



DANIELA SALES DE ASSIS BORGES

INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR
EM CULTURAS H.Ep-2, SUBMETIDAS
À LASERTERAPIA DE 685 nm E 830 nm

RECIFE - PE

2006

DANIELA SALES DE ASSIS BORGES

INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR
EM CULTURAS H.Ep-2, SUBMETIDAS
À LASERTERAPIA DE 685 nm E 830 nm

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:
Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Co-orientadora:
Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

RECIFE - PE

2006

Borges, Daniela Sales de Assis

Indução da proliferação celular em culturas H.Ep-2, submetidas à laserterapia de 685nm e 830nm / Daniela Sales de Assis Borges. – Recife : O Autor, 2006.

80 folhas : il., fig., tab., quadros, gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Odontologia – Laserterapia. 2. Célula H.Ep-2. – Proliferação celular. 3. Nutrição ideal e em déficit – Espectrofotometria. I. Título.

**616.321
617.6**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-194**

DANIELA SALES DE ASSIS BORGES

INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR
EM CULTURAS H.Ep-2, SUBMETIDAS
À LASERTERAPIA DE 685 nm E 830 nm

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovada em 10 de Março de 2006

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Conceito: Aprovada

1º. Examinador: Profa. Dra. Marize Raquel Diniz da Rosa

Conceito: Aprovada

2º. Examinador: Profa. Dra. Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho

Conceito: Aprovada



Dedicatória

A Adriano, meu amor, amigo e companheiro, por todos os momentos que já passamos juntos e por todos que ainda virão. A Ana Beatriz e Arthur, peço perdão pela ausência e falta de paciência. Espero que algum dia vocês sintam muito orgulho. Para as minhas duas “mães”: Olga (que torce por mim lá do céu) e Clara (que facilita e incentiva a minha vida aqui da terra)



Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins.

Ao Centro de Ciências da Saúde da UFPE, na pessoa do Diretor Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro.

Ao Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial da UFPE, na pessoa da Chefe Profa. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice.

Ao curso de Mestrado em Clínica Integrada da UFPE, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. Jair Carneiro Leão.

À Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro, pela orientação na realização do meu trabalho.

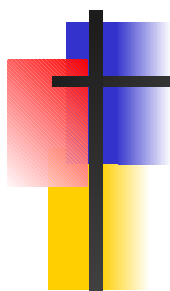
À Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento, responsável pelo Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Antibióticos e co-orientadora do meu trabalho, pelos ensinamentos profissionais e pessoais que me incentivaram na busca do conhecimento.

Aos funcionários da Pós-graduação em Odontologia da UFPE, em especial a Oziclere Sena, Secretária, que se tornou uma amiga.

Aos colegas de turma, que já fazem parte da minha história e com os quais dividi a chance de realizar este curso.

Ao Prof. Dr. Edir Carneiro Leão, ex-coordenador do curso de Pós-graduação em Odontologia da UFPE, pelo apoio, amizade e carinho em momentos tão difíceis.

À técnica em laboratório Maria do Desterro Rodrigues, do Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Antibióticos, que me ensinou e me acompanhou durante todos os experimentos.

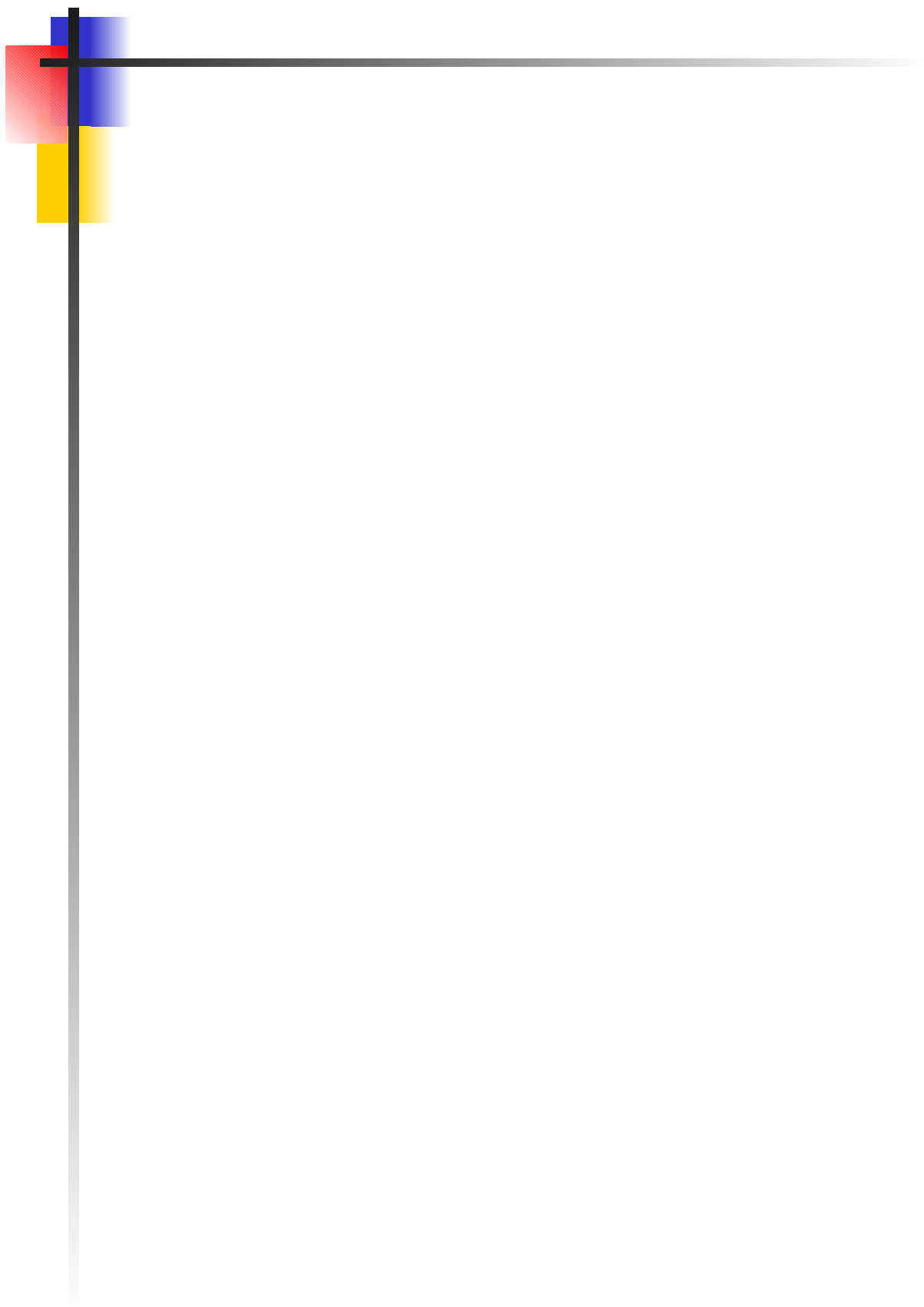


Resumo

RESUMO

O laser possui características físicas que favorecem uma interação específica com os tecidos biológicos. Para avaliar a sua influência sobre a taxa de proliferação, células oriundas do carcinoma epidermóide de laringe (H.Ep-2), *in vitro*, foram irradiadas com 685 nm e 830 nm, usando-se doses terapêuticas de 0,5 e 1,7 J/cm². Oito protocolos foram estudados e observados em cinco tempos distintos (T0h, T6h, T24h, T48h e T72h). Foram preparadas 40 microplacas contendo 200 µl de suspensão celular, com 10⁵ células/ml, em cada poço. Destas, 20 microplacas foram mantidas em nutrição ideal (10% SBF) e as outras 20 microplacas em déficit nutricional (5% de SBF). Ao final das 72 horas do experimento, todos os grupos apresentaram aumento na taxa de proliferação, tanto nas culturas em nutrição padrão quanto nas culturas em déficit nutricional. Das culturas em déficit nutricional, a que recebeu 685 nm e 0,5 J/cm² apresentou a menor curva de crescimento, enquanto todas as outras tiveram um desenvolvimento semelhante. Independente da dose utilizada, as culturas mantidas em nutrição padrão e irradiadas com 830 nm apresentaram as maiores taxas de proliferação. Comparando-se os dois comprimentos de onda, observou-se diferença significativa apenas entre as células mantidas com 10% SBF, irradiadas com 830 nm e 1,7 J/cm² (p<0,001). De maneira geral, analisando-se todas as curvas de crescimento, as culturas que receberam as menores doses responderam mais rapidamente à indução de proliferação, enquanto que a luz infravermelha apresentou os melhores resultados. Comparando-se os grupos irradiados aos seus respectivos controles, não houve diferença estatística significativa. Sob os parâmetros estudados, não se pode afirmar que a laserterapia altere a taxa de proliferação de células H.Ep-2 *in vitro*.

DESCRIPTORES*: Laserterapia, cultura celular, proliferação celular.



Abstract

ABSTRACT

Laser has physical characteristics that favor a specific interaction with biological tissues. To evaluate its influence in the proliferation rate, human larynx carcinoma cells (H.Ep-2) *in vitro* had been irradiated with 685 nm and 830 nm, using doses 0,5 and 1,7 J/cm². Eight protocols had been studied and observed in five distinct times (T0h, T6h, T24h, T48h and T72h). Forty microplates containing 200 µl of cellular suspension had been prepared, with 10⁵ cells/ml in each well. Of this, 20 microplates had been kept in ideal nutrition (10% FBS) and the others 20 microplates in nutritional deficit (5% FBS). At the end of 72 hours of the experiment, all groups presented increased proliferation rate, both the cultures in standard nutrition and nutritional deficit cultures. The cultures in nutritional deficit that received 685 nm and 0,5 J/cm² presented the lowest growing curve, while all the others had had a similar development. Independent of dose, the cultures supported in ideal nutrition and irradiated with 830 nm had presented the highest proliferation rate. Comparing both wave lengths, significant difference was observed only in the cells supported with 10% FBS, irradiated with 830 nm and 1,7 J/cm² (p<0,001). Generally, analyzing all growing curves, the cultures that had received the smaller dose had answered more quickly to the proliferation induction, while the infrared light presented the best ones results. Comparing irradiated groups with its respective controls, there were no significant differences. Under the studied parameters, lasertherapy does not change the proliferation rate in cells H.Ep-2 *in vitro*.

DESCRIPTORS*: Lasertherapy, cell culture, cell proliferation.



Lista de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– Garrafa plástica contendo as células descongeladas em manutenção.....	47
FIGURA 2	– Plaqueamento.....	49
FIGURA 3	– Esquema de preparo das placas.....	50
FIGURA 4	– Photon Lase III, DMC Equipamentos, Brasil.....	54
FIGURA 5	– Irradiação da placa.....	54
GRÁFICO 1	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 5% SBF, irradiadas com 685 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)	61
GRÁFICO 2	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 10% SBF, irradiadas com 685 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)	61
GRÁFICO 3	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 5% SBF, irradiadas com 830 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)	62
GRÁFICO 4	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 10% SBF, irradiadas com 830 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)	62
GRÁFICO 5	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 685 nm (BORGES, 2005)	64
GRÁFICO 6	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 830 nm (BORGES, 2005)	64
GRÁFICO 7	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas em déficit nutricional (BORGES, 2005)	65
GRÁFICO 8	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas em nutrição padrão (BORGES, 2005)	65
GRÁFICO 9	– Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 0,5 J/cm ² (BORGES, 2005)	66

GRÁFICO 10 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 1,7 J/cm ² (BORGES, 2005)	66
QUADRO 1 – Esquema dos grupos de experimentos.....	51
QUADRO 2 – Planejamento do experimento.....	52
QUADRO 3 – Valores de absorvância e erro padrão das culturas irradiadas e de controle para irradiação com comprimento de onda de 685 nm do laser InGaAlP (luz vermelha).....	58
QUADRO 4 – Valores de absorvância e erro padrão das culturas irradiadas e de controle para irradiação com comprimento de onda de 830 nm do laser AsGaAl (luz infravermelha).....	59
QUADRO 5 – Valores de significância durante a proliferação celular em cada grupo.....	67
QUADRO 6 – Valores de significância entre as diferentes doses.....	68
QUADRO 7 – Valores de significância entre os comprimentos de onda.....	68



Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AsGaAl	: Diodo formado pelo Arseniato de Gálio e Alumínio
AsGa	: Diodo formado pelo Arseniato de Gálio
Bax	: Proteína pró-apoptótica
Bcl-2	: Proteína anti-apoptótica
Células/ml	: Células por mililitro
DMEN	: Meio mínimo modificado de Eagles Dubecco
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DNA	: Ácido desoxiribonucléico
FMM1	: Linhagem de fibroblastos humanos
H.Ep-2	: Linhagem de células oriundas do carcinoma epidermóide de laringe
He-La	: Linhagem de células oriundas do carcinoma cervical humano
He-Ne	: Hélio-Neônio
HUVEC	: Células endoteliais do cordão umbilical humano
InGaAlP	: Diodo formado por Índio, Gálio, Alumínio e Fósforo
J/cm ²	: Joule por centímetro quadrado
KB	: Linhagem de células oriundas do carcinoma epidermóide de soalho de boca
LASER	: Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation
LLLT	: Low Level Laser Therapy
MCF-7	: Linhagem de células oriundas do carcinoma de mama
mg/ml	: Miligramas por mililitros
ml	: Mililitros
MTT	: Brometo 3-(4,5-dimetil(tiazol-2il)3,5-difenil)tetrazólio
mW	: Miliwatt (milésima parte de 1 watt, 1x10 ⁻³ watt);
NaHCO ₃	: Bicarbonato de Sódio
NHK	: Linhagem de queratinócitos humanos normais
nm	: Nanômetro
p	: Proporção amostral
PDF	: Terapia fotodinâmica
pH	: Potencial hidrogeniônico
RNA	: Ácido ribonucléico
SBF	: Soro Bovino Fetal
T	: Tempo
T3	: Hormônio triiodotironina
T4	: Hormônio tiroxina
W	: Watt (unidade do Sistema Internacional de Unidades para potência, equivalente a um joule por segundo (1 J/s))
α	: Coeficiente de absorção do meio
λ	: Comprimento de onda
μ l	: Microlitros

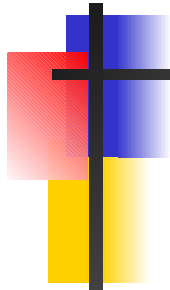


Sumário

SUMÁRIO

Borges, Daniela Sales de Assis.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 LASERTERAPIA.....	24
2.2 LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS.....	26
2.3 CULTURA CELULAR E LASERTERAPIA.....	29
2.3.1 LASERTERAPIA EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCIOTOS.....	33
2.3.2 LASERTERAPIA EM CULTURAS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	37
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3.3 HIPÓTESES.....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
4.2 LINHAGEM CELULAR.....	44
4.3 CULTURA CELULAR.....	45
4.4 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS.....	45
4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	46
4.6 MANUTENÇÃO E REPICAGEM DAS AMOSTRAS.....	47
4.7 PREPARO DAS PLACAS.....	48
4.8 IRRADIAÇÃO COM LASER.....	52
4.9 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DO CRESCIMENTO CELULAR.....	55

4.10 DESCARTE DO MATERIAL.....	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1 AVALIAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DE ACORDO COM O TEMPO OBSERVADO.....	59
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	78



1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

A utilização da luz como modalidade terapêutica teve a sua origem com a própria civilização. Antigas civilizações como a egípcia, a grega, a indiana e a chinesa já utilizavam a luz, com suas diferentes cores, como terapia em processos dolorosos e inflamatórios. Porém, as bases científicas das aplicações médicas só começaram a ser estudadas na segunda metade do século XX, quando a física, a biologia e a química tiveram seus avanços.

Quando, em 1960, Theodore Maiman desenvolveu o primeiro gerador quântico no setor óptico (um aparelho de laser), utilizando conceitos como a teoria da emissão estimulada de Einstein, de 1917, muitos estudos puderam verificar a possibilidade do uso dessa radiação produzida por este novo aparelho, que, mesmo tendo sido construído com finalidades bélicas, apresentava eficácia médica utilizando-se baixas potências.

No laser, que é uma abreviação em inglês de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, a luz é amplificada por emissão estimulada de radiação e, quando transformada em energia luminosa, pode ser visível ou não, dependendo do tipo de matéria (meio ativo) que produziu esse tipo de radiação. Este meio ativo poder ser sólido, líquido, gasoso, semi-sólido, semiconductor ou excímero, sendo único o princípio básico para produzir o laser. A matéria ou meio ativo que produz o laser é que determina qual o comprimento de onda (λ = distância entre dois picos consecutivos da trajetória da onda) que definirá as características da luz dentro de um espectro de ondas eletromagnéticas. Apesar da luz laser ser uma fonte de radiação eletromagnética, difere das demais fontes de luz (como, por exemplo, uma lâmpada incandescente) por possuir características especiais como monocromaticidade, coerência e colimação, que favorecem sua interação com os tecidos biológicos (GENOVESSE, 2000).

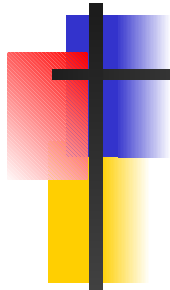
Outras especificidades são relevantes para se caracterizar a luz laser, como a potência, expressa em miliwatts ($\text{mW} = 0,001 \text{ W}$), e o regime de funcionamento do laser, isto é, se o laser é pulsado ou contínuo. Enquanto a potência determina a quantidade de energia depositada por unidade de tempo, o comprimento de onda (λ) e o coeficiente de absorção do meio (α) determinam o grau de penetração da luz nos tecidos.

A tecnologia para a utilização do laser vem sendo desenvolvida cada vez mais rapidamente, pois a possibilidade de realizar um procedimento mais rápido, de maneira mais segura e mantendo um campo mais limpo, é um atrativo extra para quem procura otimizar o trabalho. Além disso, com a evolução da tecnologia, cada vez mais é possível se desenvolver aparelhos menores, mais fáceis de serem operados e de custos reduzidos, facilitando assim o acesso a essa nova modalidade terapêutica.

Destacando o seu uso na medicina, e em especial na odontologia, os lasers foram classificados basicamente em dois tipos, de acordo com a potência que o aparelho produz:

- a) Laser de alta intensidade ou laser cirúrgico: fornece uma radiação com potencial de corte, sendo usado em cirurgias e na remoção do tecido cariado.
- b) Laser de baixa intensidade ou laser não-cirúrgico: emite radiações de baixa potência, não possuindo poder de corte e tendo uma ação fotoquímica de analgesia, antiinflamatória e de biomodulação.

Pela capacidade bioestimuladora do laser, além de estimular células normais, a luz laser pode também estimular as células neoplásicas. Com esta preocupação, este trabalho se propõe a observar se a laserterapia tem ação na proliferação de células oriundas do carcinoma epidermóide de laringe humana (H.Ep-2). Para isso, foi utilizado o Photon Lase III, com a luz vermelha (InGaAlP a 685 nm e 35 mW) e a infravermelha (AsGaAl a 830 nm e 100 mW).



2. Revisão da literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LASERTERAPIA

Em odontologia, o laser de baixa intensidade tem sido usado em diversas áreas, produzindo efeitos bioquímicos, bioelétricos e bioenergéticos, sendo usado como coadjuvante ou mesmo como o próprio tratamento. Sua utilização vai desde a modulação do processo inflamatório até processos de regeneração de ferimentos, onde outros procedimentos terapêuticos não produziram efeitos satisfatórios.

Em 1961, foi realizada com êxito a primeira cirurgia a laser (remoção de um tumor na retina, que impedia a visão) e desde então se observou que tanto a cicatrização quanto epitelização foram aceleradas quando baixas potências eram utilizadas (GENOVESE, 2000). A partir daí, muitos estudos foram desenvolvidos para esclarecer as propriedades de bioestimulação do laser.

Entre as décadas de 70 e 80, o laser mais utilizado foi o de Hélio-Neônio (He-Ne, $\lambda = 632,8$ nm), que operava de forma contínua na faixa do vermelho visível. Porém, por ter um pequeno poder de penetração, muitas vezes era necessária a utilização de fibras ópticas para guiar, de maneira invasiva, a radiação dentro do corpo. Começou-se, então, a utilização do laser semiconductor, dando origem ao primeiro diodo que operava na região do infravermelho. O laser diodo Arseniato de Gálio (AsGa) operava de forma pulsátil e emitia um comprimento de onda de 904 nm, possuindo assim uma maior penetração nos tecidos biológicos (GENOVESE, 2000).

No entanto, surgiu um dilema de ordem técnica: o laser de He-Ne (632,8 nm), apesar de possuir um menor poder de penetração, apresentava os melhores resultados de bioestimulação, enquanto que o laser de Arseniato de Gálio (940 nm) possuía maior poder de penetração, mas apresentava menores efeitos de fotobioestimulação, segundo o trabalho de Karu, 1997.

A adição do alumínio ao AsGa, formando o Arseniato de Gálio e Alumínio (AsGaAl), permitiu a produção de luz visível, na faixa do vermelho, e, além disso, este laser atuava num comprimento de onda variando de 620 a 830 nm (GENOVESE, 2000). Desta forma, este laser (AsGaAl) parecia ser a melhor alternativa para se obter os melhores efeitos de bioestimulação com satisfatória penetração da luz.

Comparando os efeitos do laser pulsado e do contínuo na cicatrização de feridas, Al-Watbam e Zhang (2004) verificaram que a LLLT, que é uma abreviação em inglês de *Low-Level Laser Therapy*, usando lasers pulsado a uma dosimetria e frequência apropriadas, poderia promover aceleração da cicatrização, porém os efeitos promovidos pelo laser de onda contínua eram ainda melhores do que todos os pulsados.

2.2 LASERTERAPIA NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS

Estudando o mecanismo de ação da bioestimulação do laser, Mester (1981), apresentou o efeito biológico e terapêutico da laserterapia, em particular na regeneração de tecidos. Neste trabalho, durante a avaliação da carcinogênese da radiação causada pelo laser de rubi, notou que, usando uma energia de 1 J/cm^2 , provocava um crescimento nos pêlos dos ratos que haviam sido depilados e este efeito se repetia e era cumulativo. Por outro lado, em níveis mais altos de energia, o efeito era inibitório.

No mesmo ano, Kana et al (1981) realizaram um estudo para determinar se a radiação com laser de baixa intensidade poderia afetar a cicatrização de feridas abertas na pele de ratos. Simularam, então, feridas no dorso tricotomizado de ratos (machos saudáveis Sprague-Dawley) que, mais tarde, foram submetidas a uma irradiação diária com laser de baixa intensidade (He-Ne, com $\lambda = 632,8 \text{ nm}$, e Argônio, com $\lambda = 514,5 \text{ nm}$), com uma potência constante de 45 mW. A radiação com o laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) produziu efeito no aumento da síntese de colágeno, com um efeito máximo em 4 J/cm^2 , com aceleração no processo de cicatrização, enquanto que o laser de Argônio ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$) provocou um aumento na concentração de colágeno nas feridas irradiadas e nas feridas contra-laterais não irradiadas, mesmo não sendo registrada aceleração na cicatrização das feridas com o laser de Argônio.

Simulando um trauma em tecido nervoso, Rochkind et al (1989) estudaram os efeitos do laser de baixa potência no sistema nervoso central e periférico e em feridas cutâneas e queimaduras. Foram usados três métodos para a aplicação do laser: (a) diretamente no nervo injuriado, (b) no segmento da medula correspondente ao nervo injuriado e (c)

simultaneamente no nervo injuriado e no segmento medular correspondente. Nesse trabalho, os pesquisadores padronizaram a potência em 16 mW, com doses de 7,6 J/cm² em cada ponto e nenhum outro tratamento ou procedimento foi realizado. Em todas as circunstâncias houve uma acelerada regeneração do nervo periférico injuriado. Em relação às feridas cutâneas, os pesquisadores relataram que a irradiação em apenas uma das feridas bilaterais confeccionadas no dorso dos ratos recuperava mais aceleradamente em ambos os lados, quando comparado ao grupo controle não irradiado. Resultados semelhantes foram obtidos em queimaduras das patas. Com esta observação, concluíram que a irradiação com laser He-Ne produz efeitos sistêmicos em feridas e tecidos conjuntivos; assim como nos nervos periféricos injuriados severamente e nas regiões medulares correspondentes, e que a laserterapia aumenta e acelera a recuperação funcional e morfológica dos tecidos lesados e seus efeitos persistem por muito tempo após a irradiação laser ser suspensa.

A proliferação de células endoteliais age como papel fundamental no processo de reparo tecidual e a laserterapia tem sido apontada como aceleradora no processo de cicatrização de feridas e na melhoria da microcirculação. Essa afirmação está comprovada no trabalho de Schindl et al (2003) que, utilizando a LLLT com 670 nm, 10 a 65 mW e fluência de 2 a 8 J/cm², por seis dias consecutivos, em HUVEC (células endoteliais do cordão umbilical humano), demonstraram uma reação dose-dependente e intensidade-dependente no aumento da proliferação destas células. Concluindo que a irradiação com baixa intensidade contribui para o aumento da angiogênese e acelera a cicatrização de feridas *in vivo*

A irradiação laser de baixa intensidade também tem sido mostrada como promotora da proliferação e ativação celular do músculo esquelético. Em recente trabalho, Shefer et al (2002) aprofundaram seus estudos utilizando miofibras isoladas (mínima unidade funcional viável do músculo esquelético). Neste trabalho, demonstraram que a laserterapia ($\lambda = 632,8$

nm e 4,5 mW) promovia sobrevivência das fibras musculares e suas células adjacentes, bem como células miogênicas cultivadas sem nenhum tipo de nutrição.

Utilizando laser He-Ne (6 mW) com a intenção de promover ou facilitar a cicatrização e a estrutura molecular do colágeno do tendão de rato como modelo para a reparação tecidual, Arizotto (1998) concluiu que animais tratados pelo laser em diferentes doses mostraram sinais de aceleração na dependência da dose. As doses, neste trabalho, foram mais eficientes com 5, 50 e 0,5 J/cm², considerados em ordem decrescente. Fenômenos como melhor organização das moléculas de colágeno, aumento do diâmetro das fibras, formação de feixes mais espessos e de melhor direcionamento azimutal foram algumas das evidências que apontaram para uma atuação positiva do laser sobre o colágeno. Neste trabalho, o laser parece atuar como um sinalizador da matriz extracelular para a alteração da estrutura fibrilar, que ocorre a partir da interação do campo eletromagnético coerente com a molécula do colágeno.

Além disso, a contaminação bacteriana promove um atraso na cicatrização de feridas abertas. Então, Nussbaun, Lilge e Mazzulli (2002) avaliaram os efeitos da laserterapia com 630, 660, 810 e 905 nm e diferentes fluências (de 1 a 50 J/cm²) no crescimento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosas*, *Echerichia coli* e *Stafilococos aureos*. De maneira geral, em todos os parâmetros utilizados, observaram-se mudanças no crescimento das bactérias. Porém, a maioria dos efeitos foi mínima com 660 nm e negativa com 905 nm. Enquanto que utilizando uma fluência entre 1 a 20 J/cm² e o comprimento de onda de 630 nm, observou-se que o crescimento bacteriano era de considerável importância na cicatrização de feridas.

O laser de baixa potência tem sido usado no tratamento da mucosite, devido à aceleração do processo de cicatrização das lesões e à promoção do alívio da dor. Sandoval et al (2003) desenvolveram uma pesquisa com pacientes imunossuprimidos do Hospital A. C.

Camargo utilizando laser de baixa potência (660 nm, 30 mW e 2 J/cm²) com tempo de aplicação em cada ponto em torno de 1 minuto e 6 segundos. Sob esses parâmetros, baseando-se numa escala de características clínicas e avaliação da toxicidade oral desenvolvida pelo Instituto Nacional do Câncer, 66,6% dos pacientes relataram alívio imediato da dor após a primeira aplicação, 42,85% apresentaram redução na incapacidade de ingerir alimentos sólidos e 75% apresentaram redução das úlceras. Dessa forma, além de ser um tratamento bem tolerado por pacientes que apresentam mucosite, demonstram efeitos benéficos melhorando a qualidade de vida dos pacientes durante o tratamento oncológico.

2.3 CULTURA CELULAR E LASERTERAPIA

Em 1955, Eagle utilizou um meio fluido, constituído por treze aminoácidos, sete vitaminas, glicose, sal e 10% de soro humano, que já haviam sido descritos como essenciais para propagação de células He-La (oriundas do carcinoma cervical humano). Ele usou esse meio numa concentração que permitisse o crescimento máximo destas células e possibilitou o crescimento de células neoplásicas. Dessa forma, uma nova linhagem de células de carcinoma epidermóide humano pôde se desenvolver continuamente neste meio de cultivo, por cinco anos, apresentando um tempo de geração numa fase logarítmica de crescimento em torno de 30 horas.

Sendo assim, utilizar culturas de células em experimentos com o laser passou a ser uma rotina para melhor se observar o comportamento e os efeitos do laser como terapia. Além do mais, segundo Freshney (1991), a utilização de culturas de células nos possibilita um melhor delineamento dos experimentos, visto que podemos ter um maior controle químico e

físico do ambiente de crescimento celular, ter uma manutenção relativamente constante das condições fisiológicas da cultura, e a possibilidade de trabalhar com linhagem uniforme de células.

Em 1987, Karu estudou o fenômeno fotobiológico para tentar explicar o mecanismo da bioestimulação do laser. O efeito local da fototerapia no tratamento das úlceras e dores em feridas com laser He-Ne ou outros lasers que trabalham na região do vermelho e infravermelho parecia ser um indicativo de que ocorria uma indução da proliferação celular. Porém, a absorção do laser pelo sistema biológico era ainda de natureza desconhecida. Por isso, na busca de explicações para tal processo, Karu, Pyatibrat e Kalendo (1995) avaliaram os níveis de ATP em células cultivadas *in vitro*, depois de irradiadas com laser He-Ne (632,8 nm, 100 J/m², 10 s). A capacidade da luz vermelha monocromática de induzir o aumento dos níveis de ATP celular foi encontrada dependendo da fase de crescimento, sendo significativa na fase do intervalo da cultura de células. E ainda, Karu, Pyatibrat e Kalendo (1994) já haviam comprovado um aumento na síntese de proteínas e de RNA mitocondrial quando as células eram expostas à irradiação com laser He-Ne. Os autores ainda demonstraram que não havia razão para se acreditar que apenas um processo fosse o responsável pelo aumento da proliferação celular, mas que uma série de reações fotobiológicas são induzidas quando a célula é irradiada. Isto veio comprovar que a luz laser de baixa potência absorvida por fotorreceptores moleculares do tecido biológico é convertida em energia química, que é transmitida a outras moléculas, causando uma reação química em cadeia em todo o tecido, nas células expostas à irradiação bem como em células à distância. Ou seja, a irradiação a certos comprimentos de onda pode ativar componentes celulares (KARU et al, 2000).

O citocromo e a oxidase são indicados como prováveis fotorreceptores quando as células são irradiadas com luz monocromática vermelha e infravermelha, como nos mostra o

trabalho de Karu et al (1999). Neste trabalho os autores relataram quatro mecanismos de ação primária desencadeados após a exposição ao laser de baixa intensidade: (a) mudanças nas propriedades redox da cadeia respiratória, através da fotoexcitação de seus estágios eletrônicos; (b) geração de oxigênio livre; (c) aquecimento localizado transitório na absorção pelos cromóforos; e (d) aumento da produção de superóxido iônico com subsequente aumento da produção de sua dismutação. A reação em cascata, ligada às alterações dos parâmetros de homeostase celular, é considerada, neste trabalho, como uma transdução fotossinal com amplificação da cadeia celular, representando o mecanismo secundário da ação do laser de baixa intensidade nas células.

O ciclo celular é controlado por diversos mecanismos que garantem uma correta divisão celular. O complexo de regulações também reflete em diferentes atuações importantes para a proliferação celular e desenvolvimento do câncer (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). A adesão da célula na matriz extracelular é o primeiro evento em seu crescimento. A superfície celular interage com a matriz extracelular promovendo e regulando processos de embriogênese, crescimento e diferenciação celular, morfogênese, regeneração de tecidos e até formação de metástases. Quando a célula é exposta à irradiação, altera a atividade do citocromo e oxidase, através da modulação da cadeia respiratória, induzindo um aumento da adesão celular (KARU, PYATIBRAT e KALENDU, 2001).

Sabendo que o estudo sobre os diversos constituintes da matriz extra-celular é essencial para o entendimento do processo cicatricial, e, também, de que o laser de baixa intensidade pode influenciar tais constituintes, Pugliesse et al (2003) utilizaram o laser AsGaAl (670 nm) com 9 mW de potência em sessão única a 4 e 8 J/cm² de fluência para avaliar o comportamento das fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial.

Durante a pesquisa, realizaram ferimentos no dorso de 72 ratos Wistar e, de forma única e pontual, aplicaram a radiação laser. Os ratos foram sacrificados com 24, 48 e 72 horas e com 5, 7 e 14 dias. As secções teciduais foram analisadas após terem sido coradas com hematoxilina-eosina, sítius vermelho e orseína. Observaram que no grupo que recebeu a radiação houve maior redução do edema e infiltrado inflamatório e uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas, apesar de não apresentar significância estatística. Além disso, o grupo que recebeu 4 J/cm² apresentou melhores resultados do que o que recebeu 8 J/cm².

Durante um estudo sobre a estrutura das mitocôndrias de leveduras *Torulopsis sphaerica*, em células da 6^a e 7^a linhagens após a irradiação com laser He-Ne (632,8 nm, 460 µJ/m² ou 1150 J/m²), encontraram-se mudanças ultra-estruturais do condrioma das células descendentes irradiadas. Determinaram também que a irradiação não causa apenas rápida regulação na síntese de ATP, mas pode, além disso, afetar o controle da atividade mitocondrial via síntese protéica, o qual é provavelmente realizado a nível genético (KARU, BAKEEVA e MANTEIFEL, 1999).

Sroka et al (1999) avaliaram a taxa de mitoses, baseando-se na síntese de DNA. Seus resultados demonstraram um aumento na taxa de mitoses quando as células foram submetidas a uma radiação entre 4 e 8 J/cm², enquanto que as mitoses foram reduzidas quando submeteram-se as células a uma exposição de 20 J/cm², comparando-se ao grupo controle não irradiado tanto em células normais quanto nas tumorais, usando de 10 a 150 mW. Ainda sugeriram a participação de porfirias endógenas e citocromos como fotorreceptores primários. No mesmo trabalho, concordaram com o termo bioestimulação para caracterizar os efeitos do laser de baixa potência, já que todas as luzes induziram o processo de proliferação celular.

2.3.1 LASERTERAPIA EM CULTURAS DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCIOTOS

Com o objetivo de um melhor entendimento dos efeitos clínicos obtidos com o laser de baixa intensidade nas feridas orais, Soundry et al (1988) conduziram um trabalho com culturas de fibroblastos humanos para avaliar o efeito de uma única irradiação, ou de uma série de irradiações, com o laser He-Ne (632,8 nm, 10 mW). Eles chegaram à conclusão que uma irradiação por dez minutos, com doses de $1,27 \text{ J/cm}^2$, induzia um aumento no crescimento celular, e que as repetidas irradiações aumentavam as divisões celulares após cada exposição. Uma avaliação cuidadosa deste estudo nos sugere que o laser diminui o tempo de cicatrização das feridas orais *in vivo*, sugerindo também uma ação regeneradora do laser de baixa intensidade nas demais células.

Contudo, para Hallman et al (1998), que estudaram os efeitos da irradiação com laser na proliferação celular em culturas de fibroblastos humanos, quando as culturas foram submetidas à ação do laser He-Ne (632,8 nm), padronizado a 24,7 mW, não encontraram nenhuma alteração da proliferação de fibroblastos. Os autores sugeriram, entretanto, que este estímulo poderia ser uma especificidade do tratamento (comprimento de onda, duração, potência, intensidade), ou ainda, que tais efeitos bioestimuladores poderiam ser atribuídos a outros mecanismos, como alterações na síntese de colágeno e no metabolismo celular, e, por isso, precisariam ser cuidadosamente estabelecidos.

Na tentativa de comprovar a proliferação de fibroblastos quando irradiados com laser, Lubart et al (1992) estudaram os efeitos do laser diodo He-Ne (632,8 nm, 35 mW e 10 mW), avaliando a indução de mitoses, após a irradiação, através de microscopia de contraste de fases, com aumento de 30 vezes. Os fibroblastos irradiados com laser de 630 nm exibiram

significante aumento no número de mitoses, utilizando 15 J/cm². Com doses ainda mais altas de energia (60 J/cm²), o número de mitoses celulares diminuiu e um processo destrutivo teve lugar. Neste trabalho, os autores sugeriram que baixos níveis de laserterapia estimulam a respiração celular.

Durante três dias consecutivos, Van Breuggell e Bar (1992), irradiaram culturas de fibroblastos humanos com o laser He-Ne a 632,8 nm e várias densidades de potência e dosagens de energia, por períodos de 0,5 a 10 minutos. Seus resultados mostraram que as potências abaixo de 2,91 mW poderiam aumentar a proliferação celular; entretanto, potências mais elevadas (5,98 mW) não produziam nenhum efeito. A estimulação da proliferação celular foi mais evidente com tempos de irradiação entre 0,5 e 2 minutos, enquanto que a produção de colágeno tipo I diminuiu com este protocolo.

Também estudando o comportamento dos fibroblastos quando expostos à irradiação laser, Loevschall et al (1994) estudaram os efeitos do laser de baixa intensidade, utilizando 812 nm e 4,5 mW, em fibroblastos da mucosa oral humana. No 6º dia após a semeadura, o meio de crescimento de rotina foi recolocado por meia hora e a irradiação foi efetuada. A possível produção fotoquímica e fotodinâmica de radicais livres e oxidantes ou a vibração fotoquímica e efeitos térmicos foram discutidos como causas de efeitos do laser de baixa intensidade nas funções celulares.

Um pouco mais tarde, Grossman et al (1998) examinaram e demonstraram os efeitos na estimulação da proliferação de queratinócitos humanos normais (NHK) *in vitro*, utilizando o laser diodo arseniato de gálio e alumínio (AsGaAl) com 780 nm, justificando que este comprimento de onda pode ser absorvido por receptores endógenos de mitocôndrias, ativando assim as funções celulares através do processo oxidativo. Para isso, avaliaram também um

possível envolvimento de espécies de oxigênio reativo na interação com o laser diodo de baixa intensidade nas culturas de NHK. Seus resultados indicaram que a irradiação com laser diodo de baixa intensidade (780 nm), utilizando 0,45 a 0,95 J/cm², aumentava a proliferação de queratócitos *in vitro*, com aparente envolvimento de espécies de oxigênio reativo.

Pogrel, Chen e Zhang (1997) não conseguiram comprovar os efeitos bioestimulatórios em culturas de fibroblastos e queratinócitos humanos irradiados com laser AsGaAl (830 nm) com potências de 5 a 100 mW e fluências de 0,12 a 4,2 J/cm², analisadas quanto à proliferação, adesão e migração celular.

Grossman et al (2000) realizaram um novo experimento para determinar os parâmetros da irradiação pelo laser He-Ne (10 mW), especialmente em relação ao aumento da proliferação de queratinócitos normais humanos (NHK) cultivados, variando densidade da energia, frequência da exposição e avaliando também a função de espécies de oxigênio reativo na interação com o laser de baixa intensidade nas culturas. Os parâmetros de proliferação estudados refletiram na taxa de síntese de DNA, na atividade metabólica e na atividade mitótica da célula. A taxa de proliferação de NHK foi significativamente aumentada nas primeiras 72 horas após a irradiação e resultante de uma exposição em dose única de 1,9 a 5,5 J/cm², mas a taxa de diferenciação de NHK não foi alterada. A adição de substâncias oxidantes suprimiu a proliferação celular, mesmo utilizando o laser para estimulá-la. Isto reafirmou a hipótese que espécies de oxigênio reativo participam com mediadores da indução da proliferação.

Analisando as mudanças morfológicas ultra-estruturais e a síntese de proteínas em culturas de fibroblastos gengivais humanos (da linhagem FMM1), Marques et al (2004) utilizaram culturas em déficit nutricional com irradiação através do laser diodo AsGaAl (904

nm), com potência de 120 mW e fluência de 3 J/cm². Os pesquisadores encontraram mudanças na estrutura de organelas citoplasmáticas, sugerindo que tais alterações poderiam levar a distúrbios no metabolismo do colágeno, com redução na síntese de proteína, apesar do pro-colágeno não ter sido alterado sob esses parâmetros.

Lopes et al (1998) estudaram a influência do laser em culturas de fibroblastos gengivais, usando diferentes concentrações de soro fetal bovino (BFS = 0%, 5%, 10%). As culturas de células receberam quatro aplicações de laser (635 nm e 780 nm) em intervalos de 12 horas, cada uma com 2 J/cm². As curvas de crescimento se mostraram menores em baixas concentrações de BFS, apesar da irradiação a laser ter acelerado o crescimento em todos os grupos.

Almeida-Lopes et al (2001) compararam os efeitos da laserterapia, usando diferentes irradiações e mesma fluência, em culturas de fibroblastos humanos. Neste trabalho, os pesquisadores usaram soro bovino fetal a 10% (cultivo em condições ideais) e a 5% (cultivo com déficit nutricional), com os seguintes comprimentos de onda: 786, 780, 692 e 670 nm. Para a irradiação, foi utilizada uma fluência de 2 J/cm². Ao final do experimento, concluíram que as culturas de células em déficit nutricional, cultivadas em meio suplementar de SBF a 5%, apresentaram uma taxa de proliferação significativamente menor que as células cultivadas em condições ideais (SBF a 10%). Entretanto, quando as células em déficit nutricional foram irradiadas, apresentaram crescimento celular similar ou até maior que as células cultivadas em condições ideais e não irradiadas. E ainda, usando a mesma fluência e potências diferentes, o laser infravermelho apresentou aumento na proliferação celular quando comparado ao laser visível. Quando as potências eram iguais, as culturas apresentavam crescimentos similares, independente dos comprimentos de onda utilizados. Ou seja,

concluíram que o LLLT atua para melhorar a proliferação de culturas de fibroblastos *in vitro*, e um menor tempo de exposição ao laser resulta numa proliferação mais elevada.

O laser de baixa intensidade também tem sido alvo de pesquisas com a intenção de verificar um efeito inibidor dos processos proliferativos. Explorando o efeito inibidor da irradiação do laser He-Ne sobre o crescimento de fibroblastos de cicatrizes hipertróficas, Shu et al (2002) descobriram que irradiações repetidas (de três a cinco vezes), com 635,8 nm, 50 mW e doses de 180 J/cm², podem levar a uma evidente diminuição do número total de células. A análise do ciclo celular mostrou que após 3 e 5 irradiações a 180 J/cm², o número celular na fase S diminuiu de 51% para 20% e 14 %, respectivamente, e o número celular na fase G0/G1 aumentou de 28% para 55% e 60%. Segundo os autores, isto aconteceu porque a irradiação laser, nestas condições, causou uma estagnação celular na fase G0/G1 e apoptose. Desta forma, o melhor termo para se identificar as propriedades da laserterapia seria a biomodulação, pois, dependendo do protocolo utilizado, o efeito tanto pode ser inibidor, quanto estimulador.

2.3.2 LASERTERAPIA EM CULTURAS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Durante um estudo para avaliar se células de tumor humano poderiam ou não exibir um incremento na capacidade de formação de colônias através da LLLT, Marchesini et al (1989) sugeriram que esta terapia poderia favorecer o crescimento de tumores. Neste estudo, os pesquisadores utilizaram células de carcinoma de cólon e mama, além de células de melanoma maligno.

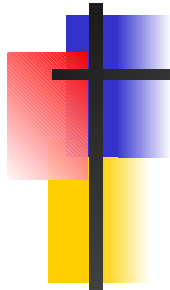
Com a mesma preocupação de avaliar os efeitos do laser em células neoplásicas, Pinheiro et al (2000) avaliaram os efeitos do laser de 635 nm e 670 nm em células H.Ep-2 *in*

vitro, usando MTT, que testa a viabilidade celular em experimentos de culturas de células (MOSMAN, 1983). Vinte e quatro horas após a inoculação, as células receberam uma irradiação com doses variando de 0,03 a 0,6 J/cm², durante sete dias. Seus resultados demonstraram que o laser com 635 nm de comprimento de onda não provoca aumento na proliferação com doses de 0,04 a 0,488 J/cm². Entretanto, a irradiação com laser de 670 nm resulta num aumento na proliferação quando comparados a ambos os controles (não irradiados e laser de 635 nm), sendo irradiado a 0,075 J/cm². Portanto, tanto a dose quanto o comprimento de onda são fatores determinantes para a proliferação de células H.Ep-2, e o MTT é um método efetivo para a detecção da proliferação destas células.

Mais tarde, aprofundando seus estudos sobre os efeitos da laserterapia em células malignas, Pinheiro et al (2002) avaliaram se o aumento das doses de laser sobre as culturas de células do carcinoma de laringe (H.Ep-2) mantidas sob 5% e 10% de SBF, promoveriam o aumento na proliferação. Neste trabalho, usando 635 e 670 nm, com doses de 0,04 a 4,8 J/cm², observaram diferenças significativas entre as duas concentrações de SBF (p=0,002) e entre as irradiadas e o grupo controle (p=0,000), embora com 635 nm o aumento da proliferação não tenha sido significativo, diferentemente das células que receberam o laser a 670 nm, que em todas as dosagens apresentaram aumento significativo na proliferação de células H.Ep-2 *in vitro*.

Para avaliar o comportamento das células KB (oriundas de carcinoma epidermóide de soalho de boca) sob ação do laser de baixa intensidade, Castro (2002) utilizou o laser diodo AsGaAl (685 nm e 830 nm), com dose de 4 J/cm². Nesse trabalho, o laser se mostrou efetivo na aceleração da proliferação das células KB, sendo que o comprimento de 830 nm mostrou um efeito proliferativo maior que o de 685 nm.

Estudando os efeitos da irradiação do laser AsGaAl, com 809 nm, 10 mW e fluências de energia variando de 1,94 a 7,84 J/cm², em células de carcinoma de laringe, Kreisler et al (2003) concluíram que a resposta celular é clara e que as células irradiadas revelaram uma atividade de proliferação consideravelmente mais alta ($p < 0,001$). Neste trabalho, a taxa de proliferação foi determinada pela atividade de fluorescência do indicador redox, adicionado às culturas imediatamente após o respectivo tratamento. Este indicador diminui pela atividade metabólica relacionada ao crescimento celular.



3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da laserterapia com 685 nm e 830 nm sobre a taxa de proliferação de células de carcinoma epidermóide de laringe (H.Ep-2) *in vitro*, em cinco diferentes tempos (T0, T6, T24, T48 e T72 horas).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

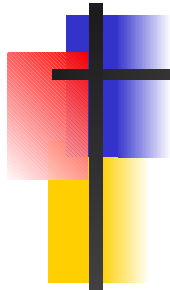
De acordo com os protocolos estabelecidos, este trabalho se propõe a avaliar o comportamento da taxa de proliferação das células H.Ep-2 *in vitro*,

- mantidas em déficit nutricional (5% de SBF) e em nutrição padrão (10% de SBF)
- submetidas á laserterapia em doses de 0,5 e 1,7 J/cm²
- tanto com a luz vermelha (685 nm) quanto com luz infravermelha (830 nm).

3.3 HIPÓTESES

H0: A laserterapia não favorece o aumento da taxa de proliferação celular em culturas H.Ep-2 *in vitro*.

H1: A laserterapia induz ao aumento da taxa de proliferação celular em culturas H.Ep-2 *in vitro*.



4. Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, sob o protocolo número 295/2004-CEP/CCS (Anexo).

4.2 LINHAGEM CELULAR

Foram utilizadas neste estudo culturas de células H.Ep-2 (células oriundas do carcinoma epidermóide de laringe), as quais foram obtidas a partir da dissociação de tumores de câncer de laringe humana e mantidas em frascos de culturas a -80 °C, até o início do experimento (NASCIMENTO, 1993). Estas células foram fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, ao Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Antibióticos, pertencente ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, onde foram realizados todos os experimentos.

4.3 CULTURA CELULAR

A cultura celular é um processo pelo qual se mantêm as células vivas em recipientes de plástico ou de vidro, por tempo determinado, observando-se os mesmos protocolos descritos para culturas de epitélios normais, com a intenção de usá-las em diversos experimentos. Neste processo, as células são mantidas em meio de cultura líquido e enriquecido, para o seu melhor desenvolvimento e multiplicação, além de se promover as condições ideais de temperatura, pressão, umidade e pH (FHESHNEY, 1998).

Foi utilizado o Meio Mínimo Modificado de Eagles Dubecco (DMEN), a 88% da Sigma, ao qual foi adicionado Soro Bovino Fetal (SBF), da Laborclin, a 20% (no período de adaptação da cultura após o descongelamento), a 10% (na manutenção da cultura e no experimento mantido em nutrição padrão) e a 5% (experimento mantido em déficit nutricional), 1% de aminoácido (L-glutamina) e 1% de antibióticos (25 mg/ml de Estreptomicina e 1000 U/ml de Penicilina).

4.4 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

No descongelamento, a garrafa contendo a cultura celular foi retirada do deep freezer (-80 °C) e rapidamente colocada em um Becker, contendo água destilada, à temperatura ambiente. Depois de descongelada, o exterior da ampola foi limpo com etanol a 70% e gaze estéril e, por evaporação à temperatura ambiente, foi seco (NASCIMENTO, 1998).

Transportada para a capela microbiológica de fluxo laminar (FLV, TROZ, Brasil), a garrafa foi aberta e seu conteúdo foi transferido para um frasco de cultura contendo SBF a

20%, o que promoveu uma nutrição máxima para a adaptação, desenvolvimento e crescimento celular. Além disso, foi necessário acrescentar uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10%, até que o pH do meio ficasse em torno de 7,8. O frasco foi então agitado para uma homogeneização da suspensão celular e verificada a viabilidade celular.

Com os frascos devidamente anotados e datados, as amostras foram incubadas em estufa úmida (modelo 20450, SEDAS, Itália) a 37 °C por 24 horas, quando o meio de cultura foi trocado para SBF a 10%, novamente verificada a viabilidade celular, e as ampolas reinseridas na mesma estufa.

Estas células foram mantidas assim até que se verificou sua completa adaptação e desenvolvimento. Só então foi realizada a duplicação dos frascos, pela repicagem das amostras.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular da cultura foi determinada pelo teste de exclusão do azul trypano, que permite determinar a porcentagem de células vivas e mortas. Este procedimento foi realizado pela possibilidade das manipulações experimentais lesarem alguns elementos celulares, notadamente a membrana citoplasmática. O azul trypano penetrou facilmente nas membranas comprometidas e corou as células mortas; aquelas que ficaram incolores estavam íntegras.

Para determinar a viabilidade da amostra, utilizou-se o seguinte cálculo:

$$Viabilidade = \frac{(\text{número de células vivas})}{(\text{número de células mortas})} \times 100$$

4.6 MANUTENÇÃO E REPICAGEM DAS AMOSTRAS

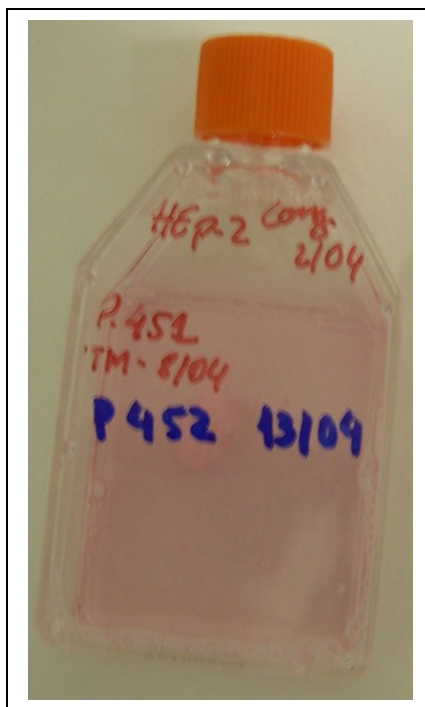


FIGURA 1 – Garrafa plástica contendo as células descongeladas em manutenção

As amostras utilizadas neste trabalho foram mantidas no Laboratório de Cultura Celular do Departamento de Antibióticos da UFPE, onde foram realizados os experimentos.

A repicagem das amostras foi efetuada duas vezes por semana, de acordo com o número de células por frasco e a necessidade do aumento da produção celular, observando-se o aspecto do meio de cultura e o desenvolvimento das células.

A repicagem celular propriamente dita foi realizada da seguinte forma:

- a) No ambiente da capela de fluxo laminar, retirou-se o meio antigo com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e bomba a vácuo (modelo 141, PRIMAR, Brasil), desprezando-o em recipiente apropriado;

- b) Adicionou-se 5 ml de tripsina cobrindo toda a superfície do frasco, retirando após dois minutos. Este processo é chamado tripsinização.
- c) Em seguida, colocou-se 2 ml de meio de cultura DMEN e agitou-se, fazendo jatos fortes com o pipetador automático e pipeta de pequeno calibre (geralmente é necessário impulsionar o frasco contra a mão para descolar as células do fundo da garrafa), e observou-se, com o auxílio de microscópio óptico, se as células estavam destacadas das suas paredes, formando uma camada móvel.
- d) Deste conteúdo, retirou-se a metade e colocou-se em outro frasco limpo e estéril. Cada frasco foi completado de modo que cada garrafa ficasse com 10 ml de suspensão celular em meio de cultura.
- e) Tampou-se cada frasco e anotou-se a natureza do procedimento realizado.
- f) As amostras foram então incubadas em estufa úmida por um tempo máximo de 72 horas.

Observação: a tripsina é uma protease secretada pelas células acinosas pancreáticas sob a forma de proenzima inativa, o tripsinogênio. Esta enzima digere as proteínas desnaturadas e parcialmente digeridas, com maior rapidez que as originais, desdobrando-as em polipeptídeos de peso variável e alguns aminoácidos. Supõe-se que atua principalmente nas ligações peptídicas das quais participa o grupo carboxila da argina ou da lisina. Assim sendo, a enzima destrói a trama protéica que liga as células. A este processo denomina-se tripsinização.

4.7 PREPARO DAS PLACAS

Vinte e quatro horas antes da primeira irradiação, uma suspensão celular foi preparada contendo 10^5 células/ml, com o auxílio da câmara de malassez.



FIGURA 2 – Plaqueamento

As garrafas contendo as células H.Ep-2 foram retiradas da estufa e levadas ao microscópio óptico (modelo binocular CH-2, OLYMPUS, Japão) onde se avaliou a viabilidade celular visualmente, observando aspectos como coloração celular, coloração do meio e adesão celular às paredes da garrafa. Então, levadas à capela de fluxo laminar, removeu-se, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o meio de cultura; adicionou-se 2 ml de tripsina e esperou-se 2 minutos. Após este período, a tripsina foi retirada e foi adicionado meio de cultura, SBF a 10% (ou 5%), para ser realizada a contagem celular.

Previamente a este processo, foram separadas 40 placas estéreis, contendo 96 poços (oito linhas e doze colunas), sendo todo o restante do material devidamente esterilizado em autoclave. Cada placa foi preparada, com o auxílio de pipeta graduada, de forma que cada poço recebesse 220 μ l da suspensão, e que, para cada poço irradiado, existisse um poço controle. Além disso, para se evitar irradiação adicional, intercalou-se os poços a serem irradiados com poços vazios, de modo que cada placa foi preparada da seguinte forma:

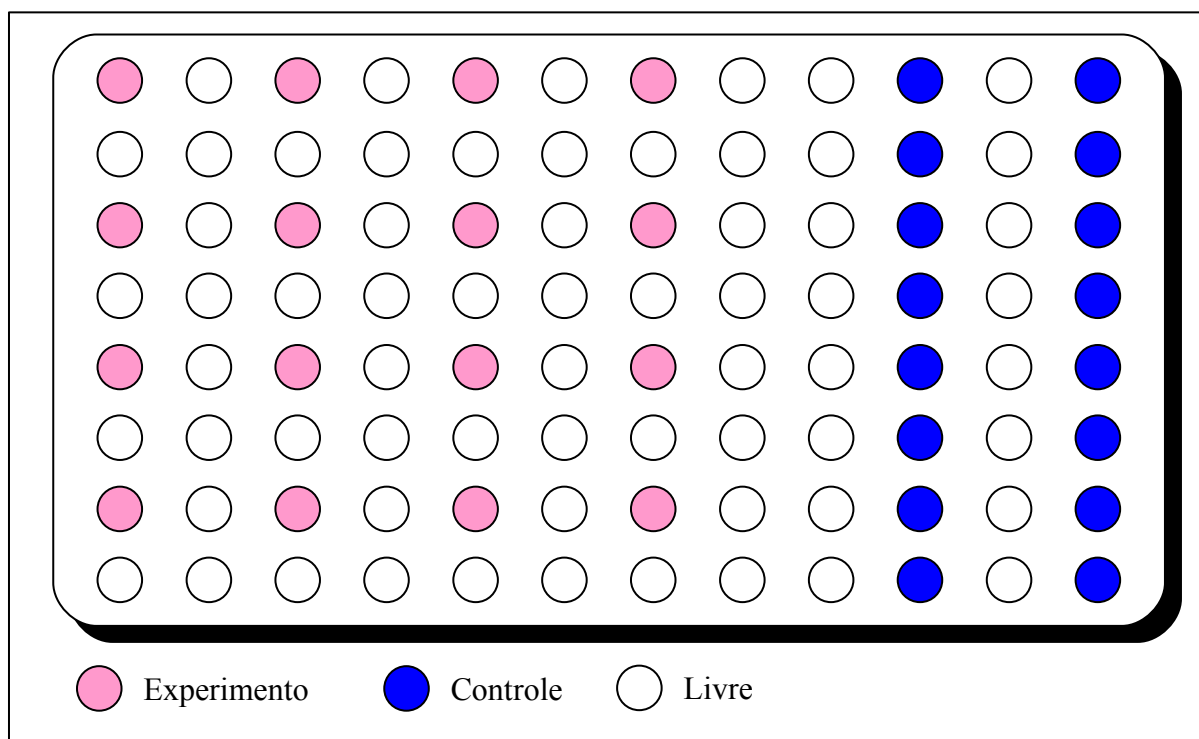


FIGURA 3 – Esquema de preparo das placas

As 40 placas foram divididas em oito grupos, de forma que cada grupo recebesse um protocolo de atuação da laserterapia:

Grupo	Emissor (diodo)	Comprimento de onda	Potência	Dose	Nutrição (SBF)
A	InGaAlP	685 nm	35 mW	0,5 J/cm ²	5%
B	InGaAlP	685 nm	35 mW	1,7 J/cm ²	5%
C	InGaAlP	685 nm	35 mW	0,5 J/cm ²	10%
D	InGaAlP	685 nm	35 mW	1,7 J/cm ²	10%
E	AsGaAl	830 nm	100 mW	0,5 J/cm ²	5%
F	AsGaAl	830 nm	100 mW	1,7 J/cm ²	5%
G	AsGaAl	830 nm	100 mW	0,5 J/cm ²	10%
H	AsGaAl	830 nm	100 mW	1,7 J/cm ²	10%

QUADRO 1 – Esquema dos grupos de experimentos

Deste modo, preparou-se cinco placas para cada grupo do experimento, pois ao final de cada etapa uma placa foi preparada para espectrofotometria e então descartada. E, ainda, o experimento foi dividido em dois momentos: inicialmente realizou-se o experimento com 10% de SBF, ou seja, com a nutrição padrão; em seguida, realizou-se o experimento com 5% de SBF, com as culturas em déficit nutricional.

*Observação: Como a ponta do *spot* não entra em contato com a cultura celular, e para que se atinja toda a área do poço, a irradiação precisa ser desfocada, a densidade de energia que efetivamente chega às células é bem menor que aquela configurada no aparelho. Para que a dose estabelecida no protocolo chegasse às células, a dose de saída do aparelho (dose Input) foi aumentada para 20 J/cm², quando a dose era de 0,5 J/cm², e 60 J/cm², quando a dose era de 1,7 J/cm².

4.8 IRRADIAÇÃO COM LASER

Como o tempo de duplicação das células H.Ep-2 de linhagem epitelial, oriundas do carcinoma epidermóide de laringe humana, possui crescimento em torno de 24 horas, programou-se cada experimento de modo que em cinco dias consecutivos, com intervalos de 24 horas, fosse possível obter os resultados de cada grupo de cinco placas.

	1º dia	2º dia		3º dia	4º dia	5º dia
		T0h	T6h	T24h	T48h	T72h
Placa P1	Plaqueamento	1ª Leitura				
		Descarte da placa				
Placa P2	Plaqueamento	1ª Irradiação	2ª Leitura			
			Descarte da placa			
Placa P3	Plaqueamento	1ª Irradiação		3ª Leitura		
				Descarte da placa		
Placa P4	Plaqueamento	1ª Irradiação		2ª Irradiação	4ª Leitura	
					Descarte da placa	
Placa P5	Plaqueamento	1ª Irradiação		2ª Irradiação	3ª Irradiação	5ª Leitura
						Descarte da placa

QUADRO 2 – Planejamento do experimento

1º dia: Plaqueamento. Os quatro grupos de cinco placas, de cada momento, foram preparados em um mesmo dia, 24 horas após a última repicagem e 24 horas antes da primeira irradiação.

2º dia: As placas P1 de cada grupo foram preparadas para a primeira leitura, 24 horas após o seu plaqueamento, e, após feita a leitura, foram descartadas. As outras quatro placas do grupo foram irradiadas de acordo com o planejamento. A segunda leitura (placas P2) foi realizada 6 horas após da primeira irradiação e as quatro placas P2 restantes foram descartadas.

3º dia: As placas P3 de cada grupo foram preparadas para a 3ª leitura, 24 horas após a primeira leitura e foram então descartadas. As placas P4 e P5 de cada grupo de experimento foram irradiadas de acordo com o planejamento, 24 horas após a primeira irradiação.

4º dia: As placas P4 de cada grupo foram preparadas para leitura, 48 horas após a primeira irradiação e 24 horas após a segunda irradiação, e foram então descartadas. Apenas as placas P5 de cada grupo do experimento foram irradiadas de acordo com o planejamento.

5º dia: Leitura das últimas placas (P5), após 72 horas da primeira irradiação, 48 horas da segunda irradiação e 24 horas da terceira irradiação, e foram, então, descartadas.

Desta forma, após a leitura, obteve-se cinco resultados para cada grupo do experimento:

- a) T0h = Vinte e quatro horas após o plaqueamento, sem nenhuma irradiação;
- b) T6h = Seis horas após uma única irradiação;
- c) T24h = Vinte e quatro horas após uma única irradiação;
- d) T48h = Vinte e quatro horas após duas irradiações com intervalos de 24 horas;
- e) T72h = Vinte e quatro horas após três irradiações com intervalos de 24 horas.

Na irradiação propriamente dita, utilizou-se o Photon lase III da DMC Equipamentos, Brasil, que possui dois meios de emissão, com comprimentos de onda e densidade de potência típicos: InGaAlP, com 685 nm e 35 mW, e AsGaAl, com 830 nm e 100 mW. Determinaram-se então duas densidades de energia para cada comprimento de onda: 0,5 J/cm² e 1,7 J/cm².



FIGURA 4 – Photon Lase III, DMC Equipamentos, Brasil

O aparelho Photon Lase III foi aprovado pela ANVISA, publicado no Diário Oficial da União, número 237, de 12 de dezembro de 2005.

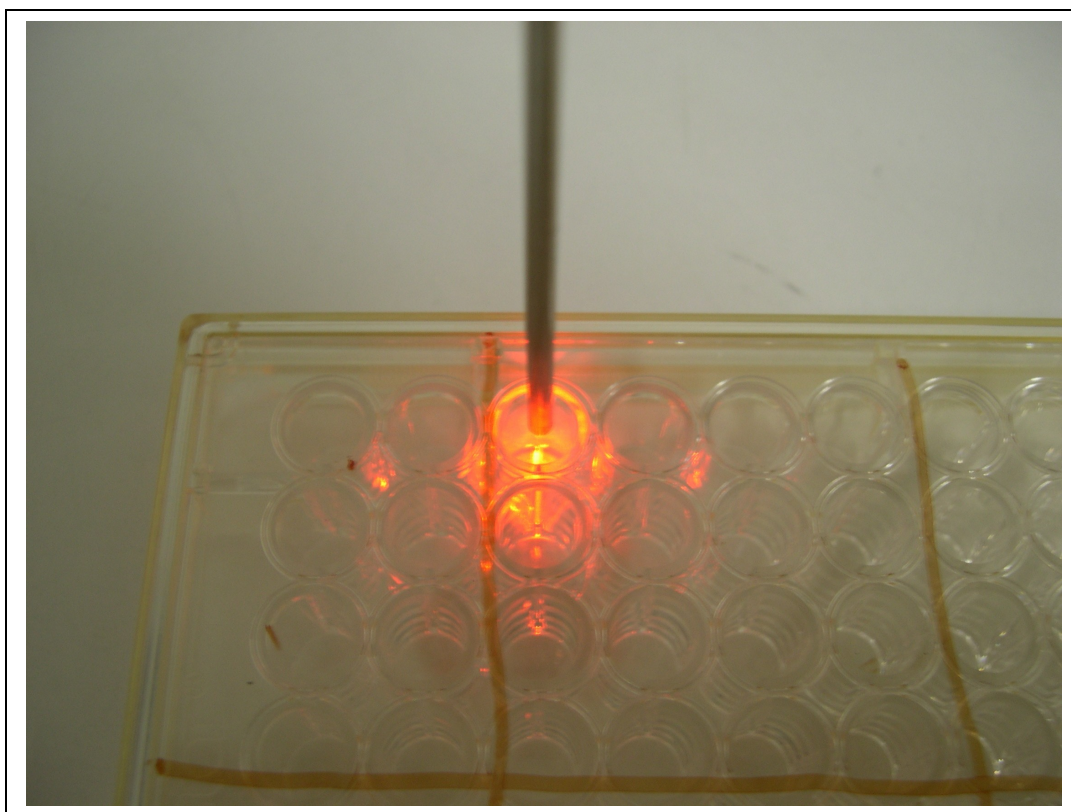


FIGURA 5 – Irradiação da placa

A irradiação laser foi transmitida através da sonda aplicadora (já que a peça de mão é que contém o diodo emissor da luz laser), de maneira desfocada (por área) e contínua, com o objetivo de atingir toda a área do poço que continha a suspensão celular. Além disso, para manter as mesmas condições em toda a placa, as irradiações foram realizadas dentro da capela de fluxo laminar, e a caneta do laser foi mantida, durante todo o tempo da irradiação, fixa a um suporte para tubo de ensaio.

É importante também ressaltar que, antes de cada irradiação, foi realizado o teste de viabilidade celular visual, verificando a coloração do meio e das células, bem como a adesão das células às paredes da garrafa, com o auxílio do microscópio óptico. Além disso, foram respeitadas todas as normas de segurança para a utilização do laser, como o uso de óculos de segurança para todas as pessoas presentes no laboratório durante a irradiação, e a colocação de avisos orientando as pessoas para não entrarem na sala sem proteção e não olharem diretamente para a luz emitida, evitando-se assim qualquer acidente.

4.9 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DO CRESCIMENTO CELULAR

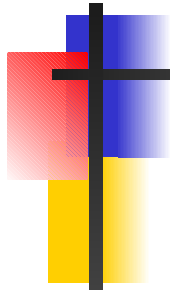
A avaliação do crescimento celular foi obtida através do método colorimétrico de contagem celular, com a solução MTT (Brometo 3-(4,5-dimetil(tiazol-2il)3,5-difenil)tetrazólio)). Este método, descrito por Mosmann (1983), baseia-se na capacidade que apenas as células vivas possuem de reduzirem o sal tetrazólio, de cor amarela, em formazan insolúvel, de cor azul, que precipita graças à ação da enzima mitocondrial succinil desidrogenase, que é ativa apenas em células vivas.

De acordo com o programado, à medida em que as placas estavam prontas para serem lidas, adicionou-se 25 µl de MTT e deixou-se em estufa biológica a 37 °C por duas horas. Após este tempo, retirou-se todo o meio com o auxílio de pipetas de pequeno calibre e bomba a vácuo, e adicionou-se 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) para dissolver o formazan azul, formado a partir do sal tetrazólio.

As placas, após este preparo, foram levadas para o espectrofotômetro (modelo ELX 800, BIO-TEC Instruments, USA), que através da espectrofotometria de absorção, com filtro de 595 nm, foram lidas, e obtiveram-se os resultados do experimento expressos em densidade óptica, que mais tarde foram analisados estatisticamente através do programa Instat.

4.10 DESCARTE DO MATERIAL

Tratando-se de material que não é contaminado, o descarte do material foi feito com uma limpeza colocando as placas em hipoclorito de sódio a 2% por 24 horas, seguido de lavagem manual e descarte da placa para incineração. As placas não poderiam ser reutilizadas em outros experimentos por não ser possível reesterilizá-las, o que comprometeria o desenvolvimento da cultura em pesquisas posteriores pela contaminação microbiológica.



5. Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados das leituras da absorbância, obtidos através do método colorimétrico do MTT e lidos no espectrofotômetro de absorção, em cinco tempos, podem ser vistos nos quadros 3 e 4, nos quais se observa que, de acordo com a média da absorbância, houve um aumento na taxa de proliferação das células H.Ep-2 irradiadas com o laser a 685 nm, bem como com o comprimento de onda de 830 nm, no decorrer do tempo.

685 nm - 5% SBF – 0,5 J/cm ²		685 nm - 5% SBF – 1,7 J/cm ²	
Experimental	Controle	Experimental	Controle
Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro
0,109 ± 0,001	0,115 ± 0,012	0,115 ± 0,012	0,115 ± 0,012
0,108 ± 0,002	0,099 ± 0,002	0,112 ± 0,002	0,106 ± 0,002
0,154 ± 0,003	0,153 ± 0,003	0,161 ± 0,007	0,147 ± 0,004
0,158 ± 0,011	0,219 ± 0,011	0,123 ± 0,012	0,141 ± 0,008
0,241 ± 0,011	0,191 ± 0,011	0,308 ± 0,010	0,331 ± 0,013
685 nm - 10% SBF – 0,5 J/cm ²		685 nm - 10% SBF – 1,7 J/cm ²	
Experimental	Controle	Experimental	Controle
Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro
0,150 ± 0,050	0,115 ± 0,012	0,100 ± 0,002	0,115 ± 0,012
0,215 ± 0,006	0,226 ± 0,007	0,197 ± 0,008	0,237 ± 0,008
0,284 ± 0,003	0,291 ± 0,002	0,317 ± 0,022	0,377 ± 0,015
0,196 ± 0,020	0,222 ± 0,008	0,190 ± 0,017	0,177 ± 0,006
0,337 ± 0,023	0,445 ± 0,009	0,325 ± 0,020	0,438 ± 0,010

QUADRO 3 – Valores de absorbância e erro padrão das culturas irradiadas e de controle para irradiação com comprimento de onda de 685 nm do laser InGaAlP (luz vermelha)

No quadro 3, pode-se observar o desenvolvimento das culturas irradiadas com o comprimento de onda de 685 nm. Nestes grupos, à medida que o tempo passa, as culturas aumentam sua taxa de proliferação, mostrando que, independente da dose ou da concentração dos meios, as células têm a capacidade de continuar se proliferando.

830 nm - 5% SBF – 0,5 J/cm ²		830 nm - 5% SBF – 1,7 J/cm ²	
Experimental	Controle	Experimental	Controle
Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro
0,107 ± 0,001	0,102 ± 0,009	0,109 ± 0,001	0,102 ± 0,009
0,127 ± 0,002	0,118 ± 0,003	0,119 ± 0,003	0,109 ± 0,002
0,149 ± 0,004	0,140 ± 0,004	0,141 ± 0,005	0,149 ± 0,002
0,115 ± 0,008	0,157 ± 0,009	0,112 ± 0,008	0,141 ± 0,009
0,300 ± 0,012	0,331 ± 0,015	0,307 ± 0,005	0,314 ± 0,006
830nm - 10% SBF – 0,5 J/cm ²		830 nm - 10% SBF – 1,7 J/cm ²	
Experimental	Controle	Experimental	Controle
Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro	Absorbância ± Erro
0,098 ± 0,002	0,102 ± 0,009	0,095 ± 0,002	0,102 ± 0,009
0,238 ± 0,006	0,250 ± 0,008	0,336 ± 0,015	0,445 ± 0,037
0,429 ± 0,029	0,386 ± 0,017	0,264 ± 0,018	0,353 ± 0,016
0,237 ± 0,017	0,212 ± 0,014	0,244 ± 0,013	0,221 ± 0,009
0,393 ± 0,014	0,470 ± 0,004	0,368 ± 0,024	0,513 ± 0,009

QUADRO 4 – Valores de absorbância e erro padrão das culturas irradiadas e de controle para irradiação com comprimento de onda de 830 nm do laser AsGaAl (luz infravermelha).

Da mesma maneira que nas células irradiadas com 685 nm, as culturas irradiadas com comprimento de onda de 830 nm, observadas no quadro 4, apresentaram desempenho semelhante, ou seja, independente da dose ou da concentração do meio de cultura, as células irradiadas continuaram se proliferando.

5.1 AVALIAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO DE ACORDO COM O TEMPO OBSERVADO

As culturas foram lidas em cinco tempos (T0, T6, T24, T48 e T72), e obtiveram-se cinco resultados.

As curvas de crescimento das células mantidas em déficit nutricional (5% SBF), irradiadas com 685 nm, bem como os seus respectivos controles, apresentaram

comportamentos semelhantes nas primeiras 24 horas do experimento (gráfico 1). Contudo, ao final das 72 horas, as células que receberam $1,7 \text{ J/cm}^2$ apresentaram um maior crescimento em relação àquelas que receberam $0,5 \text{ J/cm}^2$.

Quando as células foram mantidas em nutrição padrão (10% SBF), apresentaram crescimento maior que aquelas em déficit nutricional. Tendo crescimento nas primeiras 24 horas, seguidas de diminuição, e um maior acréscimo ao final do experimento, conforme se pôde constatar no gráfico 2. No mesmo gráfico, verificou-se ainda que as células do controle apresentaram um crescimento maior do que aquelas irradiadas com $0,5 \text{ J/cm}^2$, ou com J/cm^2 .

Avaliando-se as curvas de crescimento das culturas mantidas com 5% SBF, irradiadas com 830 nm (gráfico 3), pôde-se constatar que tanto as células irradiadas quanto as dos respectivos controles possuem comportamentos semelhantes, com elevação do crescimento ao final das 72 horas do experimento, independente da dose utilizada.

Quando as células irradiadas com 830 nm estavam sendo mantidas em nutrição padrão (gráfico 4), apresentaram comportamentos diferentes. As células que receberam $1,7 \text{ J/cm}^2$ apresentaram um maior crescimento já nas primeiras 6 horas do experimento, enquanto que as que receberam $0,5 \text{ J/cm}^2$ só apresentaram um maior crescimento nas primeiras 24 horas. Porém, ao final das 72 horas do experimento, os controles apresentaram uma maior quantidade de células que as culturas irradiadas.

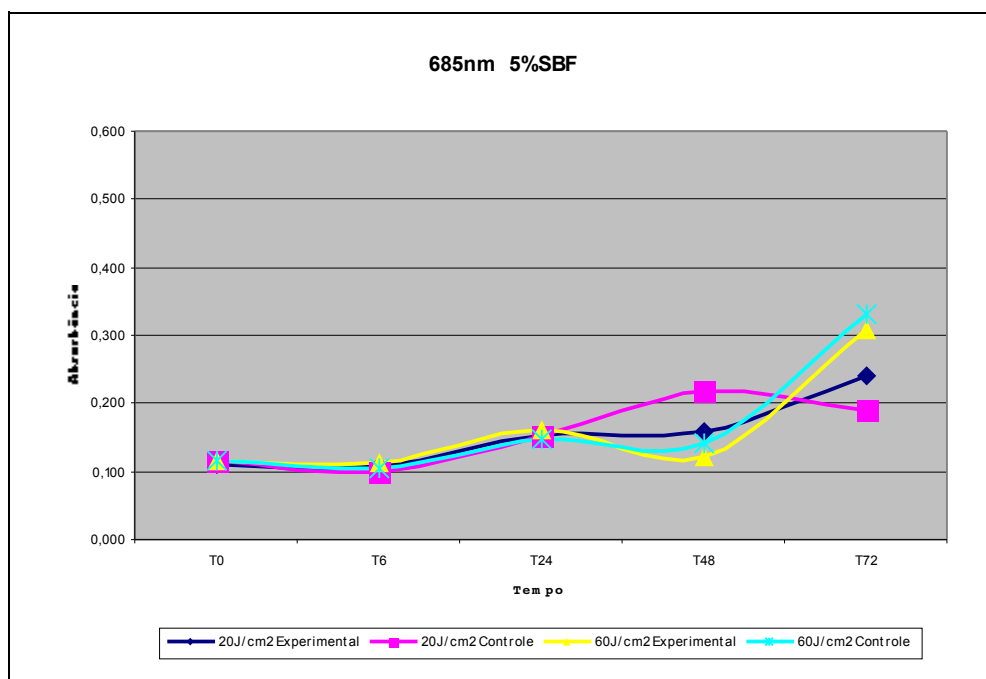


GRÁFICO 1 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 5% SBF, irradiadas com 685 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)

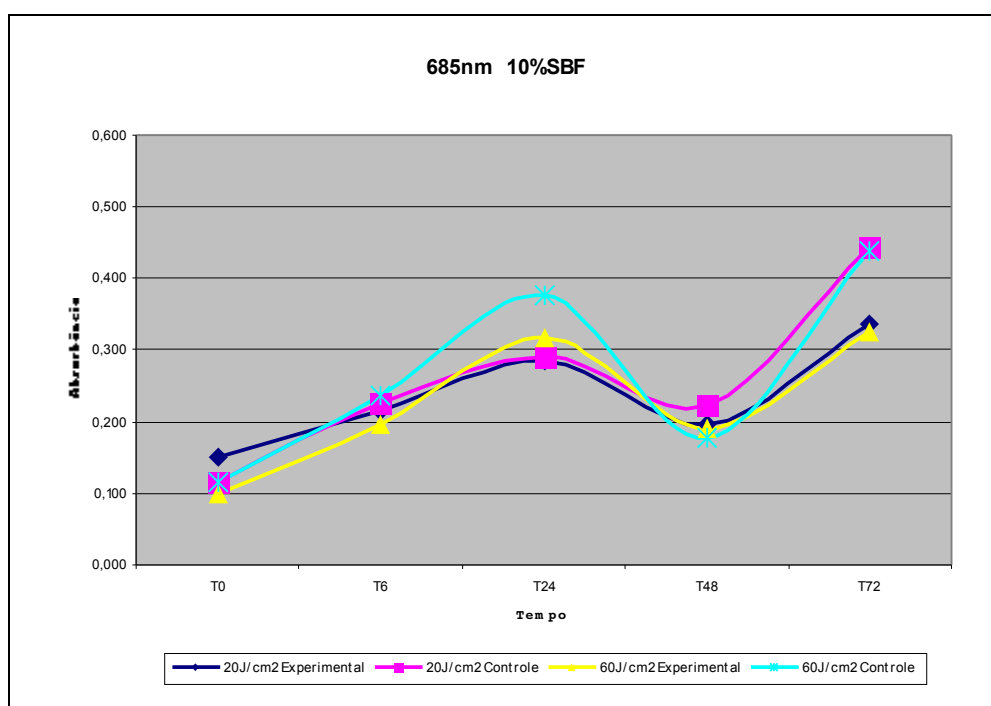


GRÁFICO 2 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 10% SBF, irradiadas com 685 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)

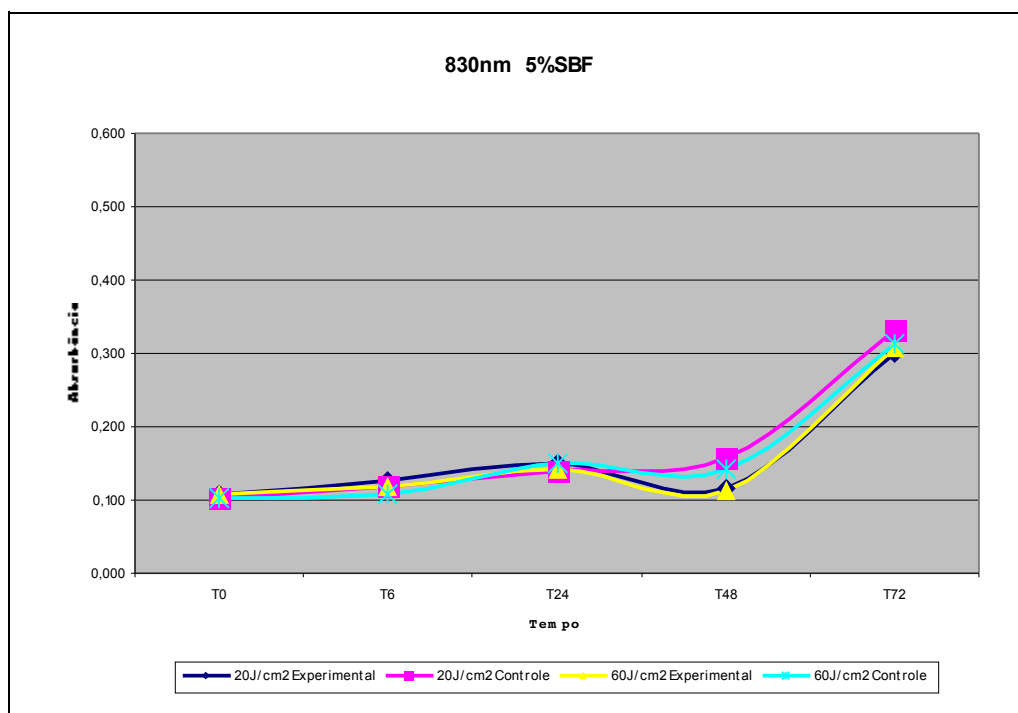


GRÁFICO 3 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 5% SBF, irradiadas com 830 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)

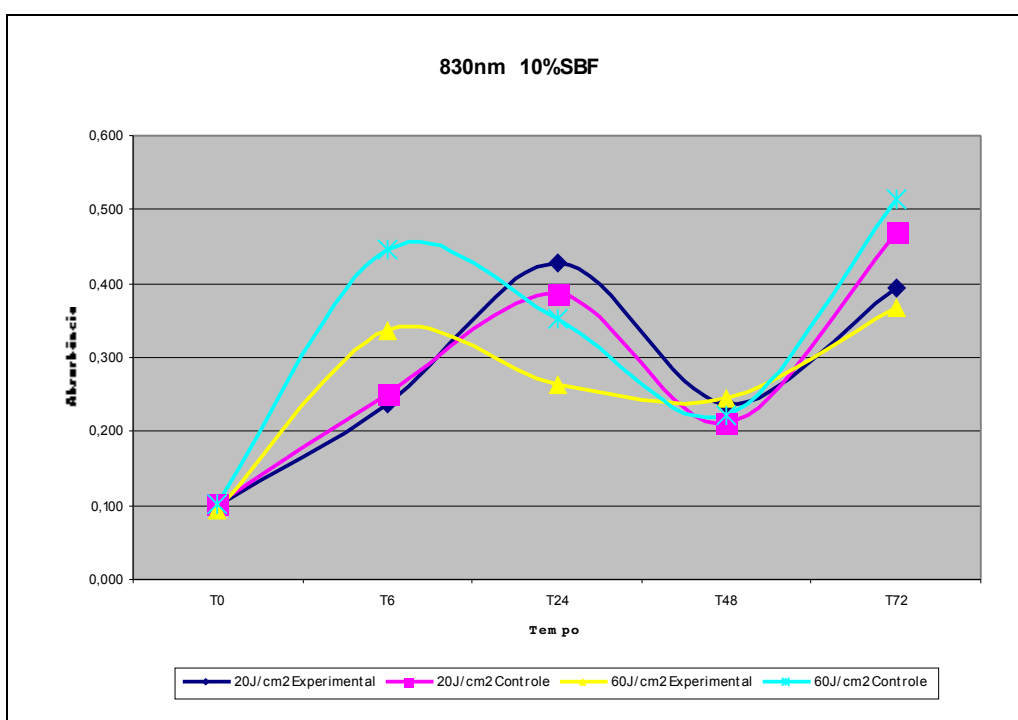


GRÁFICO 4 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas a 10% SBF, irradiadas com 830 nm e seus respectivos controles (BORGES, 2005)

Quando se avaliou o crescimento de todas as culturas irradiadas com 685 nm (gráfico 5), pôde-se constatar que as células mantidas a 10% SBF haviam se desenvolvido mais que aquelas mantidas a 5%. Ao final do experimento, a cultura que recebeu $0,5 \text{ J/cm}^2$ (em nutrição padrão) possuía uma quantidade maior de células do que todas as outras culturas irradiadas com 685 nm.

No gráfico 6, avaliou-se o comportamento das curvas de crescimento de todas as culturas irradiadas com 830 nm e pôde-se constatar que a cultura mantida em nutrição padrão, irradiada com $0,5 \text{ J/cm}^2$, apresentou um maior crescimento nas primeiras 24 horas e ao final do experimento, do que todas as outras culturas. Além do mais, no mesmo gráfico, as culturas mantidas em déficit nutricional apresentaram um crescimento semelhante, independente da dose que receberam.

Quando as culturas mantidas em déficit nutricional foram avaliadas (gráfico 7), pôde-se constatar um crescimento semelhante independente da dose e do comprimento de onda utilizada até as 24 horas. Porém, a cultura que recebeu $0,5 \text{ J/cm}^2$, associada a 685 nm, apresentou o menor crescimento do que todas as outras culturas ao final das 72 horas do experimento.

Naquelas culturas mantidas em nutrição padrão (gráfico 8), pôde-se constatar um comportamento diferente entre as culturas, que dependia da dose e do comprimento de onda. As que receberam 830 nm apresentaram os maiores crescimentos, sendo a cultura que recebeu $0,5 \text{ J/cm}^2$ a que apresentou os maiores valores.

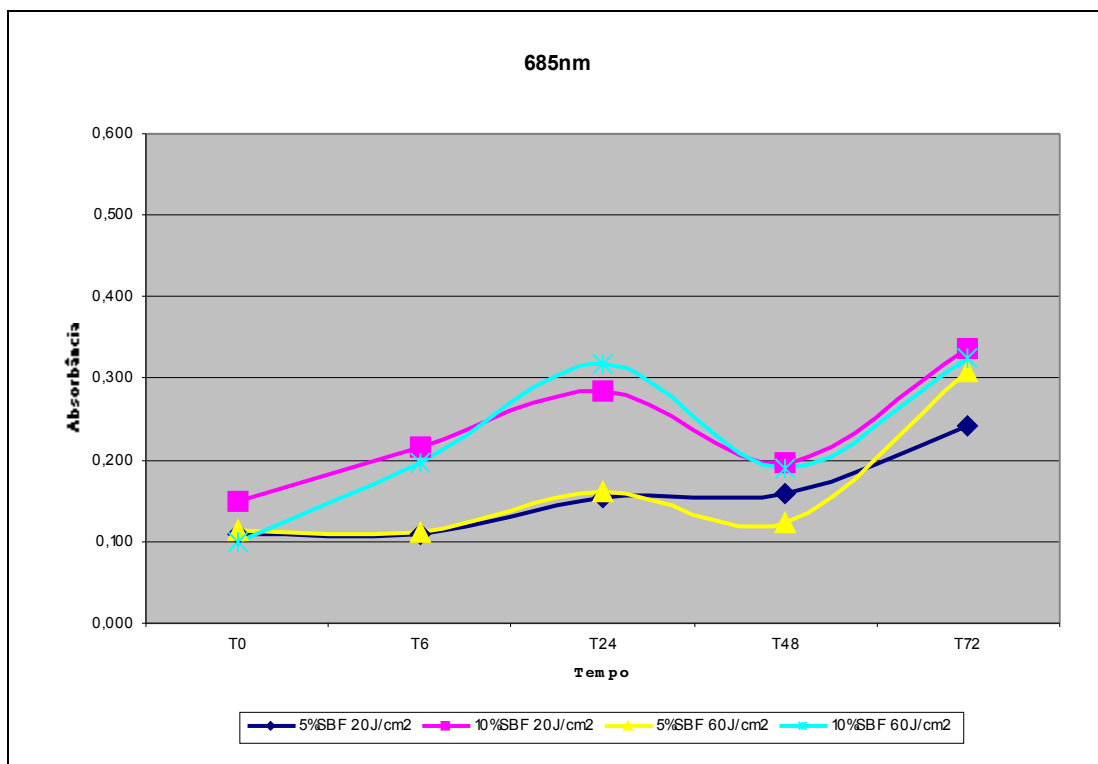


GRÁFICO 5 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 685 nm (BORGES, 2005)

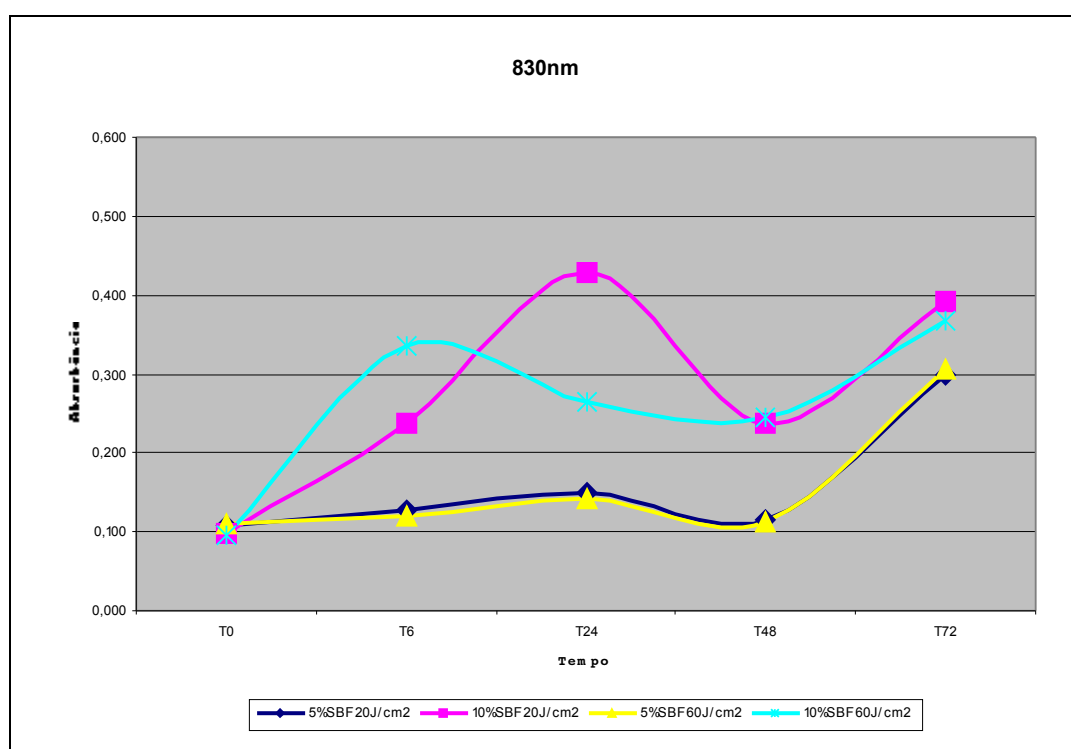


GRÁFICO 6 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 830 nm (BORGES, 2005)

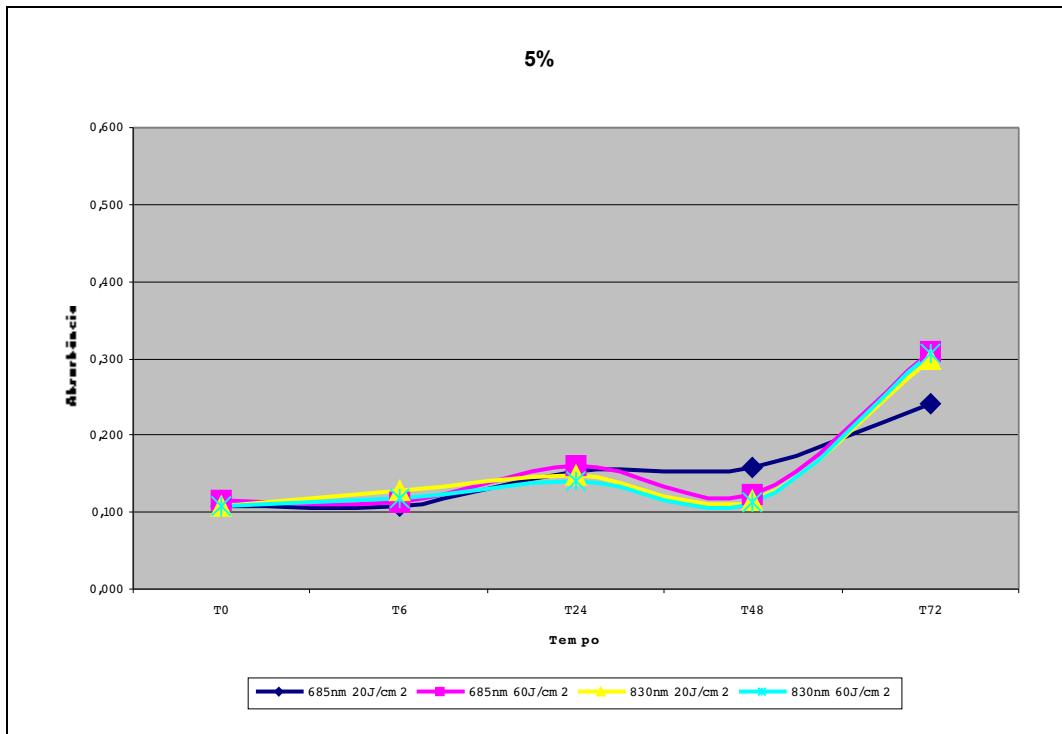


GRÁFICO 7 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas em déficit nutricional (BORGES, 2005)

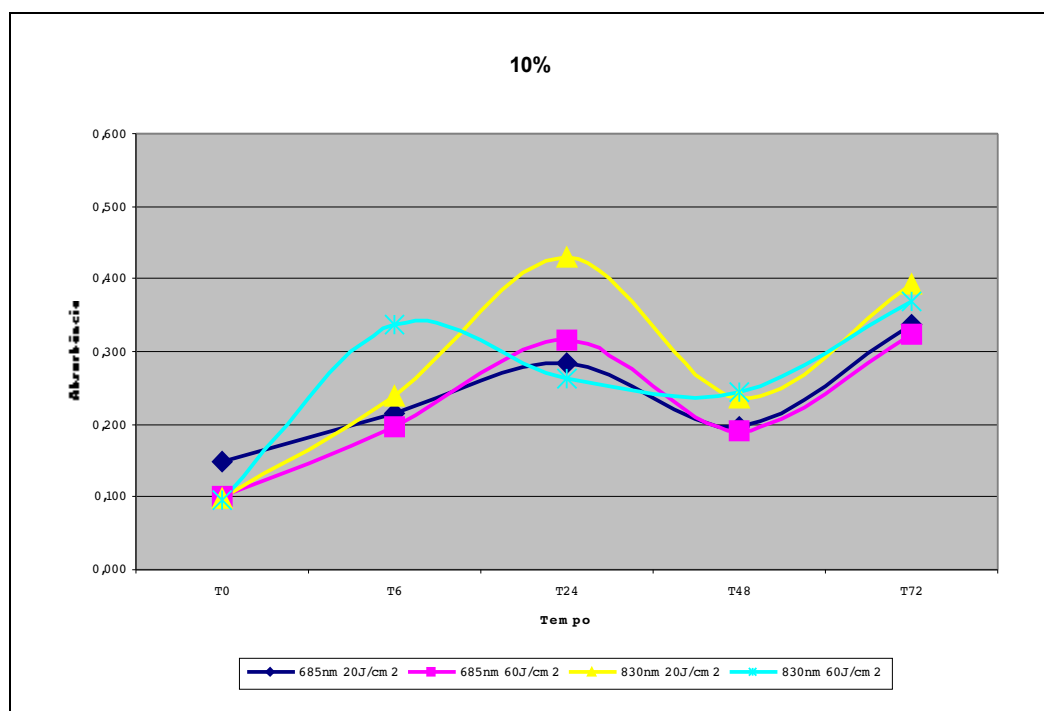


GRÁFICO 8 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 mantidas em nutrição padrão (BORGES, 2005)

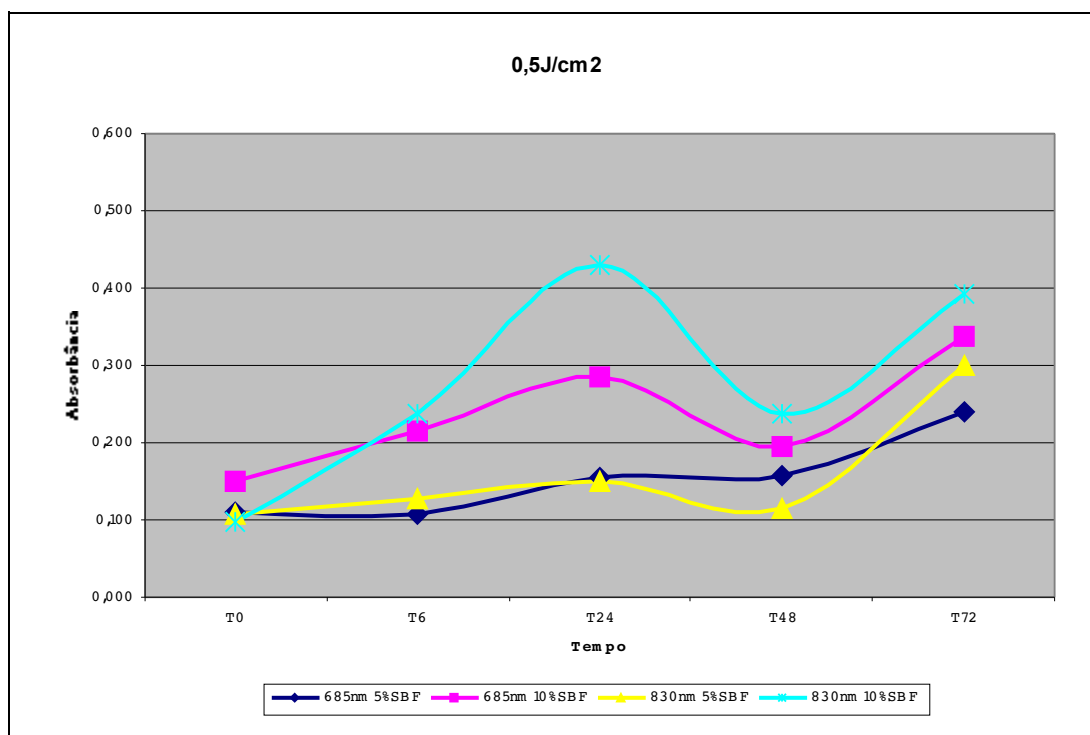


GRÁFICO 9 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 0,5 J/cm² (BORGES, 2005)

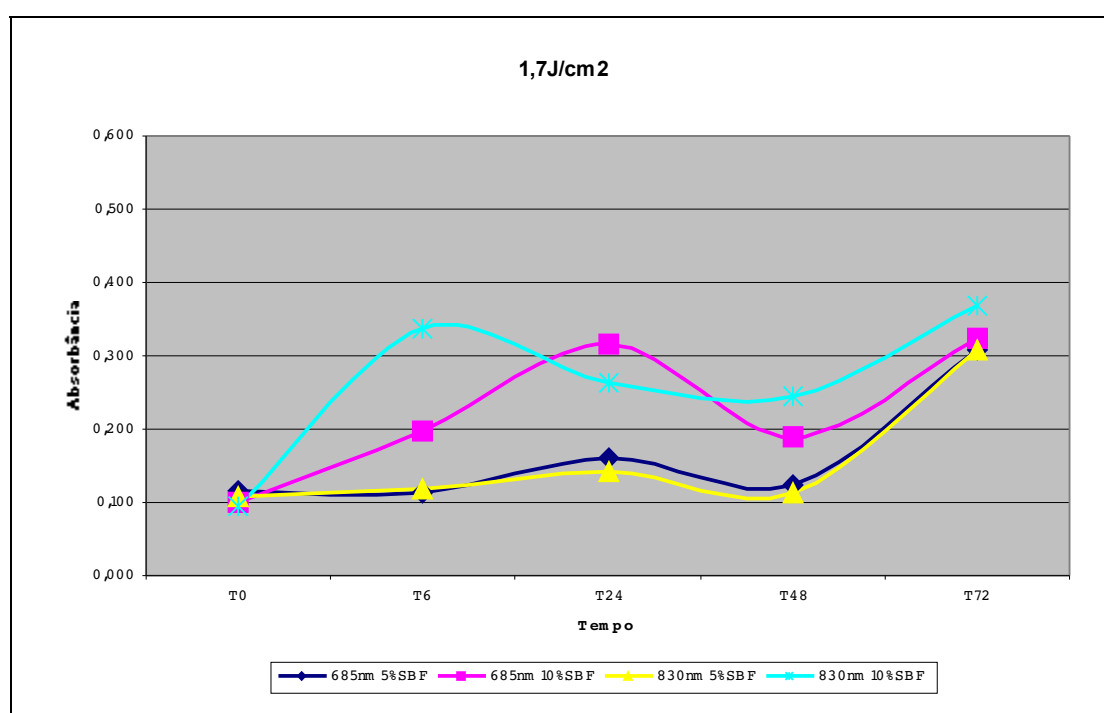


GRÁFICO 10 – Comportamento das culturas de células H.Ep-2 irradiadas com 1,7 J/cm² (BORGES, 2005)

No gráfico 9, pôde-se comparar todas as culturas que receberam $0,5 \text{ J/cm}^2$. Neste gráfico, as culturas mantidas a 10% SBF, e aquelas que receberam 830 nm, apresentaram os melhores resultados. O mesmo aconteceu quando as culturas irradiadas com $1,7 \text{ J/cm}^2$ foram comparadas (gráfico 10). Ou seja, as culturas mantidas em nutrição padrão apresentaram um melhor desenvolvimento que aquelas em déficit nutricional. Porém, as culturas mantidas a 5% SBF se comportaram de maneira semelhante, independente do comprimento de onda.

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada após verificar a distribuição da normalidade e a existência de diferenças significantes entre os desvios padrões, com o auxílio do programa Instat. Só então, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi indicado para avaliar os resultados desse experimento.

No quadro 5, verificou-se que a proliferação celular foi mais significativa após 48 horas do início do experimento, em todos os grupos. Ao final do experimento, todos os grupos apresentaram uma diferença significativa no aumento do número de células da cultura.

	T0 - T6	T6 - T24	T24 - T48	T48 - T72	T0 - T72
Grupo A	--	$p < 0,05$	--	$p < 0,01$	$p < 0,01$
Grupo B	--	--	--	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Grupo C	--	--	$p < 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
Grupo D	$p < 0,05$	$p < 0,05$	--	$p < 0,05$	$p < 0,001$
Grupo E	--	--	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Grupo F	--	--	--	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Grupo G	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,001$
Grupo H	$p < 0,001$	--	--	$p < 0,05$	$p < 0,001$

QUADRO 5 – Valores de significância durante a proliferação celular em cada grupo

Independente do meio de cultura utilizado, analisaram-se os grupos quanto às doses e aos comprimentos de onda utilizados (quadro 6). Neste caso, as culturas que receberam 0,5 J/cm² apresentaram, estatisticamente, um melhor desenvolvimento, tanto nas culturas que receberam 685 nm, quanto naquelas que receberam 830 nm.

	T0 - T6	T6 - T24	T24 - T48	T48 - T72	T0 - T72
685 nm – 0,5 J/cm²	p < 0,01	p < 0,01	--	--	--
685 nm – 1,7 J/cm²	--	--	--	--	--
830 nm – 0,5 J/cm²	--	p < 0,001	p < 0,001	--	--
830 nm – 1,7 J/cm²	--	--	p < 0,01	--	--

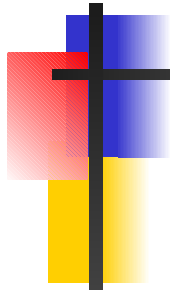
QUADRO 6 – Valores de significância entre as diferentes doses

Quanto ao comprimento de onda, quando os grupos foram comparados, apenas a cultura celular mantida em nutrição padrão, com comprimento de onda de 830 nm que recebeu 1,7 J/cm² apresentou diferença significativa (quadro 7).

	685 nm	830 nm
0,5 J/cm² - 5% SBF	--	--
0,5 J/cm² - 10% SBF	--	--
1,7 J/cm² - 5% SBF	--	--
1,7 J/cm² - 10% SBF	--	p < 0,001

QUADRO 7 – Valores de significância entre os comprimentos de onda

Quando os grupos foram comparados aos seus respectivos controles, não apresentaram diferença significativa em nenhum deles.



6. Discussão

6 DISCUSSÃO

Durante a revisão da literatura, observou-se um número reduzido de trabalhos que se relacionava diretamente com os resultados obtidos nesta pesquisa. Contudo, alguns trabalhos puderam ser utilizados como base, devido à semelhança na metodologia empregada, muito embora tenham usado diferentes linhagens celulares e protocolos de laserterapia.

Neste experimento, avaliou-se a influência do tempo na taxa de proliferação das células H.Ep-2 (oriundas do carcinoma epidermóide de laringe), irradiadas com 685 nm e 830 nm, nas doses de 0,5 J/cm² e 1,7 J/cm², mantidas em déficit nutricional (5% de SBF) e em nutrição padrão (10% de SBF). Não que o tempo total do ciclo celular seja diferente para as células tumorais, ou seja, que haja encurtamento do tempo do ciclo celular, mas é sabido que a laserterapia pode influenciar os mecanismos que promovem a divisão celular, alterando sua taxa de proliferação.

Neste trabalho, pôde-se observar que o tempo teve influência sobre o crescimento da cultura celular, aumentando sua taxa de proliferação após as 72 horas do experimento, fato este observado tanto usando culturas em déficit nutricional (5% SBF) quanto em culturas mantidas em nutrição padrão (10% SBF). Isto porque as células neoplásicas se comportam da mesma maneira que as células normais (EAGLE, 1955), diferentemente de Castro (2001) que observou um decréscimo na taxa de proliferação da cultura de células KB (carcinoma de boca) irradiadas com 685 nm e 830 nm, quando estas células estavam em déficit nutricional.

Usando-se repetidas irradiações, encontrou-se um aumento significativo ao final das 72 horas do experimento em todos os grupos, visto que repetidas irradiações aumentam as divisões celulares após cada exposição (SOUNDRY et al, 1988), num efeito cumulativo. E, mesmo que não tenham apresentado um aumento significativo quando comparadas ao grupo controle, as células irradiadas revelaram uma atividade proliferativa mais alta, assim como

KREISLER et al (2003) também observaram em seu trabalho. Contudo, Shu et al (2002) descobriram que, se estas irradiações repetidas estiverem associadas a doses e potências elevadas, podem levar a uma evidente diminuição do número total de células por uma estagnação celular na fase G0/G1 e apoptose, o que não foi observada neste trabalho.

Muitos trabalhos têm sido publicados com uma variedade de protocolos: doses, potências, comprimentos de onda, concentrações do meio de cultura. Isto tem provocado uma série de resultados que se contradizem.

Quando a luz visível foi usada ($\lambda = 685 \text{ nm}$), observou-se que, com a dose menor ($0,5 \text{ J/cm}^2$), a cultura mantida em déficit nutricional respondeu mais rapidamente à irradiação (já nas primeiras 24 horas). Isto aconteceu porque as menores doses estimulam a respiração celular (LUBART et al, 1992), demonstrando um aumento nas suas curvas de crescimento, da mesma forma que no trabalho de Lopes et al (1998), e que, assim como no trabalho de Almeida-Lopes et al (2001), independente da concentração do meio de cultura, as células apresentam aumento na taxa de proliferação quando menores tempos são utilizados. Porém, ao final das 72 horas do experimento, a cultura irradiada com $1,7 \text{ J/cm}^2$, apresentou um maior crescimento.

Da mesma forma, observou-se que, usando 830 nm , as células mantidas em déficit nutricional se comportaram de maneira semelhante, independentemente da dose utilizada. Como também foi observado no trabalho de Pogrel, Chen e Zang (1997) em culturas de fibroblastos e queratinócitos irradiados com 830 nm .

Comparando os dois comprimentos de onda (685 nm e 830 nm), nas doses ($0,5 \text{ J/cm}^2$ e $1,7 \text{ J/cm}^2$), e nas diferentes concentrações do meio de cultura (5% e 10% de SBF) que foram usados, encontrou-se diferença significativa apenas quando o laser a 830 nm foi usado associado com $1,7 \text{ J/cm}^2$ e 10% de SBF. Isto porque de acordo com o trabalho de Grossman et al 1998), os comprimentos de onda maiores podem ativar as funções celulares num processo oxidativo.

As células mantidas em nutrição padrão se desenvolveram melhor que aquelas mantidas em déficit nutricional, mesmo tendo sido observado que as mantidas em déficit nutricional se comportaram de maneira semelhante, independente da dose ou do comprimento de onda. Enquanto que aquelas mantidas em nutrição padrão e irradiadas com 830 nm se desenvolveram melhor que as irradiadas com 685 nm.

Pinheiro et al (2002) afirmaram não ter encontrado diferença significativa entre as diferentes concentrações quando usaram 635 nm; porém, quando usaram 670 nm, encontraram diferenças significantes. Em trabalho anterior, Pinheiro et al (2000) já haviam alertado para o fato de que a dose e o comprimento de onda seriam fatores determinantes para a proliferação de células H.Ep-2, e Hallman et al (1988) sugeriram que o estímulo poderia ser uma especificidade do tratamento (comprimento de onda, dose, potência, tempo) e que tais efeitos bioestimuladores poderiam se atribuídos a outros mecanismos como alteração na síntese de colágeno e no metabolismo celular.

Diversos fatores precisam ser analisados para determinar se um protocolo é favorável ou não ao tratamento. Cada célula possui sua especificidade de resposta, e o conhecimento dessa interação luz-resposta celular é que poderá determinar o emprego de uma terapêutica adequada. Para isso, outros estudos deverão ser realizados como o objetivo de ampliar os conhecimentos e identificar, com maior precisão, os protocolos mais seguros da laserterapia.

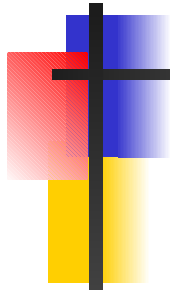


7. Conclusões

7 CONCLUSÕES

Sob os parâmetros estudados pode-se afirmar que:

- Houve aumento na taxa de proliferação das células H.Ep-2 irradiadas com o laser de baixa intensidade, porém, quando comparadas aos respectivos grupos controles, não se observou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados.
- Culturas celulares H.Ep-2 se desenvolveram e se proliferaram tanto em nutrição ideal (10% de SBF) quanto em déficit nutricional (5% de SBF), independente do comprimento de onda e da dose utilizada.
- A menor dose ($0,5 \text{ J/cm}^2$) promoveu uma proliferação mais rápida quando as células foram mantidas em déficit nutricional.
- A luz infravermelha promoveu melhores resultados de bioestimulação quando associadas à nutrição ideal e a $1,7 \text{ J/cm}^2$.



Referências

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-LOPES, L.; RIGAU, J. ZANGARO, R.A.; GUIDUGLI-NETO, J.; JAEGER, M.M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiation and same fluence. **Lasers Surg. Med.** v. 29 n. 2, p. 179-184. 2001.

AL-WATBAN, F.A.; ZHANG, X.Y. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.** v. 22. n 1, p. 15-18. Fev. 2004.

ARIZOTTO, N. A. Ação do laser Hélio-Neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia de força atômico e espectroscopia por infravermelho. 1998 Tese (doutorado) – UNICAMP.

CASTRO, J.F.L. Avaliação da proliferação celular em culturas de células de carcinoma epidermóide de boca (KB) submetidas a laserterapia não-cirúrgica de 685 nm e 830 nm: estudo espectrofotométrico pelo método MTT. 2002. Tese (doutorado) _ Programa integrado de doutorado em odontologia UFPB/UFBA.

EAGLE, H. Propagation in a fluid medium on a human epidermoid Carcinoma, Strain KB. **P.S.E.B.M.**, v. 89, P.362-364, 1955.

FRESHNEY, R. I. **Culture de cellules neoplasiques.** In: ADOPHE, M., MEIMON, G. B. Culture de cellules animals: methodologies applications. Ed. Inserm, cap.18, p.195-220, 1998.

FRESHNEY, R.I. Biology on cultured cell. A manual of basic technique. 3 a., New York: Wisley-less, 1991, 347p.

GENOVESE, J. W. Laser de Baixa potência: Aplicações Terapêuticas em odontologia. São Paulo : **Lovisa**, 2000. 175p.

GROSSMAN, N. , SCHNEID, N., REUVENI, H, et al. He-Ne (633 nm) Low Power Laser radiation Stimuates Proliferation of Keratinocyte Cultures Involving Reactive Oxygen Species. **Laser Lif. Sci.**, v. 9, p.111-126, 2000.

GROSSMAN, N., SCHNEID, N., REUVENI, H., et al. 780 nm Low Poser Diodo Laser Irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med.** v.22, p. 212-218, 1998.

HALLMAN, H. BASFORD, J. R. , O'BRIEN, J. F., et al. Does Low-Energy Helium-Neon Laser Irradiation Alter “*In Vitro*” Replication of Human Fibroblasts? **Lasers Surg. Med.**, v.8, p.125-129, 1998.

KANA, J. S. , HUTSCHENREITER, G., HAINA, D. et al. Effect of Low-power Density Laser Radiation on Healing of Open Skin Wounds in Rats. **Arch. Surg.** v. 116, p.293-296, 1981.

KARU, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser. **IEEE Journal of Quantum Electronics**. v.23, n.10, 1987.

KARU, T. I. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochemistry and Photobiology B. Biol.**: n.49, p. 1-17, 1999.

KARU, T. I., BAKEEVA, L. E., MANTEIFEL, V. M. Could irradiation with monochromatic light of visible spectral region cause genetic effects? Online. <http://www.photobiology.com/photobiology99/contrib/karu/index.html> . 1999.

KARU, T.I. Mechanism of low-power laser light action cellular level. **Laser in Medicine and Dentistry**. Vitagraf: Rijeka, v.4, p.97-125. 2000.

KARU, T.I. PYATIBRAT, L., KALENDO, G., Irradiation with He-Ne laser increase ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photo Biology: biology**. Tel Aviv, v.27, p.219-223, 1994.

KARU, T.I. PYATIBRAT, L., KALENDO, G., Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated *in vitro*. **Journal of Photochemistry and Photo Biology: biology**. Tel Aviv, v.27, p.219-223, 1995.

KARU, T.I. The science of low power laser therapy. London: **Harwood Acad. Publ.** 1997.

KARU, T.I., PYATIBRAT, L., KALENDO, G., Donors of NO and pulsed radiation at $\lambda = 820$ nm exert on cell attachment to extracellular matrices. **Toxicology Letters**. v.121, p.57-61, 2001.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.;d'HOEDT, B Low-level 809 nm BaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells *in vitro*. **Lasers Med. Surg. Sci.** v.18 n. 3, p. 100-103, 2003.

LOEVSCHALL, H. , ARENHOLT-BINDSLEY, D. Effect of Low Level Diode Laser Irradiation of Human Oral Mucosa Fibroblasts *in Vitro*. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.14, p.347-354, 1994.

LOPES, L. A., JAEGER, M.M., BRUNERA JUNIOR, A., et al. Action of power laser irradiation on the proliferation of human gingival fibroblasts "*in vitro*". **SPIE**. Spain. v.3248,p.156-161, 1998.

LUBART, R., WOLLMAN,Y., FRIEDMANN,H., et al. Effects of visible and near-infrared laser on cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology**, Tel Aviv, v.12, p.305-310, 1992 b.

MARCHESINI, R.; DASDIA.; MELLONI, E. et al. Effects of low-energy laser irradiation on colony formation capability in different human tumor cells *in vitro*. **Laser Surg. Med.** n.9, p.59-62, 1989.

MARQUES, M. M.; PEREIRA, A. N.; FUJIHARA, N. A.; NOGUEIRA, F. N.; EDUARDO, C. P. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastruture of human gingival fibroblasts. **Laser Surg. Med.** n.34, v.3, p. 260-265, 2004.

MESTER, E. Risultati Clinici di Stimolazione Laser e Studi Sperimentali circa il meccanismo di azione. **Minerva Medica**. v.72, p.2195-2199,1981.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 65, p.55-63, 1983.

NASCIMENTO, S. C. Recherche de L'activite Antitumorale de Produits de Synthese ou D'origine Naturelle: Utilisation du samba pour L'analyse des Modifications Cellulaires Induites [Dissertation]. Universite Joseph Fourier, Grenoble, 1993.

NUSSBAUM, E. L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630, 660, 810, 905 nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm² on three species of bacteria *in vitro*. **J. Clin. Laser Med. Surg.** n.20, v.6, p.325-333, 2002.

PINHEIRO, A. L. B.; NASCIMENTO, S. C.; VIEIRA, A. L. B.; BRUGNERA, A. Jr.; ZANIN, F. A.; ROLIM, A. B.; SILVA, P. S. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *in vitro* study. **J. Clin. Laser Med. Surg.** n.1 v.20, 23-26, 2002.

PINHEIRO, A. L. B. NASCIMENTO, S. C., VIEIRA, A.L.B. et al. Effects of LLLT on the proliferation of H.Ep-2 cells: study *in vitro*. **Laser Dentistry**, v. 6, p. 75-81, 2000.

POGREL, M. A.; CHEN, J. W.; ZANG, K. Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. **Laser Surg. Med.** n.20, p.426-432, 1997.

PUGLIESE, L. S.; MEDRADO, A. P.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.** n. 17, v.4, p. 307-13, 2003.

ROCHKIND, S., ROUSSO, M., NISSAN, M., et al. Systemic Effects of Low-Power Laser Irradiation on the Peripheral and Central Nervous System, Cutaneous Wounds, and Burns. **Laser in Surgery and Medicine**. v.9, p.174-182, 1989.

SANDOVAL, R. L.; KOGA, D. H.; BULOTO, L. S.; SUZUKI, R.; DIB, L. L. Management of chemo-and-radio therapy induce oral mucositis with low-energy laser: initial results of A. C. Camargo Hospital, **J Appl. Oral Sci.** n. 11, v.4, 337-41, 2003.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHIDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **British Journal of Dermatology**. n.148, p.334-336, 2003.

SHEFER, G.; PARTRIDGE, T. A.; HESLOP, L.; GROSS, J. G.; ORON, U.; HALEVY, O. Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. **J. Cell Sci.** n. 115, p.1461-1469, 2002.

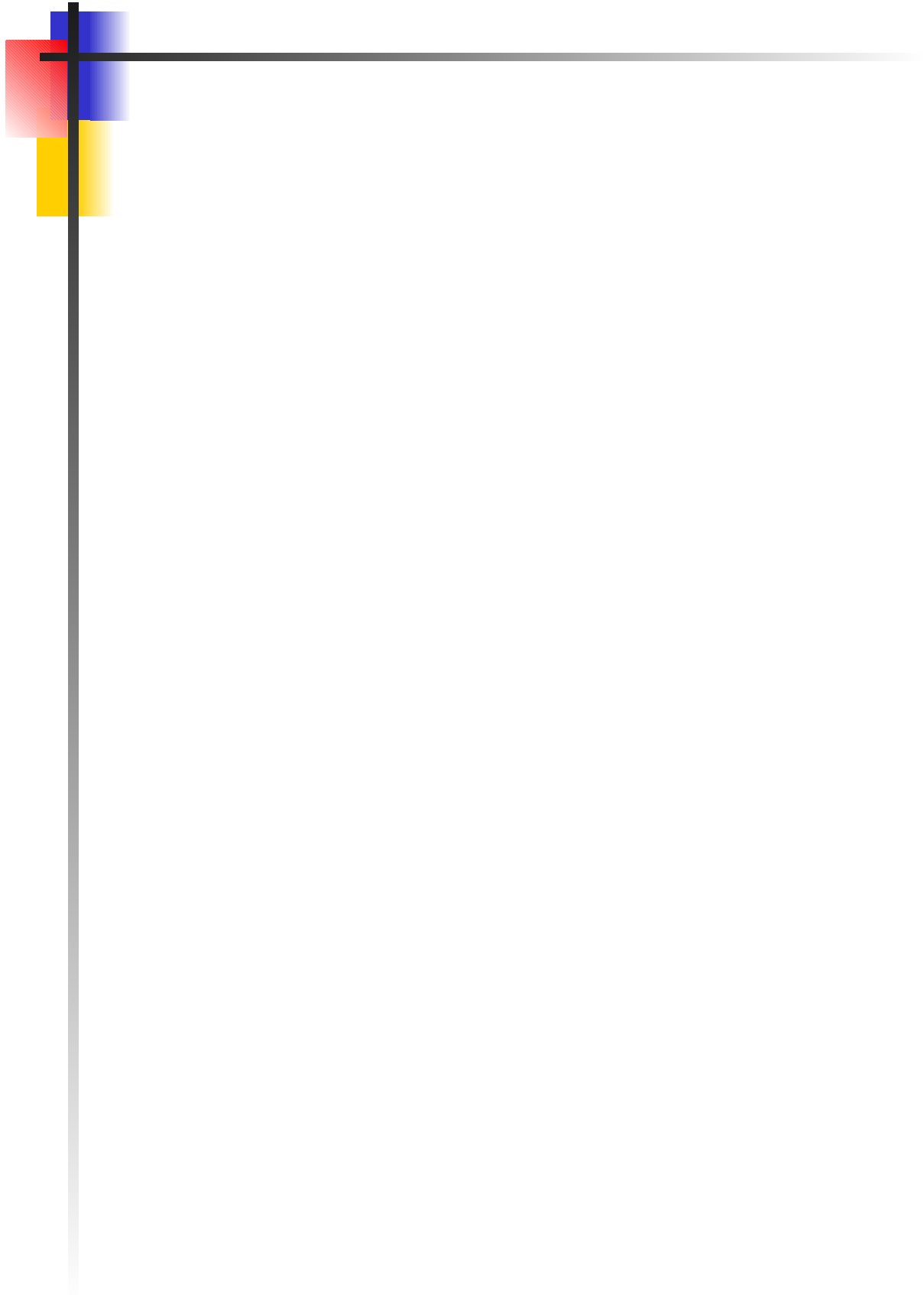
SHU, B; WU, Z.; HAO, L.; ZENG, D. FENG, G.; LIN, Y. Experimental study on He-Ne laser irradiation to inhibit scar fibroblast growth in culture. **Chin. J. Traumatol.** V.4, n 5, p. 246-9. Ago 2002.

SOUDRY, M., FRANQUIN, J. C., MARTIN, P. M., et al. Effect of a helium-neon laser on cellular growth: an *in vitro* study of human gingival fibroblasts. **Journal of Biology Buecale**. V.16, n.3, p.129-135,1988.

SROKA, R. et al. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Laser Surgery and Medicine**. V. 25, p. 263-271, 1999.

VAN BREUGEL, H.H.; BAR, P.R. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*. **Masters Surg. Med.** V. 12. n. 5, p. 528-537. 1992.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** v.36; p.131-149, 2003.



Anexo



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa**

Of. N.º 725/2004-CEP/CCS

Recife, 20 de dezembro de 2004.

Ref. Protocolo de Pesquisa n.º 295/2004-CEP/CCS

Título: "Indução da proliferação celular em culturas de células H.Ep2 através da laserterapia de baixa intensidade"

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE registrou e analisou, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 20 de dezembro de 2004

Ressaltamos que ao pesquisador responsável deverá apresentar relatório, em 30 / 06 / 2005

Atenciosamente,



Profª Maria Clara Albuquerque
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

À
Sra. Daniela Sales de Assis Borges
Pós-Graduação de Odontologia - CCS/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 3271 8588; cepcs@npd.ufpe.br

Ata da 50ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco- Facial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 10 de março de 2006.

Às 9:00(nove horas) do dia 10 do mês de março do ano de dois mil e seis, reuniram-se no Auditório do Curso de Odontologia do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial da UFPE, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. Jair Carneiro Leão, atuando como (presidente), Profa. Dra. Marize Raquel Diniz da Rosa da UFPB, atuando como primeira examinadora. Profa. Dra. Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho – UFPE, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“INDUÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CULTURAS H.Ep-2, SUBMETIDAS À LASERTERAPIA DE 685 nm”**, da CD DANIELA SALES DE ASSIS BORGES, candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da professora Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO. Dando início aos trabalhos o senhor Coordenador Prof. Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO, por fazer parte da Banca Examinadora, convidou a mestranda, DANIELA SALES DE ASSIS BORGES, para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho. Seguindo o presidente convidou os senhores membros para compor a Banca Examinadora, em seguida foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse dos trabalhos e conferir os membros, convidou a candidata para ocupar seu lugar sendo dado início a candidata colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores se reuniram em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Profa. Dra. Marize Raquel Diniz da Rosa (**APROVADA**), Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho (**APROVADA**), Prof. Dr. Jair Carneiro Leão (**APROVADA**) a candidata recebeu três conceitos (**APROVADA**) é considerada (**APROVADA**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso. Face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a UFPE através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis para os devidos fins. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente da Banca

Examinadora encerrou a sessão e para constar eu, Oziclere Sena de Araújo Silva, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE, **DANIELA SALES DE ASSIS BORGES** *Daniela Sales de Assis Borges*

Oziclere Sena de Araújo Silva

Recife, 10 de março de 2006.

Jair Carneiro Leão
Prof. Dr JAIR CARNEIRO LEÃO
Presidente,

Marize Raquel Diniz da Rosa
Profa.Dra. MARIZE RAQUEL DINIZ DA ROSA
1º Examinador

Alessandra Albuquerque Tavares Carvalho
Profa. Dra. ALESSANDRA ALBUQUERQUE TAVARES CARVALHO
2º Examinador