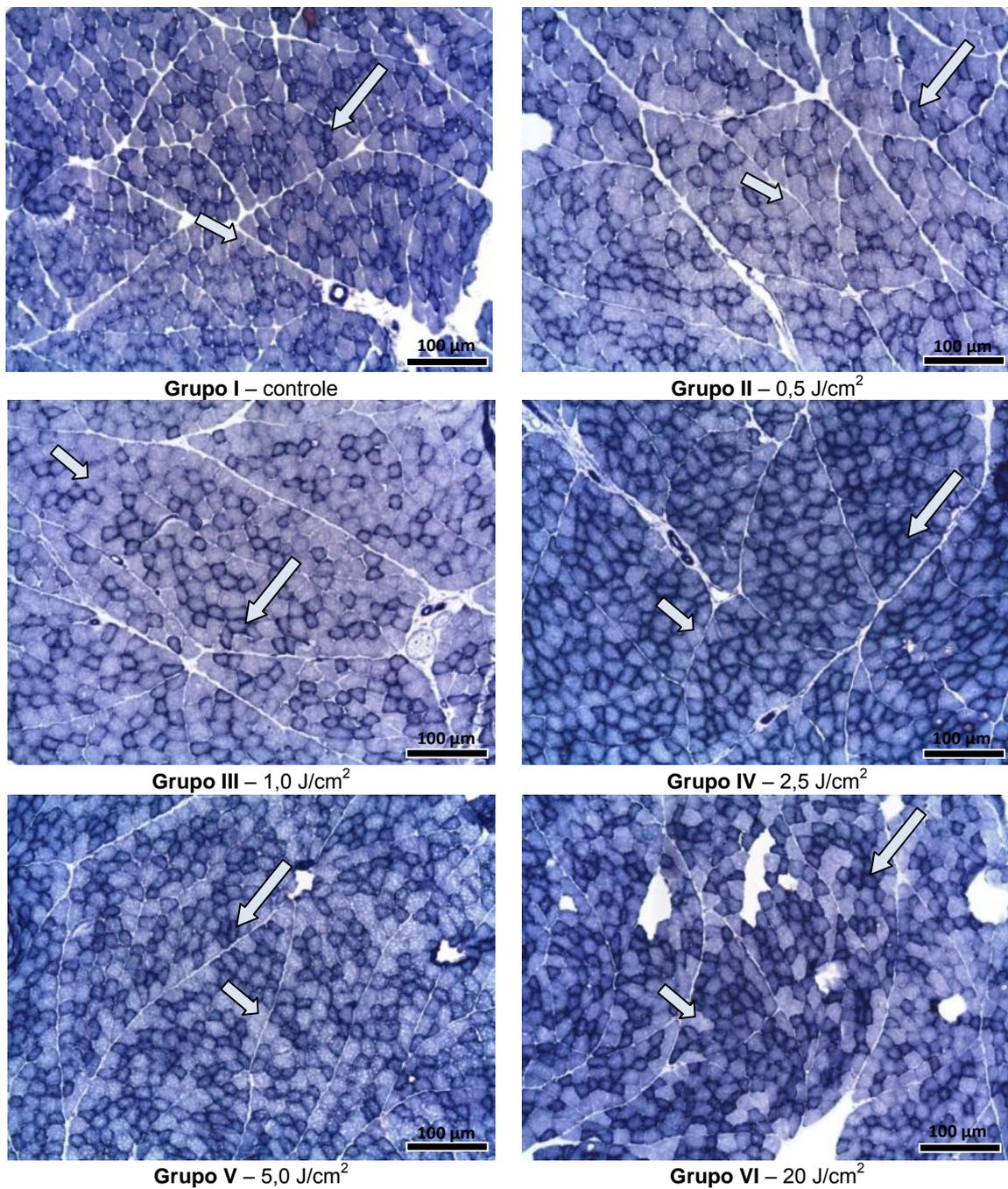
VI. RESULTADOS

1. Histoenzimologia – Técnica para demonstração das enzimas oxidativas

1.1. Nicotinamida adenina dinucleotídeo – NADH

A análise quantitativa das fibras reveladas pela reação da **nicotinamida adenina dinucleotídeo** (NADH) obtida pela contagem de pontos num sistema-teste e auxílio do *software "ImageJ"* mostrou que os dados de interesse tiveram uma distribuição normal ou muito próximo disso. Assim o teste estatístico de escolha para essa análise foi a análise de variância (ANOVA).

Essa reação histoquímica permitiu avaliar a capacidade oxidativa do músculo masseter esquerdo dos ratos, pela coloração das fibras musculares em três intensidades de coloração (fibras claras, intermediárias e escuras), sendo a mais escura a de maior a atividade oxidativa.



Prancha I Atividade do NADH 20x - Corte seriado de músculos masseter após irradiação com diferentes densidades de energia. Notam-se nos grupos I, II e III predomínio de fibras claras (seta) e nos grupos IV, V e VI um aumento de fibras intermediárias (seta longa).

A análise das fibras escuras mostrou que apenas o grupo que recebeu 20 J/cm^2 ($2,27 \pm 0,47$) apresentou um aumento estatisticamente significativo nesse tipo de fibra, consideradas as de maior atividade oxidativa. No entanto, as fibras escuras nesse músculo não se revelaram em número significativo, quando comparadas aos outros tipos de fibras.

Fibras Escuras NADH

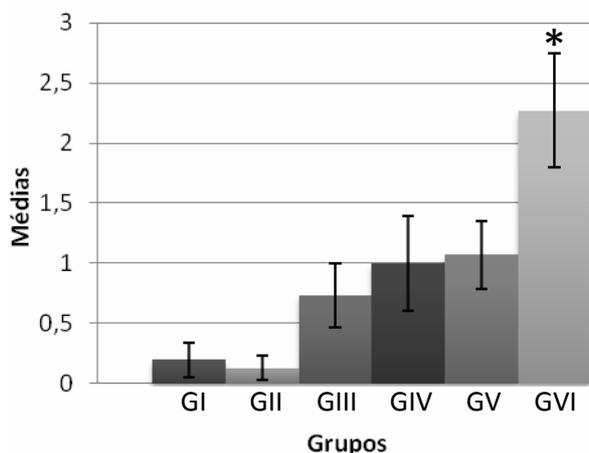


Gráfico I NADH – Área de fibras escuras nos grupos que receberam diferentes densidades de energia. Somente o grupo VI (*) mostrou área significativamente maior que os demais grupos (ANOVA, $p=0,05$). Cada coluna representa a média com o erro padrão.

A área de fibras intermediárias frente à irradiação laser não alteraram estatisticamente nos grupos que receberam 0 (GI); $0,5$ (GII) e $1,0 \text{ J/cm}^2$ (GIII) ($25,8 \pm 0,96$; $23,93 \pm 1,09$ e $21,8 \pm 1,02$). Houve aumento significativo nos grupos que receberam (GIV) $2,5$; (GV) 5 e 20 J/cm^2 (GVI) ($30 \pm 1,26$; $33,47 \pm 2,15$ e $31,67 \pm 6,88$) em relação ao grupo controle, no entanto, não revelaram diferença estatística entre si. Comparando os grupos IV, V e VI a maior área de fibras intermediárias foi observada no grupo que recebeu $5,0 \text{ J/cm}^2$ (V), a menor no grupo (IV) de $2,5 \text{ J/cm}^2$, destacando-se que no grupo com a maior densidade de energia 20 J/cm^2 , a área desse tipo de fibra não foi maior, como poderia se esperar.

Fibras Intermediárias NADH

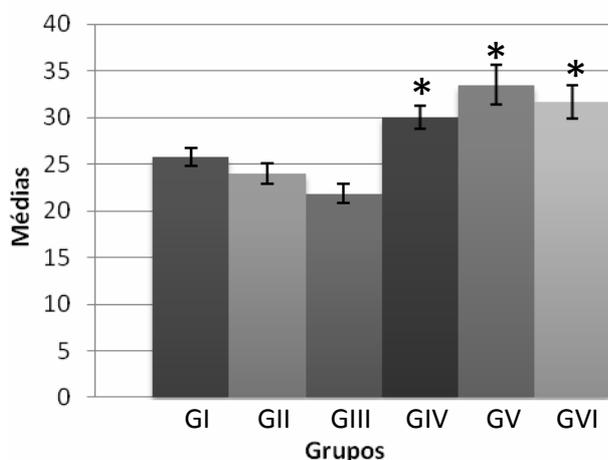


Gráfico II NADH – Área de fibras intermediárias nos grupos que receberam diferentes densidades de energia. Notam-se aumento significativo na área dessas fibras nos grupos IV, V e VI (*) em relação aos demais grupos (ANOVA, $p=0,05$). Cada coluna representa a média com o erro padrão.

Ao se examinar as fibras claras, de menor capacidade oxidativa, observou-se que os grupos irradiados com maiores densidades de energia tiveram a menor área dessas fibras, sendo no grupo V ($5,0 \text{ J/cm}^2$) ($39,87 \pm 2,04$) e no grupo VI (20 J/cm^2).

O grupo IV ($2,5 \text{ J/cm}^2$) ($45,27 \pm 1,38$) revelou uma área de fibras claras significativamente maior comparada aos grupos V e VI. Os grupos I, II e III não apresentaram área de fibras claras diferentes entre si, no entanto esse aumento foi significativo quando comparado com os grupos irradiados com densidades maiores.

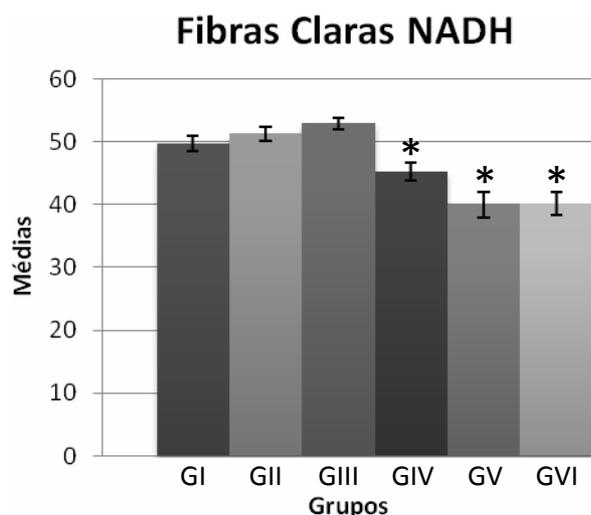
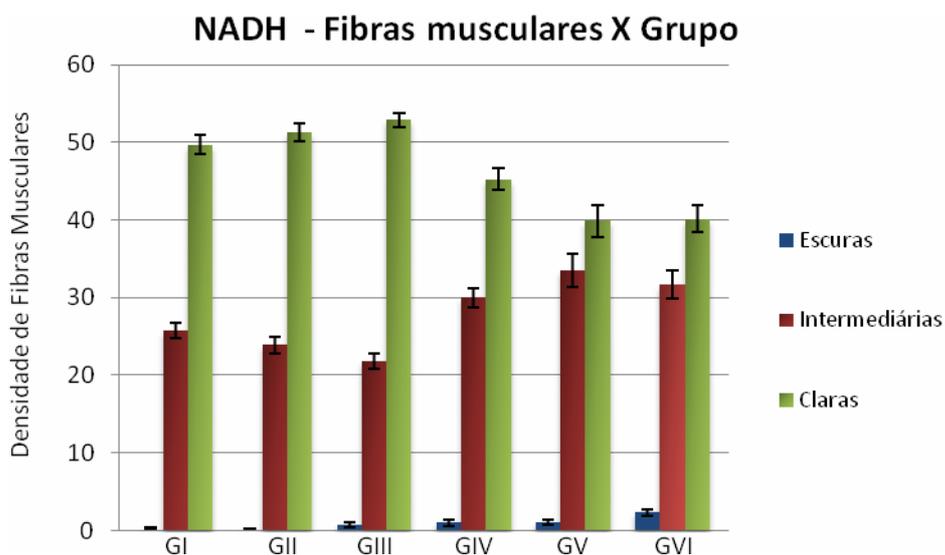
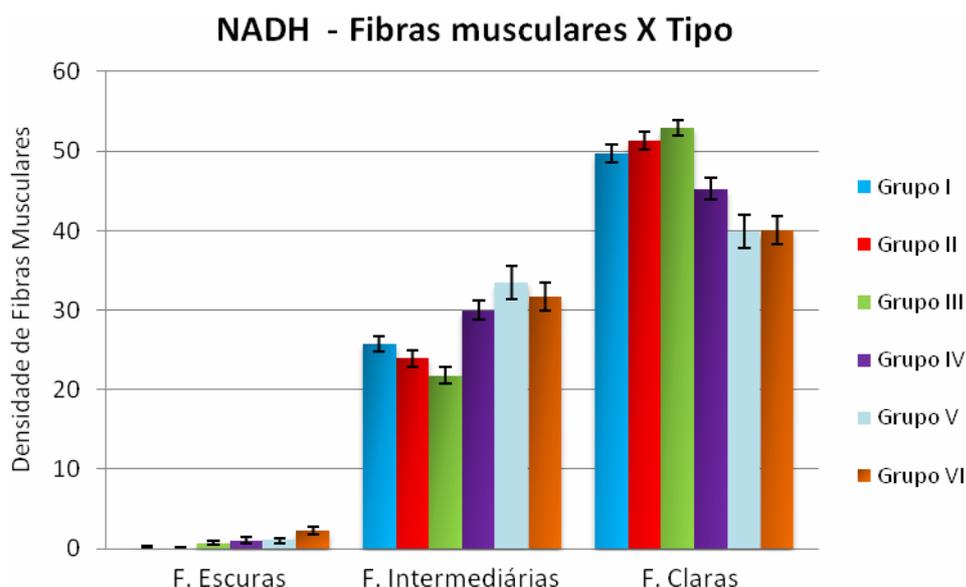


Gráfico III NADH – Área de fibras claras nos grupos que receberam diferentes densidades de energia. Observa-se redução significativa na área dessas fibras nos grupos IV, V e VI (*) (ANOVA, $p=0,05$).

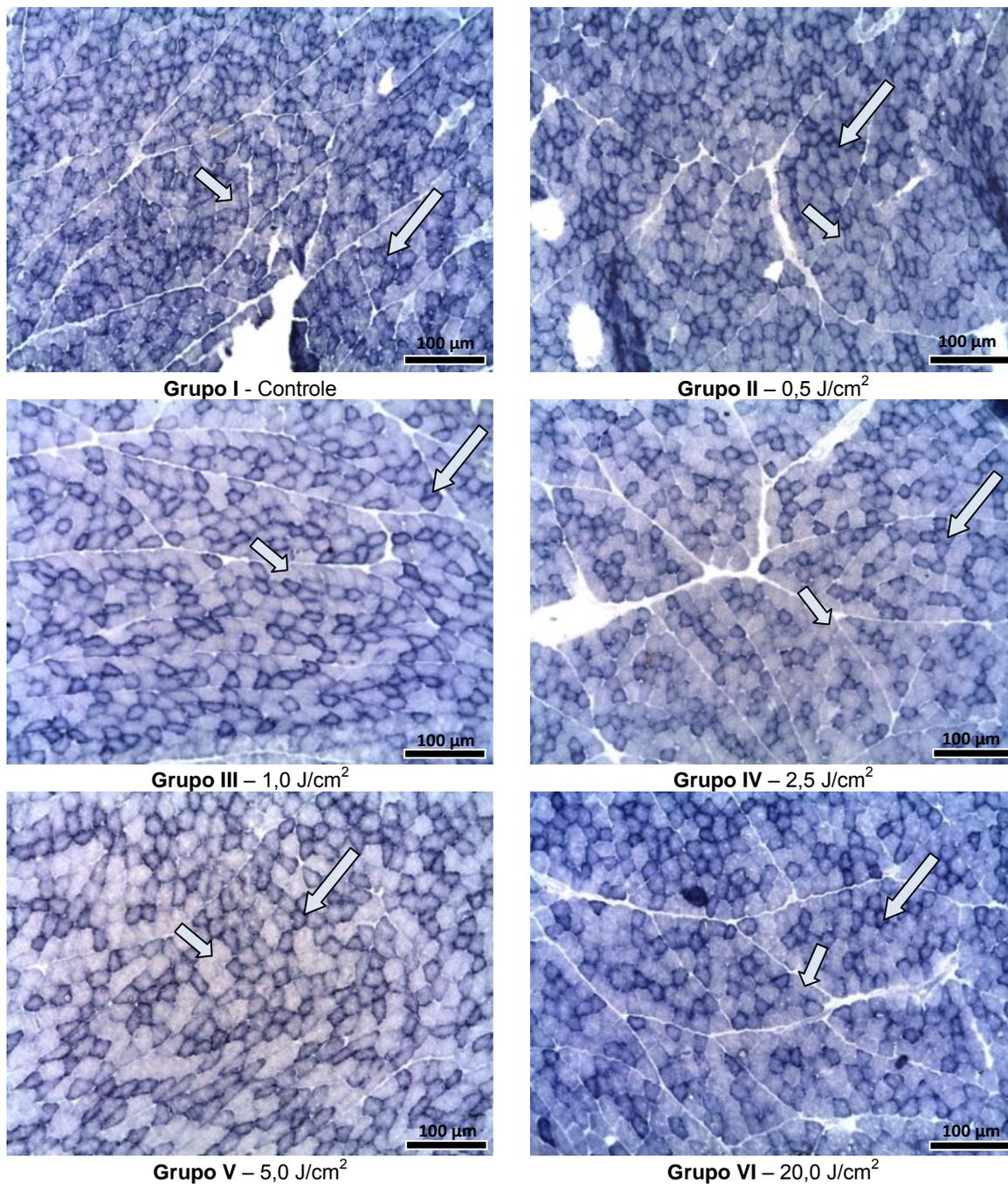
Analisando-se os 3 tipos de fibras musculares reveladas por essa reação, observou-se que o feixe superficial do músculo masseter é composto, em sua maioria, por fibras claras (baixa capacidade oxidativa). Porém, com a aplicação do laser de baixa intensidade ocorreu um aumento na área de fibras intermediárias (alta capacidade oxidativa) em razão da diminuição da área das fibras claras. Essa modificação ocorreu nos grupos que foram irradiados com as maiores densidade de energia (GIV; GV e GVI), o que mostra uma interação positiva e dose-dependente da laserterapia com o metabolismo oxidativo (NADH).



1.2. Succinato desidrogenase – SDH

A análise quantitativa das fibras reveladas pela reação da Succinato desidrogenase (SDH) obtida pela contagem de pontos usando um sistema-teste de 80 pontos e auxílio do *software* “ImageJ” mostrou também uma distribuição normal, de modo que o teste estatístico de escolha foi a análise de variância (ANOVA).

Essa reação histoquímica permitiu avaliar a atividade metabólica do músculo, por meio de coloração das fibras musculares podendo diferenciar três intensidades de azul (fibras claras, intermediárias e escuras), sendo as escuras de maior atividade metabólica.



Prancha II Atividade do SDH 20x - Corte seriado de músculos masseter após irradiação com diferentes densidades de energia. Notam-se nos grupos I, II e III predomínio de fibras claras (seta) e nos grupos IV, V e VI um aumento de fibras intermediárias (seta longa), porém de mais discretamente que na atividade do NADH.

Separando os dados pelos tipos de fibras verificou-se que as fibras de coloração escura, são escassas não permitindo observar o padrão metabólico relacionado com as densidades de energia aplicadas. A área de fibras escuras não revelou diferença estatística entre os grupos e nenhuma tendência de modificações quanto às irradiações.

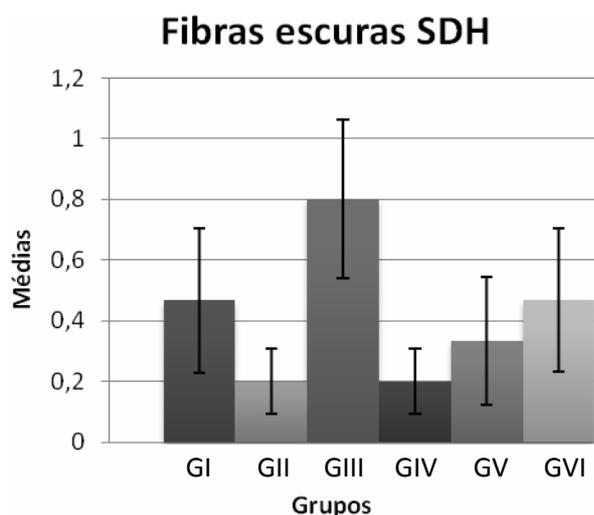


Gráfico I SDH – Área de fibras escuras nos grupos que receberam diferentes densidades de energia. Não houve diferença significativa na área das fibras escuras entre os 6 grupos do estudo (ANOVA, $p=0,05$). Cada coluna representa a média com o erro padrão.

As áreas de fibras intermediárias mostraram diferença muito discreta entre os grupos. Os grupos I ($0\text{J}/\text{cm}^2$), II ($0,5\text{J}/\text{cm}^2$), III ($1,0\text{ J}/\text{cm}^2$), IV ($2,5\text{J}/\text{cm}^2$) e VI ($20\text{J}/\text{cm}^2$) foram semelhantes, apenas o grupo V de ($5,0\text{ J}/\text{cm}^2$) revelou uma área ligeiramente maior que os demais grupos. A tendência de aumento da atividade metabólica das fibras acompanha o grupo com as três maiores densidades de energia irradiadas, assim o grupo IV ($2,5\text{ J}/\text{cm}^2$) ($29,73\pm 1,25$) dessas fibras, seguindo pelo grupo VI ($30,20\pm 1,72$) e finalmente pelo grupo V ($32,20\pm 1,61$).

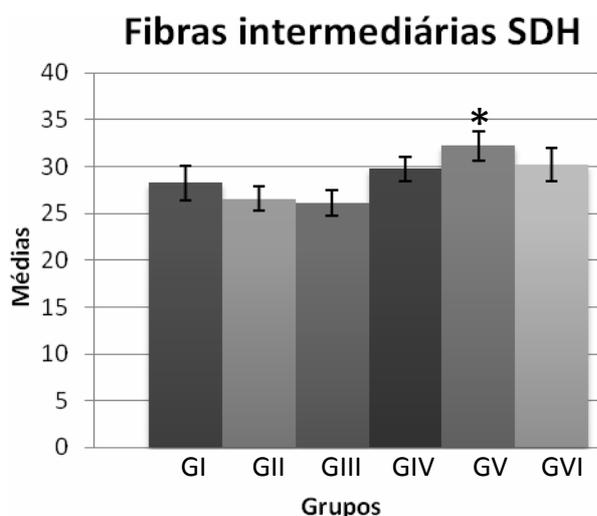


Gráfico II SDH – Área de fibras escuras nos grupos que receberam diferentes densidades de energia. Houve diferença significativa apenas na área das fibras intermediárias do grupo V(*) (ANOVA, $p=0,05$). Cada coluna representa a média com o desvio padrão.

A área fibras claras não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos, porém, observou-se uma tendência de diminuição da área com as densidades mais altas. Enquanto o grupo controle (GI) apresentou a área de $(45,27 \pm 2,07)$ os grupos V (5 J/cm^2) e VI (20 J/cm^2) revelaram respectivamente $(42,13 \pm 1,66)$ e $(44,67 \pm 1,69)$.

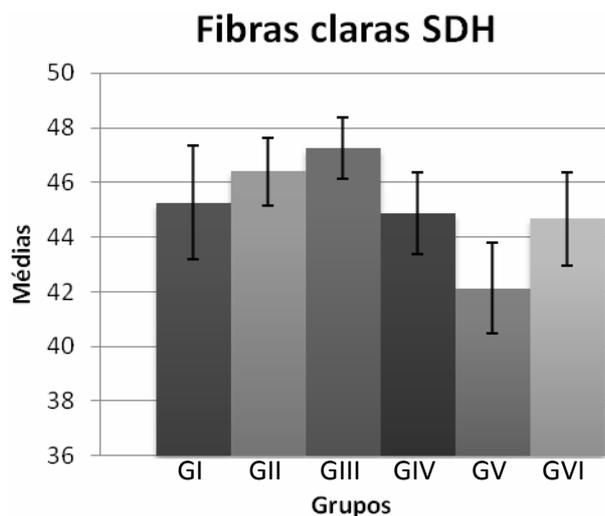
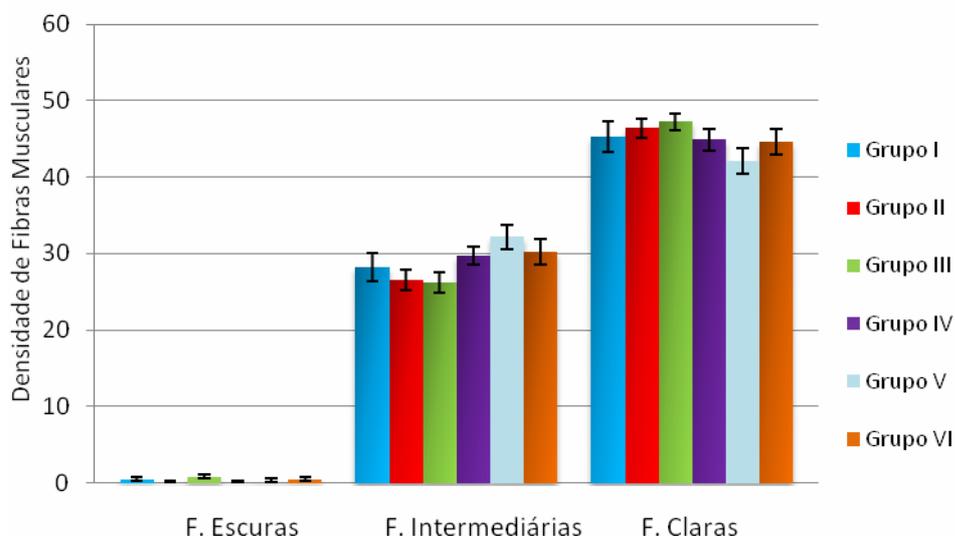


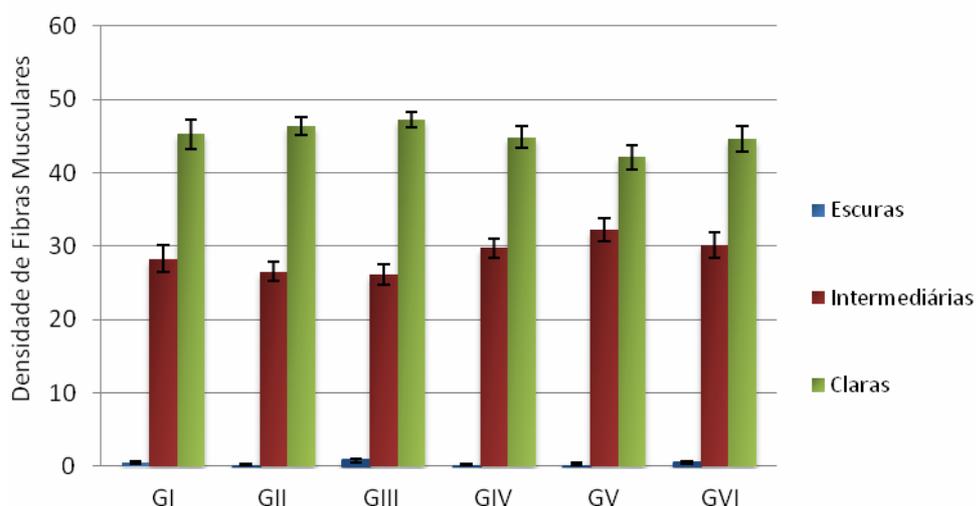
Gráfico III SDH – Área de fibras claras nos grupos que receberam, diferentes densidades de energia. Observa-se que não houve diferenças significantes entre os grupos para as fibras claras (ANOVA, $p=0,005$).

Analisando-se todos os tipos de fibras musculares juntos observou-se que o feixe superficial do músculo masseter caracteriza-se por apresentar a atividade metabólica baixa pela quantidade de fibras claras. No entanto, na análise de cada tipo de fibra por grupo irradiado notou-se uma diminuição da área de fibras claras em favor do aumento de fibras intermediárias, com o aumento da densidade de energia aplicada.

SDH - Fibras musculares X Tipo



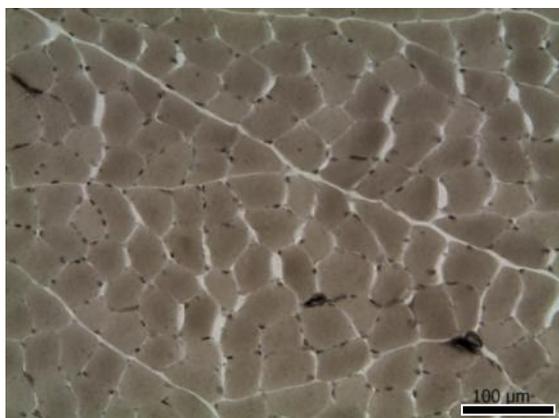
SDH - Fibras musculares X Grupo



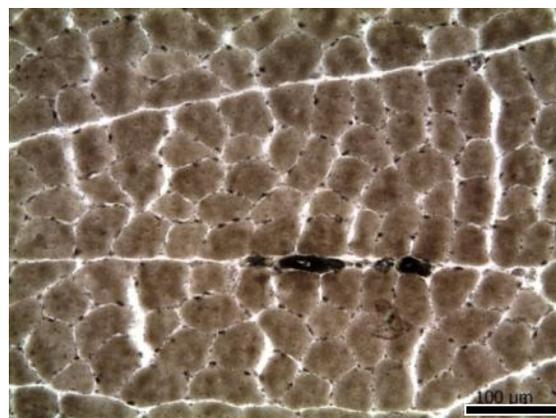
2. Adenosina Trifosfatase - ATPase

As reações de adenosina trifosfatase (ATPase) permitem diferenciar a capacidade de contração das fibras, conforme a coloração revelada em um determinado pH. A reação em meio alcalino (pH 9,4), relevou as fibras de contração rápida em cor acastanhada escura, enquanto as de contração lenta em coloração clara, em meio ácido (pH 4,6) essa relação se inverte, assim as fibras de contração rápida são acastanhadas claras, e as de coloração lenta em coloração escura. Conforme se observa nas figuras abaixo de com reações de ATPase ácida e as figuras de ATPase alcalina não foram observadas diferenças entre os tipo e subtipo de fibras musculares.

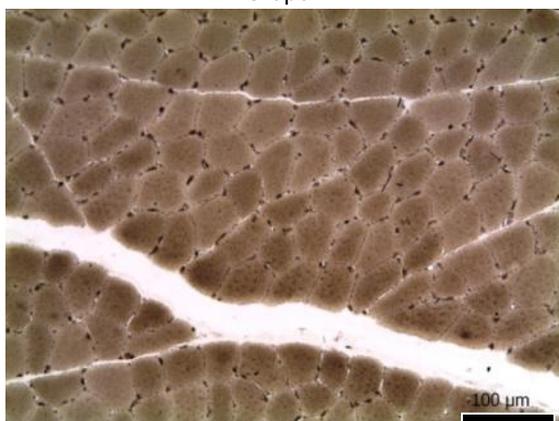
2.1. ATPase ácida



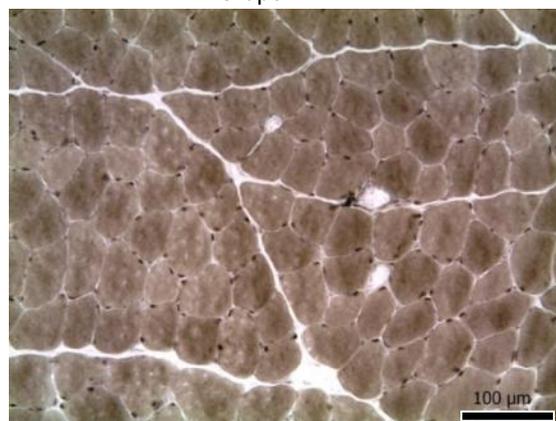
Grupo I



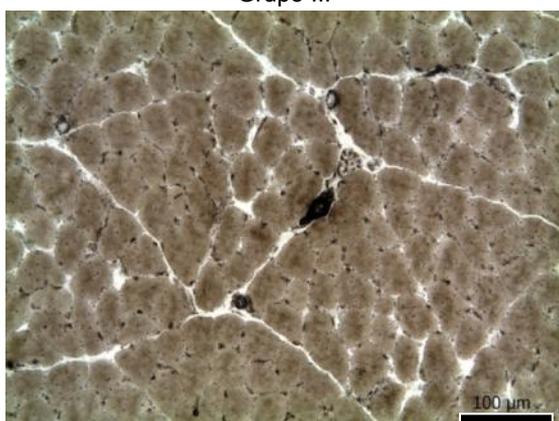
Grupo II



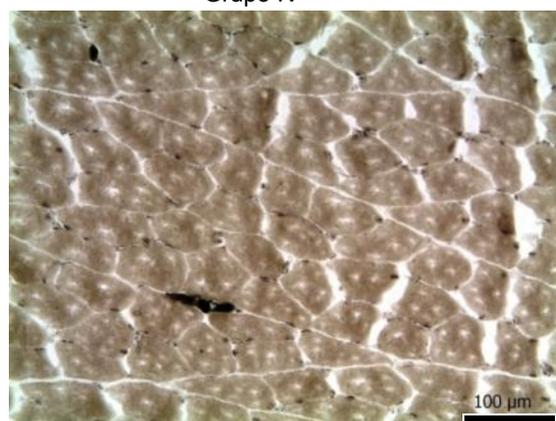
Grupo III



Grupo IV



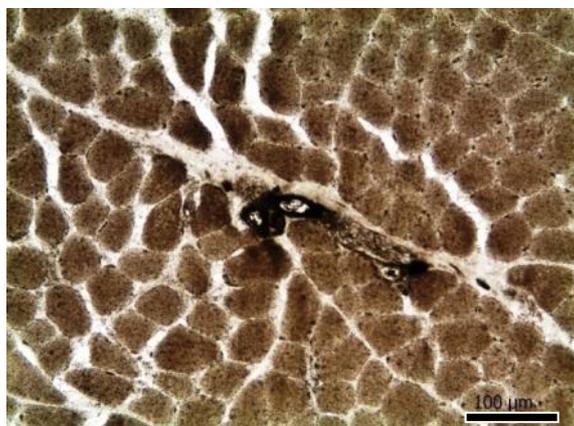
Grupo V



Grupo VI

Prancha III Atividade da ATPase ácida 20x - Corte seriado de músculos masseter após irradiação com diferentes densidades de energia. Nota-se não haver diferença entre os subtipos de fibras para essa reação com pH ácido (4,6).

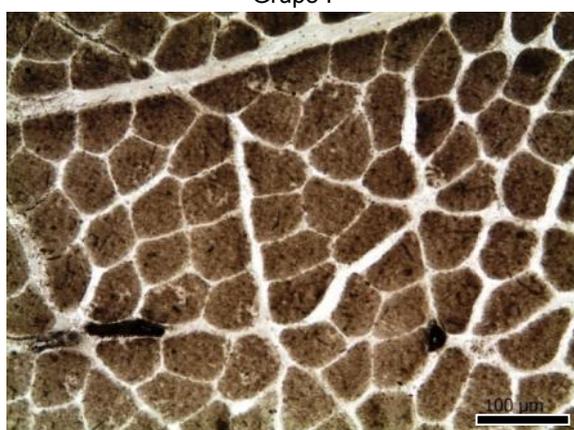
2.2. ATPase alcalina



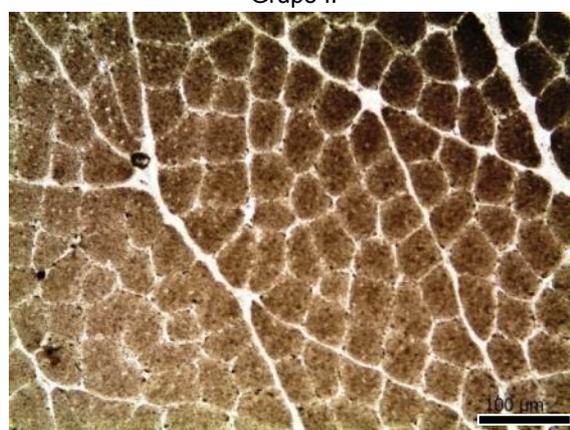
Grupo I



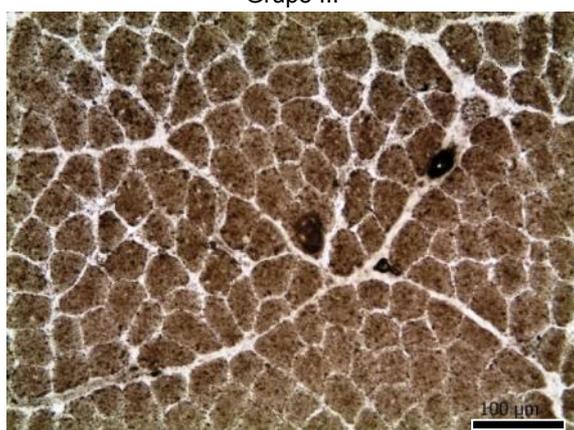
Grupo II



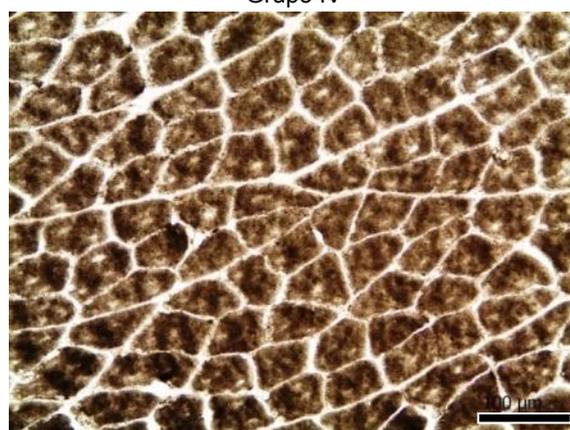
Grupo III



Grupo IV



Grupo V



Grupo VI

Prancha IV Atividade da ATPase alcalina 20x - Corte seriado de músculos masseter após irradiação com diferentes densidades de energia. Nota-se, assim como na atividade da ATPase alcalina, não haver diferença entre os subtipos de fibras para essa reação com pH alcalino (9,4).

3. Histologia ao microscópio de Luz

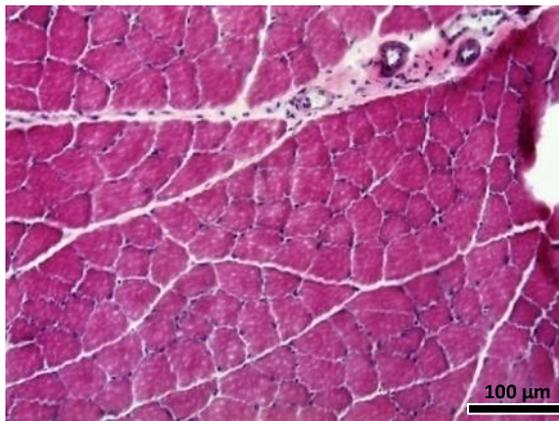
3.1. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

Os cortes transversais de músculo masseter corados com hematoxilina e eosina (HE) revelaram fibras musculares caracterizadas pela forma arredondada preenchida por miofibrilas e núcleos achatados periféricos. Entre as fibras musculares foram evidentes os capilares, terminações nervosas e elementos celulares de endomísio ou perimísio.

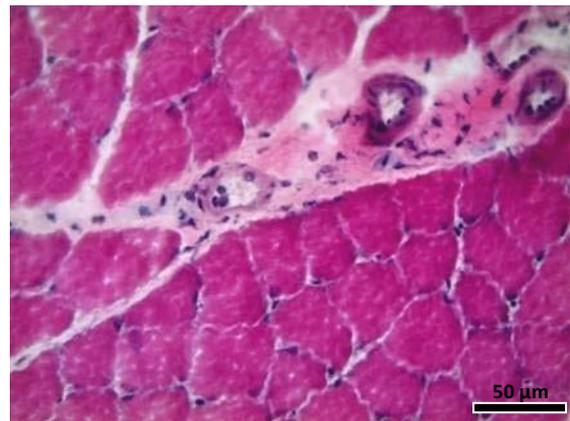
Os presentes resultados revelaram que nos grupos I e II, irradiados com densidades de energia de 0 e $0,5\text{J}/\text{cm}^2$, mantêm as características histológicas inalteradas. Os grupos III e IV, que receberam as densidades de energia de 1,0 e $2,5\text{ J}/\text{cm}^2$ respectivamente, apresentaram volume maior do núcleo das fibras musculares esporadicamente assim como do núcleo dos fibroblastos.

No grupo V, que recebeu $5\text{J}/\text{cm}^2$, o núcleo volumoso das fibras musculares quanto dos fibroblastos foram mais freqüentes.

O grupo VI, que recebeu irradiações de a densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$, manteve as características do grupo V ($5\text{J}/\text{cm}^2$), além disso apresentou neutrófilos e eosinófilos na tecido conjuntivo.



Grupo I (20x)



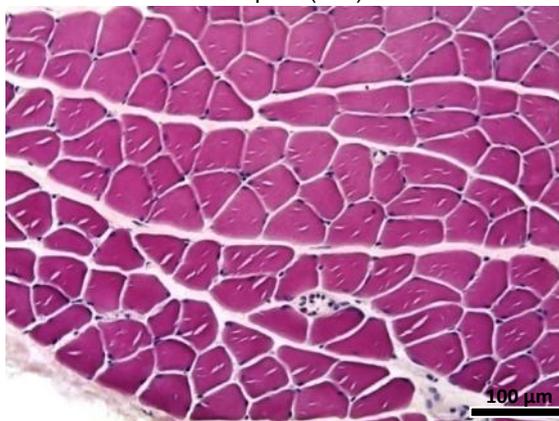
Grupo I (40x)



Grupo II (20x)



Grupo II (40x)



Grupo III (20x)



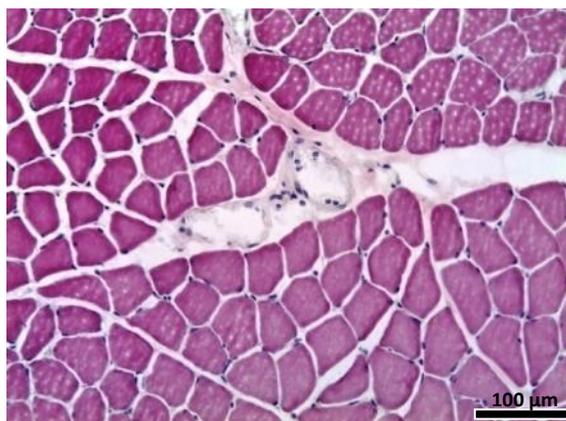
Grupo III (40x)



Grupo IV (20x)



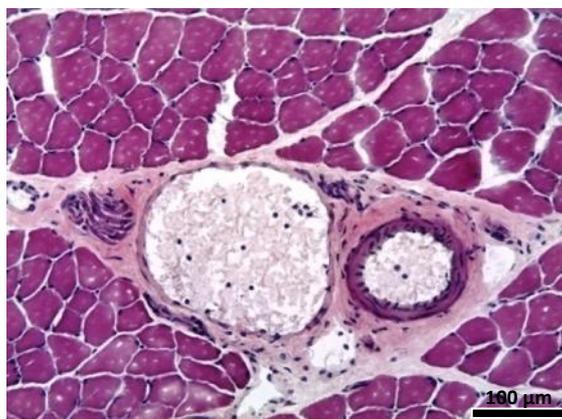
Grupo IV (40x)



Grupo V (20x)



Grupo V (40x)



Grupo VI (20x)



Grupo VI (40x)

Prancha V Microscopia de luz, coloração HE 20x e 40x- Corte seriado de músculos masseter após irradiação com diferentes densidades de energia. Observa-se no grupo II núcleos das fibras musculares achatados (seta), no grupo V fibroblastos com núcleos volumosos (seta curva), no grupo VI células inflamatórias nos vasos sanguíneos (seta longa).

4. Microscopia eletrônica de transmissão

Grupo I (0J/cm² - Controle)

As figuras met1 e met2 revelaram mitocôndrias de tamanhos variados tanto na região subsarcolemal quanto entre as miofibrilas. Entre elas foram evidentes também formações alongadas com características mitocondriais, invaginações de sarcolema e cisternas de retículo sarcoplasmático.

Os capilares presentes entre as fibras musculares revelaram a célula endotelial com seu núcleo, circundada pela membrana basal (Fig met3). Como mostram as figuras met4 e met3 as vesículas pinocíticas e as cavéolas são abundantes, além da presença de mitocôndrias no citoplasma da célula endotelial.

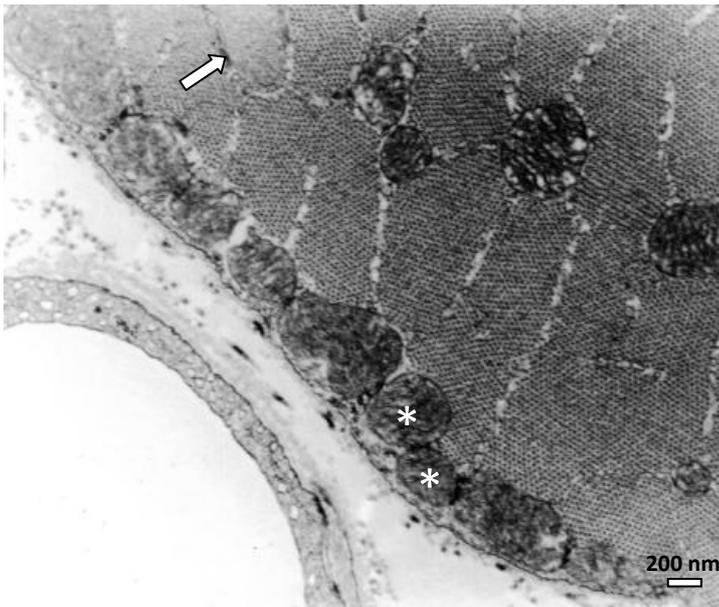


Fig. met1 – Mitocôndrias arredondadas (*) de tamanhos variados na camada subsarcolemal e escassas formações alongadas com aspecto mitocondrial (seta). (20.000 X)

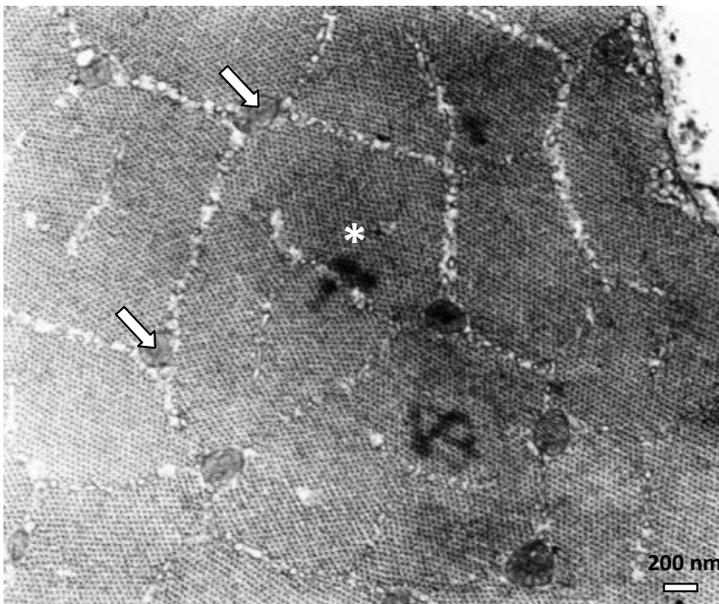


Fig. met2 – Mitocôndrias (seta) arredondadas e pequenas entre as miofibrilas (*). (20.000 X)

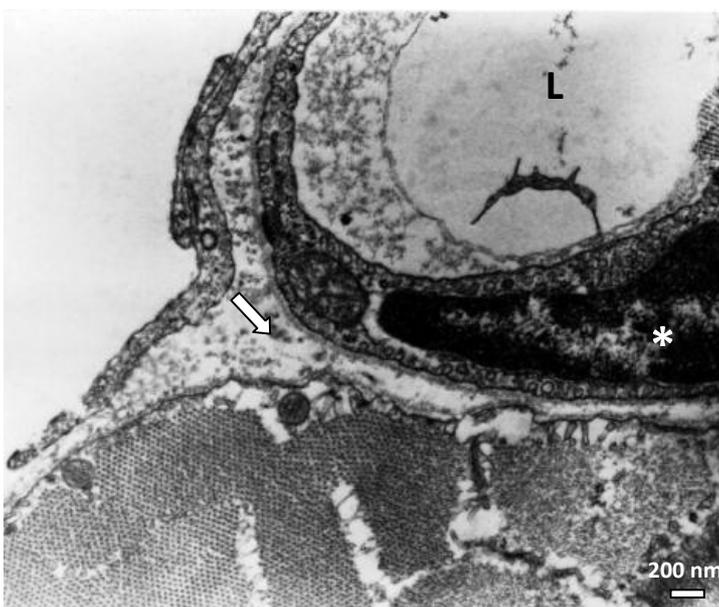


Fig. met3 – O capilar circundado pela membrana basal (seta), o núcleo da célula endotelial (*) e a luz (L). (20.000 X)

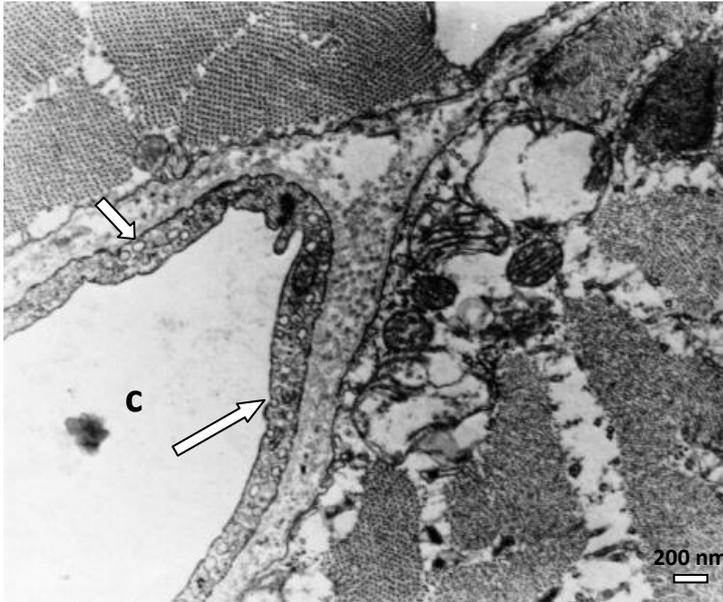


Fig. met4 – Capilar (c) entre as fibras musculares com vesículas pinocíticas (seta) e cavéolas (seta longa). (20.000 X)

Grupo II (0,5J/cm²)

As mitocôndrias subsarcolemais revelaram formas e tamanhos variados, algumas delas com características de divisão em outras mitocôndrias menores. Entre as miofibrilas foram observadas formações alongadas de aspecto mitocondrial em proximidade com as cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático e invaginações do sarcolema (Fig. met5).

O espaço entre as fibras mostrou um capilar com a membrana basal contendo uma hemácia, e a célula endotelial com algumas vesículas dilatadas entre outras menores e cavéolas (Fig. met6).

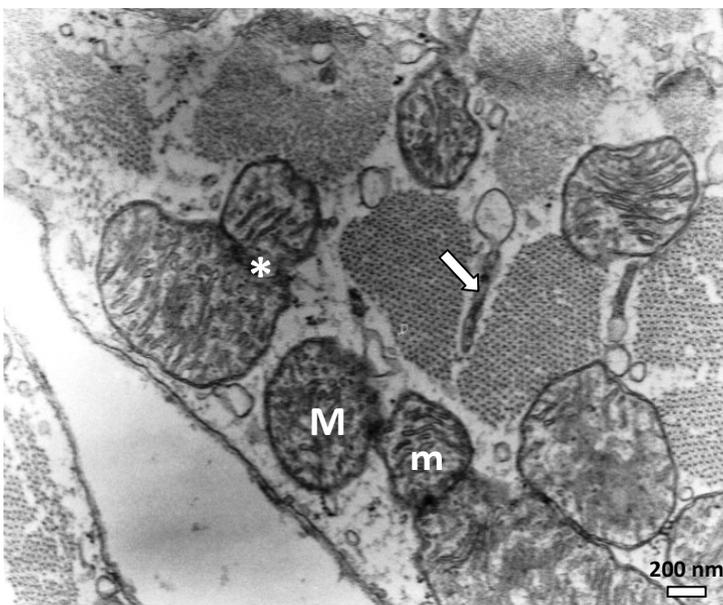


Fig. met5 - Mitocôndrias de tamanhos variados (M e m), mitocôndria com característica de divisão (*), formações alongadas de aspecto mitocondrial (seta). (20.000x)

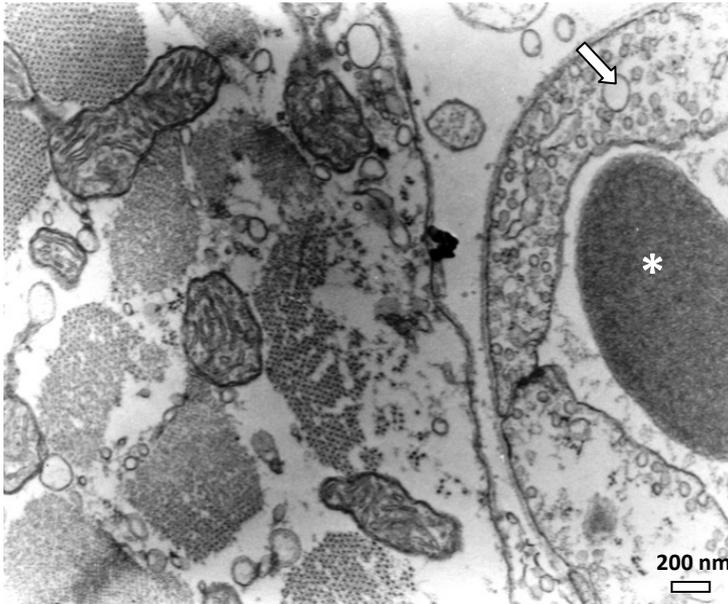


Fig. met6 – Capilar com uma hemácia (*), vesículas dilatadas da célula endotelial (seta). (20.000x).

Grupo III(1,0J/cm²)

Na região subsarcolemal e intermiofibrilar as mitocôndrias apresentaram morfologia e tamanho variados. No espaço intermiofibrilar foram evidentes as formações alongadas eletrondensas de aspecto mitocondrial próximas às cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático e invaginação do sarcolema (Fig. met7).

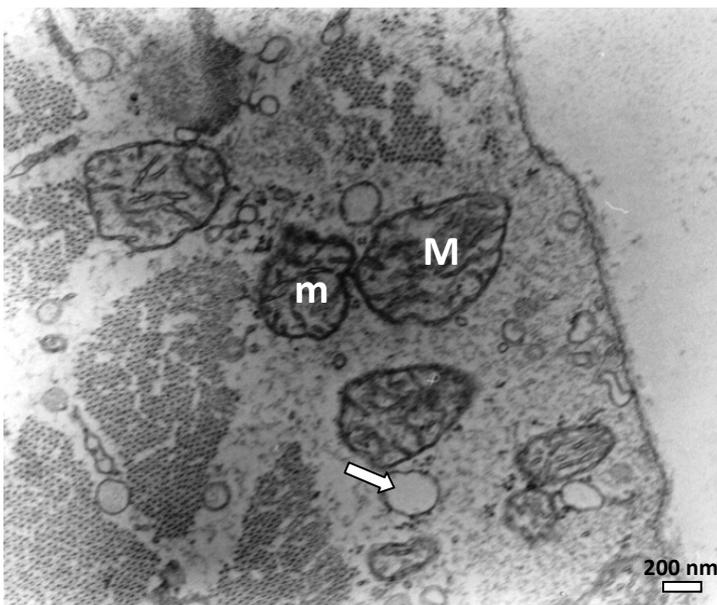


Fig. met7 – Mitocôndrias de formas variadas (M e m) cisternas dilatadas (seta) e formações eletrondensas. (20.000x)

Grupo IV (2,5J/cm²)

No espaço intermiofibrilar as formações alongadas eletrondensas foram numerosas e as cisternas do retículo sarcoplasmático abundantes e muito dilatadas (Fig. met8). Foram observadas mitocôndrias subsarcolemais com características de que estão em divisão e mitocôndrias intermiofibrilares numerosas com tamanhos variados, além de amplas cisternas do retículo sarcoplasmático algumas em íntimo contato com as mitocôndrias (Fig. met9).

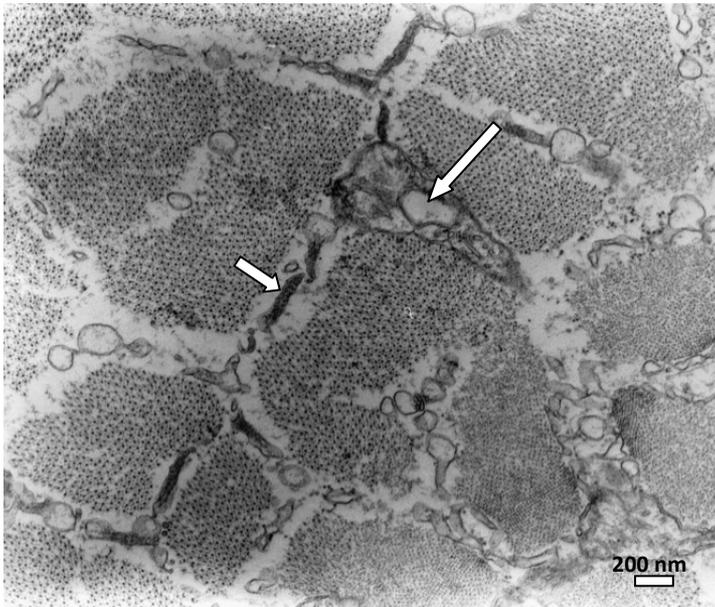


Fig. met8 – Formações eletrondensas (seta) e cisternas dilatadas (seta longa) (20.000x).

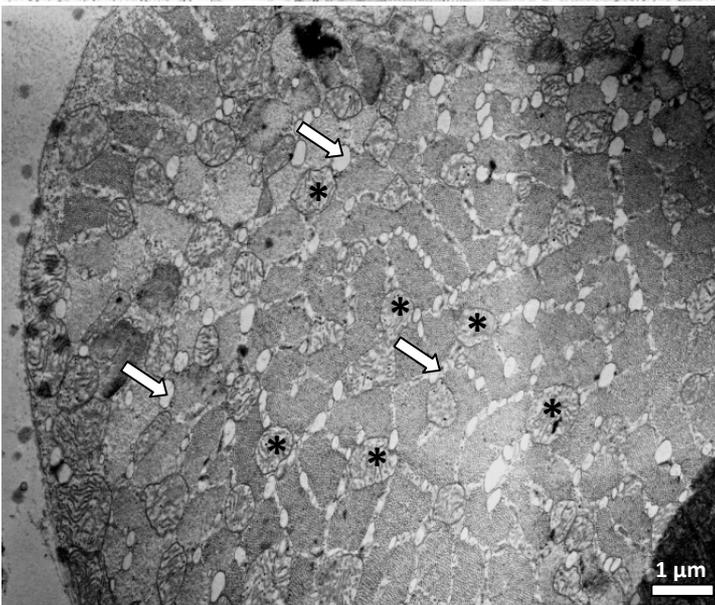


Fig. met9 – Mitocôndrias (*) numerosas e com tamanhos variados, cisternas dilatadas (seta) em contato com as mitocôndrias (6.000x).

Grupo V (5J/cm²)

Notam-se mitocôndrias grandes concentradas na região subsarcolemal (Fig. met10), e outras arredondadas de tamanhos variados. Apresentou entre as miofibrilas mitocôndrias fusionadas, formações alongadas com características mitocondriais, além das invaginações do sarcolema e cisternas do retículo sarcoplasmático (Fig. met11).

Os capilares freqüentes entre as fibras musculares mostraram nas figuras met12 e met13 o núcleo das células endoteliais e seu citoplasma repleto de vesículas de pinocitose e cavéolas. Essas vesículas são formadas pela capacidade da membrana celular englobar líquido e transportá-lo de uma superfície à outra, em ambas as direções. Notou-se também protrusões citoplasmáticas das células endoteliais.

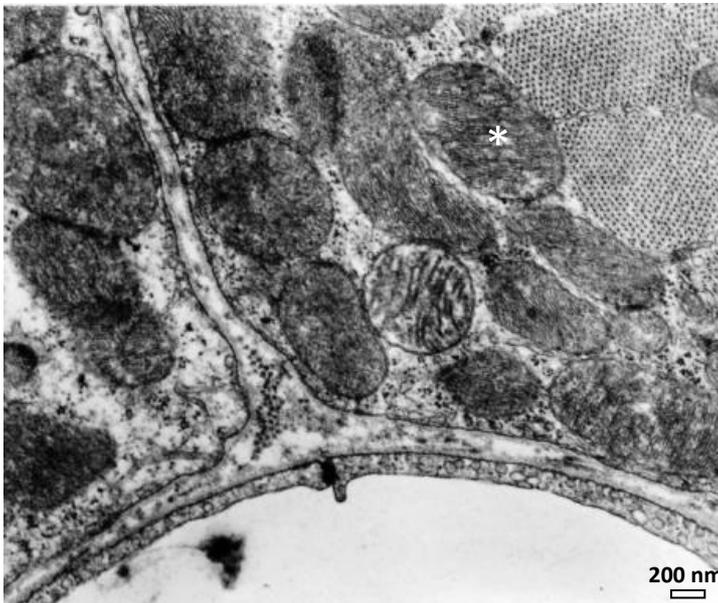


Fig. met10 – Na camada subsarcolemal observam-se mitocôndrias grandes (*). (20.000 X)

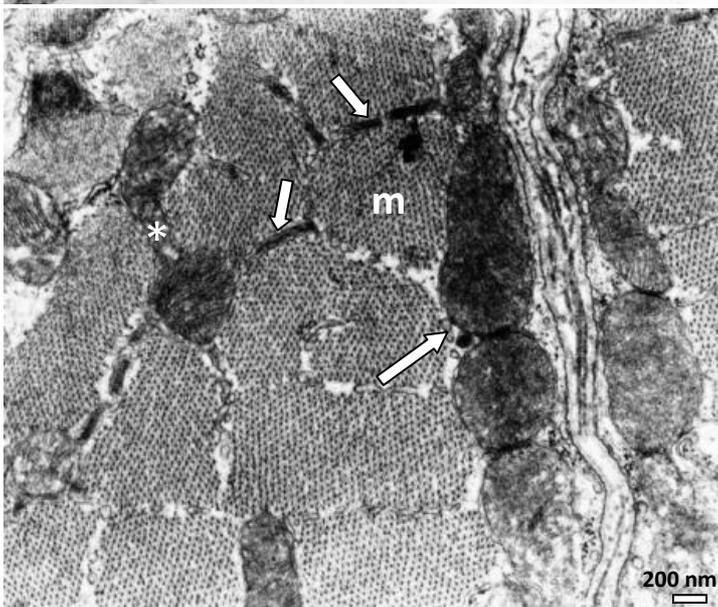


Fig. met11 – Entre as miofibrilas (m) Mitocôndrias fusionadas (*), formações alongadas com características mitocondriais (seta), além de cisternas do retículo sarcoplasmático (seta longa). (20.000 X)

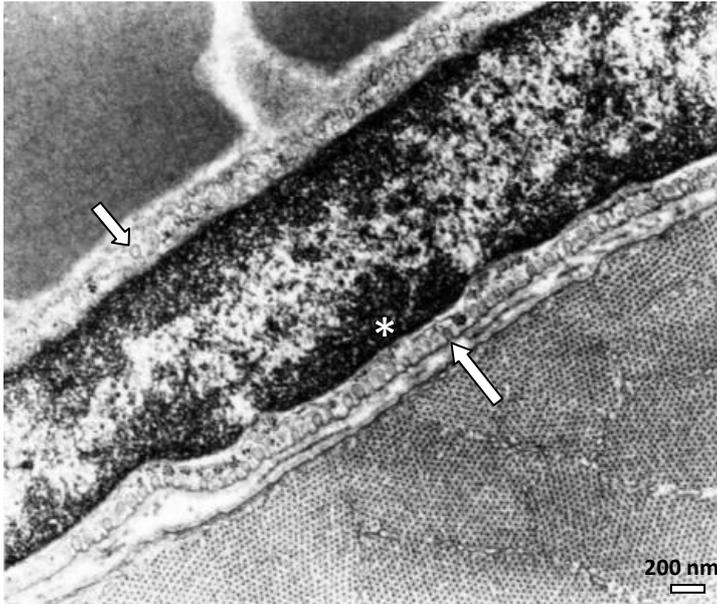


Fig. met12 – Porção do capilar mostrando o Núcleo da célula endotelial(*), com numerosas cavéolas (seta longa) e vesículas pinocíticas (seta). (20.000X)



Fig. met13 – Luz do capilar (L), núcleo da célula endotelial (*), protrusões citoplasmática (seta curva), e a presença de numerosas vesículas pinocíticas (seta), cavéolas (seta longa). (20.000X)

Grupo VI (20J/cm²)

As mitocôndrias de diâmetros variados foram numerosas tanto na região subsarcolemal (Fig. met15) entre as miofibrilas (Figs. met14). Mostrou entre as miofibrilas estruturas alongadas eletrondensas (Fig. met15), assim como invaginações do sarcolema e cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático dilatadas (Fig. met14).

A figura met16 revelou um capilar com hemácia, cuja célula endotelial apresentou numerosas vesículas pinocíticas e algumas protrusões citoplasmáticas.

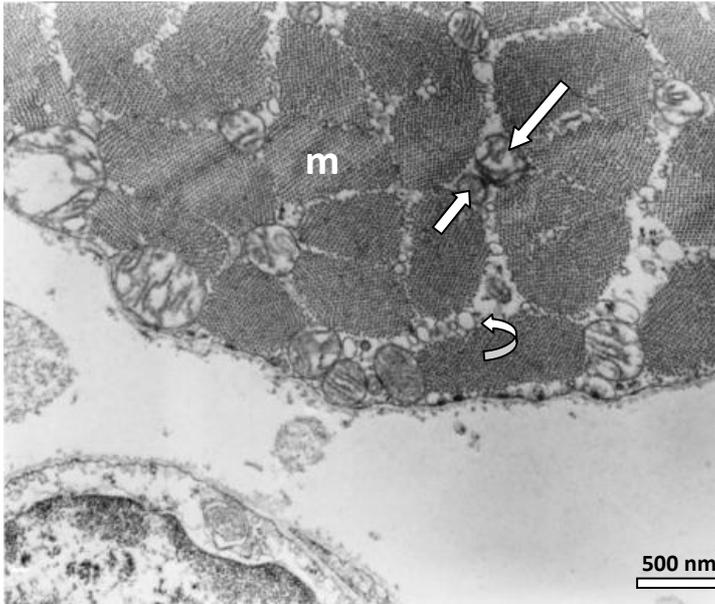


Fig. met14 – Miofibrilas (m), mitocondriais arredondadas pequenas (seta) justapostas às mitocôndrias maiores (seta longa), além de cisternas dilatadas do retículo sarcoplasmático (seta curva) dilatado. (15.000X)

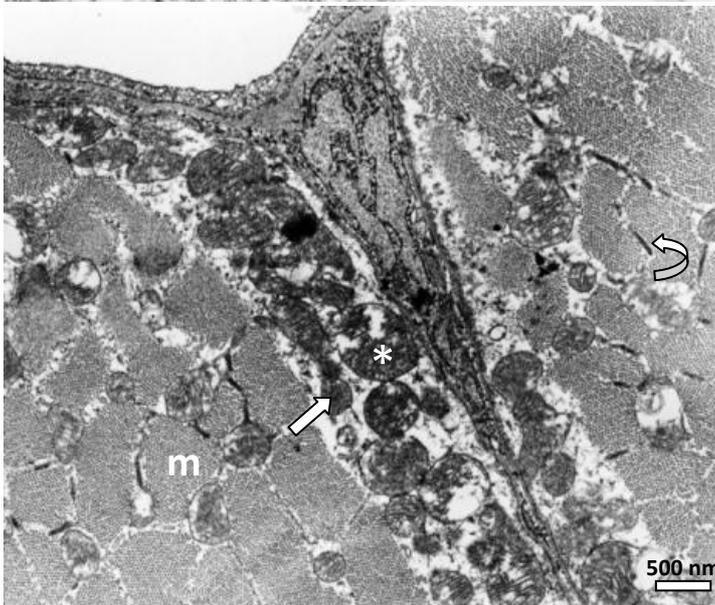


Fig. met15 – Região subsarcolemal com acúmulo de mitocôndrias arredondadas grandes (*) entremeadas por mitocôndrias muito pequenas (seta). Entre as miofibrilas (m) são freqüentes as estruturas alongadas eletrondensas (seta curva). (10.000X).

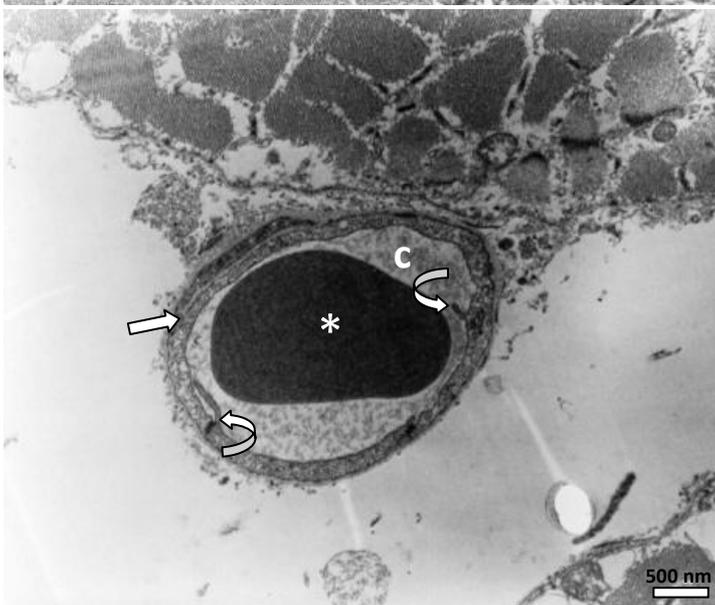


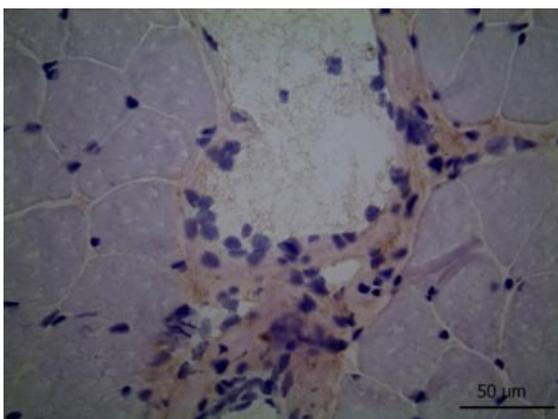
Fig. met16 – Capilar (c) com uma hemácia (*). As células endoteliais (seta) contêm numerosas vesículas pinocíticas e mostra protrusões citoplasmáticas (seta curva) (10.000X).

5. Imunohistoquímica

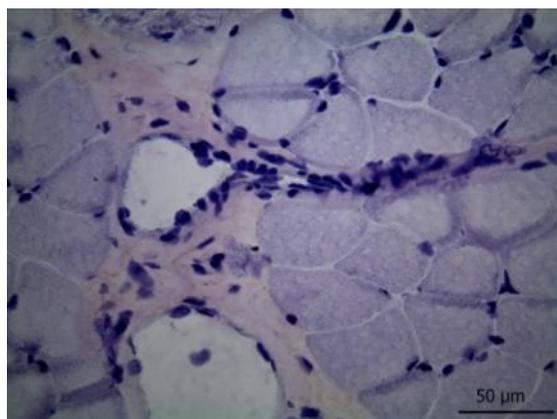
5.1. Fator de crescimento do endotélio vascular - VEGF

Os resultados qualitativos dessa análise imunohistoquímica revelaram a presença do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) no músculo masseter de todos os grupos. Os resultados revelados pelas lâminas histológicas de controle negativo apresentaram especificidade para o VEGF, visto que em nenhum dos grupos analisados o controle negativo foi corado. Observa-se ainda que a intensidade de coloração para o VEGF variou entre os grupos, sendo que teve aparentemente a maior quantidade no grupo VI ($20\text{J}/\text{cm}^2$) e a menor quantidade no grupo II ($0,5\text{J}/\text{cm}^2$), e de uma maneira em geral os grupos de animais irradiados com as menores densidades de energia do laser de baixa potência apresentaram também as menores intensidades de coloração.

Grupo I (controle)

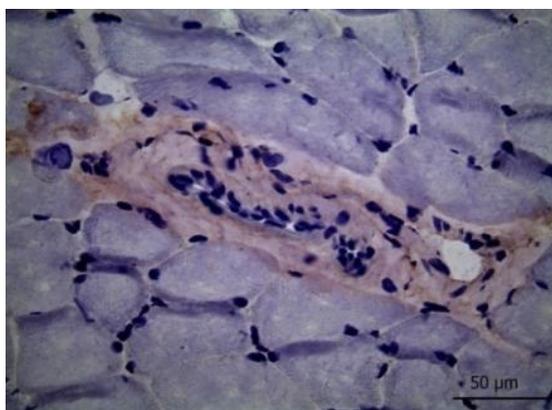


VEGF – 40x

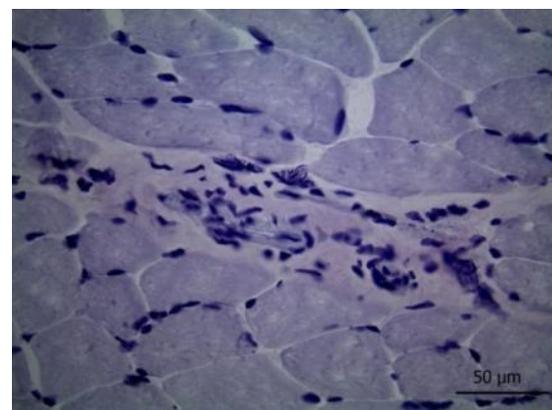


Controle Negativo – 40x

Grupo II ($0,5\text{J}/\text{cm}^2$)

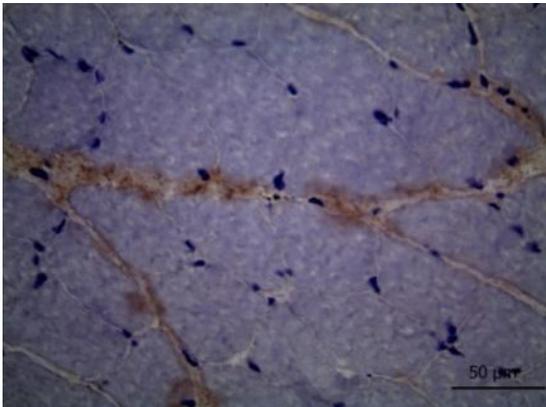


VEGF – 40x

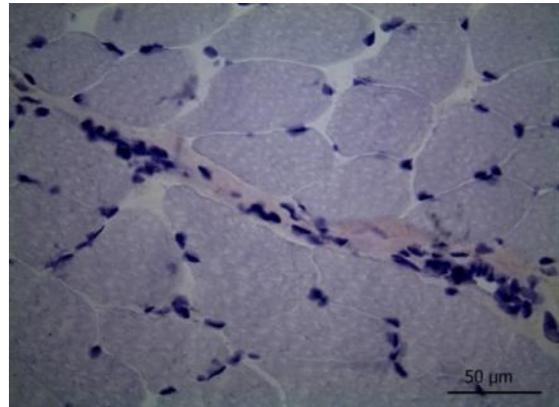


Controle Negativo – 40x

Grupo III (1,0J/cm²)

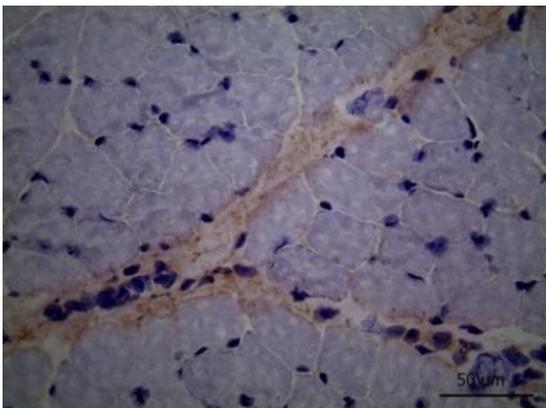


VEGF – 40x

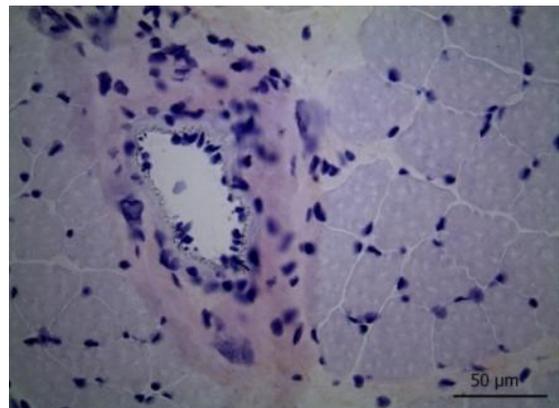


Controle Negativo – 40x

Grupo IV (2,5J/cm²)

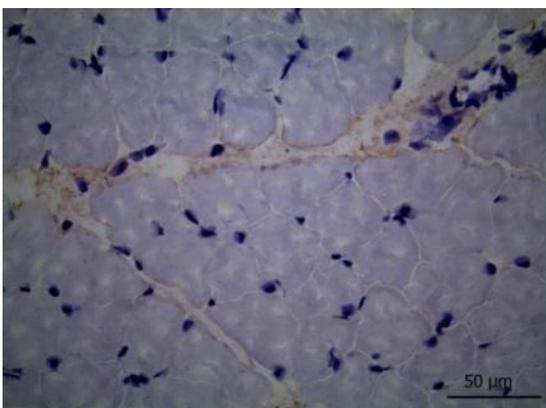


VEGF – 40x

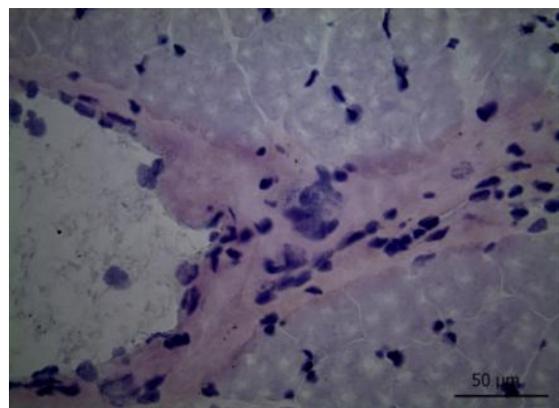


Controle Negativo – 40x

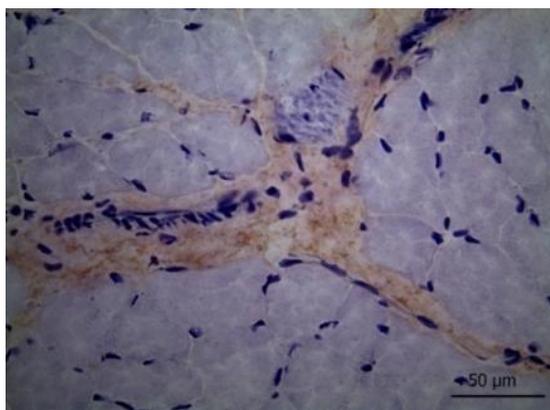
Grupo V (5,0J/cm²)



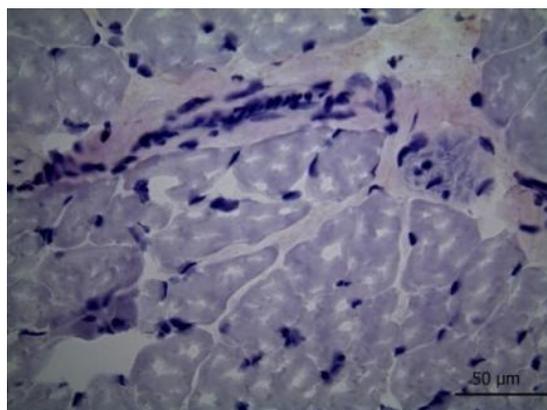
VEGF – 40x



Controle Negativo – 40x

Grupo VI (20J/cm²)

VEGF – 40x

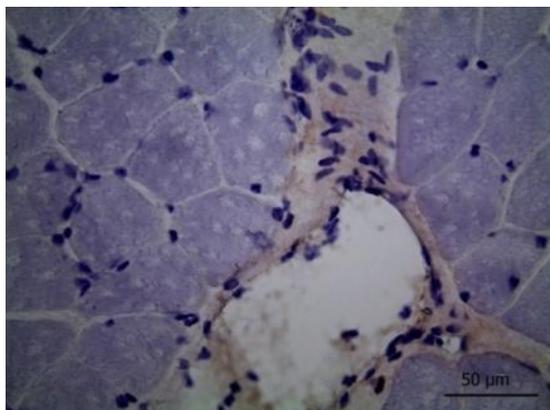


Controle Negativo – 40x

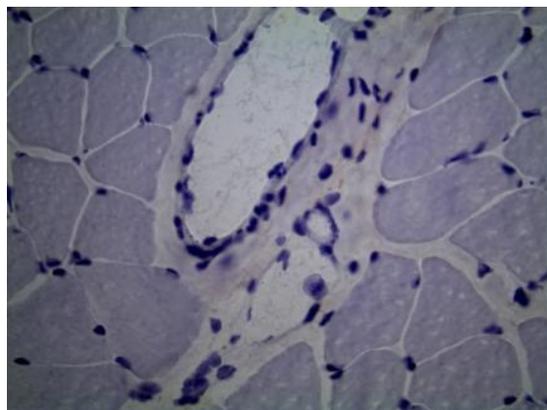
Prancha VI Reação VEGF 40x - Músculo masseter após a irradiação com diferentes densidades de energia. Nota-se que a intensidade de coloração variou entre os grupos, porém a intensidade foi maior no grupo que recebeu 20J/cm².

5.2. Receptor de fator de crescimento do endotélio vascular – VEGFR-2

A análise qualitativa da reação imunohistoquímica para evidenciar o receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2) mostrou especificidade, pois as lâminas histológicas de controle negativo não revelaram estruturas coradas. Houve diferença na intensidade de coloração entre os grupos estudados. Sendo que o grupo que aparentemente apresentou a menor quantidade desse fator foi o grupo II (0,5 J/cm²), e grupo com maior concentração desse fator foi o grupo IV (2,5J/cm²). Essa reação foi equivalente nos grupos V (5J/cm²) e VI (20J/cm²), revelando uma relação de dose-dependência, de modo que os grupos com marcações mais densas foram também aqueles irradiados com a maior densidade de energia.

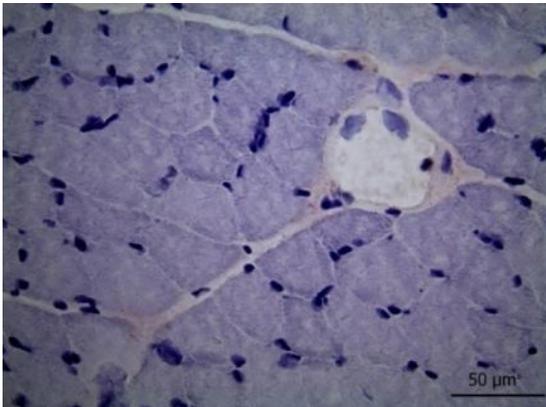
Grupo I (controle)

VEGF – 40x

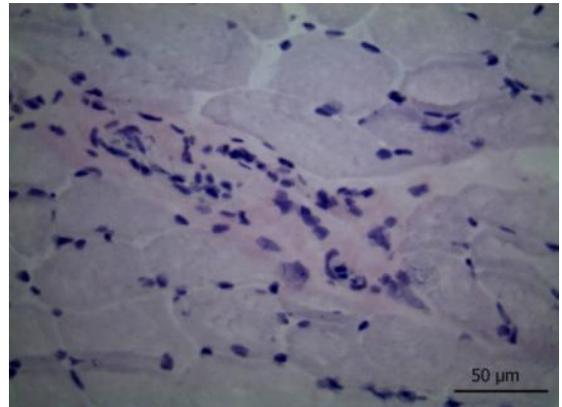


Controle Negativo – 40x

Grupo II (0,5 J/cm²)

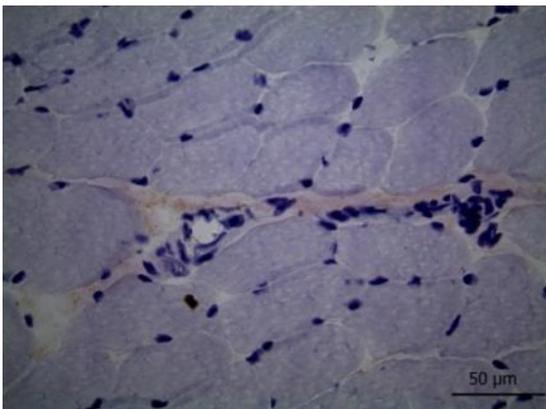


VEGF – 40x

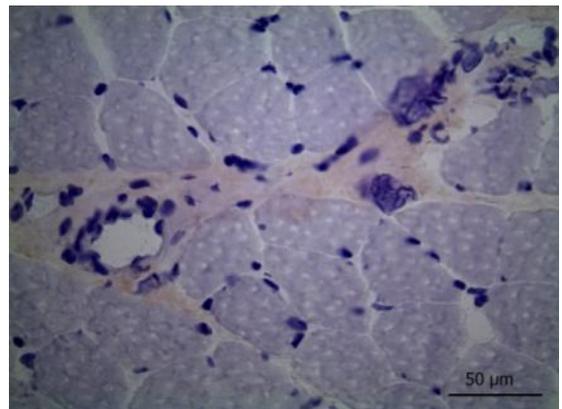


Controle Negativo – 40x

Grupo III (1,0 J/cm²)

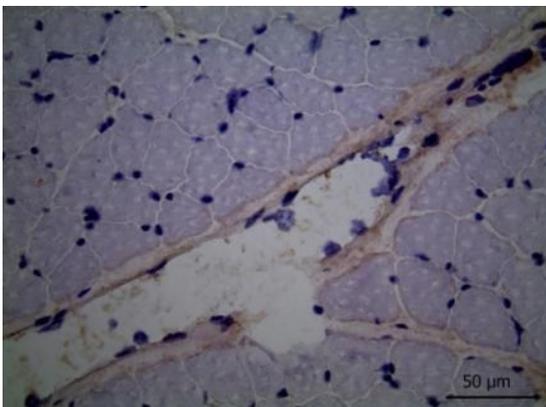


VEGF – 40x

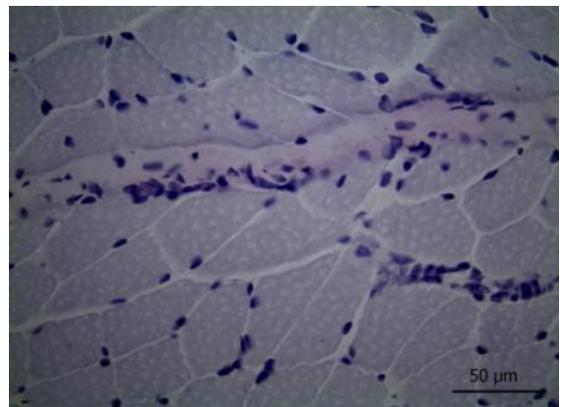


Controle Negativo – 40x

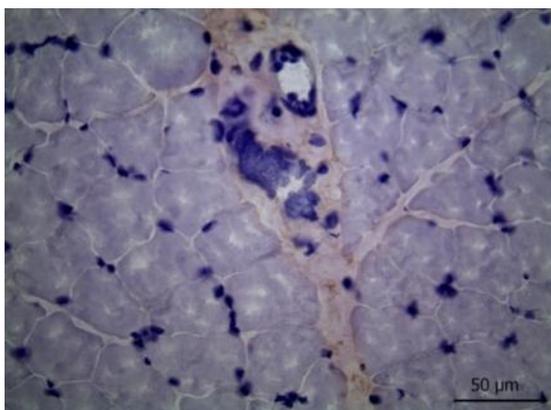
Grupo IV (2,5 J/cm²)



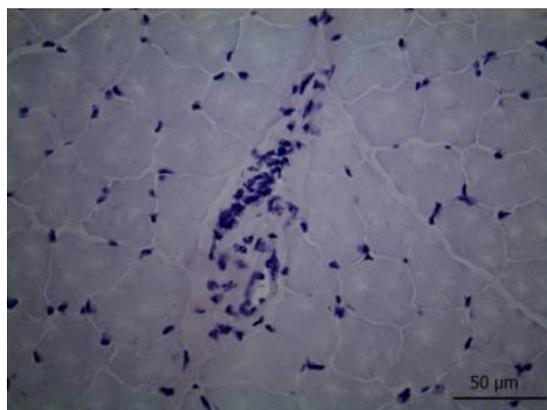
VEGF – 40x



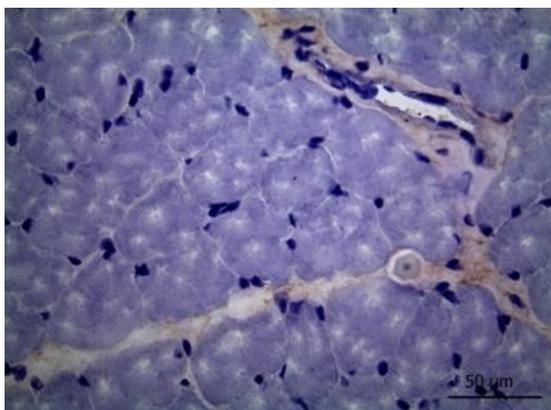
Controle Negativo – 40x

Grupo V (5 J/cm²)

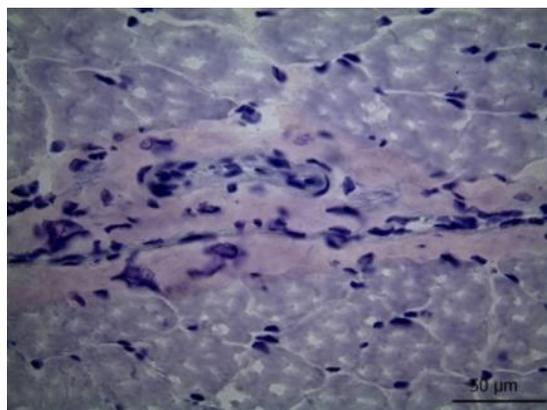
VEGF – 40x



Controle Negativo – 40x

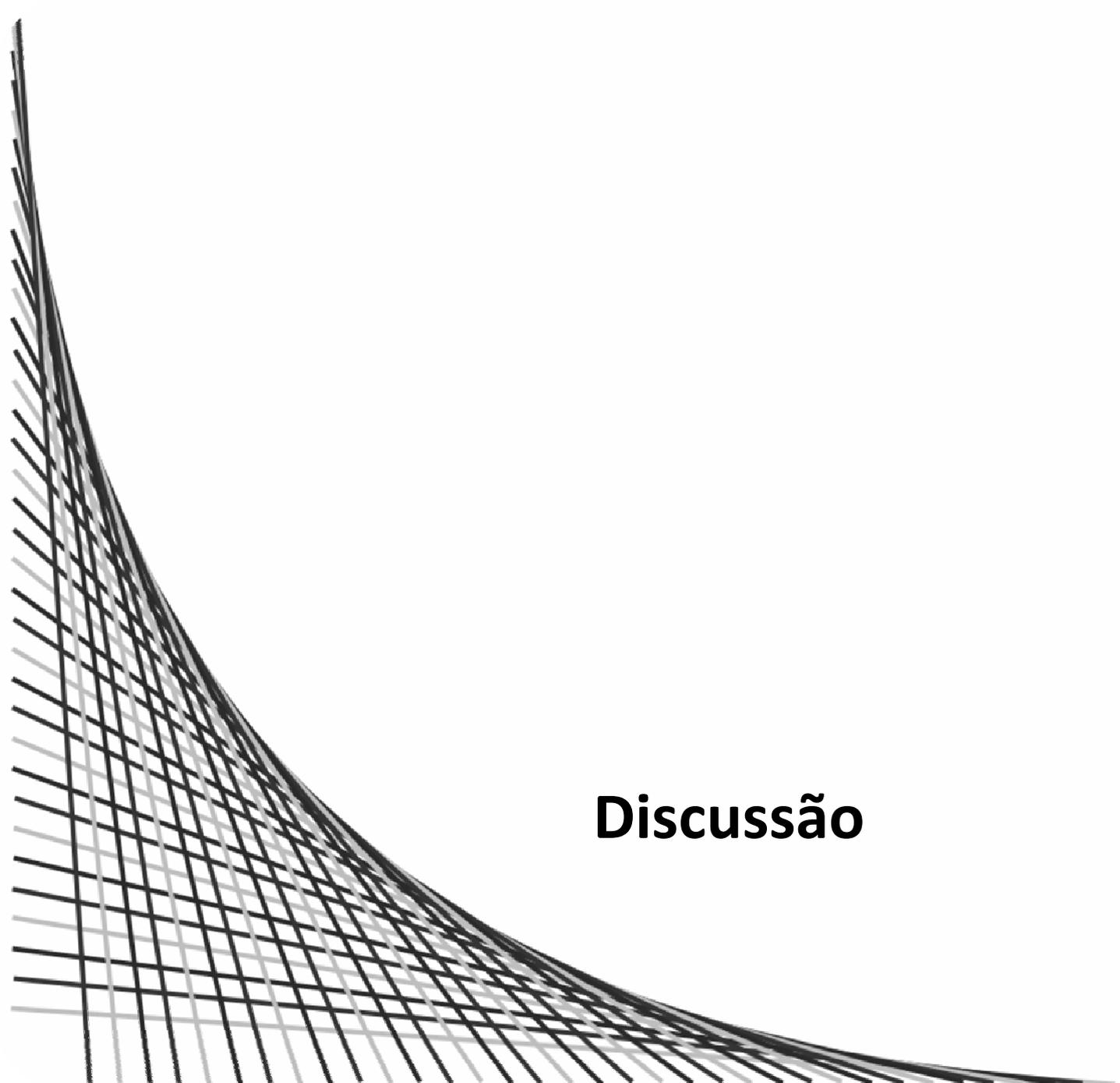
Grupo VI (20 J/cm²)

VEGF – 40x



Controle Negativo – 40x

Prancha VII Reação de VEGFR-2 40x- Músculo masseter após a irradiação com as diferentes densidades de energia. Nota-se que a intensidade de coloração variou entre os grupos, e a intensidade foi maior nos grupos que receberam 2,5 e 20 J/cm².



Discussão

VII. DISCUSSÃO

Enzimas oxidativas

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e Succinato desidrogenase (SDH)

Os resultados revelaram que a capacidade oxidativa do músculo masseter dos ratos foi biomodulada pelo protocolo utilizado de irradiação do laser de baixa intensidade, com uma tendência de resposta dose-dependente. Assim, até a dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$, quanto maior a densidade de energia irradiada no músculo foi maior a capacidade oxidativa, exceção feita ao grupo que recebeu uma densidade de energia ($20\text{J}/\text{cm}^2$) muito maior. Neste caso a resposta oxidativa foi menor em relação ao grupo V ($5\text{J}/\text{cm}^2$).

Comparando-se as áreas ocupadas pelas fibras intermediárias reveladas pelas reações com NADH e SDH em grupos irradiados com as diferentes densidades de energia, houve um aumento significativo da capacidade oxidativa e metabólica, nos grupos irradiados com as maiores densidades de energia 2,5; 5,0 e $20\text{J}/\text{cm}^2$. O aumento dessa área de fibras intermediárias foi proporcional à diminuição da área de fibras claras. Apesar da diferença entre esses grupos não ser estatisticamente significante, é valido destacar que uma área menor de fibra intermediária foi evidenciada no grupo com a maior densidade de energia de $20\text{J}/\text{cm}^2$. Este fato corrobora com os relatos de que em culturas de fibroblastos humanos normais e lesados, a fototerapia em menor dose aumenta a proliferação e a viabilidade celular (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2006) e quando aplicadas em altas doses altera a morfologia dos fibroblastos, danifica, lesa fragmenta e diminui a atividade mitocondrial, além de causar perigo ao DNA e à membrana plasmática (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005, 2006). Manteifel e Karu (2005) revelaram em cultura de levedura maior eficiência com a irradiação menor $460\text{J}/\text{m}^2$ (equivalente a $0,046\text{J}/\text{cm}^2$) resultando em ativação do citocromo c oxidase e NADH-desidrogenase, assim como, aumento da área de superfície das cristas mitocondriais; enquanto a irradiação maior de $1,15\text{J}/\text{cm}^2$ induziu vários danos como, organelas com aberrações e inibição das principais funções mitocondriais. Em seu estudo usando animais Amaral, Parizotto e Salvini (2001) verificaram que dentre as densidades de energia 2,6; 8,4 e $25\text{J}/\text{cm}^2$, a menor foi a que apresentou melhor resultado no reparo de lesão causada por miotoxinas. Lopes-Martins et al. (2006), Leal-Junior et al. (2010) e Iyomasa et al. (2009) avaliando diferentes densidades de energia em músculo esquelético de roedores relataram que os melhores resultados dos seus estudos não foram observados com as maiores doses de seus protocolos. Hou et al. (2008) relatam que uma das menores doses de seu estudo ($0,5\text{J}/\text{cm}^2$) foi considerada a ideal para estimular a proliferação das

células tronco mesenquimais da medula óssea. Em sua revisão Karu (1989) constatou que as baixas dosagens da fototerapia causam regulação de redox do metabolismo celular, e com altas doses prevalecem os danos fotodinâmicos. Tais fatos corroboram com os resultados do presente estudo, em que não foi a densidade de energia mais alta que revelou o melhor quadro das enzimas oxidativas e sim uma densidade intermediária.

Apesar desses resultados benéficos com densidades menores de energia, vale destacar que os protocolos de irradiação são muito variados tanto em cultura de células, quanto em estudos experimentais, dificultando a comparação entre si. No entanto, tais fatos destacam a importância de se planejar muito bem uma laserterapia analisando aspectos como: tecido a ser irradiado e a profundidade do alvo, entre outros. Os estudos da cicatrização de lesões em ratos (GRBAVAC et al., 2006) e em camundongos (DEMIDOVA-RICE et al., 2007) elucidaram bem essa diferença. A melhora na regeneração da lesão cirúrgica circular, induzida no dorso do rato, foi obtida com densidade de energia de 20 e 40 J/cm², enquanto no dorso de camundongo com 2J/cm². Desta forma, observa-se que o campo da laserterapia ainda requer estudos com protocolos de irradiação em diferentes tecidos e diferentes modelos experimentais com o propósito de padronizá-los para cada situação clínica e assim obter o máximo de efeitos positivos possíveis e evitar casos de ineficácia e até os efeitos maléficos à saúde.

Em culturas de células os resultados favoráveis quanto à proliferação celular foi mostrada com 2J/cm² em células dos músculos lisos dos vasos sanguíneos (GAVISH; PEREZ; GERTZ, 2006) e com 0,5J/cm² em células ósseas mesenquimais da medula óssea (HOU et al., 2008).

O aumento da capacidade oxidativa e da atividade metabólica com as densidades de energia 2,5; 5 e 20 J/cm² revelada em nossos estudos pode contribuir para a compreensão do mecanismo pelo qual a laserterapia acelera a recuperação pós exercício, assim como retarda o aparecimento da fadiga muscular. Há relatos de estudos experimentais em ratos (LOPES-MARTINS et al., 2006; SUSSAI et al., 2009; LEAL-JUNIOR et al., 2010) e clínicos em humanos (LEAL-JUNIOR et al., 2008, 2009 a, b, c) de que o laser de baixa intensidade melhora a fadiga muscular. Silveira et al. em 2009, revelaram que a irradiação com o laser aumentou a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima succinato desidrogenase (SDH), corroborando assim com nossos dados de que as densidades de energia utilizadas no presente estudo aumentaram a capacidade oxidativa e atividade metabólica do músculo masseter.

Apesar do ceticismo entre os médicos sobre o fato de que a radiação de baixa intensidade age diretamente sobre o organismo em nível molecular (KARU, 1989), recentes estudos evidenciaram a enzima citocromo C oxidase da cadeia respiratória como um aceptor universal para a radiação vermelha e infra-vermelha em células de mamíferos

(KARU, 2008 a, b). Esclareceram ainda o mecanismo da fotobiomodulação baseado na capacidade da luz alterar o metabolismo celular como resultado da absorção da luz pela mitocôndria (KARU, 1988, 1989), em especial pela enzima citocromo C oxidase (KARU, 1999; PASTORE; GRECO; PASSARELLA, 2000). Atualmente a sinalização retrógrada tem sido considerada uma via de comunicação entre a mitocôndria e o núcleo que influencia muitas atividades celulares (RYAN; HOOGENRAAD, 2007). Schroeder et al. (2007) sugeriram que a resposta à luz vermelha ou infravermelha envolve a sinalização retrógrada.

Assim, em músculos masseteres de ratos irradiados com as densidades de energia de 2,5; 5 e 20J/cm², o aumento da capacidade oxidativa e da atividade metabólica estão relacionadas com a atividade aumentada da cadeia respiratória mitocondrial, o que justificaria a melhora da fadiga muscular em experimentação animal e clínica em humanos.

Adenosina Trifosfatase (ATPase)

As diferentes densidades de energia usadas em nosso experimento não alteraram a capacidade contrátil das fibras quando analisadas por meio da reação ATPásica. A literatura consultada abordou as interações da actina, miosina e ATP (BÁRÁNY, 1967), a propriedade de a miosina hidrolisar ATP (GUTH; SAMAHA, 1969) e a constituição da miosina por uma cabeça contendo ATPase e uma longa cauda (KIERSZENBAUM, 2008). Além disso, destacou as diferentes classificações atribuídas aos tipos de fibras musculares conforme Brooke e Kaiser (1970) e Peter et al. (1972). No entanto, não foram encontradas muitas informações do efeito do laser de baixa intensidade sobre a capacidade contrátil das fibras musculares. Apenas o trabalho de Hawkins e Abrahamse (2006) avaliou a viabilidade celular de fibroblastos humanos pela atividade da ATPase em culturas celulares. Observando esses dados não específicos para a musculatura não permitiram uma comparação com resultados do presente estudo.

Microscopia eletrônica de transmissão

O aspecto ultraestrutural de músculo irradiado revelou mitocôndrias com formas e tamanhos variados, algumas fusionadas, outras em divisão. De modo interessante as formações eletrondensas alongadas com características mitocondriais entre as miofibrilas aumentaram proporcionalmente às densidades de energia aplicadas. Foram evidentes também as dilatadas cisternas do retículo sarcoplasmático, algumas delas muito próximas às formações alongadas com características mitocondriais e também com mitocôndrias. A literatura revelou que a irradiação do laser sobre a mitocôndria expandiu a matriz e aumentou a área de superfície da crista (KARU, 2007), ampliou os espaços

intermembranosos e dilatou os espaços entre as cristas mitocondriais (IYOMASA et al., 2009). Em 1983, Smith e Ord correlacionaram o aumento do número de cristas mitocondriais com a atividade energética dessas organelas, e Karu (2007) associou as alterações da crista com a ativação da cadeia respiratória e fosforilação oxidativa. Esses dados corroboram com os resultados histoenzimológicos do presente estudo com NADH, visto que as enzimas do metabolismo oxidativo foram ativadas. Desta forma, a morfologia ultraestrutural das mitocôndrias foi alterada conforme a densidade de energia aplicada.

É válido destacar ainda no músculo irradiado, as dilatadas cisternas do retículo sarcoplasmático entre as miofibrilas observadas em nível ultraestrutural deste estudo, cujas características foram descritas também por Iyomasa e colaboradores (2009) entre as miofibrilas de músculo lesionado irradiado com $5\text{J}/\text{cm}^2$. Essas cisternas foram evidenciadas muito próximas às formações alongadas com características mitocondriais e próximas às algumas mitocôndrias. Rizzuto et al. (1998) e Hajnóczky et al. (2000) mencionaram que a associação entre as membranas da mitocôndria e o retículo sarcoplasmático à uma distância de 50 a 100nm é um requisito para a transferência de Ca^{2+} à mitocôndria. Para Manteifel e Karu (2007) o aumento do número de associações da mitocôndria com o retículo sarcoplasmático por área de citoplasma reflete o aumento da capacidade mitocondrial em captar Ca^{2+} , cuja função é realizada apenas por mitocôndrias altamente energizadas. Desta forma, as características ultraestruturais das dilatadas cisternas muito próximas às formações alongadas com características mitocondriais e próximas às algumas mitocôndrias deste estudo corroboram com os relatos de Manteifel e Karu (2007) sugerindo que a radiação de baixa intensidade age diretamente sobre o organismo em nível molecular.

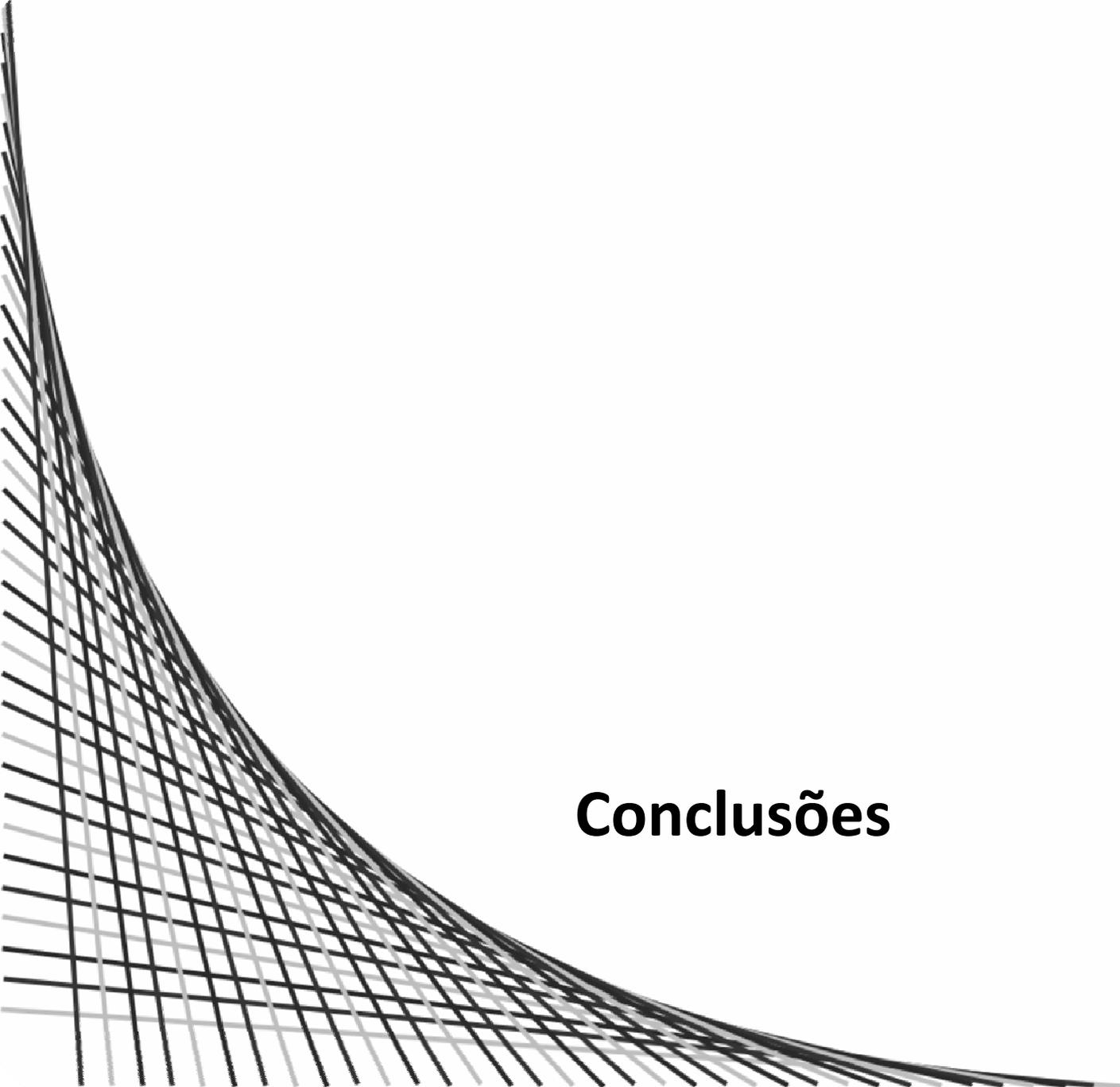
A presença freqüente de estruturas alongadas com características mitocondriais entre as miofibrilas, de mitocôndrias fusionadas e de mitocôndrias em divisão no grupo irradiado revelam o aumento da plasticidade mitocondrial pela ação do laser, visto que, segundo Bereiter-Hahn e Voth (1994) a plasticidade das mitocôndrias é demonstrada por sua movimentação permanente, divisão e fusão. Para Skulachev et al. (2004) várias células eucarióticas contêm mitocôndria ramificada, cujas características foram reveladas ao microscópio eletrônico de transmissão também em algumas fibras musculares, em nossos estudos. Essa organização da mitocôndria como uma rede contínua foi revelada também durante todo o ciclo celular da levedura (MANTEIFEL; KARU, 2007). Portanto, a freqüente presença de estruturas alongadas com características mitocondriais, as mitocôndrias fusionadas e as em divisão sugerem um aumento da dinâmica celular, em músculo irradiado com densidades diferentes de energia.

Imunohistoquímica - VEGF e VEGFR-2

Em nosso estudo o padrão de imunomarcacão para o VEGF variou entre os grupos, sendo que a intensidade de coloracão foi proporcional a densidade de energia do laser de baixa intensidade sugerindo que a expressão do VEGF pelo estímulo induzido com a irradiaçao foi dose-dependente. Esses dados corroboram com o estudo de Tuby, Maltz e Oron (2006) em coracão de ratos irradiados, no qual verificaram um aumento significativo de VEGF e óxido nítrico sintase (iNOS), assim como do número total de vasos sanguíneos neoformados. O aumento do VEGF como efeito biomodulador do laser foi também descrito em células tronco da medula óssea (HOU et al., 2008). A expressao do VEGF proporcional à densidade de energia irradiada obtida em nosso estudo, então confirma a açao do laser sobre a angiogênese.

É válido destacar que em 2010 Silva et al. relataram a inibicão da expressao do VEGF por irradiaçao com laser de baixa intensidade, densidade de energia de 35J/cm² (pós-operatório imediato) e 5J/cm² (48 horas após a cirurgia) com o intuito de reduzir a lesao na língua de ratos. Há necessidade de outros estudos para verificar se a dose não foi excessiva e se o período de aplicacão foi inadequado para o propósito esperado, visto que altas doses aplicadas alteram a morfologia de fibroblastos e diminui a atividade mitocondrial, entre outros danos observados (HAWKINS; ABRAHAMSE, 2005, 2006) ou prevalecem os danos fotodinâmicos (KARU, 1989)

O VEGFR-2 foi expresso neste estudo tanto no controle quanto nos grupos irradiados. Porém, os padrões de imunomarcacão para o VEGFR-2 foram mais intensos entre os grupos que receberam maiores densidades de energia (2,5; 5,0 e 20J/cm²). Conforme Shibuya (2006) o receptor-2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR-2) é expresso principalmente nas células do endotélio vascular, o qual é o sinal transdutor principal para que a célula precursora endotelial positiva se diferencie em célula endotelial vascular e para sua proliferaçao. São escassos na literatura os relatos de que o laser de baixa intensidade aumenta de modo significativo o VEGFR-2. No entanto, a expressao do VEGFR-2 com diferentes densidades de energia sugerem que o estímulo é dose-dependente e que a irradiaçao é capaz de induzir a angiogênese.



Conclusões

VIII. CONCLUSÕES

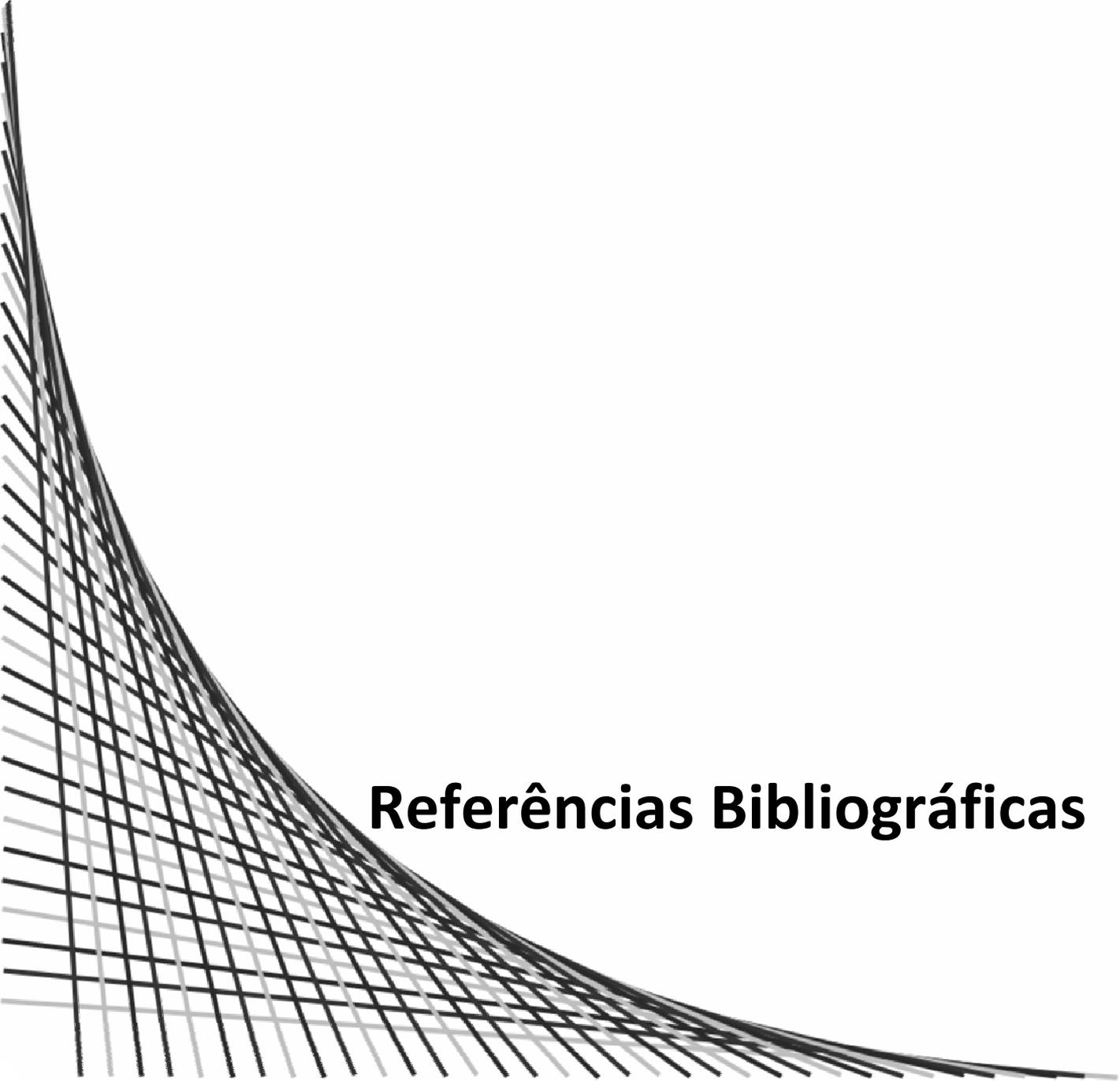
Foi possível concluir que, o músculo masseter de rato irradiado com diferentes densidades de energia:

- I.
 - a. Aumentou suas atividades histoenzimológicas para NADH e SDH, principalmente com as densidades de energia 2,5; 5,0 e 20J/cm². Revelando assim que a laserterapia aumenta a capacidade oxidativa e metabólica do músculo;
 - b. Não alterou as atividades histoenzimológicas para a ATPase, indicando que nosso protocolo de irradiação não alterou a capacidade contrátil das fibras musculares.

- II. Alterou a morfologia do núcleo das fibras musculares e dos fibroblastos presentes no endomísio, tornando-as mais volumosas com as doses 5 e 20 J/cm². Com as doses de 1,0 e 2,5 J/cm² essas características dos núcleos foram esporádicas, sugerindo aumento de síntese protéica com densidades de energia mais altas.

- III. Em nível ultraestrutural, nos grupos irradiados houve alteração morfológica das mitocôndrias: umas em fusão, outras em divisão e tamanhos variados, indicando que essas doses foram capazes de aumentar a plasticidade mitocondrial. As cisternas dilatadas muito próximas às formações alongadas com características mitocondriais e às algumas mitocôndrias refletem possível aumento na transferência de Ca²⁺ à mitocôndria.

- IV. Por meio das reações imunohistoquímicas para VEGF e VEGFR-2, houve aumento da intensidade de coloração conforme o aumento na densidade de energia. Refletindo assim que as densidades de energia mais altas (2,5; 5,0 e 20J/cm²) foram capazes de estimular a angiogênese no músculo.

An abstract graphic on the left side of the page, consisting of a dense, overlapping grid of thin, curved lines. The lines are arranged in a way that they appear to be part of a larger, curved structure, possibly a stylized letter or a decorative element. The lines are black and grey, and they curve from the top left towards the bottom right, creating a sense of depth and movement.

Referências Bibliográficas

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4.ed. Artmed, 2004. 1584p.
2. AMARAL, A.C.; PARIZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice. **Lasers Med Sci.**, v.16, p.44-51, 2001.
3. AMAT, A.; RIGAU, J.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; ANDERS, J.J. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. **J Photochem Photobiol B.**, v. 82, n.2, p.152-60, 2006.
4. AMIR, A.; SOLOMON, A.S.; GILER, S.; CORDOBA, M.; HAUBEN, D.J. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. **Br J Plast Surg.**, v.53, p.58-62, 2000.
5. ARAS, M.H.; GÜNGÖRMÜŞ, M. Placebo-controlled randomized clinical trial of the effect two different low-level laser therapies (LLL)-intraoral and extraoral-on trismus and facial swelling following surgical extraction of the lower third molar. **Lasers Med Sci.** 2009.
6. ARAÚJO, C.E.N; RIBEIRO, M.S.; FAVARO, R. ZECELL, D.M.; ZORN, T.M.T. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **J Photochem Photobiol.**, v.86, p.87-96, 2007.
7. AVNI, D.; LEVKOVITZ, S.; MALTZ, L.; ORON, U. Protection of skeletal muscles from ischemic injury: low-level laser therapy increases antioxidant activity. **Photomed Laser Surg.**, v.23, p.273-7, 2005.
8. BÁRÁNY, M. ATPase Activity of Myosin Correlated with Speed of Muscle Shortening. **J Gen Physiol.**, v. 50, n.6, p. 197-218, 1967.
9. BAXTER, G.D. **Therapeutic Lasers Theory and Practice**. 1.ed. New York: Churchill Livingstone, 1997. 259p.
10. BEN-DOV, N.; SHEFER, G.; IRINITCHIV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v.1448, p.372-380, 1999.
11. BEREITER-HAHN, J.; VÖTH, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. **Microsc Res Tech.**, v.27, n.3, p.198-219, 1994.

12. BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol (Berl)**, v.190, p.597-602, 1994.
13. BIBIKOVA, A.; ORON, U. Regeneration in denervated toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation. **Anat Rec.**, v.241, p.123-128, 1995.
14. BORSELLI, C.; STORRIE, H.; BENESCH-LEE, F.; SHVARTSMAN, D.; CEZAR, C.; LICHTMAN, J.W.; VANDENBURGH, H.H; MOONEY, D.J. Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.107, n.8, p.3287-9, 2010.
15. BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol.**, v.23, p.369-79, 1970.
16. BRUGNERA-JR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. 1. Ed. São Paulo: Pancast editora, 1998, 355p.
17. BYRNE, A.M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J.H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med.**, v.9, n.4, p.777-94. 2005.
18. CARMO-ARAÚJO, E.M.; DAL-PAI-SILVA, M.; DAL-PAI, V.; CECCHINI, R.; ANJOS FERREIRA, A.L. Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. **Int J Exp Pathol.**, v.88, n.3, p.147-54, 2007.
19. CEBASEK, V.; KUBÍNOVÁ, L.; JANÁČEK, J.; RIBARIC, S.; ERZEN I. Adaptation of muscle fibre types and capillary network to acute denervation and shortlasting reinnervation. **Cell Tissue Res.**, v.330, n.2, p.279-89, 2007.
20. CRESSONI, M.D.; DIB GIUSTI, H.H.; CASAROTTO, R.A.; ANARUMA, C.A. The Effects of a 785-nm AlGaInP Laser on the Regeneration of Rat Anterior Tibialis Muscle After Surgically-Induced Injury. **Photomed Laser Surg.**, Sep. 2008.
21. DEMIDOVA-RICE, T.N.; SALOMATINA, E.V.; YAROSLAVSKY, A.N.; HERMAN, I.M.; HAMBLIN, M.R. Low-level light stimulates excisional wound healing in mice. **Lasers Surg Med.**, v. 39, n.9, p.706-15, 2007.
22. EHRBAR, M.; DJONOV, V.G.; SCHNELL, C.; TSCHANZ, S.A.; MARTINY-BARON, G.; SCHENK, U.; WOOD, J.; BURRI, P.H.; HUBBELL, J.A.; ZISCH, A.H. Cell-demanded liberation of VEGF₁₂₁ from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. **Circ Res.**, v. 94, n.8, p.1124-32, 2004.

23. FIKÁCKOVÁ, H.; DOSTÁLOVÁ, T.; NAVRÁTIL, L.; KLASCHKA, J. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study. **Photomed Laser Surg.**, v. 25, p. 297-303, 2007.
24. FRICTON, J.R. Temporomandibular muscle and joint disorders. **Pain**, v.109, p.530, 2004.
25. FUNG, D.T.C.; NG, G.Y.F.; LEUNG, M.C.P.; TAY, D.K.C. Effects of a Therapeutic Laser on the Ultrastructural Morphology of Repairing Medial Collateral Ligament in a Rat Model. **Lasers Surg Med.**, v.32, p.286-93, 2003.
26. GAL, P.; VIDINSKY, B.; TOPORCER, T.; MOKRY, M.; MOZES, S.; LONGAUER, F.; Sabo, J. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomed Laser Surg.**, v.24, p.480-88, 2006.
27. GAVISH, L.; PEREZ, L.; GERTZ, S.D. Low-Level Laser Irradiation Modulates Matrix Metalloproteinase Activity and Gene Expression in Porcine Aortic Smooth Muscle Cells. **Lasers Surg Med.**, v.38, p.779-86, 2006.
28. GOODMAN, J.D.; KAUFMAN, H.W. Effects of an Argon Laser on the Crystalline Properties and Rate of Dissolution in Acid of Tooth Enamel in the Presence of Sodium Fluoride. **J. Dent. Res.**, v.56, n.10, p.1201-7, 1977.
29. GORDIENKO A.I. The influence of laser and electrophoresis of myramistin on dehydrogenases activity of the blood neutrophils in complex treatment of purulent complications in abdominal surgery. **Klin Khir.**, v 10, p.25, 1999.
30. GORGEY A.S.; WADEE A.N.; SOBHI N.N. The Effect of Low-Level Laser Therapy on Electrically Induced Muscle Fatigue: A Pilot Study. **Photomed Laser Surg.**, v.26, p.501-6, 2008.
31. GRBAVAC R.A.; VEECK E.B.; BERNARD J.P.; RAMALHO L.M.; PINHEIRO A.L. Effects of laser therapy in CO₂ laser wounds in rats. **Photomed Laser Surg.**, v.24, p.389-96. 2006.
32. GUTH, L.; SAMAHA, F.J. Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. **Experimental Neurology**, v. 25, p.138-52, 1969.
33. HAJNÓCZKY, G.; CSORDÁS, G.; MADESH, M.; PACHER, P. The machinery of local Ca²⁺ signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. **J Physiol.**, v. 529, p.69-81, 2000.
34. HAWKINS, D.; ABRAHAMSE, H. Biological effects of Helium-Neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. **Photomed Laser Surg.**, v.23, p.251-9, 2005.

35. HAWKINS, D.H.; ABRAHAMSE, H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers Surg Med.**, v.38, p.74-83, 2006.
36. HOU, J.; ZHANG, H.; YUAN, X.; LI, J.; WEI, Y.; HU, S. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: Proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. **Lasers Surg Med.**, v.40, p.726-33, 2008.
37. HUDLICKA, O.; BROWN, M.D. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. **J Vasc Res.**, v.46, n.5, p.504-12, 2009.
38. INFANGER, M.; SHAKIBAEI, M.; KOSSMEHL, P.; HOLLENBERG, S.M., GROSSE, J. FARAMARZI, S.; SCHULZE-TANZIL, G.; PAUL, M.; GRIMM, D. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. **J Vasc Res.**, v.42, n.3, p.202-13. 2005.
39. IYOMASA, D.M.; GARAVELO, I.; IYOMASA, M.M.; WATANABE, I.; ISSA, J.P.M. Ultrastructural analysis of the low level laser therapy effects on the lesioned anterior tibial muscle in the Gerbil. **Micron Oxford**, v.40, n.4, p.413-8, 2009.
40. KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci.**, v.2, p.53-74, 1988.
41. KARU, T.I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, v.56, n.5, p. 691-704, 1989.
42. KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.49, p.1-17, 1999.
43. KARU, T.I. Attachment of cells can be increased by monochromatic radiation in the red-to-near IR region: A novel mitochondrial signaling pathway. **Photodynamic Therapy at the Cellular Level**, Ed. Research Signpost, Russia, 2007.
44. KARU, T.I. Mitochondrial mechanisms of laser phototherapy. **Proceedings of light-activated tissue regeneration and therapy conference**. p. 27-34. 2008.
45. KARU, T.I. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. **Photochem Photobiol.**, v.84, n.5, p.1091-9, 2008.
46. KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular - Uma Introdução à Patologia** – 2.ed. Elsevier, 2008. 696p.

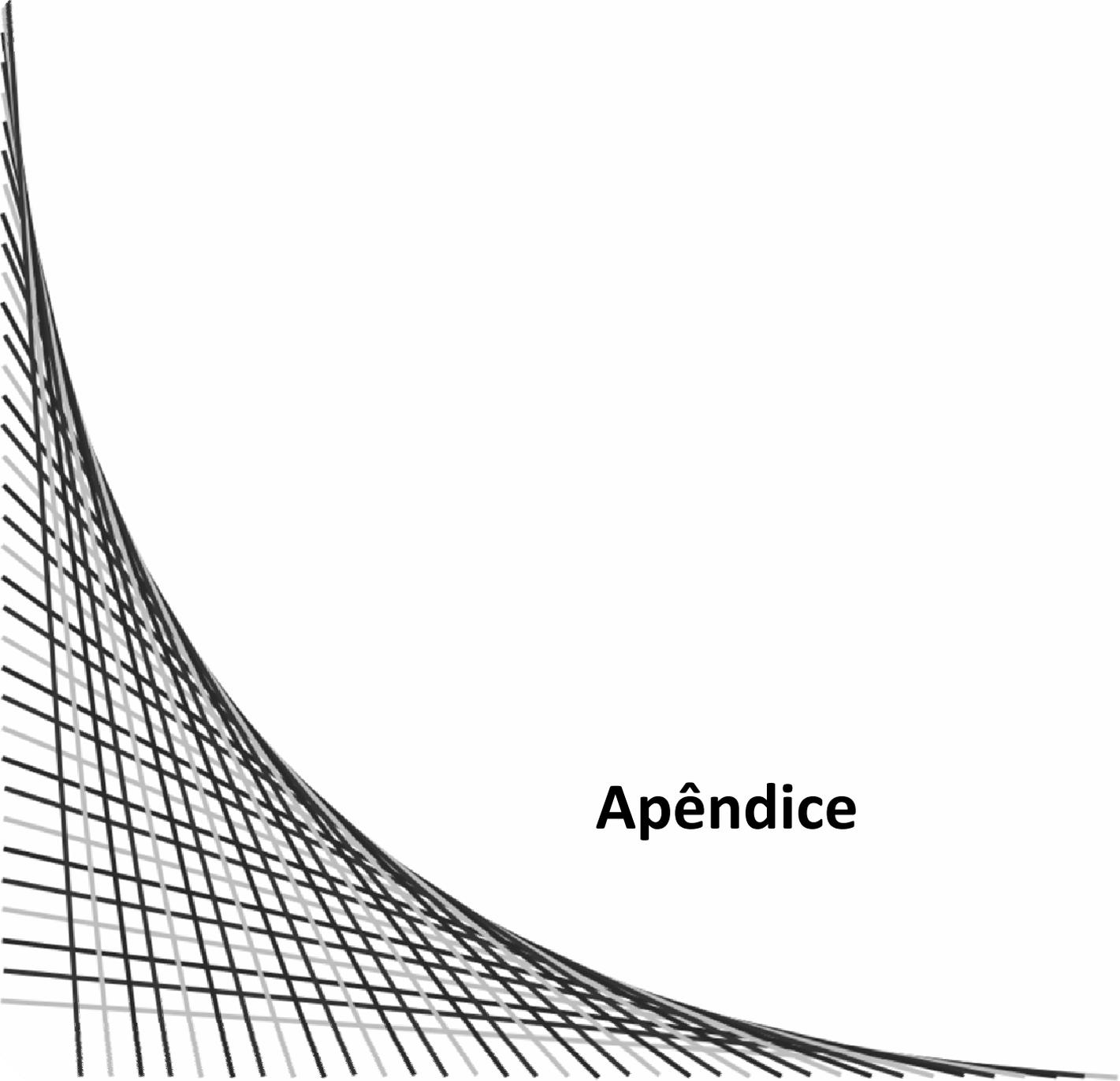
47. LEAL-JUNIOR, E.C.P.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; DALAN, F.; FERRARI, M.; SBABO, F.M.; GENEROSI, R.A.; BARONI, B.M.; PENNA, S.C.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 655-nm Low-Level Laser Therapy on Exercise-Induced Skeletal Muscle Fatigue in Humans. **Photomed Laser Surg.**, v. 26, p.419-24, 2008.
48. LEAL-JUNIOR, E.C.P.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BARONI, B.M.; DE MARCHI, T.; TAUFER, D.; MANFRO, D.S.; RECH, M.; DANNA, V.; GROSSELI, D. ;GENEROSI, R.A.; MARCOS, R.L.; RAMOS, L.; BJORDAL, .J.M. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. **Laser med Sci.**, v.24, n.6, p. 857-63, 2009a.
49. LEAL-JUNIOR, E.C.; LOPES-MARTINS, R.A.; VANIN, A.A.; BARONI, B.M.; GROSSELLI, D.; DE MARCHI, T.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. **Lasers Med Sci.**, v.24, n.3, p. 425-31, 2009b.
50. LEAL-JUNIOR, E.C.P.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; BARONI, B.M.; ROSSI, T.M.R.P.; GROSSELLI, D.; GENEROSI, R.A.; GODOI, V.; BASSO, M.; MANCALOSSI, J.L.; BJORDAL, J.M.; Comparison between single-diode low-level laser therapy (LLLT) and LED multi-diode (cluster) therapy (LEDT) applications before high-intensity exercise. **Photomed Laser Surg.**, v. 27, p. 1-8, 2009c.
51. LEAL-JUNIOR, E.C.P.; LOPES-MARTINS, R.A.B; ALMEIDA, P.; RAMOS, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser therapy (GaAs 904 nm) in skeletal muscle fatigue and biochemical markers of muscle damage in rats. **Eur J Appl Physiol.**, v.108, n.6, p.1083-8, 2010.
52. LIZARELLI, R.F.Z. **Protocolos Clínicos Odontológicos: Uso do laser de baixa intensidade**. 2.ed. São Carlos: Bons Negócios editora Ltda, 2005. 64p.
53. LOPES-MARTINS, R.A.B.; MARCOS, R.L.; LEONARDO, P.S.; PRIANTI JR., A.C.; MUSCARÁ, M.N.; AIMBIRE, F.; FRIGO, L.; IVERSEN, V.V.; BJORDAL, J.M. Effect of low-level laser (Ga-Al-As 655 nm.) on skeletal muscle fatigue induced by electrical stimulation in rats. **J Appl Physiol.**, v.101, p.283-288, 2006.
54. MACIEL, V.H. **Protocolos clínicos para aplicação do LASER de baixa intensidade nos procedimentos fisioterapêuticos**. São Carlos: MM Optics, p.19-20, 2006.
55. MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**, v. 187, p.492-4, 1960.
56. MANTEIFEL, V.M.; KARU, T.I. Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in subsequent generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. **Izv Akad Nauk Ser Biol.**, v. 6 (nov-dez), p. 672-83, 2005.

57. MANTEIFEL, V.; KARU T.I. Influence of a short-time He-Ne laser irradiation on the next generations of yeast cells: Prolonged effects on mitochondrial ultrastructure. **Photodynamic Therapy at the Cellular Level**, Ed. Research Signpost, Russia, 2007.
58. MAXWELL, L.C.; FAULKNER, J.A.; LIEBERMAN, D.A. Histochemical manifestations of age and endurance training in skeletal muscle fibers. **Am J Physiol.**, v.224, n.2, p. 356-61, 1973.
59. MAYEVSKY, A.; BARBIRO-MICHAELY, E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.41, n.10, p.1977-88, 2009.
60. MEDEIROS, J.S.; VIEIRA, G.F.; NISHIMURA, P.Y. Laser application effects of the bite strength of the masseter muscle, as an orofacial pain treatment. **Photomed Laser Surg.**, v.23, p.373-376, 2005.
61. MEDRADO, A.R.A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers Surg Med.**, v.32, p.239-44, 2003.
62. MEIRELES, G.C.S. Análise comparativa dos lasers de Ga-Al-As de $\lambda=660$ nm $\lambda+780$ nm na cicatrização de úlceras por queimaduras em dorso de ratos diabéticos e não-diabéticos: estudo histológico. 2005. 120f. **Tese (Doutorado)**, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2005.
63. MIYASHITA, E.; FONSECA, A.S. **Odontologia Estética**, Artes Médicas, p. 739-68, 2004.
64. NUNEZ, S.C.; GARCEZ, A.S.; SUZUKI, S.S.; RIBEIRO, M.S. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. **Photomed Laser Surg.**, v.24, p.45-9, 2006.
65. PASTORE, D.; GRECO, M.; PASSARELLA, S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. **Int J Radiat Biol.**, v.76, n.6, p.863-70, 2000.
66. PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v.11, p.2627-33, 1972.
67. PINHEIRO, A.L.B.; NASCIMENTO, S.C.; VIEIRA, A.L.; BRUGNERA, A.; ZANIN, F.A.; ROLIM, A.B.; SILVA, P.S. Effects of low level laser therapy on malignant cells: in vitro study. **J Clin Laser Med and Surg.**, v.20, p.23-6, 2002.
68. PODBIELSKI, M.; OTROCKA-DOMAGAŁA, I.; ROTKIEWICZ, T. Effects of laser light on regenerating muscle fibres in pigs. **Medycyna Weterynaryjna**, v.62, p.1158-63, 2006.

69. POGREL, M.A.; CHEN, J.W.; ZHANG, K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Lasers Surg Med.**, v.20, p.426-32, 1997.
70. POURZARANDIAN, A.; WATANABE, H.; RUWANPURA, S.M.P.M.; AOKI, A.; ISHIKAWA, I. Effect of Low-Level Er:YAG Laser Irradiation on Cultured Human Gingival Fibroblasts. **J Periodontol.**, v.76, n.2, 187-93, 2005.
71. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy, **J. Cell Biol.**, v.17, p.208, 1963.
72. REIS, S.R.A.; MEDRADO, A.P.; MARCHIONNI, A.M.T.; FIGUEIRA, C., FRACASSI, L.D.; KNOP, L.A.H. Effect of 670-nm Laser Therapy and Dexamethasone on Tissue Repair: A Histological and Ultrastructural Study. **Photomed Laser Surg.**, v.26, n.4, p. 307-13, 2008.
73. RICHTER, G.T.; BOWEN, T. 3RD; BOERMA, M.; FAN, C.Y., HAUER-JENSEN, M.; VURAL, E. Impact of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in irradiated rats. **Arch Facial Plast Surg.**, v.11, n.2, p.110-3, 2009.
74. RIZZI, C.F.; MAURIZ, J.L.; FREITAS CORREA, D.S.; MOREIRA, A.J.; ZETTLER, C.G.; FILIPPIN, L.I.; MARRONI, N.P.; GONZALEZ-GALLEGO, J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. **Lasers Surg Med.**, v.38, p.704-13, 2006.
75. RIZZUTO, R.; PINTON, P.; CARRINGTON, W.; FAY, F.S.; FOGARTY, K.E.; LIFSHITZ, L.M.; TUFT, R.A.; POZZAN, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. **Science**, v.280, n.5370, p.1763-6, 1998.
76. RYAN, M.T.; HOOGENRAAD, N.J. Mitochondrial-nuclear communications. **Annu Rev Biochem.**, v.76, p.701-22, 2007.
77. SCHROEDER, P.; POHL, C.; CALLES, C.; MARKS, C.; WILD, S.; KRUTMANN, J.; Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. **Free Radic Biol Med.**, v.43, n.1, p.128-35. 2007.
78. SHEFER, G.; BARASH, I.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. **Biochim Biophys Acta**, v.1593, p.131-9, 2003.
79. SHEFER, G.; ORON, U.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A.; HALEVY, O. Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. **J Cell Physiol.**, v.187, p.73-80, 2001.

80. SHEFER, G.; PARTRIDGE, T.A.; HESLOP, L.; GROSS, J.G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J Cell Sci.**, v.115, p.1461-9, 2002.
81. SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. **Endothelium**, v.13, n.2, p.63-9, 2006.
82. SHIRANI, A.M.; GUTKNECHT, N.; TAGHIZADEH, M.; MIR, M. Low-level laser therapy and myofacial pain dysfunction syndrome: a randomized controlled clinical trial. **Lasers Med Sci.**, v.24, n.5, p.715-20, 2009.
83. SIECK, G.C.; SACKSM, R.D.; BLANCO, C.E.; EDGERTON, V.R. SDH activity and cross-sectional area of muscle fibers in cat diaphragm. **J Appl Physiol.**, v.60, n.4, p.1284-92, 1986.
84. SILVA, T.C.; OLIVEIRA, T.M.; SAKAI, V.T.; DIONÍSIO, T.J.; SANTOS, C.F.; BAGNATO, V.S.; MACHADO, M.A. In Vivo Effects on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-A(165) Messenger Ribonucleic Acid of an Infrared Diode Laser Associated or Not with a Visible Red Diode Laser. **Photomed Laser Surg.**, v.28, n.1, p.63-8, 2010.
85. SILVEIRA, P.C.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol B.**, v.86, n.3, p.279-82., 2007.
86. SILVEIRA, P.C.L.; SILVA, L.A.; FRAGA, D.B.; FREITAS, T.P.; STRECK, E.L.; PINHO, R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. **J Photochem Photobiol.**, v.95, p. 89–92, 2009.
87. SIMÕES, A. Laser em baixa intensidade para profissionais da saúde – aula: **LELO – Laboratório Especial de Laser em Odontologia - Universidade de São Paulo**, São Paulo, SP, 25 de outubro de 2007.
88. SKULACHEV, V.P.; BAKEEVAM, L.E.; CHERNYAK, B.V.; DOMNINA, L.V.; MININ, A.A.; PLETJUSHKINA, O.Y.; SAPRUNOVA, V.B.; SKULACHEV, I.V.; TSYPLENKOVA, V.G.; VASILIEV, J.M.; YAGUZHINSKY, L.S.; ZOROV, D.B. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. **Mol Cell Biochem.**, v. 256-257, n.1-2, p.341-58, 2004.
89. SMEITINK, J.A.; van den HEUVEL, L.W.; KOOPMAN, W.J.; NIJTMAS, L.G.; UGALDE,C.; WILLEMS, P.H. Cell biological consequences of mitochondrial NADH: ubiquinone oxireductase deficiency. **Curr Neurovasc Res.**, v.1, n.1, p.29-40, 2004.
90. SMITH, R.A.; ORD M.J. Mitochondrial form and function relationships in vivo: their potential in toxicology and pathology. **Int Rev Cytol.**, v.83, p.63-134, 1983.

91. SUSSAI, D.A.; CARVALHO, P.T.C.; DOURADO, D.M.; BELCHIOR, A.C.G.; REIS, F.A.; PEREIRA, D.M. Low-level laser therapy attenuates creatine kinase levels and apoptosis during forced swimming in rats. **Lasers Med Sci.**, v.25, n.1, p.115-20, 2010.
92. TAFUR, J.; MILLS, P.J. Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms. **Photomed Laser Surg.**, v.26, n.4, p.323-8, 2008.
93. TANG, K.; XIA, F.C.; WAGNER, P.D.; BREEN, E.C. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. **Respir Physiol Neurobiol.**, v.170, n.1, p.16-22, 2010.
94. TRIEPELS, R.H.; van den HEUVEL, L.P.; TRIJBELS, J.M.; SMEITINK, J.A. Respiratory chain complex I deficiency. **Am J Med Genet.**, v.106, n.1, p.37-45, 2001.
95. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. **Lasers Surg Med.**, v.38, p. 682-8, 2006.
96. TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Implantation of low-level laser irradiated mesenchymal stem cells into the infarcted rat heart is associated with reduction in infarct size and enhanced angiogenesis. **Photomed Laser Surg.**, v.27, n.2, p.227-32, 2008.
97. WATAHA, J.C.; LOCKWOOD, P.E.; LEWIS, J.B.; RUEGGERBERG, F.A.; MESSER, R.L. Biological effects of blue light from dental curing units. **Dent Mater.**, v.20, n.2, p.150-7, 2004.
98. WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Applications of solutions containing lead and barium. **J Biophys Cytol.**, v. 4, n.6, p.727-30, 1958.
99. WIKIPEDIA – Succinate Dehydrogenase, disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Succinate_dehydrogenase - acesso em 10 de março de 2010.
100. WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **J Clin Laser Med Surg.**, v.16, n.3, p.159-65, 1998.
101. YAGI, T.; SEO, B.B.; NAKAMARU-OGISO, E.; MARELLA, M.; BARBER-SINGH, J.; YAMASHITA, T.; KAO, M.C.; MATSUNO-YAGI, A. Can a single subunit yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) remedy diseases caused by respiratory complex I defects? **Rejuvenation Res.**, v.9, n.2, p.191-7, 2006 .
102. YU W, NAIM JO, MCGOWAN M, IPPOLITO K, LANZAFAME RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol.**, v.66, n.6, p.866-71, 1997.



Apêndice

APÊNDICE

Apêndice A - Parâmetros e Grandeza física do laser

Para facilitar o entendimento do trabalho será descrito a seguir alguns parâmetros e grandezas físicas do laser, baseando-se nas informações de Lizarelli (2005).

Energia – quantidade de luz depositada no tecido irradiado, calculada pelo produto da potência pelo tempo de irradiação, dada pela unidade de medida **J** (Joule);

Densidade de energia (dose) – relação da quantidade de energia aplicada com a área dessa aplicação, ou seja, a distribuição da energia por unidade de área, dada pela unidade de medida de **J/cm²** (Joule por centímetro quadrado);

Potência – taxa em que a energia é transmitida, ou seja, a relação da energia irradiada pelo tempo de irradiação, dada em **W** (Watt ou J/s – Joule por segundo);

Intensidade (densidade de potência ou irradiância) – quantidade de energia aplicada pela área de aplicação, dada pela unidade de **W/cm²** (watt por centímetro quadrado), é o parâmetro que define se o laser é de alta ou baixa intensidade, assim todo laser que alcance mais de 10W/cm² de intensidade será considerado de alta potência;

Frequência: é a quantidade de pulsos do laser por segundo, designada em **Hertz (Hz)**. Existem aparelhos de laser com ondas pulsadas e ondas contínuas (*Continuous Wave – CW*), nesse caso não existe frequência;

Área do spot de irradiação: dada por convenção em **cm²**. Quanto maior a área de aplicação, menor será a densidade de energia aplicada, devido à concentração da energia;

Comprimento de onda – é a distância entre valores repetidos num padrão de onda (fig 15). Nesse caso na ordem de **nm** (nanômetros). Quanto maior é o comprimento de onda menos energia a onda eletromagnética é capaz de carregar, porém maior é o seu poder de penetração.

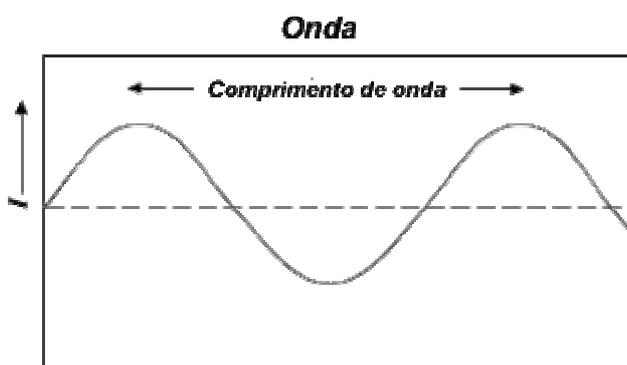


Fig. 15 – Comprimento de Onda

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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