

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CARLOS RICARDO DE QUEIROZ MARTINIANO**

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A  
MARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS COM  $^{99m}\text{Tc}$  *IN*  
*VITRO* E CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS *IN VIVO*.**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOFÍSICA**

**RECIFE**

**2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**  
**MESTRADO EM BIOFÍSICA**

**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A  
MARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS COM  $^{99m}\text{Tc}$  *IN*  
*VITRO* E CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS *IN VIVO*.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE  
MESTRADO EM BIOFÍSICA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO PARA A OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM BIOFÍSICA.

**CARLOS RICARDO DE QUEIROZ MARTINIANO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DRA. MARIA TERESA  
JANSEM DE A. CATANHO**

**RECIFE**

**2003**

## Ficha Catalográfica

MARTINIANO, Carlos Ricardo de Queiroz.

T197p Influência da Radiação não Ionizante sobre a Marcação de Células Sangüíneas com  $^{99\text{M}}\text{Tc}$  in vitro e Cicatrização em Camundongos in vivo / Carlos Ricardo Martiniano de Queiroz – Recife – PE, 2003.

Orientador: Sérgio Eduardo Montes Carneiro.

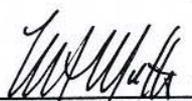
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas.

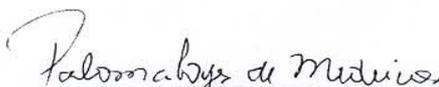
01-0167-BFE

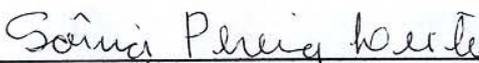


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA  
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
**MESTRADO EM BIOFÍSICA**

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO ALUNO **CARLOS RICARDO QUEIROZ MARTINIANO**, APRESENTADA, ÀS NOVE HORAS, NO AUDITÓRIO DO DEPTO. BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA (DBR) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (CCB) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), AOS NOVE DIAS DO MÊS DE OUTUBRO DE DOIS MIL E TRÊS, INTITULADA: "**INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO NÃO IONIZANTE SOBRE A MARCAÇÃO DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS COM  $^{99m}\text{Tc}$  IN VITRO E CICATRIZAÇÃO EM CAMUNDONGOS IN VIVO**" E ORIENTADA PELA PROFA. MARIA TERESA JANSEM (DEPTO. BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA/UFPE). A BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELOS PROFESSORES DOUTORES: MAURICY ALVES DA MOTTA (DEPTO. BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA/UFPE) – NA QUALIDADE DE PRESIDENTE - EM SUBSTITUIÇÃO AO MEMBRO TITULAR PROFA. JULIANNA FERREIRA CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE (DEPTO. ANTIBIÓTICOS/UFPE), PALOMA LYS DE MEDEIROS (DEPTO. HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA/UFPE) E SÔNIA PEREIRA LEITE (DEPTO. HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA/UFPE), FOI APRESENTADA AOS PRESENTES PELA PROFA. MARIA TERESA JANSEM CATANHO (COORDENADORA DO MESTRADO EM BIOFÍSICA). A SEGUIR, O MESTRANDO EXPÔS SEU TRABALHO EM TEMPO HÁBIL. NA SEQUÊNCIA, OS EXAMINADORES PROCEDERAM AS ARGUIÇÕES E O PARECER FINAL. O RESULTADO FOI O SEGUINTE: PROF. MAURICY ALVES DA MOTTA: **APROVADO**, PROFA. PALOMA LYS DE MEDEIROS: **APROVADO**, PROFA. SÔNIA PEREIRA LEITE: **APROVADO**. DIANTE DAS MENÇÕES CITADAS E DE ACORDO COM O REGIMENTO DA PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA E A RES. 03/98 DO CCEPE O ALUNO FOI CONSIDERADO **APROVADO**, FAZENDO JUZ AO TÍTULO DE **MESTRE EM BIOFÍSICA**. NADA MAIS HAVENDO A REGISTRAR FIRMAM ESTE DOCUMENTO OS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA. RECIFE, 09 DE OUTUBRO DE 2003.

ASS:   
PROF. MAURICY ALVES DA MOTTA

ASS:   
PROFA. PALOMA LYS DE MEDEIROS

ASS:   
PROFA. SÔNIA PEREIRA LEITE

*confere original*  
*Valeria*  
Valéria Lemos de Oliveira  
Secretária do Mestrado em  
Biofísica

Quando a sabedoria penetrar em teu coração,  
E o saber deleitar a tua alma,  
A reflexão velará sobre ti,  
Amparar-te-á a razão

**Provérbios**

## **Minha Eterna Gratidão**

Ao meu pai Carlos Rolim Martiniano, pelos seus ensinamentos profissionais e de vida, que diariamente ponho em prática. A meu inesquecível pai, que sempre me incentivou a percorrer como ele, o caminho do magistério, à sua maneira sempre positiva de encarar a vida, à sua facilidade de sonhar e à sua capacidade intelectual e espiritual de lutar por todos os seus sonhos. Graças a ele estamos concluindo mais uma etapa de nossa vida profissional.

*Dedico este trabalho aos meus pais Carlos Rolim e Livia, que sempre me incentivaram, a minha querida esposa Marise e aos meus filhos Manuela e Emanuel, razões de todo o meu esforço.*

## **AGRADECIMENTOS**

- ▶ A Deus pelo Dom da vida.
- ▶ A professora Maria Teresa Jansem pelo incentivo, sua solidariedade, seus ensinamentos profissionais e pessoais e pela oportunidade de realizar esta tese sob sua orientação.
- ▶ A minha esposa Marise que sempre me apoiou nos momentos difíceis.
- ▶ A Dra. Grace Mary e Dra. Simey Magnata pela sua bondade e ensinamentos durante a fase experimental e conclusão dos trabalhos.
- ▶ Aos alunos de Iniciação Científica Edgar, Jailson e Marília pela ajuda inestimável para a realização dos experimentos.
- ▶ Aos colegas do Curso de Mestrado, pela convivência agradável e enriquecedora em todos os momentos do curso.
- ▶ A Universidade Vale do Acaraú pelo convênio com a Universidade Federal de Pernambuco.
- ▶ A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A densidade energética de baixa potência (Laser e campo eletromagnético) vem sendo utilizada, nos últimos anos, com bastante frequência na área médica e odontológica. O principal uso do Laser é auxiliar o reparo tecidual, para aliviar a dor, controlar a inflamação e o edema. Enquanto que, a ação de campos eletromagnéticos de baixa frequência sobre os seres vivos é alvo de estudo ao longo dos últimos anos e tem se constatado a sua interferência sobre a debilidade do sistema endócrino. Vale ressaltar que o estudo de marcação das hemácias com tecnécio-99m é usado para diversas avaliações em medicina nuclear incluindo o estudo do volume sanguíneo em tratamento intensivo neurológico. Este trabalho visa avaliar a influencia da radiação não ionizante sobre a marcação de hemácias "in vitro" e avaliar o efeito do laser na cicatrização em camundongos. Para isto foram utilizadas amostras de sangue de ratos da linhagem Wistar com 60 dias de idade pesando cerca de 240g. O sangue foi colhido por punção cardíaca e dividido em dois grupos. O primeiro para ser submetido à indução com Laser de Baixa Potência (LBP) nas seguintes densidades energéticas separadamente: 3, 6, 9 e 18 J/cm<sup>2</sup>. Nos experimentos, com a indução do LBP foram utilizados o EDT A e a Heparina como anticoagulante. O segundo grupo foi submetido a um campo eletromagnético (CEM) de 60 Hz durante 2, 4, 17 e 21 horas separadamente. Após a indução do laser e do campo eletromagnético as amostras de sangue foram submetidas a marcação com Tecnécio 99m (<sup>99m</sup>Tc). Os resultados mostram que a presença de EDT A e Heparina no sangue, como anticoagulante é capaz de modificar a captação de tecnécio-99m pelas hemácias. A indução do laser promove uma redução da capacidade de ligação do tecnécio-99m a partir de 3J/cm<sup>2</sup> obtendo uma redução em torno de 50% e permanecendo inalterada até 18J/cm<sup>2</sup>. Por outro lado, pode-se verificar que o campo eletromagnético também altera a capacidade de ligação em função do tempo de exposição, porém a inibição da captação pelas hemácias é menos acentuada que o laser. No experimento "in vivo" com camundongos machos, após incisões no abdome da ordem de 1 cm, com posterior aplicação do laser na densidade energética de 3J/cm<sup>2</sup>, na incisão esquerda, observa-se que 48 horas após as aplicações, o tecido epitelial e conjuntivo, macroscopicamente, encontra-se totalmente livre de inflação e infecção e com uma cicatrização superficial mais pronunciada que a incisão direita. Pode-se concluir que o laser e o campo eletromagnético promovem alterações na marcação dos elementos sanguíneos, e o laser é capaz de acelerar o reparo celular.

## ABSTRACT

The energy density of low potency (Laser and electromagnetic field) comes being used, in the last years, with sufficient frequency in the medical and dentistry area. The main use of the Laser is auxiliary the tecidual repair, to alliviate pain, to contrai the inflammation and oedema. While that, the action of the low frequency electromagnetic field on the livings creature is studied in the last years and interfer on the endocrine system. The study of labeling red blood cells with  $^{99m}\text{Tc}$  is used for diverge evaluations in nuclear medicine including the study of the sanguine volume in neurological intensive treatment. This paper aims to evaluate influences of the not ionizing radiation on the uptake of red blood cells "in vitro" and for evaluate the effect of the laser in the cicatization in mice. For this, samples of ancestry Wistar rats blood was used with 60 days of age weighing about 240g. The first experiment was applied differents doses of gallium arsenid laser witht energy density of: 3, 6, 9 and 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . The experiment was realized with EDT A and Heparina as anticoagulating. The second group was submitted to an electromagnetic field (CEM) of 60 Hz during 2, 4, 17 and 21 hours separately. After the induction of the laser and the eletromagnetic field, the samples of blood were submitted the labeling with  $^{99m}\text{Tc}$ . The results show that the presence of EDTA and Heparina in the blood, as anticoagulating, modify the  $^{99m}\text{Tc}$  uptake. The induction of the laser promotes a reduction of the capacity of  $^{99m}\text{Tc}$  labeling from  $3\text{J}/\text{cm}^2$  reducing on around 50% and remaining unchanged until  $18\text{J}/\text{cm}^2$ . Henceforth, it can be verified that the electromagnetic field algo modifies the capacity of labeling in function of the exposition time, however the inhibition of the red blood cells uptake is less that the laser. The experiment "in vivo" with male mice, after incisions in abdome of the arder of one cm, with posterior application of the energy density laser of  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , in the left incision, were observed 48 hours after, the epithelial and conjunctive tissue showed without inflamation and infection and with a cicatrize superficial than the right incision. Concluded that the laser and the electromagnetic field promote alterations in the labeling on the elements blood, and the laser is capable to speed up the cellular repair.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- CEM - Campo Eletromagnético
- EGF - Fator de Crescimento Endotelial
- EMC - Matriz Extracelular
- FgFb - Fator de Crescimento Fibrablastico
- IL-1 - Interleucina-1
- InGaAIL-Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio
- LBP - Laser de Baixa Potência
- LET - Energia de Transferência Linear
- PDGF - Fator de Crescimento derivado de Plaquetas
- PET - Tomografia por Emissão Positron
- PMN - Polimorfonucleares
- SPECT - Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
- TNF - Fator de Necrose Tumoral
- VSC - Volume Sanguíneo Cerebral
- TGF - Fator de Transformação do Crescimento

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Gráfico da porcentagem da captação do Tecnécio no plasma e nas hemácias frente a indução com o laser.....	46
Fig. 2	Gráfico da porcentagem de captação do Tecnécio nas porções solúveis e insolúveis das células frente a indução com o Laser.	47
Fig. 3	Gráfico da porcentagem de captação do Tecnécio nas porções solúveis e insolúveis no plasma frente a indução com o Laser..	48
Fig. 4	Gráfico da porcentagem de captação do Tecnécio no plasma e nas hemácias frente ao campo eletromagnético de $GOH_2$ .....	49
Fig. 5	Gráfico da porcentagem de captação do Tecnécio na porção insolúvel das células frente a ação do campo eletromagnético de $GOH_2$ .....	50
Fig. 6	Gráfico da porcentagem de captação do Tecnécio na porção solúvel e insolúvel do plasma frente a ação do campo eletromagnético.....	52

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Considerações Gerais .....	13
1.2 O Laser .....	13
1.2.1 Considerações gerais .....	14
1.2.2 História do Laser .....	15
1.2.3 Propriedades da Luz Laser .....	16
1.2.4 A Radiação Laser.....	17
1.2.4.1 Propriedades Físicas.....	17
1.2.4.2 Emissão Espontânea.....	17
1.2.4.3 Emissão Estimulada.....	18
1.2.5 Classificação dos Lasers .....	19
1.2.5.1 Tipos de Lasers.....	19
1.2.6 Emissores de Laser .....	20
1.2.6.1 Cavidade Ressonante.....	20
1.2.6.2 Fonte de Energia .....	20
1.2.7 Efeitos Terapêuticos da Luz Laser.....	20
1.2.7.1 Efeito Analgésico .....	20
1.2.7.2 Efeito Antinflamatório .....	21
1.2.8 Interação Tecidual .....	22
1.2.8.1 Efeitos Primários ou Diretos .....	22
1.2.8.2 Efeitos Secundários ou Indiretos .....	23
1.2.8.3 Aspectos Moleculares .....	23
1.2.8.4 Bases da Aplicação Terapêutica do Laser .....	23
1.3 A Ação do Campo Eletromagnéticos sobre Organismos Vivos .....	25
1.3.1 Campos Elétricos e Magnéticos .....	26
1.3.1.1 Acoplamento a Campos Elétricos de Baixa Freqüência.....	28
1.3.1.2 Acoplamento a Campos Magnéticos de Baixa Freqüência ..	29
1.3.1.3 Absorção da energia de campos eletromagnéticos .....	29
1.3.2 Mecanismos de Interação Celular.....	30

1.3.3 Bases Biológicas para Limitar a Exposição (até 100KHz) .....	30
1.4 Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tecnécio 99m. ....	32
1.5 Processo de Cicatrização Tecidual.....	37
2. OBJETIVOS .....	41
2.1 Gerais .....	41
2.2 Específicos .....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Obtenção das Amostras de Sangue .....	42
3.1.1 Indução do Laser nas Amostras Sangüíneas .....	42
3.1.2 Indução do Campo Eletromagnético nas Amostras .....	42
3.2 Método da Marcação das Hemácias e Proteínas Plasmáticas com Tecnécio 99m .....	43
3.3 Experimento “In Vivo” .....	44
3.4 Análise estatística .....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Indução das Células Sangüíneas com Laser de Baixa Freqüência utilizando EDTA como Anticoagulante .....	46
4.2 Indução das Células Sangüíneas com o Laser de Baixa Potência utilizando Heparina como Anticoagulante.....	47
4.3 Indução das Células Sangüíneas com o Campo Eletromagnético de 60 Hz.....	48
4.4 Observações da Reparação de Feridas Cirúrgicas em Camundongos, usando o Laser de Baixa Potência .....	50
5. DISCUSSÃO .....	53
6. CONCLUSÕES .....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

Atualmente, a ciência tem evoluído rapidamente e, estimulando os profissionais da área de saúde para a necessidade de constantes atualizações. O Laser de Baixa Potência (LBP) vem sendo utilizado em diversas especialidades, nas áreas da Física, da Biologia e da saúde como um todo (MELLO; MELLO, 2001). O LPB é utilizado principalmente como auxiliar no reparo tecidual, para aliviar a dor, controlar a inflamação e o edema.

Os aparelhos de LBP vêm povoando aos poucos os consultórios dos odontológicos, principalmente dos dentistas que se dedicam à cirurgia e ao tratamento das dores relacionadas com a odontologia (GENOVESE, 2000). Cada vez, mais pessoas em sendo tratadas com o uso do LBP para fins terapêuticos (GENOVESE, 2000).

Atualmente, os campos eletromagnéticos estão se tornando cada vez mais importantes, pelo fato de que existe um crescente aumento do número de equipamentos elétricos e eletrônicos que utilizam as radiações eletromagnéticas, os quais estão cada vez mais expondo esse tipo de radiação em nosso meio (MALMIVUO; PLONSEY, 1995).

A marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o  $^{99m}\text{Tc}$  vem sendo muito utilizado dentro da medicina nuclear em especial na tomografia computadorizada por emissão de fóton único. (CORDES et al., 1988). Assim como as hemácias marcadas por drogas altera o resultado final do exame (CORDES et al., 1988).

Este trabalho coloca a energia do LBP em contato com os elementos sangüíneos que serão marcados com o  $^{99m}\text{Tc}$ . Os elementos sangüíneos também

são submetidos a um campo eletromagnético (CEM) e em seguida estes elementos sangüíneos são marcados com o Tecnécio -99m.

Em um experimento adicional, promovemos incisões cirúrgicas em camundongos e em seguida realizamos indução com o LBP e observamos o tempo do reparo tecidual, comparando-se com uma incisão controle no mesmo animal, esta última não é exposta ao tratamento com laser.

## **1.2. O Laser**

### **1.2.1. Considerações Gerais**

Laser é uma forma de energia que se transforma em energia luminosa, visível ou não, dependendo da matéria que produz esse tipo de radiação (BOECHAT, 1999; MISERANDINO, 1995).

Os lasers são fonte de radiação eletromagnética ou luz, possuindo, no entanto, algumas características especiais que as diferem de outras fontes de luz, como uma lâmpada incandescente (BOECHAT, 1999).

O emprego da luz, uma das mais belas formas de energia pura, vem sendo utilizada desde os primórdios da civilização, para fins terapêuticos, principalmente no combate dos processos dolorosos e inflamatórios. Neste particular, destaca-se o laser (GENOVESE, 2000).

As propriedades terapêuticas do laser vêm sendo estudadas desde a sua descoberta por Einstein em 1917. Sua ação analgésica é observada a nível de receptores periféricos até o estímulo no sistema nervoso central. A ação antiinflamatória e antiedematosa são exercidas mediante a aceleração da microcirculação, originando alterações na pressão hidrostática capilar, com reabsorção do edema e eliminação do acúmulo de catabólitos intermediários. Por outro lado, o laser aumenta o número de células nos tecidos irradiados acelerando o processo de mitose (COLLS, 1984).

### 1.2.2. História do Laser

A partir da teoria de Einstein (1917), Shawlow e Townes formularam os princípios pelos quais os lasers operam, e em 1958 demonstraram a possibilidade de construir um laser, quando simultaneamente, na antiga URSS, os cientistas Basov e Projomov também verificaram a possibilidade de construção de um aparelho a laser (BENEDICENTI, 1989).

O primeiro aparelho a laser que surgiu foi desenvolvido por Theodore Maiman em 1960, usando como material o rubi, gerando, assim, o primeiro laser sólido. Em 1961 Lavan e colaboradores. desenvolveram o laser gasoso de He-Ne (GENOVESE, 2000).

Em 1964, Patel et al desenvolveram o laser de dióxido de carbono, que emitia radiação na faixa vermelha do espectro visual, e o laser de argônio (BRUGNERA ; PINHEIRO., 1989).

Em 1968, Goldman et al. publicaram os primeiros trabalhos na área da cirurgia buco-maxilo-facial. Neste mesmo ano o Laser médico volta a ser assunto de grande interesse nos Estados Unidos, com o surgimento do Laser de Argônio, um laser cirúrgico com maior controle do operador (CATONE, 1997).

Segundo Hodge (1999), somente em 1982 o cirurgião- dentista Benedicenti publicou uma gama de trabalhos sobre a ação da luz Laser atuando na bioestimulação celular, comprovando, através de experiências hospitalares e na Universidade de Gênova, Itália, um aumento da ATP mitocondrial em cerca de 22%. Benedicenti, ainda em 1982, observou a comprovação do efeito analgésico em humanos, através do método radioimunológico, com aumento de betaendorfina no líquido cefalo-raquidiano, depois da irradiação com Soft Laser. Em 1984, editou o manual de laserterapia para cavidade oral, no qual descreve inúmeras utilizações na odontoestomatologia, dando destaque especial para o tratamento de elementos dentais com hipersensibilidade dentária tanto de origem traumática, pelo preparo protético, quanto por diversas fontes, bem como por retrações gengivais devido a problemas periodontais.

### 1.2.3. Propriedades da Luz Laser

A luz laser tem como característica ser um feixe de luz monocromática, emitindo radiações com um único comprimento de onda, orientado na mesma direção e sentido. Sua direção única permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos. São justamente estas características que fazem o laser de baixa intensidade apresentar propriedades terapêuticas (BENEDICENTI, 1989; BRUGNERA JR., 1998)

De acordo com Genovese (2000), a luz ou radiação eletromagnética de um Laser representa um fluxo luminoso de alta intensidade de energia. A energia laser não existe na natureza e é produzida a partir de algum tipo de energia, como uma lâmpada, que estimula um grande número de elétrons em repouso, os quais são capazes de produzir fótons de luz e este processo desencadeia uma ação que possa adquirir as três principais características dos Lasers que são:

#### a) Monocromaticidade

A luz laser é composta de fótons, todos da mesma cor e todos com o mesmo comprimento de onda. É, portanto uma luz pura. Essa característica é importante devido à absorção seletiva do tecido humano. Ao contrário, a luz branca é composta de fótons de várias cores, conseqüentemente, de vários comprimentos de onda.

#### b) Coerência

É uma das propriedades da luz laser que a distingue de outras formas de luz. E devido à emissão estimulada que gera fótons coerentes cujas energias se somam e viajam na mesma direção, movendo-se em fases no tempo e no espaço.

#### c) Colimação

A luz laser é unidirecional e, por ser paralela ao eixo do tubo que a produz, possui divergência mínima, ou seja, o feixe de fótons é colimado (paralelo).

A pequena divergência permite que através de um sistema de lentes se consiga concentrar toda a energia do laser em um ponto focal.

#### **1.2.4. A Radiação Laser**

##### **1.3.4.1. Propriedades Físicas**

A luz laser é uma radiação eletromagnética, não ionizante, bastante diferente da luz fluorescente comum com propriedades específicas (LOPEZ, 1990)

A radiação laser pode ser refletida, absorvida ou espalhada pelo tecido. Sua monocromaticidade determina a absorção seletiva pelos cromóforos, e cada comprimento de onda terá um tipo diferente de interação no tecido alvo (PINHEIRO, 1997; VITRAL, 2001).

A terapia laser não tem efeito cumulativo sobre os tecidos e acelera a atividade mitótica. Quando há agressão ao tecido, as células são estimuladas promovendo uma despolarização da membrana celular, alterando a passagem de íons, e conseqüentemente seu metabolismo; quando usamos uma baixa intensidade de energia, estaremos estimulando suas mitocôndrias, induzindo a repolarização da membrana (BENEDICENTI, 1989; KERT; ROSE, 1989).

##### **1.2.4.2. Emissão Espontânea**

A luz é uma forma de energia gerada, emitida ou absorvida por átomos ou moléculas. Para emitir energia, o átomo ou molécula precisa ser levado a um nível de excitação de energia acima do seu estado natural de repouso. Os átomos, e os seres humanos, não conseguem manter a excitação por períodos longos, conseqüentemente, eles têm uma tendência natural de livrar-se do excesso de energia, na forma de emissão de partículas ou pacote de ondas luminosas chamadas fótons. Esse fenômeno é chamado de emissão espontânea da luz (GENOVESE, 2000)

De acordo com Brugnera (1998), a energia de excitação pode ser causada por choque entre átomos, partículas e moléculas, e ainda por ondas eletromagnéticas.

O estado estável corresponde ao nível mínimo de energia e ao receber mais energia passa ao estado excitado, sendo este estado anormal e o átomo excitado fica instável e deve retornar ao estado de repouso (estável), liberando espontaneamente energia adicional. Essa energia pode ser transformada em energia cinética durante as colisões, resultando em um aumento de temperatura. Essa perda de energia pode também originar uma radiação eletromagnética (BRUGNERA, 1998; CICONELI; BRAGA; BERRO 1997).

A emissão espontânea de radiação é considerada incoerente porque os átomos liberam energia independentemente entre si, sem direção ou polaridade entre as emissões. Desta maneira a radiação é multidirecional (KERT, 1989).

#### 1.2.4.3. Emissão Estimulada

O princípio da emissão estimulada foi primeiramente proposto por Einstein, 1916, através de trabalhos na área de física quântica, publicados no seu tratado, Zur Quantum Theorie der Strahlung, no qual foram delineados os princípios que tornariam possível o desenvolvimento da tecnologia dos Lasers e suas aplicações (LEHNERT, 1996).

O processo de estimulação ocorre quando uma fonte energética fornece energia para o átomo de um meio. Os átomos que absorvem parte da energia se tornam excitados e recebem mais energia do que podem reter, e logo após liberam esta energia na forma de radiação laser (TASAKI, 1999).

A emissão contínua é resultante da excitação contínua de um meio ativado por descarga elétrica (lasers gasosos). A emissão pulsátil ou chamada de relaxada é resultante de bombardeamento pulsátil de um meio ativo. Esse meio é progressivamente bombardeado até chegar a um nível de excitação suficiente para produzir emissão laser (KIMURA, 1987)

### 1.2.5. Classificação dos Lasers

Os lasers podem ser classificados em dois grandes grupos: Lasers não-cirúrgicos, ou LIL T (low-Intensity Laser Treatment) ou terapêutico; e os cirúrgicos ou HILT (High-Intensity laser Treatment) (MISERANDINO, 1995).

Os lasers cirúrgicos podem ser ainda classificados quanto à forma de emissão da radiação em contínuos, pulsáveis e q-switched (BRUGNERA, 1998).

Segundo Pick (1993) os lasers podem ser classificados quanto ao meio ativo, que é o material presente no interior da cavidade óptica, e que geralmente determina o comprimento de onda, a potência, e a energia gerada pelo laser, em quatro grupos: sólido, líquido, gasoso e semicondutores:

- a) Lasers Sólidos: O seu meio ativo é constituído por uma pedra preciosa, como o rubi, que foi o primeiro laser a surgir, ou por cristais especiais como: ítrio-alumínio-granada (Y AG). Ex.: Nd-YAG, Ho-YAG.
- b) Laser Gasoso: Produzem energia laser através da excitação de meios gasosos atômicos neutros, ionizados ou moléculas. Ex.:  $\text{Co}_2$ , Argônio, Criptônio, Hélio-Neônio
- c) Lasers Líquidos: São corantes orgânicos diluídos em solvente líquido que produzem uma grande quantidade de comprimentos de onda. Ex.: radamina e cumarina.

#### 1.2.5.1 Tipos de Lasers

Segundo Genovese (2000) os tipos de lasers são:

- a) Semicondutores: A radiação laser é emitida no interior de uma junção positivo-negativo de um diodo semicondutor. Ex.: Arseniato de Gálio e Alumínio (AsGaAl). São lasers de baixa potência, usados para aparelhos portáteis e miniaturizados. Tem aplicação em acupuntura e em bioestimulação usando radiação visível e infravermelha.

- b) Excímeros: São lasers que usam moléculas excímeras ou excípleras, que são moléculas diatômicas em um meio gasoso de grande rendimento (KrF, XeCl).

## **1.2.6. Emissores de Laser**

### **1.2.6.1. Cuidade Ressonante**

Este é formado por um tubo reto contendo uma grande quantidade de átomos ou moléculas iguais. Em cada extremidade existem espelhos, sendo que numa ponta, o espelho é totalmente refletor, e na outra ponta (saída), é parcialmente refletor (MISERANDINO, 1995).

### **1.2.6.2. Fonte de Energia**

Os átomos são excitados para um nível de energia mais elevado por uma fonte extrema (elétrica, química, ou mecânica). Por meio do mecanismo de emissão espontânea, que acontece na forma aleatória, os átomos começam a emitir fótons que viajam em várias direções dentro da cavidade ressonante. Aqueles que batem contra a parede são absorvidos na forma de calor, desaparecendo de cena. Por outro lado, os fótons que viajam na direção paralela ao eixo da cavidade ressonante têm grande probabilidade de encontrar outro átomo excitado e, desta forma, estimular a emissão de fótons adicionais, coerentes com o fóton estimulador e viajando na mesma direção ao longo da cavidade. Esses dois fótons continuam sua viagem estimulando mais fótons e assim sucessivamente caracterizando a amplificação luminosa. Esse efeito é intensificado pelos espelhos (GENOVESE, 2000).

## **1.2.7. Efeitos Terapêuticos da Luz Laser**

### **1.2.7.1. Efeito analgésico**

A diminuição da intensidade de dor e até a analgesia ocorre devido a ação sobre enzima cicloxigenase, interrompendo a conversão do ácido araquidônico

em prostaglandina que facilita a ação da bradicinina. Por outro lado, a aplicação de LBP aumenta a produção de endorfinas que são fatores analgésicos fisiológicos, e também aumenta a excreção de glicorticóides que inibem a síntese de  $\beta$ -endorfina (HANSSON, 1989; KIM, 1998).

A terapia a laser atua mantendo o potencial de membrana, evitando a sua despolarização, através do aumento da síntese de ATP que atua diminuindo a permeabilidade do Na<sup>+</sup> nas fibras nervosas, dificultando a transmissão do impulso nervoso (BOECHAT, 1999).

#### 1.2.7.2. Efeito antiinflamatório

A inflamação é caracterizada por uma seqüência de eventos que se inicia após uma agressão sofrida pelo organismo, ou seja, compreende as alterações em resposta à lesão. Vale salientar que esta lesão poderá ser causada por: bactérias (microorganismos patógenos), traumatismo, agente químico, calor ou qualquer outro fenômeno (RANG, 1992). Logo, tem como objetivo restabelecer as condições fisiológicas e estruturais alteradas em função do desequilíbrio provocado pelos elementos agressores. Assim, está sinergicamente relacionada com a necessidade de eliminação ou estabilização do agente agressor e com a reestruturação das regiões lesadas. As substâncias mediadoras envolvidas no processo inflamatório são várias, como: histamina (vasodilatadora), bradicininas, serotoninas, eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e outras que são liberadas pelas células lesadas nos líquidos circulantes, fazendo com que haja um aumento de permeabilidade dos capilares vizinhos (facilita diapedese dos leucócitos), logo permite que grandes quantidades de líquidos, proteínas e fibrinogênio extravasem para os tecidos resultando em edema extracelular (JONES; DERBYSHIRE, 1996).

Por outro lado, subjazem aos efeitos benéficos da inflamação reações que podem causar lesões por vezes mais pronunciadas que a lesão causada pelo elemento agressor inicial. Dessa forma, surgiu a necessidade de controlar o processo inflamatório.

O mecanismo da inflamação atua principalmente no tecido conjuntivo vascularizado, assim como no plasma ou nas células sangüíneas e estruturas extravasculares do tecido conjuntivo. Dentre as células sangüíneas encontram-se neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo que participam da inflamação são os mastócitos, os macrófagos e os fibroblastos. A matriz extracelular é constituída por proteínas fibrosas, glicoproteínas e proteoglicanos.

A inflamação pode ser caracterizada em dois tipos: a inflamação aguda e a inflamação crônica. A inflamação aguda é de curta duração, caracterizada pelo extravasamento de leucócitos do sangue para o tecido extravascular, fenômeno conhecido como diapedese. Além do extravasamento leucocitário, também ocorre a passagem de líquido do sangue para os tecidos sendo esta a principal causa do edema. Na inflamação crônica há uma proliferação de vasos sangüíneos além da presença de macrófagos e linfócitos (STADNYK; GAULDIE, 1991).

A terapia com LBP promove um aumento de mastócitos, aumentando a quantidade de histamina que provoca alterações circulatórias locais, como: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (BOECHAT, 1999; CATONE, 1997).

### **1.2.8. Interação Tecidual**

#### **1.2.8.1. Efeitos Primários ou Diretos**

Os efeitos primários segundo Mello e Mello (2001), estão subdivididos em:

- a) Efeito bioquímico - devido à ação da radiação laser ocorre o controle da liberação de substâncias endógenas como a serotonina, bradicinina, prostaglandinas e histaminas, bem como uma produção maior de ATP, acelerando a mitose.
- b) Efeito bioelétrico - a luz laser age sobre a "bomba de sódio", mantendo o potencial de membrana, que em condições patológicas pode chegar a zero.

- c) Efeito bioenergetico - observou-se que irradiando uma zona com laser, por indução biológica, as mais próximas serão também beneficiadas.

#### 1.2.8.2. Efeitos Secundários ou Indiretos

Mello e Mello (2001) descreve dois efeitos secundários da radiação laser:

- a) Estímulo à microcirculação - a radiação laser tem uma ação indireta sobre o esfíncter pré-capilar, estimulando um aumento da microcirculação
- b) Estimulo ao trofismo celular - como há um aumento da produção de ATP, a velocidade da mitose é aumentada, conseqüentemente o acelerado processo de reparação tecidual.

#### 1.2.8.3. Aspectos Moleculares

Pesquisas realizadas com LBP revelam o aumento na vitalidade funcional das mitocôndrias, proporcionando uma capacidade maior de regeneração e cicatrização dos tecidos sem uma ação degenerativa destes (COBB, 1997)

Benedicenti (1989), constatou a bioestimulação da luz laser nos tecidos, verificando um aumento de ATP mitocondrial e de  $\beta$ -endorfina no líquido cefaloraquidiano.

A aplicação do laser de baixa potência como terapêutica, aumenta a circulação periférica atuando como bioestimulante celular (BOECHAT, 1999).

#### 1.2.8.4. Bases da Aplicação Terapêutica do Laser

A Laserterapia pode ser bastante eficaz no tratamento das Disfunções Temporomandibulares, como foi pesquisado por Bezeur et al (1998) que aplicou laser em 27 pacientes com dor e disfunção temporomandibular durante cinco dias consecutivos e verificou que 80% dos pacientes tomaram-se assintomáticos, a abertura máxima bucal aumentou durante o tratamento, e a redução de sons (click e

estalido) na articulação durante a abertura e fechamento da boca diminuiu devido ao aumento do metabolismo celular, conseqüentemente uma maior produção de líquido sinovial.

Segundo Genovese (2000), o laser vermelho atua na biorregulação das organelas, enquanto o infravermelho atua na biorregulação da membrana citoplasmática. Dependendo do tipo de laser pode ser produzido um efeito biológico a nível celular que consiste na estimulação das mitocôndrias, determinando um aumento na produção de ATP. A esse mecanismo dá-se o nome de bioestimulação.

Sabe-se também que os mastócitos, sendo células bastante delicadas ao serem submetidos à agentes químicos, calor, frio, radiação ionizante e outras, liberam heparina que é anticoagulante e histamina que produz aumento da permeabilidade capilar, vasodilatação, incremento da drenagem linfática, e aumento da atividade fibroblástica, auxiliando a recomposição tecidual (COLLS, 1984; KIMURA, 1987).

Miserandino (1995), descreve os efeitos do feixe de luz laser nos tecidos como:

- a) Efeito fotomecânico: Com a incidência de um feixe de laser no tecido pode ocorrer um choque mecânico, o qual promove uma expansão do material em todos os pontos a partir do ponto irradiado.
- b) Efeito fotoablação: É o efeito laser na remoção da massa.
- c) Efeito fototérmico.  
Aos 43°C: alteração das proteínas, retração do tecido, hiperemia.  
Aos 50°C: menor atividade enzimática.  
Aos 60°C: desnaturação de proteínas, desidratação e coagulação.  
Aos 80°C: desnaturação do coagulo maior carbonização das proteínas.  
Aos 100°C: vaporização e ablação dos tecidos.
- d) Efeito fotoquímico: São alterações a nível mitocondrial com produção de ATP, acelerando a mitose, controla a produção de substâncias

liberadas nos fenômenos dolorosos como as prostaglandinas, prostaciclina, serotoninas, bradicininas, etc., desgranulação dos mastócitos, favorecendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar.

e) Efeito fotoelétrico: estimula através do aumento da produção de ATP, a manter o potencial de membrana (bomba de sódio), que em condições patológicas estão alterados. De acordo com Boechat (1999), dependendo da natureza do tecido e do comprimento de onda do laser podem ocorrer quatro tipos de interações com o tecido:

- Reflexão: Acontece quando a luz é refletida por um tecido e, portanto não há efeito terapêutico no tecido. A reflexão varia dependendo do tipo de pigmentação tecidual, da rugosidade da superfície e do ângulo de incidência dos feixes luminosos.
- Absorção: Ocorre quando a luz é absorvida, a energia radiante é transformada em energia térmica (calor). É esta energia térmica que provoca efeitos específicos nos tecidos. A absorção depende da composição do tecido, da pigmentação e do conteúdo de água, podendo provocar um efeito de fotoablação, que é a rápida vaporização dos tecidos.
- Difusão: é o espalhamento da energia laser dentro do tecido, sendo o resultado da reflexão aleatória da energia do seu ângulo original.
- Transmissão: refere-se à habilidade da energia de difundir-se por meio do tecido sem nenhum efeito, porém depende do tipo de tecido e do comprimento de onda.

### 1.3. A Ação do Campo Eletromagnético sobre Organismos Vivos

De acordo com Blank; Soo; Pepstein, 1995, o aumento exagerado nas taxas de Na, K-ATP ase quando o organismo é submetido aos campos

eletromagnéticos de 60Hz acarreta o aumento do nível de estresse na população submetida a esse tipo de radiação. Esta radiação é produzida, principalmente, pela própria instalação elétrica domiciliar ou do ambiente de trabalho. Muitos estudos tentando estabelecer uma correlação entre o aparecimento de diversas formas de câncer e a exposição aos campos eletromagnéticos variáveis de baixa frequência tem, sido feitos na última década (BALCER; ELIZABETH, 1995; ERREN, 1997; LOOMIS et al., 1994). Estudos epidemiológicos foram feitos sobre o risco de câncer em relação à exposição aos campos eletromagnéticos de baixa frequência (50/60Hz), das redes de distribuição de energia. (NATIONAL RADIOBIOLOGICAL PROTECTION BOARD, 1992, 1993 e 1994; SAVITZ, 1993; HEALTH, 1996; STEVENS; TENFORDE, 1996; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, 1996). A exposição aos campos eletromagnéticos pode causar aborto. De acordo com GOLDBERG (2000), embora não se tenha provado que o campo eletromagnético causa danos aos organismos vivos, também não é conclusivo o fato de que as ondas eletromagnéticas são inofensivas quando incidem dentro de uma certa potência e frequência. Wertheimer e Leeper, (1979) apresentam o primeiro estudo indicando que a exposição do meio ambiente a irradiações eletromagnéticas de 50 a 60Hz poderia aumentar os riscos de doenças crônicas.

### 1.3.1. Campos Elétricos e Magnéticos

Segundo o (INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, 1994) os campos elétricos existem com a presença de carga e os campos magnéticos resultam do movimento físico do campo elétrico.

Um campo elétrico  $E$ , exerce forças sobre uma carga elétrica e é expresso em volt por metro ( $\text{V m}^{-1}$ ) ou  $\text{V/m Watt/cm}^2$ .

Os campos magnéticos podem exercer forças físicas sobre cargas elétricas, mas somente quando tais cargas estão em movimento. Campos elétricos e magnéticos tem amplitude e direção. Um campo magnético pode ser especificado de duas maneiras: como fluxo de densidade magnética  $B$ , expresso em tesla (T) ou como campo magnético  $H$ , expresso em Ámpere por metro ( $\text{A m}^{-1}$ ). As duas

quantidades são relacionadas pela fórmula:  $B = \mu H$ , onde  $\mu$  é a constante de proporcionalidade (permeabilidade magnética). No vácuo e no ar, bem como em materiais não magnéticos (inclusive meios biológicos),  $\mu$  tem o valor de  $4 \pi \cdot 10^{-7}$  quando expresso em Henry por metro ( $\text{H} \cdot \text{m}^{-1}$ ).

Portanto, na descrição de um campo magnético, para finalidades de proteção, basta especificar uma das grandezas, B ou H.

Numa região de campo distante, o modelo de onda plana é uma boa aproximação para a propagação de campo eletromagnético. As características da onda plana são:

- ▶ As frentes de onda têm uma geometria plana
- ▶ Os vetores E e H e a direção de propagação são mutuamente perpendiculares.
- ▶ A fase dos campos E e H é a mesma. No espaço livre (vácuo), o quociente E/H é igual a 377 Ohm, que é o valor de impedância característica do espaço livre;
- ▶ A densidade de potência S, ie., a potência por unidade de área normal à direção de propagação, está relacionada aos campos elétricos e magnéticos, pela expressão:

$$S = EH = E^2/377 = 377 H^2$$

A situação na região do campo próximo é bem mais complicada, porque os valores máximos e mínimo dos campos E e H não ocorrem nos mesmos pontos ao longo da direção de propagação, como acontece na região de campo distante. Na região de campo próximo, a estrutura do campo eletromagnético pode não ser homogênea, e pode haver variações substanciais no valor da impedância de onda ( $377 \Omega$  no campo distante), poderá haver quase exclusivamente campos E em algumas regiões e campos H em outros.

A exposição a CEM variáveis no tempo resulta em correntes internas no corpo e absorção de energia nos tecidos, que dependem dos mecanismos de acoplamento e da freqüência envolvida.

O campo elétrico interno e a densidade de corrente estão relacionados pela Lei Ohm:

$$I = \sigma E$$

- ▶ onde  $\sigma$  é a condutividade elétrica do meio.

Mecanismos de acoplamento entre os campos e o corpo humano.

Há três mecanismos básicos de acoplamento, bem estabelecidos, através dos quais campos elétricos e magnéticos variáveis no tempo interagem diretamente com a matéria viva (UNEP/WHO/IRPRA, 1993) (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL RADIATION PROTECTION ASSOCIATION, 1993):

- ▶ Acoplamento a campos elétricos de baixa freqüência.
- ▶ Acoplamento a campos magnéticos de baixa freqüência.
- ▶ Absorção de energia de campos eletromagnéticos.

#### 1.3.1.1 Acoplamento a campos elétricos de baixa freqüência.

A interação de campos elétricos variáveis no tempo, com o corpo humano, resulta num fluxo de cargas elétricas (corrente elétrica), na polarização de cargas ligadas (formações de dipolos elétricos), e na reorientação dos dipolos elétricos já presentes no tecido. As amplitudes relativas destes diferentes efeitos dependem das propriedades elétricas do corpo, isto é, da condutividade elétrica (que rege o fluxo da corrente elétrica) e da permissividade (que rege a amplitude dos efeitos de polarização). A condutividade elétrica e a permissividade variam com o tipo de tecido do corpo e também dependem da freqüência do campo aplicado. Os campos elétricos externos ao corpo induzem no mesmo uma carga superficial; daí

resultando correntes induzidas no corpo, cuja distribuição depende das condições de exposição, do tamanho e forma do corpo, e da posição deste no campo.

#### 1.3.1.2. Acoplamento a campos magnéticos de baixa freqüência

A interação física de campos magnéticos variáveis no tempo, com o corpo humano, resulta na indução de campos elétricos induzidos e correntes elétricas circulantes. As amplitudes dos campos induzidos e a densidade da corrente são proporcionais ao laço (caminho fechado) escolhido, à condutividade elétrica do tecido, à taxa de variação e à amplitude da densidade do fluxo magnético. (UNEP / WHO / IRPA, 1993).

Para uma dada amplitude e freqüência do campo magnético, os campos elétricos mais intensos são induzidos onde as dimensões do laço são maiores; sendo que o caminho exato e a amplitude da corrente induzida em qualquer parte do corpo, dependerão da condutividade elétrica do tecido. (UNEP / WHO / IRPA, 1993).

O corpo não é eletricamente homogêneo, entretanto, as densidades de correntes induzidas podem ser calculadas, usando modelos que representam, de maneira realística, as propriedades anatômicas e elétricas do corpo e recorrendo a métodos computacionais, que tem grau elevado de resolução anatômica (UNEP / WHO / IRPA, 1993).

#### 1.3.1.3 Absorção da energia de campos eletromagnéticos

A exposição a campos elétricos e magnéticos de freqüência baixa resulta normalmente em uma absorção de energia desprezível, sem elevação mensurável da temperatura do corpo. Entretanto, a exposição a campos eletromagnéticos de freqüências acima de aproximadamente 100 KHz, pode conduzir a uma absorção significativa de energia e a um aumento de temperatura. Em geral, a exposição a um campo eletromagnético uniforme (onda plana) resulta em uma deposição e distribuição de energia altamente não uniforme dentro do corpo, que precisa ser avaliada por medidas dosimétricas e por cálculos ( UNEP / WHO / IRRA, 1993).

Com respeito à absorção de energia pelo corpo humano, os campos eletromagnéticos podem ser divididos em quatro faixas (DURNEY, MASSOUDI; ISKANDER, 1985):

- ▶ Frequência de aproximadamente 100KHz a 20MHz, nas quais a absorção no tronco diminui rapidamente com a frequência decrescente e pode ocorrer uma absorção significativa no pescoço e nas pernas.
- ▶ Frequências de aproximadamente 20MHz a 300MHz, nas quais pode ocorrer uma absorção relativamente alta no corpo todo, e até mesmo valores mais altos, se fazem consideradas ressonâncias em partes do corpo (por ex.: na cabeça)
- ▶ Frequências de aproximadamente 300MHz a vários GHz, nas quais ocorre absorção local significante e não uniforme.
- ▶ Frequências acima de 10GHz, nas quais a absorção de energia ocorre, principalmente, na superfície do corpo.

### **1.3.2. Mecanismos de Interação Celular**

Para os campos elétricos e magnéticos iniciarem ou promoverem efeitos adversos na saúde dos sistemas biológicos, eles devem engatilhar uma série de passos. Esta cadeia de eventos começa com a interação do campo com moléculas ou estruturas biológicas. O campo pode alterar o tamanho, a forma, a carga, estados químicos ou energéticos. Esta fase de transdução de energia deve envolver alguma transferência de energia para ocorrer um efeito na molécula ou estrutura biológica. A troca pode ser sentida e amplificada a menos que o sistema biológico produza uma resposta que possa ter conseqüência para o organismo (VALBERG; KAVET; RAFFERTY, 1997).

### **1.3.3. Bases Biológicas para limitar a exposição (até 100KHz)**

Com a possível exceção de tumores de mama, há pouca evidência, a partir dos estudos em laboratório, de que campos magnéticos de frequência de

distribuição de energia tenham um efeito de promoção de tumores. Embora sejam necessários estudos adicionais em animais, para esclarecer os possíveis efeitos de CEM sobre sinais produzidos em células e na regulação endócrina – ambos os quais pode influenciar o crescimento de tumores promovendo a proliferação celular – Só se pode concluir que não há, atualmente, nenhuma evidência consciente de efeitos cancerígenos destes campos e que, portanto, estes dados não podem ser usados como base para desenvolver diretrizes para exposição (TENFORDE, 1996).

Estudos em laboratório, com sistemas celulares e animais, não encontraram nenhum efeito bem fundamentado, de campos de baixa frequência, que seja indicador de efeitos prejudiciais à saúde, quando a densidade de corrente induzida está abaixo de  $10\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$ . (TENFORE, 1996)

Em níveis mais altos de densidade de corrente induzida ( $10 - 100\text{mA}\cdot\text{m}^{-2}$ ), tem sido coerentemente observados efeitos mais significativos em tecidos, tais como mudanças funcionais no sistema nervoso (TENFORDE, 1996).

Dados sobre o risco de câncer, associado com a exposição a CEM, de indivíduos morando perto de linhas de transmissão, são aparentemente consistentes ao indicar um pequeno aumento de risco de leucemia entre crianças, embora estudos mais recentes questionem esta fraca associação. Entretanto os estudos não indicaram um risco, da mesma forma elevado, de nenhum outro tipo de câncer infantil, ou qualquer outra forma de câncer em adultos. Desconhece-se a causa básica para a ligação hipotética entre a leucemia infantil e o fato de residir na proximidade imediata de linhas de transmissão. Se a ligação não está relacionada a CEM, gerados pelas linhas de transmissão, então fatores de risco desconhecidos para a leucemia teriam que estar relacionados com as linhas, de maneira a ser determinada. Na ausência de apoio por estudos em laboratório, os dados epidemiológicos são insuficientes para permitir o estabelecimento de uma diretriz de exposição (TENFORDE, 1996).

Tem havido relatos de aumento de risco de certos tipos de câncer, tais como leucemia, tumores de tecidos nervosos e limitadamente câncer de mama entre eletricitários. Na maioria dos estudos, os tipos de trabalho foram usados para

classificar os indivíduos de acordo com os núcleos de exposições presumidas a campos magnéticos. Alguns estudos mais recentes, entretanto, tem usado métodos mais sofisticados de determinação da exposição.

Em geral esses estudos sugeriram um aumento do risco de leucemia ou de tumores cerebrais, mas foram inconsistentes com referências ao tipo de câncer para o qual há a base de diretrizes para exposição ao CEM. Em um grande número de estudos epidemiológicos, não resultou nenhuma evidência consistente da existência de efeitos reprodutivos adversos (INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, 1994).

#### 1.4. A Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com $^{99m}\text{Tc}$

A ciência e a tecnologia utilizada no tratamento e diagnóstico de determinadas patologias tem sido direcionada em grande parte para a medicina nuclear. Esta se baseia na utilização de radiação para fins terapêuticos e diagnósticos. Um isótopo radioativo emite radiação e este isótopo está associado a uma molécula ou célula. A união da molécula ou célula ao isótopo chama-se radifarmaco. Os emissores de radiação gama ( $\gamma$ ) são utilizados para diagnóstico, eles têm menor energia de transferência linear (LET), ou seja, maior penetração no tecido e menor interação com a matéria. Em tomografia por emissão de pósitron (PET) utilizam-se os emissores de pósitron ( $\beta^+$ ) e em tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) utilizam-se emissores de radiação  $\gamma$ . Na terapêutica, utilizam-se os radioisótopos emissores de partículas beta ( $\beta^-$ ), que, por apresentarem maior interação com a matéria, são capazes de destruir um determinado alvo previamente escolhido. (HABERT, 1996).

Foi observado em 1896 por Henri Becquerel, que o Urânio era capaz de escurecer uma placa fotográfica. Marie e Pierre Curie chamaram este fenômeno de radioatividade e demonstraram sua ocorrência com o rádio, polônio e tório. Rutherford e Soddy definiram a radioatividade como um processo de transmutação

de um elemento instável em outro elemento com liberação de radiação (HABERT, 1996).

A descoberta da radioatividade induzida ou artificial em 1934 por Irene Curie e Frederick Juliot abriu um novo campo com enorme aplicabilidade, já que os radionuclídeos naturais em medicina nuclear apresentavam problemas em relação a meia vida longa, emissão de diferentes tipos de radiação, necessidade de complicados esquemas de radioproteção e dejetos altamente tóxicos. Durante os anos sessenta, o Tecnécio 99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), um radionuclídeo artificial foi introduzido na prática médica, outros radionuclídeos também utilizados na prática médica e em pesquisas biomédica são o cobalto-57, fósforo-32, índio-111, iodo-123, iodo-125, iodo-131, mercúrio-203, ouro-198 e tálio-201. (EARLY; SADEE, 1995)

A fonte primária para a produção direta de radionuclídeos é através de reatores nucleares e aceleradores de partícula. A fonte secundária consiste no método indireto conhecido como geradores de radionuclídeos. Os geradores de radionuclídeos geralmente são portáteis, ocupam pouco espaço e, ao contrário dos reatores e aceleradores de partículas, podem ser instalados facilmente em clínicas, hospitais ou centro de diagnósticos. O mais importante e mais utilizado é o gerador molibidênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ). (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).

O Tecnécio foi obtido artificialmente em 1937 por Pierre e Segré. Em 1957, apareceram os primeiros geradores de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  fabricados no Brookhaven National Laboratory, EUA, (EARLY; SADEE, 1995).

O Tecnécio 99m atualmente é o radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear para procedimentos diagnósticos (EARLY, 1995) como também em pesquisa básica. Este radionuclídeo tem vantagens que facilitaram o seu uso, por exemplo: é facilmente obtido através de geradores  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , portáteis, esses geradores podem ser instalados dentro de uma unidade de diagnóstico ocupando pouco espaço e com baixo custo; o Tecnécio tem meia vida de 6(seis) horas; emissão gama de 140 Kev, energia corpuscular desprezível; pequena dose de radiação é necessária para exames; dejetos radioativos desprezíveis; danos ambientais desprezíveis e possibilita a marcação de diferentes espécies de moléculas e células

(EARLY; SADEE, 1995; SAHA, 1997). A emissão radioativa de  $^{99m}\text{Tc}$  pode ser detectada por quase todos os aparelhos em medicina nuclear. (EARLY; SADEE, 1995; SAHA, 1997; SRIVASTAVA, 1996)

Na tabela periódica o  $^{99m}\text{Tc}$  está posicionado próximo ao manganês (Mn) e rênio (Re), mas sua química é similar a do Re. Como um metal de transição do grupo VIIB possui sete elétrons na sua última camada e está distante da configuração de um gás nobre, ele pode perder esses elétrons e passar para o estado de oxidação +7, formando o íon pertecnetado ( $\text{TeO}_4^-$ ). Graças à sua diversidade química é possível a sua incorporação por uma variedade de formas químicas, podendo assim marcar inúmeros radiofármacos. (EARLY; SADEE, 1995; HABERT, 1996; SRIVASTAVA; STRUB, 1990; DEUSANJEE, 1990)

De acordo com Saha (1997) os radionuclídeos são essencialmente aplicados em Ciências Biológicas como fonte de radicais ou como traçadores radioativos. Os traçadores radioativos são compostos que apresentam em sua constituição um elemento radioativo. Para serem aplicados em seres humanos, o radiotraçador deverá ter características como apirogênicidade, ser esteril, não provocar reações tóxicas ou anafilíticas e ser submetido a controle de qualidade. Uma vez que estas condições são satisfeitas o radiotraçador será denominado radiofármaco.

Continuando com Saha, o radiofármaco tem dois componentes: o radionuclídeo e o fármaco e será elaborado com base nas características de cada um destes componentes. O fármaco poderá ser escolhido por sua localização preferencial em um determinado órgão ou pela sua participação em processos fisiológicos ou patológicos de interesse. O fármaco poderá ser uma célula, um hormônio, um neurotransmissor ou uma medicação. Contudo que, o produto da interação entre o fármaco e o radionuclídeo seja um radiofármaco estável, capaz de exercer sua função com mais alto grau possível de especificidade.

O estudo específico de determinados órgãos e tecidos do corpo humano é possível graças à possibilidade de se adicionar o elemento radioativo em moléculas ou espécies biológicas. Estes órgãos têm afinidade específica por certas moléculas

que participam da sua estrutura ou do seu metabolismo. As características físico-químicas das espécies marcadas irão determinar a sua melhor aplicação. As moléculas mais utilizadas são: ácido tiomálico (estudo renal), albumina (estudo da volemia), dextran (vias linfáticas), enxofre coloidal (fígado e boca), ácido glucoheptônico (rim e cérebro), iminodifosfato (osso e coração), iodofenil (vesículas e vias biliares), macroagregados de albumina (pulmão), microagregados de albumina (fígado). Entre as espécies biológicas temos: cercárias de *Shistosoma mansoni*, *Diplococcus pneumonia*, *Duguesia tigrina*, *Escherichia coli*, fibroblastos, hemácias, lucócitos e plaquetas. (BERNARDO FILHO, 1988)

A marcação de hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$  foi realizada pela primeira vez por Fisher e colaboradores em 1967 <sup>(13)</sup>. Foi considerado um radiofármaco de bom potencial para estudo, mas tinha baixa eficiência de marcação e rápida depuração (WEINSTEM; SMAAK, 1970). A marcação de hemácias aparece como um método simples e efetivo para investigar a função cardíaca, graças a descoberta da necessidade de se usar um agente redutor para o tecnécio (ATKINS et al., 1973; ECKLMAN et al., 1971). A marcação baseia-se na reação intracelular entre o  $^{99m}\text{Tc}$  reduzido e a cadeia beta da *hemoglobina* (Hb). O  $^{99m}\text{Tc O}^-_4$  entra e sai livremente da hemácia por difusão, porém na presença do íon estanoso ( $\text{Sn}^{+2}$ ), ele é reduzido no meio intracelular reagindo com a Hb, ficando aproximadamente  $75,8 \pm 2,3\%$  ligado à globina e  $19 \pm 1,5\%$  ligada ao heme (REHSNI; SHERMA, 1980; SRIVASTAVA, 1984). Estando ligado à Hb o  $^{99m}\text{Tc}$  ficará fixado dentro da hemácia (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995). Entre os vários agentes redutores normalmente se utiliza o cloreto estanoso bi-hidratado ( $\text{Sn Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (BRAGA et al., 2000). Na presença de cloreto estanoso o  $^{99m}\text{Tc}$  é reduzido para o estado de +5, +4 ou +3 (SAHA, 1997).

As hemácias possuem características que facilitam a sua marcação, por exemplo: as hemácias são as mais numerosas entre todos os elementos celulares sangüíneos; são simples de separar e manipular, sendo resistentes a vários agentes físicos e químicos *in vitro*; não são tão dependentes de energia ou suplementos nutricionais como outros elementos celulares *in vitro*; e dispõem de vários

mecanismos de transporte celular, sendo a hemoglobina rica em locais ativos de ligações metálicas (BRAGA et al, 2000).

As hemácias podem ser marcadas com o  $^{99m}\text{Tc}$  pelos métodos *in vitro*, *in vivo* ou os dois métodos combinados (BERNARDO FILHO *et al.*, 1983). No método *in vitro*, o sangue é retirado do paciente e adiciona-se o cloreto estansoso e depois o pertecnetato. Atingindo o tempo de incubação ideal, o preparo é reinjetado no paciente. No método combinado injeta-se o agente redutor no paciente e após 20 minutos retira-se o sangue. Adiciona-se o pertecnetato, incuba-se por 10 minutos e reinjeta o preparado no paciente. No método *in vivo* injeta-se primeiro o cloreto estansoso no paciente, espera-se 20 minutos e injeta-se o pertecnetato. A marcação *in vitro* proporciona maior estabilidade do radiofármaco resultando em melhor eficiência de marcação e melhores imagens em gama câmara, porém por uma questão de conveniência e menor exposição do Tecnécio ao sangue do paciente, o método *in vivo* é amplamente utilizado. (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995)

A radioatividade proveniente das hemácias marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  delinea claramente o coração, os órgãos que são bem irrigados, como fígado, o baço, e os vasos sangüíneos de grosso calibre. Com este princípio a marcação de hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$  tem vasta aplicação em medicina nuclear cardiovascular, na detecção de sítios de sangramento gastrointestinal, no diagnóstico de trombose venosa profunda, e no cálculo da massa de células vermelhas (EARLY, 1995; SAHA, 1997; SRIVASTAVA, 1987). Como outras possibilidades temos a avaliação do fluxo em malformações vasculares em partes moles (INOVE et al., 1999), rastreamento de hemangiomas ocultos em outras localizações frente ao diagnóstico de hemangioendoteliomas hepáticos (BAR-SEVER, et al., 1994) e avaliação da vascularização de tumores cerebrais com o objetivo de aprimorar seu tratamento (FRONT, 1978). As hemácias também podem ser desnaturadas por calor aumentando a sua captação e melhorando a imagem esplênica (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995). Em ciências neurológicas constatamos a sua grande utilidade na determinação do volume sangüíneo cerebral (VSC) em diversas

situações clínicas (LISHMANOAV et al. 1977; SABATINI et al., 1991; SAKAI et al., 1989).

As hemácias marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  servem ainda como modelo experimental simples e conveniente para estudos do transporte celular, estrutura e função da membrana plasmática (BISCHOP; SURGNOR, 1964; WHITTAM, 1964), para testar o efeito de medicações *in vivo* (TODD et al., 1992), e para o cálculo preciso do volume sangüíneo em ratos (LEE, 1985).

### **1.5. Processo de Cicatrização Tecidual**

Nas feridas cujas bordas foram aproximadas por sutura e que não tenham sido infectadas, a cicatrização é denominada primária ou por primeira intenção, que ocorre pelo seguinte mecanismo:

O sangue extravasado pelo corte forma um coágulo que ocupa espaço entre as margens da ferida. A partir do coágulo e do tecido lesado, surgem fatores quimiotáticos e vasoativos que promovem a exsudação de líquidos do sangue para as margens da lesão e assim fagócitos deixam a corrente sangüínea e alcança a lesão. Cerca de seis horas após, as margens da ferida contém fagócitos e por volta de 24 horas, o coágulo está invadido por essas células, com predomínio dos Polimorfonucleares (PMN). (TATARUNAS et al., 1998)

Com quarenta e oito horas, o número de PMN diminui sensivelmente, passando o exsudato a ser constituído predominantemente por macrófagos. Nesse intervalo, as células da camada basal da epiderme entram em mitose e migram sobre a superfície do coágulo, recompondo o epitélio (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 1994).

Os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens tornam-se ativados, proliferam, migram em direção ao coágulo em reabsorção e começam a sintetizar os componentes da matriz extracelular (EMC), que é uma rede complexa de macromoléculas secretadas, localizadas no espaço extracelular, tendo um papel

central no controle dos processos celulares básicos, como proliferação, diferenciação, migração e interações celulares. A rede macromolecular da ECM é constituída de colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas, secretadas por células do tecido conjuntivo como os fibroblastos e células epiteliais. Todos esses componentes estão em íntimo contato com suas células de origem e formam um, leito gelatinoso tridimensional no qual as células evoluem. (BAYNES; DOMINICKZAK, 2000)

O endotélio dos capilares adjacente emite brotos que crescem em direção do coagulo, formando novos capilares sangüíneos. Esse tecido conjuntivo frouxo rico em capilares sangüíneos e contendo leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (colágeno tipo III), ácido hialurônico e moderada quantidade de proteoglicanos, é denominado de tecido de granulação. Macroscopicamente, esse tecido tem coloração rósea e aspecto granuloso. (THORODDSEN, 1999).

Os colágenos são as principais proteínas da EMC, perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo, sendo os componentes estruturais primários da EMC, tendo o papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz. (BAYNES; DOMINICKZAK, 2000).

Os colágenos podem ser classificados em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila e os não-fibrilares. As fibrilas colagenosas da derme são híbridas dos colágenos de tipo I e II, sendo o colágeno do tipo I o mais abundante, ocorrendo em uma variedade de tecidos, fornecendo alta resistência à tensão da pele, tendões e ligamentos (BOSATRA; JUCCI, 1984)

Os colágenos não-fibrilares formam um grupo heterogêneo contendo segmentos em tríplice hélice, de comprimento variável interrompidos por um ou mais segmentos intervenientes não-helicoidais. Esse grupo inclui os colágenos das membranas basais (tipo IV), colágenos fibrila-associados com tríplice hélices inteuompidas (FACITs) e colágenos com múltiplos domínios tríplice hélices conhecidos como multiplexinas. (BOLTON; YOUNG; DYSON, 1985).

A quantidade de colágenos aumenta com o tempo e por volta de duas semanas suas fibras passam a predominar na matriz extracelular. O colágeno tipo I passa a predominar em relação ao tipo III, sendo as fibras colágenas mais densas. As células fagocitárias vão desaparecendo e o tecido de granulação passa a ser constituído por um tecido conjuntivo progressivamente mais denso e menos vascularizado, situado logo abaixo da epiderme já regenerada. (DALLAN; OLIVEIRA, 2000).

Os miofibroblastos surgem e provocam a contração da cicatriz, aproximando mais ainda as bordas da ferida. Apesar de estar consolidada por volta de dez dias, a cicatriz gasta algumas semanas para completar sua remodelação e adquirir resistência máxima (TATARUNAS *et al.*, 1998).

A ativação dos fibroblastos se faz por: 1) fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), sintetizado por macrófagos e plaquetas, que induz a célula a passar das fases da intérfase  $G_0$  a  $G_1$  e a expor receptores para outros fatores de crescimento; 2) Fator de crescimento fibroblástico (FGfb), produzido por fibroblastos e células endoteliais, que tem ação mitogênica para fibroblastos e induz a síntese dos componentes da matriz; 3) Interleucina -1 (Il-1), Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa e Fator de transformação do crescimento (TGF) beta, produzidos por macrófagos, são estimuladores potentes da síntese de colágeno pelos fibroblastos. O TGF beta é estimulador da cicatriz, pois ativa a colagenálise. A proliferação epitelial da epiderme depende da ação de fatores de crescimento, principalmente do fator de crescimento endotelial (EGF), liberados por células fagocitárias (HYNES; BADEK; DILKE, 1999).

Quando a ferida é extensa, como o é geralmente nas úlceras de decúbito, forma-se um grande coágulo; se há infecção, surge reação inflamatória. Nos dois casos, a exsudação de fagócitos é muito intensa e forma-se grande quantidade de tecido de granulação. Como as bordas da ferida estão distantes, a regeneração da epiderme é mais lenta e demora mais tempo para se completar. As células da epiderme proliferam nas margens, onde ocorre certo grau de hiperplastia devido à grande quantidade de fatores de crescimento liberados a partir das células

exsudadas. Nas fases iniciais, o tecido de granulação faz saliência da superfície da ferida. Com o passar do tempo, ele sofre as mesmas transformações descritas na cicatrização por primeira intenção, sendo muito mais intenso e evidenciável o fenômeno da retração da cicatriz pelos miofibroblastos. (TATARUNAS et al., 1998).

No caso das feridas necrosadas, a diminuição do fluxo sangüíneo local provoca uma diminuição da respiração mitocondrial, causando alterações na membrana celular, como diminuição da eliminação de sódio, com conseqüente aumento da relação Na/K e aumento de água no interior da célula. Esse líquido gera uma tumefação no Retículo Endoplasmático e alargamento do Complexo de Golgi. (TORRA i BOU; SOLDEVILLA, 1999).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos Gerais

O trabalho visa avaliar a indução do Laser de Baixa Potência (LBP), o Campo Eletromagnético de 60 Hz sobre a marcação de hemáticas com pertecnetato através de estudos "*in vitro*" em ratos Wistar e investigar a ação do LBP sobre o processo de cicatrização em camundongos "*in vivo*".

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Aplicar o laser sobre as células sangüíneas "*in vitro*" em diferentes densidades de energia ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ), e o campo eletromagnético em diferentes tempos de incubação.
- b) Estudar a marcação de hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$ .
- c) Comparar a marcação das hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$  na presença de ácido EDTA e heparina.
- d) Avaliar o processo de cicatrização celular após a indução do laser em camundongos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção das Amostras de Sangue**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade de 90 dias, pesando de 200-250g e camundongos da linhagem albinos suíços, com idade de 60 dias, pesando de 20-30g, provenientes do biotério do Departamento de Antibióticos e do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais receberam diariamente água "ad lidium" e alimentação do tipo ração comercial para roedores, iluminação artificial, ciclo claro e escuro de 12/12 horas temperatura ambiente variando entre 24° – 26°C.

As amostras de sangue dos ratos foram obtidas por punção cardíaca na presença dos anticoagulantes EDTA a 10%, para cada 5mL de sangue e heparina de 5000 UI/ml.

##### **3.1.1. Indução do Laser nas Amostras Sangüíneas**

O aparelho emissor de laser foi o DMC com tensão de operação de 70V a 240V, potência de 9W. Emissão visível, comprimento de onda de 685nm, potência útil de 35mw e meio ativo Fosfeto de Índio Gálio e Alumínio (InGa AIP).

As amostras de células sangüíneas contidas em tubos, na presença de EDTA e Heparina, perfazendo um total de cinco tubos por experimento, foram submetidas ao laser em diferentes densidades de energia 3, 6, 9 e 18 J/cm<sup>2</sup> e o tubo controle não foi submetido ao laser.

##### **3.1.2. Indução do Campo Eletromagnético nas Amostras**

As amostras de sangue em um total de cinco tubos por experimento foram tratadas com EDTA e heparina a 10% e submetido a um campo eletromagnético de 60Hz em diferentes tempos de exposição 2, 4, 16 e 21 horas, respectivamente. As

células sangüíneas controle foram colocadas em local que não existia campo eletromagnético.

### **3.2. Método da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o Tc – $^{99m}$ .**

Após a exposição ao laser e ao campo eletromagnético, as amostras do sangue com EDTA e a heparina e EDTA, foram submetidas a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o pertecnetato de sódio. Inicialmente foi acrescido a cada tubo de ensaio submetido previamente ao vácuo, contendo o sangue, 0,5ml de cloreto estanoso, bi-hidratado ( $\text{Sn Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) na concentração de 1,2  $\mu\text{g/ml}$ . Para se obter esta concentração o cloreto estanoso foi diluído em solução salina (NaCl 0,9%) e preparado imediatamente antes de sua utilização. O tecnécio, obtido instantes antes, a partir de um gerador de Molibidênio-Tecnécio ( $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ) (Hospital das Clínicas – UFPE), na forma de Pertecnetato de Sódio que foi diluído e colocado em aparelho contador gama para aferir a sua radiação.

Em seguida foi aplicado em cada tubo 3,7MBq de Tecnécio Meta estável diluído incubado por 10 minutos. Na seqüência os tubos foram colocados em uma centrífuga refrigerada e a 1500 rpm por 10 minutos. Após 10 minutos de centrifugação, foram aspiradas a fração plasmática (sobrenadante) e a fração celular, e depositados em tubos de ensaio distintos contendo solução salina, segundo o esquema 1.

Amostras de 20  $\mu\text{l}$  da fração plasmática e da fração celular foram isoladas e precipitadas em ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%) e centrifugados a 1.500 rpm por cinco minutos na mesma centrífuga. Foram então separadas a fração solúvel (FS) e a fração insolúvel (FI) do plasma e hemácias. Água destilada (1mL) foi adicionada as FI, que permaneciam depositadas no fundo do tubo de ensaio, após a retirada das FS.

Depois de concluído a separação das frações sangüíneas, as mesmas foram colocadas em aparelho DPC Gamby CR para a medição da captação do

Tecnécio em cada fração. Com a obtenção destes resultados percentuais foram utilizadas as seguintes fórmulas para a obtenção do percentual de atividade do Tecnécio no plasma, nas células, na fração insolúvel do plasma ou fração insolúvel das células e na fração solúvel do plasma ou fração solúvel das células. As fórmulas para determinação da eficiência de marcação dos elementos sangüíneos com <sup>99m</sup>Tc são demonstrados abaixo:

Fórmula para o cálculo do percentual de atividade (% ATI) nas diferentes frações obtidas após centrifugação e precipitação com TCA 5%

$$\begin{array}{c} \text{No Plasma} \\ \hline \text{FP} \\ \hline \text{FP} + \text{FC} \end{array} \quad \left| \quad \begin{array}{c} \text{Nas Células} \\ \hline \text{FC} \\ \hline \text{FP} + \text{FC} \end{array} \quad \left| \quad \begin{array}{c} \text{FIP ou FIC / FSP ou FSC} \\ \hline \text{FI} \\ \hline \text{FS} + \text{FI} \end{array} \quad \text{ou} \quad \begin{array}{c} \hline \text{FS} \\ \hline \text{FS} + \text{FI} \end{array}$$

### 3.3. Experimento "In Vivo" – Influência do laser em reparação tecidual em camundongos

O estudo *in vivo* foi realizado utilizando camundongos e tricotomizados no abdome, em seguida foram feitas duas incisões de 1 cm de comprimento, somente na pele. Após a incisão, foi realizada a aplicação de 3 j/cm<sup>2</sup> do lado esquerdo do abdome, sobre a incisão. A incisão do lado direito não foi irradiada. Em todos os camundongos foram realizados os mesmo experimentos. Em todas as etapas da aplicação do soft laser foram feitas as fotografias, após a incisão, 24 e 48 horas até o término do processo de reparo até o quinto dia do processo de reparação. Vale ressaltar que os animais não receberam nenhum tratamento de assepsia local e ou profilaxia antibacteriana.

### 3.4. Análise estatística

Os experimentos para verificação do efeito do laser e campo eletromagnético para marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com <sup>99m</sup>Tc, no estudo *in vitro*, foram realizados com um número de cinco determinações. Os resultados foram calculados e expressos pelas médias aritméticas dos valores obtidos e o desvio padrão das mesmas. Os resultados foram comparados empregando-se o teste t de Student, considerando o  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Indução das Células Sangüíneas com LBP utilizando EDTA como Anticoagulante

A indução do laser nas células sangüíneas na presença de EDTA nas diferentes densidades energéticas variou com 3, 6, 9 e 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Observa-se na figura 1, que nas hemácias ocorreu uma redução na captação do  $^{99m}\text{Tc}$  nas densidades energéticas de 3 e 6  $\text{J}/\text{cm}^2$  e com 9  $\text{J}/\text{cm}^2$  verificou-se um aumento na captação, permanecendo inalterado com 18  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Por outro lado, verificou-se que a captação de  $^{99m}\text{Tc}$  em hemácias normais é de 63,45%, representado o controle (indução 0).

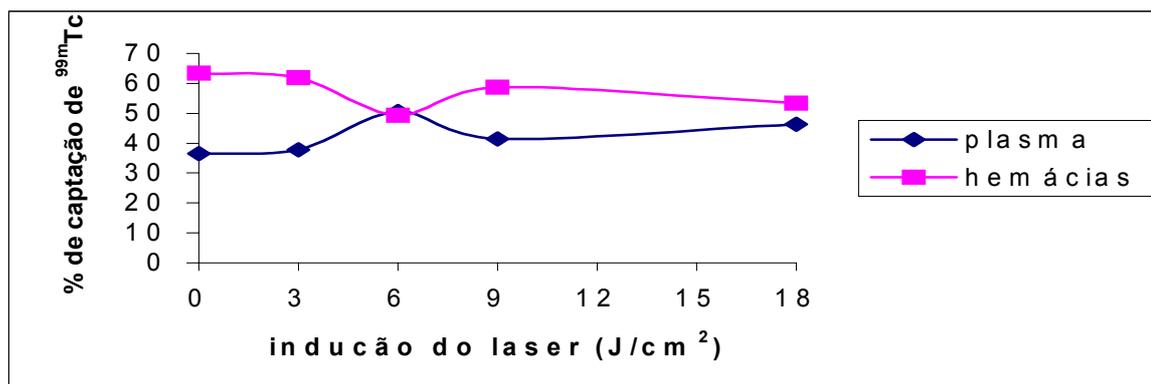
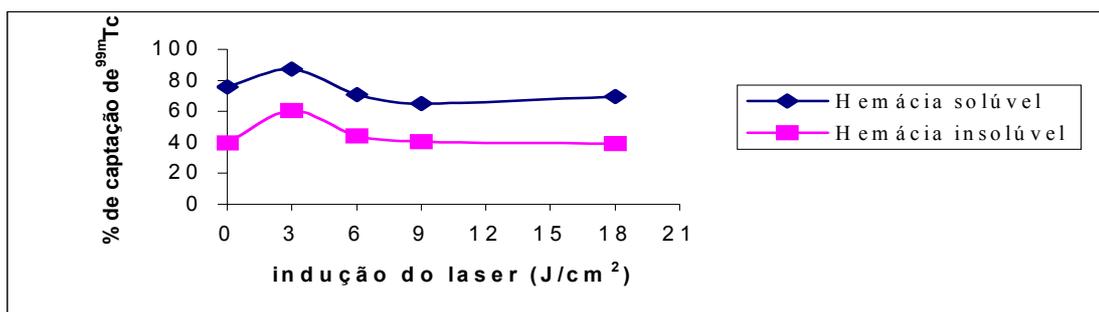


Figura 1 - Avaliação da captação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelas células sangüíneas totais na presença de EDTA, após indução do laser ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ), Os dados expressam médias e desvio padrão  $p = 0,005$ .

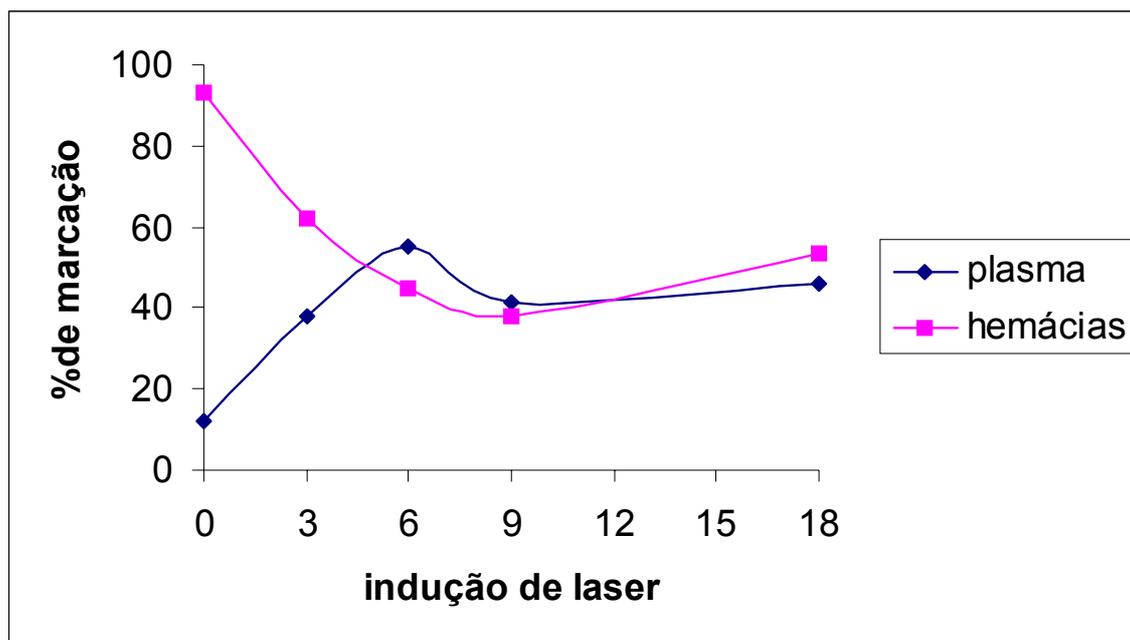
A figura 2, mostra que nas células sangüíneas da fração solúveis após precipitação com TCA 5% ocorre um aumento na captação do  $^{99m}\text{Tc}$  com a densidade energética de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ , enquanto que a fração insolúvel das hemácias a captação do  $^{99m}\text{Tc}$ , foi menor (do que solúvel). Este aumento apresenta uma diferença considerável, quando comparado ao controle (0)  $p=0,005$ . Isto mostra que a captação do  $^{99m}\text{Tc}$  é mantida na fração solúvel das hemácias.



**Figura 2 - Avaliação da captação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelas células sangüíneas solúveis após indução do laser ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ), Os dados expressam médias e desvio padrão  $p = 0,005$ . Utilizando o EDTA como anticoagulante.**

#### **4.2. Indução das Células Sangüíneas com LBP utilizando Heparina como Anticoagulante**

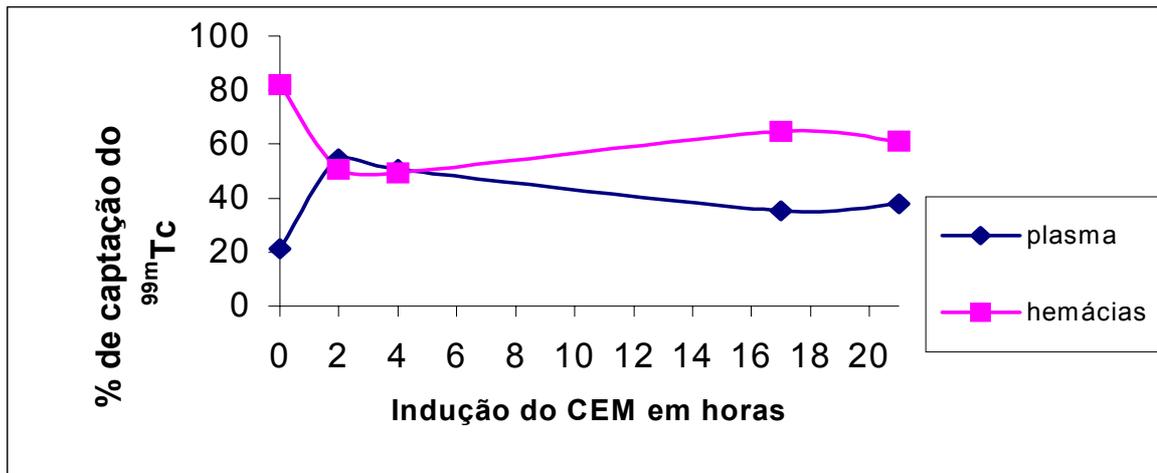
Na figura 3, observa-se que nas células sangüíneas, a presença de heparina aumentou a captação de ligação na ordem de 93% quando comparado ao controle (indução 0), e verifica-se uma redução na captação com a energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  de forma significativa. Este resultado mostra ainda a capacidade de ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  com o plasma e quando precipitado com o TCA 5%, as frações das células solúveis permanecem praticamente inalteradas.



**Figura 3 - Avaliação da captação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelas células sangüíneas totais na presença de heparina, após indução do laser ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Os dados expressam médias e desvio padrão  $p = 0,005$ .**

#### **4.3. Indução das Células Sangüíneas com o Campo Eletromagnético de 60Hz**

No estudo da irradiação do CEM em células sangüíneas, no período de 2, 4, 17 e 21 horas, observa-se que as hemácias após o tempo de indução, quando comparado com o tempo 0 (zero), verifica-se que à 2 e 4 horas de exposição, a captação do  $^{99m}\text{Tc}$  se reduz de maneira significativa com  $p = 0.01$  para as hemácias e  $0.009$  para o plasma respectivamente. Enquanto que, no plasma observa-se um aumento de captação com um  $p = 0.001$  e em seguida a captação decai conforme o tempo de exposição, não sendo observado alterações significativas nas hemácias, apresentam uma leve tendência ao aumento da captação sem diferença significativa em relação aos tempos 2 e 4h, como mostra a figura 4.



**Figura 4 - Avaliação da captação do Tc99m pelas células sangüíneas totais na presença de heparina, após indução do CEM, Os dados expressam médias e desvio padrão  $p = 0,005$ . Usando EDTA como anticoagulante.**

Por outro lado, observa-se um aumento na marcação das frações solúveis e insolúveis das hemácias com duas horas da exposição ao CEM. Após um período de quatro horas de marcação as hemácias solúveis apresentam um declínio no percentual de capacitação de 40%, ao contrário das hemácias solúveis apresentam um aumento na marcação par 50% em relação ao controle (figura 5).

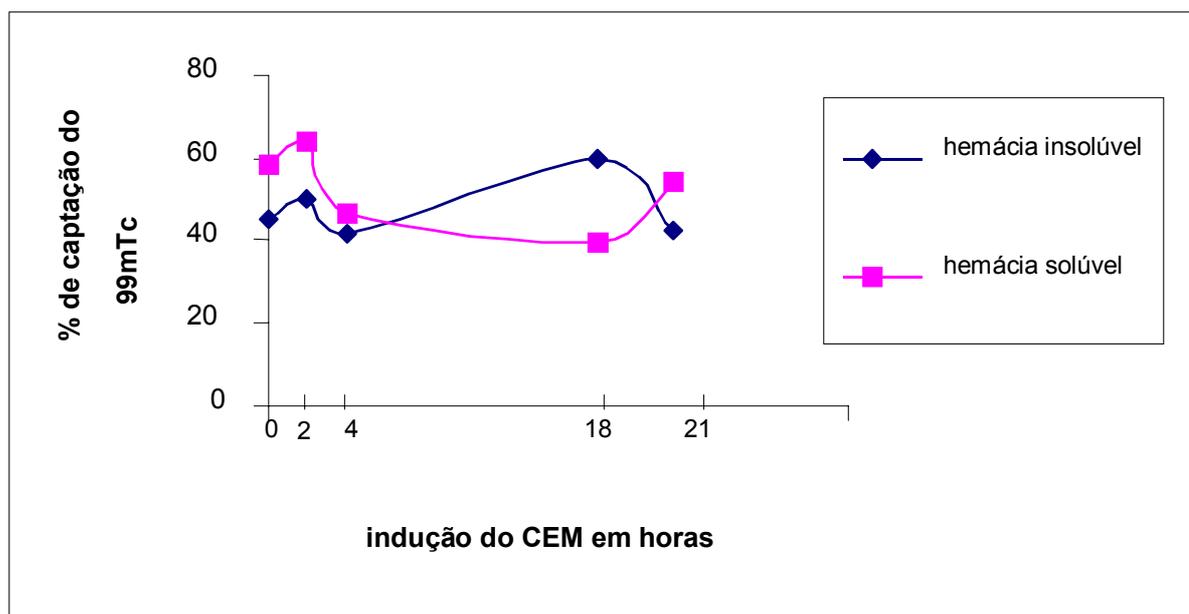


Figura 5 - Avaliação da captação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelas hemácias, após indução do CEM, Os dados expressam médias e desvio padrão  $p = 0,005$ .

#### 4.4 Indução do laser de baixa potência na cicatrização tecidual em camundongos

A figura 6 mostra a evolução do reparo tecidual. Incisões antes de iniciar-se o tratamento são observadas na figura 6<sup>A</sup>. A figura 6B retrata a primeira aplicação do LBP na incisão esquerda do camundongo (lado tratado). Após 24 horas (figura 6C) a incisão do lado esquerdo submetida a indução do laser apresenta bordas mais pronunciadas quando comparada a incisão controle, (lado direito do mesmo animal). Após 48 horas não se observa processo inflamatório localizado (figura 6D). Pode-se denotar que após cinco dias de tratamento (figura 6E), a incisão que recebeu a indução do laser parece estar totalmente cicatrizada, enquanto que na incisão controle observa-se ainda um aumento de volume na cicatriz, esses achados nos leva a sugerir que o laser é capaz de ativar um processo antiinflamatório. Esse acompanhamento também é realizado após sete dias, assegurando-se o processo de observação.

**A****B****C****D**

**Figura 6 – (A) Inclusões antes do LBP (direito = controle; esquerdo = tratado; (B) Primeira aplicação do LBP na incisão esquerda do camundongo; (C) Aspecto da incisão após 24 horas; (D) Aspecto da incisão após 48 horas.**



**E**



**F**

**Figura 6 - (E) Aspecto das cicatrizações após cinco dias; (F) Aspecto das cicatrizações após sete dias.**

## 5. DISCUSSÃO

O estudo da indução do laser em células sangüíneas *in vitro* mostrou que a presença de EDTA promove uma redução da captação do pertecnetato das hemácias a partir de 63% de marcação nas densidades energéticas de 3 a 6 J/cm<sup>2</sup>, enquanto que com o uso a heparina o aumento na captação do pertecnetato de 93% no controle, reduziu de forma significativa a partir de 3 J/cm<sup>2</sup>. Isso mostra que o EDTA como quelante compete com o sítio de ligação do estanho, impedindo a redução que facilita a marcação do  $^{99m}\text{Tc}$  na hemoglobina. Por outro lado, Bernardo-Filho et al. 1994 relataram que existem muitas controvérsias sobre o efeito de diferentes anticoagulantes com relação a marcação de hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$ . O EDTA utilizado como anticoagulante, na marcação de de hemácias com  $^{99m}\text{Tc}$  pode alterar a capacidade de ligação, provavelmente devido a sua alta capacidade de quelação. Isto mostra que, a membrana das hemácias exerce um importante papel na regulação do transporte do íon estanho para dentro das células.

Lima Filho, et al. (2002) demonstraram em seus trabalhos que o ácido fítico potente regulador da função celular foi capaz de alterar a marcação de hemácias e provavelmente apresenta propriedades quelantes.

Estudos '*in vitro*' têm demonstrado e sugerido que os estágios seqüências da marcação intracelular que inclui no processo de redução,  $^{99m}\text{Tc}$  pertecnetato de sódio pelo estanho + 2 ( $\text{Sn}^{+2}$ ), gerando a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  reduzido na hemoglobina. O sistema de transporte  $\text{Sn}^{+2}$  e  $^{99m}\text{Tc}$  para o compartimento interno da célula pode envolver os canais e  $\text{Ca}^{++}$  e o transporte e ânion na banda 3.(BRAGA, et al.,2000).

Os resultados mostram que o LBP e o CEM, são capazes de modificar a captação do  $^{99m}\text{Tc}$  na presença de diferentes densidades energéticas. Isto indica que a presença de determinadas radiações não ionizantes no sangue, pode modificar as características de radiofármacos, alterando seu comportamento biológico ou a sua eficiência de marcação.

Na literatura não existe descrito um modelo de estudo bem definido para avaliar a interação dos radiofármacos com as radiações não ionizantes. Da mesma forma, a avaliação do efeito das drogas na marcação de elementos sangüíneos com radionuclídeos não tem modelo experimental bem definido (SANTOS et al, 1995; SPICER; HLADIK-III; LULBERRY, 1999). Entretanto vários autores descrevem que radiações não ionizantes podem interferir com a marcação de hemácias, leucócitos e proteínas plasmáticas marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  e o  $^{111}\text{In}$  (BERNARDO FILHO; SILVA; REIS, 1994; SAMPSON, 1996).

O estudo de radiações não ionizantes como o laser e campo eletromagnético influenciando na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o  $^{99m}\text{Tc}$ , baseia-se em três fatores principais:

O primeiro se deve à importância da marcação de elementos sangüíneos na medicina nuclear em geral, e na sua utilização também em ciências neurológicas (BAR – SENER Z et al. 1994; Front D, 1978) e em técnicas modernas de estudo funcionais do sistema nervoso como o SPECT (CORDES et al., 1988; Di PIERA et al., 1986).

O segundo fator é a quantidade crescente de pessoas que estão utilizando a terapia laser e estão expostos ao campo eletromagnético de baixa potência no seu cotidiano (BLANK; SOO; PAPSTEIN, 1995; GENOVESE, 2000).

O terceiro fator é que a ação do LBP e CEM sobre a membrana das hemácias promove uma ação indireta na marcação através da indução dos canais iônicos que poderiam estar competindo com a entrada do pertecnetato e impedindo a ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  na hemoglobina da hemácia. (BENEDICENT, 1989; ICNIRP, 1994).

Estes resultados corroboram com os achados deste trabalho, uma vez que o EDTA reduz a capacidade de ligação do  $^{99m}\text{Tc}$ . Uma vez que, vários estudos foram realizados com a presença de extratos vegetais que são capazes de alterar ou não a marcação de hemácias, ampliando o conhecimento da possibilidade de interação medicamentosa com radiofármacos podendo acarretar um equívoco em

radiodiagnósticos. No entanto, a energia do laser aplicado em pacientes provavelmente poderá modificar a qualidade as imagens dos radiodiagnósticos com compostos farmacológicos marcados com radioisótopos, podendo levar uma má interpretação dos resultados, sendo um fator complicador para a medicina nuclear..

No experimento com os camundongos *in vivo* optamos por utilizar doses de  $3 \text{ J/Cm}^2$  dentro dos limites propostos pela literatura. (ANNEROTH et al., 1988)

A aplicação de laser diodo InGa AIP se mostrou simples e segura e o aparelho de fácil aplicação, tanto ao tubo de ensaio contendo o sangue como na pele dos camundongos como descrito na literatura (KOLARI, 1985)

O mecanismo da inflamação atua principalmente no tecido conjuntivo vascularizado, assim como no plasma ou nas células circulantes do plasma e estruturas extravasculares do tecido conjuntivo. Dentre as células circulantes encontram-se neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo que participam da inflamação são os mastócitos, os macrófagos e os fibroblastos. A matriz extracelular é constituída por proteínas fibrosas, glicoproteínas e proteoglicanos. (VANE; FLOWER; BOTTING, 1995, BJORKMAN, 1998).

Os efeitos da reação podem causar lesões por vezes mais pronunciadas que a lesão causada pelo elemento agressor inicial podem ser atenuadas por energia de baixa potência e / ou drogas com é conhecido na literatura.

Os resultados mostram que a atuação do laser em camundongos desenvolveu uma rápida cicatrização, e não apresentou no local o aparecimento de inflamação ou infecção, mostrando que o laser apresenta possivelmente uma eficácia na bioestimulação tecidual. Por outro lado alguns estudos *in vitro* buscam elucidar os possíveis efeitos deletérios da radiação laser, como os trabalhos de GROSS e JELKMANN, 1999, que analisaram cultura de epitélio renal de ratos tratados com doses crescentes de radiação laser, em tempos também crescentes, durante cinco dias, os resultados revelaram um decréscimo do número de células em todos os grupos estudados quando o tempo de exposição excedia 5 segundos.

De maneira que, o efeito do laser sobre as células inflamatórias poderá contribuir para elucidar os prováveis mecanismos de liberação dos mediadores químicos e explicar que a energia de baixa potência poderá ser utilizada em terapias do processo inflamatório.

## 6. CONCLUSÕES

1. A radiação não ionizante seja com o LBP ou o CEM, altera a capacidade de ligação do  $^{99m}\text{Tc}$  pelas hemácias.
2. A utilização da heparina como anticoagulante proporcionou uma maior eficiência de marcação em comparação com o uso do EDTA.
3. O laser, é capaz de estimular o processo de reparo tecidual e minimizar a inflamação decorrente do trauma cirúrgico. Com a perspectiva de popularização do uso do LBP nos procedimentos cirúrgicos, médicos e odontológicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNEROOTH, G.; HALL, G.; RYDEN, H.; ZETTERQUIST, L. The effect of low energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. British **Journal of oral and maxillofacial Surgery**. V. 26 pg 12-7, 1988.

ATKINS, H. L., ECKELMAN, W. KLAPPER, J.F., RICHARDS, P. Vascular imaging with Tc – 99m red blood cells. **Radiology** 1973; 106:357-363.

BALCER, K.; ELIZABETH, K. Gene Expression Following 60-Hz Magnetic Field Exposure. *Environmental Health Perspectives*, Boston, MA, p. 18-22, June, 1995.

BAR-SEVER, et al. A rare coexistence of a multicentric hepatic hemangioendothelioma with a large brain hemangioma in a preterm infant. **Pediatr Radiol** 1994; 24:141-142.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. *Bioquímica Médica*. Artes Médicas. 1ª ed. SP. 2000

BECK, J. L. & D'AMORE, P.A. Vascular Development: cellular and molecular regulation. *FASEB Journal* v. 11. pg. 365-373. 1997.

BENEDICENTI, A *Manuale de laserterapia de cavo orale*. Rinini: Magieolli, 1989.

BERNARDO FILHO, M.; GUTFILEN B.; MACIEL O. S. Effects of different anticoagulants on the labeling of red blood cells and plasma proteins with Tc-99m **Nucl Med Comm** 1994; 15:730-734.

BERNARDO FILHO, M. *Marcação de estruturas biológicas com técnica – 99m* [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ : Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988.

BERNARDO FILHO, M., MOURA, I.N.S. and BOASQUERIVSQUE, E.M. 99m – technetium – labeled red blood cells "in vitro". **Arq Biol Tecnol** 1983; 26: p. 455-461.

BERNARDO FILHO, M., PIRES, E.T.; BOASQUEVISQUE, E.M.; HASSAN-VALOCH, A. Studies an the incorporation of 99m – tecontinum to the platyhelminter Dygesia Titrina. **Rev. Pansital** 1993; 44:7-11.

BERNARDO FILHO, M., SILVA, J.R.M., REIS, R.J.N., BOASQUIENISQUE, E. M. and HASSÓN-VALASCH, A. Condition for labeling of schistossoma manson cercaria with technetium – 99m. **I Nud Biol Med** 1992; 36:56-59.

BEZUR, J. J. et al. The effect of therapeutic laser treatment in patients with craniomandibular disorders. **J. Cranion. Disorders**, v. 2, p. 83-88, 1998.

BISCHOP, C., SURGNOR, D.M. The red blood cells. Academic Press. New York; 1964.

BJORRKMANN, D. J. The effect of aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs on prostaglandins. **The American Journal of Medicine**.v.105(1b)p.125, 1998.

BLANK, M.; SOO, L.; PAPSTEIN, V. Efeito dos campos magnéticos de baixa frequência na atividade do Na, K-atpASE. **Bioelectrochemistry and Bioenergeticx**, v. 38, p. 267-273, 1995.

BOECHAT, D.R. Laser / Tissue interaction. **J. Am. Dent. Assoc.** v. 125, n. 2, p. 57-61, Fev. 1999.

BOLTON, P., YOUNG, S., DYSON, M. The Direct Effect of 860 nm Light On Cell Proliferation And On Succinic Dehydrogenase Activity Of Human Fibrosblasts In Vitro. **Laser Therapy**. v. 7. p. 55-60. 1995.

BOSATRA, M., JUCCI, A. In vitro Fibroblast and Dermis Fibroblast Activation by Laser Irradition at Low Energy. **Dermatologica**. v. 168 p. 157-162. 1984.

BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N., FELICIADNO, G.D.; REINIGER, I.W., OLIVEIRA, J. F.; SILVA, C.R., RICARDO FILHO, M. The efect of drugs on the labeling of blood elements with technetium – 99m. **Curr Pharm Des**: 6:1179-1191. 2000.

BRUGNERA JR., A.; PINHEIRO, A.L. Laser na odontologia moderna. São Paulo : Pancast, 1998.

CALLAHAN, R.J., FRAELICH, J.W., MEKUSICK, K.A.; LEPPA, I., STRAUSS, H.W. A modified method for the *in vitro* labeling of red blood cells with Tc -99mP : Concise Communication I NuCl Medx. 1982; 23:315-318.

CATONE, A. Laser application in oral and maxillofacial surgery. Philadelphia: Sanders, 1997.

CICONELLI, K.C.; BRAGA, C.A.; BERRO, R.J. Utilização da luz de baixa densidade de potência de As Ga Al como agente analgésico e antiinflamatório em cirurgias com implantes orais. J. Bras. Odon. Clin. v. 5, set./out. 1997.

COBB. C. M. Laser in periodontitis: use and abuse. Comp. Contin. Educ. Dent., 18(9) : 847-52, Sep. 1997.

COLLS, J. La terapia laser. Barcelona : Centro de Documentação Lazer de Meditec, 1984.

CORDES, M., HENKES, H., SCHALZ, A., EICHSTADT, H., FELIX, R. Ischemic brain infact: combined determination fo regional cerebral blood flow and volume by SPECT. ROFTschr Geb Rontgenstr Nuklearmed 1988; 149:245-248.

DALLAN, L. A. O. & OLIVEIRA, S. A. Cirurgia de revascularização trasmiscárdica a laser de CO<sub>2</sub> . Rev. Bras. Cir. Cardiovasc. v.15. pag. 89-104. 2000.

DEUSANJEE., M.K. The chemistry of 99mm Tc – labeled radiopharmaceuticals. Sem Nucl Med 1990; 1:5-27.

DI PIERA, V., PERANI, D., SAVI, A.,M GERUNDINI, P., LENZI, G.L., FAZIO, F. Sequential assessment of regional cerebral blood flow, regional cerebral blood volume, and blood-brain barrier in focal cerebral ischemia: a care report. J Cereb Blood Flow Netab 1986; 379-384.

DURNEY, C.H.; MASSOUDI, H.; ISKANDER, M.F. Radiofrequency radiation dosimetry handbook. Brooks Air Force Base, TX: U.S. Air Force School of Aerospace, Medical Division. Reg. No SAM-TR-85-73, 1985.

EARLY, P.J., SADEE, D.B.. Principles and practice of nuclear medicine. 2 ed. Toronto : Masby – Yen Book, Inc. 1995 : 877 pp.

ECKLMAN, W., RICHARDS, P., HAUSER, V., ATKINS, H. Technetium labeled red blood cells. *J Nucl Med* 1971; 12:22-26.

ERREN, T.C. Epidemiologic studies of LEMG and breast cancer risk: a biologically based overview. In: The melatonin hypothesis: breast cancer and the use of electric power. Columbus: Battelle Press, 1997.

FISHER J., WAL, R., LEON, A. Technetium –  $^{99m}\text{Tc}$  as a label for erythrocytes. *J Nucl Med* 1967; 8:229-232.

FRONT, D. Scintigraphic assessment of vascularity and blood-tissue barrier of human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1978; 41:18-23.

GENOVESE, J. W. Laser de baixa intensidade. São Paulo : Lovise, 2000.

GROSS, A. J. ; JELKMANN, W. Helium neon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture. *Lasers in surgery and medicine*. V. 10 pgs 40-44, 1999.

GUTFILEN B., RIBEIRO BLAR, MATTOS, M.F., RIBEIRO, C.R. and BERNARDO FILHO, M. Labeling of thymidine with technetium –  $^{99m}\text{Tc}$ : Suggestion of a chemical model. *Arq. Bial Tecnol.* 1996; 39:69-74.

GUTFILEN, B.; MARINHO, J.C.A., Razemblum, S.; BERNARDO FILHO, M.  $^{99m}\text{Tc}$  – labeled leukocytes obtained with suitable technique: the biodistribution study in rabbits. *Acta Med Biol* 1993; 41:193-196.

HABERT, J.C. Atomic and nuclear structure. In: HABERT, J.C., ECKELMAN, W.C., NEUMANN .R.D. eds. *Nuclear Medicine: diagnosis and therapy*. New York : Thieme Medical Publishers, Inc., 1996:3-20.

HANSSON, T. Infrared laser in treatment of craniomandibular disorders arthrogeniso pains. J. Prosther. Dent.m, v. 61, p. 64, Jun., 1989.

HEALTH JR, C.W. Electromagnetic field exposure and cancer: a review of epidemiological evidence. Ca. Cancer J. Clin, v. 46, p. 29-44, 1996.

HODGE JR., L. J. et al. Changes in the effects stimulation of locus coeruleus and nucleus raphe magnus following dorsal rhizotomy. Brain. Res., v. 88, p. 325-329, New York, 1999.

HYNES, R. O.; BADER, B.L.; DILKE, K. H. Integrins in vascular development. Braz J Med. Biol. Res. V. 32. p. 501-510 May. 1999.

INOVE, Y, WAKITE, S., YOSHIKAWA, R., KAJI, N., YOSHIKA, N. AHTAKE, T., AHTOMO, K., HARII, K. Evolution of flow characteristics of sset tissue vascular msformations using technetium –  $^{99m}$  labelled red blood cells. Eur J. Nucl Med 1999; 26:367-372. 1999.

INOVE, Y., MOMOSE, T., MACHIDA, K., HONDA, N., MANIUA, T., TAKAHASHI, T., KAMANO, T., KINOSHITA, M., TSUTSUMI, K., ASANO, T., Quantitation of cerebral blood volume by  $^{99m}\text{Tc}$  – DTPA-HSA Spect. Radiat Med 1992; 10:184-8.

INTERNATIONAL COMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION, Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields. Health Phys, v. 66, p. 100-106, 1994.

JONES, K.P.; DERBYSHIRE, S.W.G. Cerebral mechanisms operating in the presence and absence of inflammatory pain. **Ann. Rheumat. Dis.**, vol. 55, p. 411-420, 1996.

KERT, J.; ROSE, L. Clinical Low Laser Therapy. Dinamarca: Scan Med. Laser Tech, 1989.

KIM, K. Comparative study of the clinical effects os splint, laser acupuncture and laser therapy of temporomandibular disorders. J. Dent. Calleg Seoul Nat. Univers., 1(12) : 195, Jul., 1998.

KIMURA, M. Clinical evaluation of a As Fa Al semiconductor laser irradiation on solitary aphta erosion and hipersensitivity dentine. J. Dent. College, 87(21) : 29-35, Jun. 1987.

KOLARI, P. J. Penetration of unfocused laser light into the skin. Archives of Dermatology. V. 277, p 342-244, 1985.

LEE, H.B., BLAUFX, M.D. Blood volume in the rad. J Nucl Med 1985; 26:72-76.

LEHNERT, M. W. et al. Laser in medicine and dentistry. Northwest dent., 75(1): 17-22. Jan./Fev. 1996.

LIMAFILHO, G.L.; LIMA, G.M.T.; FREITAS, R.S.; ALEIXO, L.C.M.; MORENO, S,R,F; CATANHO, M.T.J.A; BERNARDO-FILHO, M. Evaluation of the phytic acid effect on the labeling of blood elements with technetium  $^{99m}$  and on the survival of a strain of *Escherichia coli* treated with stannous fluoride. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 777-782, 2002

LINDERKAMP, O., BERG, D., BETKE, K. KOFERL, F., KRIGEL, H., RIEGEL, K.P. Blood volume and hematocrit in various organs in newborn piglets. Pediatr Res 1989; 14:1324-1347.

LISHMANOAV, Y., SHVERA, I., USSOV, W., SHIPULIN, V. The effect of carotid endarterectomy on cerebral blood flow and cerebral blood volume studied by SPECT, J. Neuroradiol 1977; 24:155-162.

LOOMIS, D. P. et al. Breast cancer mortality among female electrical workers in the United States. J. Natl Cancer Inst. v. 86, p. 885-886, 1994.

LOPEZ, V. J. El laser em el tratamiento de las disfunciones de ATM. Rev. Act. Odontol. Esp. 35, Jun. 1990.

LOURFI, I., FRACKAWISH, R.S., MYERS, M.J., LAVENDER, J.P. Regional brain hematocrit in stroke by single photon emission computed tomography imaging. Am J Physiol Imaging 1987; 2:10-16.

MALMIVUO, J.; PLONSEY, R.; Biselectromagnetism – Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields; Oxford University Press; New York, 1995.

MELLO, J. B.; MELLO, G.P.S. Laser em odontologia. São Paulo: Santos, 2001.

MESTER E.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. Lasers in surgery and medicine. v. 5. p. 31-39, 1985.

MISERANDINO, L. J. et al. Lasers in dentistry. Singapore: Quintessence, 1995.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE / NACIONAL RESEARCH COUNCIL, Possible health effects of exposure to residential electric and magnetic fields. Washington, National Academy Press, 1996.

NATIONAL RADIOBIOLOGICAL PROTECTION BOARD. Electromagnetic fields and the risk of cancer: report of an Advisory Group on Non-ionizing Radiation. Chilton, UK, Documents, v. 3, n. 1, 1992.

NATIONAL RADIOBIOLOGICAL PROTECTION BOARD. Electromagnetic fields and the risk of cancer: Summary of the views of the Advisory Group on Non-ionizing Radiation on epidemiological studies published since its 1992 report. Chilton, UK, Documents, v. 4, n. 5, 1993.

NATIONAL RADIOBIOLOGICAL PROTECTION BOARD. Health effects related to the use of visual display unit: Report by the Advisory Group on Non-ionizing Radiation. Chilton, UK, Documents, v. 5, n. 2, 1994a.

NATIONAL RADIOBIOLOGICAL PROTECTION BOARD. Electromagnetic fields and risk of cancer: Supplementary report by the Advisory Group on Non-ionizing Radiation of 12 April 1994. Radiol. Prot. Bull, v. 154, p. 10-12, 1994b.

OWUNWANNE, A., PATEL, M., SADEK, S. eds. The handbook of radiopharmaceuticals. London : Chapman & Hall, 1995:236pp.

PICK, R.M. Using lasers in clinical dental practice. J. Am. Assoc., v. 124, n. 2, p. 37-47, Feb. 1993.

PINHEIRO, A.L. et al. Low level laser therapy in the management of disorders of maxilofacial region. J. Clin. Laser Med. Surg. 15(4): 181-3, Mar. 1997

. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.: **Farmacologia**, 3ed, Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, p.374, 1992

REHSNI, M.L. SHERMA, S.K. Site of Tc –  $^{99m}$  binding to red blood cell: concise communication. I Nucl Med 1980; 21:676-678.

ROBBINS, S.L., KUMAR, V.; COTRAN, R.S. Inflammation and Repair. In: Pathology Basis of Disease. 5<sup>a</sup> ed., Philadelphia, WB Saunders Company, p. 51-92, 1994.

SABATINI, V., CELSI, P., VIALARD, G., RASCO, A., MARE-VERGNES, J.P. Quantitative assessment of cerebral blood volume by single – photon emission computed tomography. Stroke 1991; 22:324-330.

SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy. New York : Springer – Verlag, 1997 : 331.

SAKAI, F. IGARASHI, H., SUZUKI, S., TAZAKI, Y. Cerebral blood flow and cerebral hematocrit in patients with cerebral ischemia measured by single-photon emission computed tomography. Acta Neurol Scand Suppl 1989; 127:9-13.

SAMPSON C. B. Complications and difficulties in radiolabeling blood cells: A review Nucl Med Comm; 17:648-658. 1996.

SANTOS, J. S, PAULA E. F., CORREA T. G, FREITAS L. C., FONSECA, L. M., GUTFILEN B. And BERNARDO, FILHO M. Effect of Cyclophosphamide on the Binding of  $^{99m}\text{Te-O}_4$  and  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  to blood cells and plasma proteins. Braz J. Med Biol res, 28:131-135. 1995.

SAVITZ, D.A. Overview of epidemiological research on electric and magnetic fields and cancer. Am. Ind. Hyg. Ass. J., v. 54, n. 197-204, 1993.

SPICER, J. A., HLADIK-III W. B., LULBERRY, W. E. The effects of selected antineoplastic agents on the labeling of erythrocytes with technetium- $^{99m}$  using the Ultrateg RBC Kit. J Nucl Med Technol 1999; 27:132-135.

SRIEOSTSVR, S.C., STRAUB, R.F. Blood cell labeling with Tc = 99mm: Progress and prespec tines. *Sem Nucl Med*; 1:41-51. 1990.

SRIVASTAVA, S. C. Is there life technetium: What is the potential for developing new brandod-bases radiomuclides? *Semin Nuck Med*: 2:119-131, 1996.

SRIVASTAVA, S. State of the art (and science) bload cell labeling. *Brookhaven Lecture Series*; 232:1-14, 1987.

SRIVASTAVA, S.C., CHEIVU, L.R. Radionuclide labeled red bolood cells: current status and future prospects. *Semin Nucl Med*; 14:68-82. 1984.

STADNYK, A.W.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. ***Parasitology Today***, v. 7, p. A7-A12, 1991.

STEVENS, R.G. Electric power use and breast cancer: a hypothesis. *Am J Epidemiol*, v. 125. 1998.

TASAKI, K. et. al. Application of low laser therapy in closed lock temporonamdibular joint dysfunction. *Laser Surg. Med.*, v. 4, p. 84-86, 1999.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência As Ga (904nm). *Acta Cir. Bras.* v. 13. p. 311-316, 1998.

TENFORDE, T.S. Interaction of ELF mangetic fields with living system. In: Polk, C.; Postow, E., eds. *Biological effects of electromagnetic fields*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1996: 185-230.

THORODDSEN, A. Pressure sore prevalence: national survey "*Journal of Clinical Nursing*". v. 1, p. 170-179. 1999.

TODD, M.M., WEKS, J.B., WARNET, D.S. Cerebral bload flow, bload volume, and brain tissue hematocrit during isovalemie hemadilution with hetastarch in rats. *Am J Physiol*: 263:H75-82, 1992.

TORRA i BOYU, J.E.; SOLDEVILLA, J. J. A. Epidemiologia de las úlceras por presión en España. Estudio piloto en la Comunidad Autónoma de la Rioja. "Gerokomos" – Espanha. v. 10. p. 75. 1999.

UNITED ORGANIZATION ENVIRONMENT PROGRAMME; WORD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL RADIATION PROTECTION ASSOCIATION. Eletromagnetic fields (300 Hz to 300 GHz). Geneva: World Health Organization; Environmental Health Criteria, v. 137. 1993.

VALBERG, P. A.; KAVET, R.; RAFFERTY., C. N. *Can Low-Level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effects?* Radial Res., v. 148, p. 2-21. 1997.

VANE, J. R; FLOWER, R. J.; BOTTING. R. M. History of aspirin and its mechanism of action. **Stroke**,21:IV 12-IV 23,1990

VITRAL, R.W.; TELLES, C.S. A utilização da tomografia computadorizada na articulação temporomandibular. J. Brás. Ocl. ATM & Dor Orofac., v. 1(1), jan./mar./2001.

WEINSTEM, M.B., SMAAK, W.M. Technical difficulties in the Tc = 99m labeling of erythrocytes. J Nucl Med; 11:41-46, 1970.

WHITTAM, R. Transport and diffusion in red blood cells. Edward Arnold. London; 1964.