

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

# **Efeito da radiação do diodo laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ) em cultura de fibroblastos (CHO-K1)**

**Celia Marinho Manzanete Carnevalli**

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

São José dos Campos, SP  
2001

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

# **Efeito da radiação do diodo laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ) em cultura de fibroblastos (CHO-K1)**

**Celia Marinho Manzanete Carnevalli**

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

Orientadora: Profa. Dra.  
Cristina Pacheco Soares.

São José dos Campos, SP  
2001

**Carnevalli, Celia Marinho Manzanete**

Efeito da radiação do diodo laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ) em cultura de fibroblastos (CHO-K1). São José dos Campos: Univap, 2001. 50p.

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

Efeitos da irradiação, Laser de Baixa Potência; Engenharia Biomédica; dissertação de Mestrado; Soares, Cristina Pacheco, orientadora; t.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmico e científicos a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura:

Data:

**Efeito da radiação do diodo laser ( $\lambda = 830\text{nm}$ ) em cultura de  
fibroblastos (CHO-K1)**

**Celia Marinho Manzanete Carnevalli**

Banca examinadora:

Prof. Dra Cristina Pacheco Soares (Orientadora)

Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (UNIVAP)

Prof. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha (UNESP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D – Univap  
São José dos Campos, 28 de setembro de 2001

*Dedico este trabalho  
a meu Marido e filhos,  
A na Paula e César*

## **AGRADECIMENTOS**

**A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, e me acompanhar em mais esta conquista.**

Às pessoas que trabalham no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e ao Dr. Newton Soares da Silva que me receberam com entusiasmo e boa vontade, cedendo-me todo o tempo necessário e não medindo esforços para me ajudar. A todos os amigos e colegas que ajudaram a tornar esse sonho realidade.

Gostaria de agradecer a graduanda Graziela de Sousa pela amizade e ajuda prestada para a realização das fotografias elaboradas deste trabalho. Devo agradecer Também o mestrando Marcelo Pazos, pela paciência ao me ajudar ultrapassar a minha dificuldade no que diz respeito a compreensão da língua inglesa.

Agradeço a Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, pela orientação, sabedoria, amizade, paciência, profissionalismo e boa vontade que com carinho e dedicação me orientou neste trabalho, cujo a boa vontade e sorriso terno me ensinou a trabalhar com cultura de células.

Agradeço imensamente a minha mãe e meus irmãos que me incentivaram e sempre torceram por mim, fazendo com que eu nunca me sentisse sozinha e em especial a meu pai, Homem inteligente, de muita Energia Espiritual, Honestidade, Garra e exemplo de trabalhador.

Agradeço em especial a meu amado esposo Remo César Carnevalli, Homem, Pai cujo o amor, dedicação, bom humor, paciência, carinho e otimismo fizeram com que eu tivesse a certeza de que podemos, “dosar” com equilíbrio e sabedoria a dupla “profissão - Família”, sem as quais não conseguiria finalizar esta dissertação.

**A vocês minha eterna gratidão**

## RESUMO

*O uso de lasers de baixa potência têm sido recomendado por muitos autores no tratamento de úlceras ou feridas afim de acelerar o processo de cura, no entanto a literatura é muito conflitante com relação aos efeitos do laser neste processo, sendo difícil de identificar efeitos específicos do laser porque muitos fatores são relevantes no processo de cura das feridas e muitas variáveis modificam o efeito do laser nos tecidos. A utilização do laser em culturas de células visa a compreensão do mecanismo da ação do LBP, em sistemas biológicos.*

*Em nosso trabalho irradiamos células CHO-K1 com baixa potência e obtivemos um efeito bioestimulador do grupo irradiado em relação ao grupo controle, onde identificamos quais os efeitos produzidos em estruturas celulares de células fibroblásticas durante um processo bioestimulador com marcadores específicos para mitocôndrias (JC-1), núcleo (DAPI) e citoesqueleto (rodamina –faloidina).*

*A fluorescência usada para visualizar o núcleo da célula, nos permitiu observar que o processo de divisão celular foi intenso no grupo irradiado em relação ao grupo controle até o quarto dia de experimento. As células irradiadas apresentaram mudança na conformação morfológica das mitocôndrias, identificamos que a disposição das proteínas actínicas dos filamentos intermediários sofrem um perturbação durante o processo de irradiação que são restabelecidos completamente.*

## ABSTRACT

*The use of low power lasers has been recommended by many authors for the treatment of ulcer or wounds, aiming to accelerate the healing process. Meanwhile the literature about the effects of laser in this process, is very conflicting being difficult to identify effects of laser because many factors are relevant to the wound healing process and many modify the effect of laser in the tissue. The use of laser in cell culture in search for answers to best understand the mechanism of action of low power laser, has been of great use.*

*In this work, CHO-K1 cells were irradiated with low doses and a significant biostimulation effect of the irradiated group in relation to control group was obtained, where we identified which are the real effects that low power laser presents in fibroblastic cells during the biostimulation process with specific probes for mitochondria (JC-1), núcleo (DAPI), and cytoskeleton (rhodamine-phalloidin).*

*The fluorescence used to visualize the cells, allowed to observe that the process of cellular division was intense in the irradiated group in relation to the control group up to day 4 of experiment. The irradiated cells had changes in the morphologic conformation at mitochondria. We identified the arrangement of the actin proteins of the intermediary filaments suffer a disturb during the process of irradiation and are reestablished completely.*





## SUMÁRIO

### 1- INTRODUÇÃO

1.1	Interação laser-tecido.....	02
1.2	Efeito do laser “ <i>in vitro</i> ”.....	03
1.3	Ação do Laser em Organelas Citoplasmáticas.....	06
1.3.1-	Mitocôndrias.....	06
1.3.2-	Núcleo.....	08
1.3.3-	Citoesqueleto.....	09
1.4	Microscopia de Fluorescência.....	10
1.5	Marcadores Biológicos fluorescentes.....	11
1.5.1-	JC-1.....	11
1.5.2-	DAPI.....	12
1.5.3-	Rodamina-Faloidina.....	13

### 2- OBJETIVO 14

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS 15

3.1	Cultura de Células.....	15
3.1.1-	Linhagem Celular.....	15
	Células CHO-K1	
	Soluções Tampão	
	Enzima Tripsina	
	F12 Nutriente Misture	
3.2	Crescimento e Manutenção de Culturas de Células.....	16
3.3	Congelamento e Descongelamento Celular.....	17
3.4	Controle de Células Viáveis.....	17
3.5	Contagem Celular.....	18

3.6 Irradiação das Placas.....	18
3.7 Análise Estatística.....	19
3.8 Procedimento para Marcação e Análise das Culturas.....	19
3.8.1- Mitocôndrias.....	19
3.8.2- Núcleo.....	19
3.8.3- Citoesqueleto.....	20
 4-RESULTADOS	 21
4.1 Proliferação Celular.....	21
4.1.2 Análise Estatística.....	22
4.2 Marcadores fluorescentes.....	23
4.2.1- JC1: marcador fluorescente para mitocôndrias.....	23
4.2.1- DAPI: marcador fluorescente para núcleo.....	24
4.2.1- Faloidina Rodamina: marcador fluorescente para citoesqueleto.....	25
 5- DISCUSSÃO	 37
 6- CONCLUSÕES	 42
 6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 43

## INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Figura 1. Esquema da Mitocôndria: estrutura cilíndrica que possui material genético próprio DNA e é responsável pela produção de energia na forma de ATP. Biology Raven, 1992.....	07
Figura 2- Esquema da estrutura do núcleo , o DNA está sequestrado no núcleo. Raven Biology, 1992.....	09
Figura 03: Esquema do citoesqueleto: responsável por controlar os movimentos da célula. Biology Raven, 1992.....	11
Figura 04: Esquema da Irradiação das placas.....	17
Figura 5: Gráfico da análise da proliferação celular obtido da média de 48 amostras...	21
Figura 6: Histograma demonstrando o desvio padrão do grupo controle e do grupo irradiado. * Significante $p > 0,05$ .....	22
Figura 7: Células CHO-K1 1º dia marcadas com <b>JC-1</b> Células controle marcadas com sonda fluorescente JC-1 apresentam suas mitocôndrias filamentosas, com alto potencial de membrana. X 2500.....	26
Figura 8: Células CHO-K1 irradiadas e marcadas com <b>JC1</b> 1º dia de experimento. As células irradiadas apresentam suas mitocôndrias com aspecto granular (→). Podemos observar uma migração para a região perinuclear (>), o potencial de membrana permanece alto. X2500.....	26
Figura 9: Células CHO-K1 controle marcadas com <b>JC1</b> 3º dia de experimento. Observa-se uma pequena redução do potencial de membrana (→). As mitocôndrias	

encontram-se dispersas no citoplasma com aspecto filamentosos (→) X 2500.....27

Figura 10: Células CHO-K1 irradiadas marcadas com **JC1** 3<sup>o</sup> dia de experimento. As mitocôndrias localizadas na região perinuclear apresentam aspecto granular e com alto potencial de membrana (→) ; enquanto as mitocôndrias da periferia apresentam-se com aspecto granular possuem baixo potencial de membrana (>). X 2500.....27

Figura 11: Células CHO-K1 controle marcadas com **JC1**, 4<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se células com altas atividade mitocondrial (→) e outras com baixa atividade (>) X2500.....28

Figura 12: Células CHO-K1 marcadas com **JC1** no 4<sup>o</sup> dia de experimento. Pode-se notar intenso agrupamento das mitocôndrias na região perinuclear com alta atividade mitocondrial (→) .X 2500.....28

Figura 13: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **DAPI**, 1<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se atividade mitótica nas células controle, com intensa marcação dos cromossomos. (→) . X2500.....29

Figura 14: CHO-K1 marcadas com **DAPI**, 1<sup>o</sup> dia de irradiação. Nota-se condensação da cromatina (→) e organização dos cromossomos para divisão celular (cabeça de seta). X 2500.....29

Figura 15: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **DAPI**, 4<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se cromatina difusa (seta) e a presença de células com células com núcleo fragmentado (>). A quantidade de células em divisão é menor. X 2500.....30

Figura 16: CHO-K1 irradiadas marcadas com **DAPI**, 4<sup>o</sup> dia de experimento. Nota-se um aumento no número de células e intensa atividade mitótica (seta), com a cromatina condensada (>) e melhor preservação das células (\*). x 2500.....30

Figura 17: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **DAPI**, 5<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se um comprometimento da integridade celular, a cromatina difusa (→) ; não sendo observado atividade mitótica. X 2500.....31

Figura 18: CHO-K1 irradiadas marcadas com **DAPI**, 5<sup>o</sup> dia de experimento. As células ainda apresentam atividade mitótica (>), cromatina bem preservada (→). X2500.....31

Figura 19: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **faloidina rodamina**, 1<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se a perfeita distribuição dos filamentos intermediários no citoplasma (→) . X 2500.....32

Figura 20: Células CHO-K1 marcadas com **faloidina rodamina**, 1<sup>o</sup> dia de irradiação. Observa-se leve perturbação na distribuição dos filamentos (seta) ocorrendo ainda a disposição de feixes paralelos (>) . X2500.....33

Figura 21: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **faloidina rodamina**, 2<sup>o</sup> dia de experimento. Nota-se a distribuição paralela e organizada dos filamentos intermediários (→) . X2500.....34

Figura 22: CHO-K1 irradiadas marcadas com **faloidina rodamina**, 2<sup>o</sup> dia de irradiação. Observa-se completa desorganização dos feixes de filamentos intermediários ocorrendo uma marcação difusa da proteína (>). X 2500.....34

Figura 23: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **faloidina rodamina**, 3<sup>o</sup> dia de experimento. Os filamentos intermediários permanecem intactos, ocorrendo marcação menos intensa que no 1<sup>o</sup> dia. (→)X 2500.....35

Figura 24: CHO-K1 irradiadas marcadas com **faloidina rodamina**, 3<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se reorganização dos feixes de filamentos intermediários (→). X 2500.....35

Figura 25: Células CHO-K1 grupo controle marcadas com **faloidina rodamina** 4<sup>o</sup> dia de experimento. Nota-se a disposição inalterada dos filamentos intermediários (→). X 2500.....36

Figura 26: CHO-K1 irradiadas marcadas com **faloidina rodamina**, 4<sup>o</sup> dia de experimento. Observa-se o completo restabelecimento da organização dos filamentos intermediários (→) X 2500.....36

## ABREVIATURAS

ADP: Adenosina di-fosfato

ATP: Adenosina tri-fosfato

$\text{Ca}^{2+}$  : Ion cálcio

CHO: Células de Ovário de Hamster

Cm: Centímetro

DMSO: Dimetilsulfóxido

J : Joules

LBP: Laser de Baixa Potência

M : Molar

mg : Miligramas

$\text{Mg}^{2+}$ : Magnésio

mW: Miliwatts

$\text{Na}^+$ : Ion sódio

$^{\circ}\text{C}$  : Grau Centígrado

PBS: Solução tampão fosfato

Rpm: Rotações por Minuto

SFB: Soro fetal bovino

W : Watts

$\lambda$  : Comprimento de onda

$\mu\text{g}$  : Micrograma

$\mu\text{l}$  : Microlitro

$\mu\text{M}$ : Micromolar

$\mu\text{m}$ : Micrometro



***“Uma corrida nem sempre é  
vencida pelo mais rápido, mas  
às vezes por aquele que  
apenas se mantém nela...”***

***autor desconhecido***1-INTRODUÇÃO

Na história da medicina e da odontologia, a busca de procedimentos para minimizar a dor, estimular a cicatrização e regressão de edemas, com conseqüente ação antiinflamatória e bioestimulação celular, têm feito com que cientistas pesquisem dia após dia objetivando descobrir algo que, de certo modo, possa atuar no órgão, tecido ou célula sem causar efeitos secundários deletérios aos tecidos circunvizinhos (DONATO & BORAKS, 1993). O uso do laser de baixa potência (LBP) foi difundido no Japão e Europa por mais de 10 anos; despertando interesse para a odontologia com técnicas que incluem diferentes aplicações clínicas entre elas: aceleração da cicatrização de ferida cutânea, remodelamento da restauração óssea, normalização da função hormonal anormal, atenuação da dor, excitação do lançamento da endorfina e modulação do sistema imune (WALSH 1997, BASFORD *et al* 1996). No entanto a literatura é muito conflitante com relação aos efeitos do laser nestes processos, sendo difícil de identificar efeitos específicos do laser porque muitos fatores são e muitas variáveis modificam o efeito do laser nos tecidos (KIMURA *et al* 2000).

A palavra laser provém de um abreviatura que significa amplificação da luz por ação estimulada de radiação. Este gerador ou laser deverá conter substâncias (sólidas, líquidas ou gasosas) que possuam grandes diferenças nos níveis de energia, com tempos relativamente longo de existência. Vários elementos foram descobertos para a fabricação de uma fonte de laser: certos sólidos, cristais, semicondutores, vapores, gases e líquidos. Cada elemento fornece uma variedade diferente de emissões no espectro, que atualmente cobrem a faixa espectral do ultravioleta ao infravermelho longínquo. A estrutura de um laser a diodo, é formada por um bloco de material cristalino semiconductor. As duas estruturas cristalinas são dotadas com certa quantidade de material para que possam apresentar características elétricas diferentes. A emissão pode ser na região do vermelho e do infra-vermelho próximo. (GENOVESE, 1991)

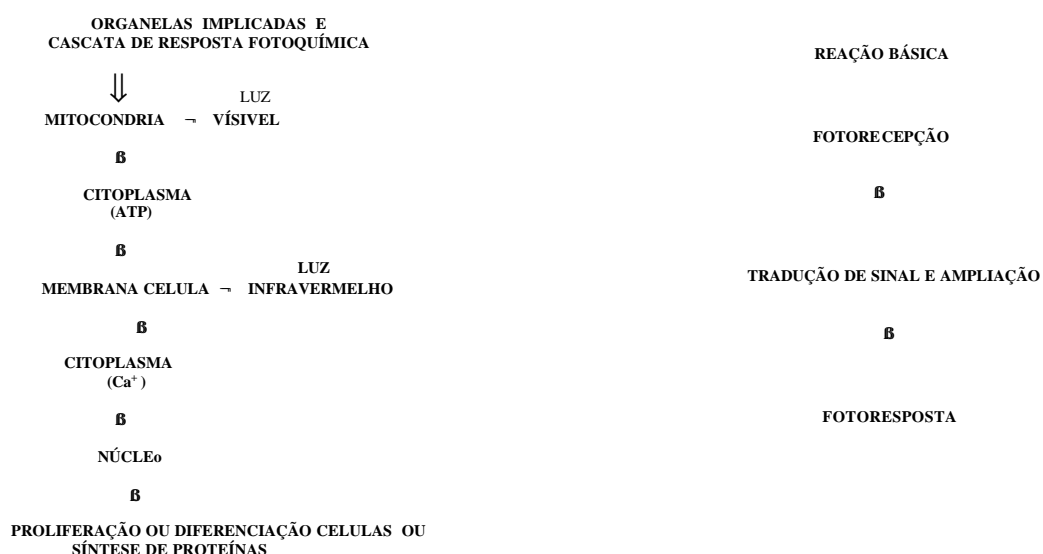
As radiações ópticas produzidas pelos lasers médicos têm basicamente as mesmas características, porém se trabalha com o laser buscando resultados clínicos bastante específicos. A célula tem um limiar de sobrevivência, de acordo com a localização do tecido e seu estado fisiológico. Quando trabalhamos respeitando esse limiar da célula, lhe oferecemos uma baixa intensidade de energia, que será utilizada

por ela de maneira que estimule sua membrana, suas mitocôndrias e outras estruturas celulares envolvidas em um processo de bioestimulação. Dessa forma estaremos induzindo essa célula à biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, isso denomina-se Laser Terapia (LOPES, 1999).

O conhecimento dos parâmetros ópticos da pele ou da localização onde será aplicado o laser é importante para todo o tipo de terapia a laser, pois a porcentagem da incidência e penetração da luz sobre um determinado tecido ou célula com diferentes lasers é um fator decisivo para a seleção da dose de irradiação necessária para se produzir o efeito desejado (KOLÀROVÀ *et al*, 1999). A terapia com laser de baixa potência devido a sua luz monocromática é capaz de alterar o comportamento celular sem provocar aquecimento significativo. O primeiro efeito catalogado foi sua ação bioestimuladora, porém a literatura menciona sua capacidade de inibir a atividade celular. Contudo tem-se que, para se obter o efeito de bioestimulação é necessário uma densidade de energia de 1 a 4 J/cm<sup>2</sup> e uma potência de 10mW a 90 mW (BASFORO *et al*, 1996).

## 1.1- Interação Laser-Tecido

O mecanismo da interação do laser com a célula foi descrito por KARU, *et al* em 1988 como demonstrado abaixo. Sendo que os incrementos de ATP mitocondrial que se produz após irradiação com laser, favorecem um grande número de reações.



A energia laser entregue ao tecido na terapia de baixa potência, altera através de diversas reações bioquímicas o metabolismo usual da região tratada (WEI YU *et al*, 1997). A exposição dos tecidos à radiação laser na região do vermelho aumenta a taxa de formação do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, como também o tamanho e o número de mitocôndrias (MANTEIFEL *et al*, 1997), somando-se a isto, existe um acúmulo de material fibrilar no citoplasma de fibroblastos. Estas mudanças estão associadas a ativação do metabolismo e a síntese protéica, acelerando a cicatrização (BOSATRA, 1984; VACCA *et al*, 1996).

A maior absorção do laser por estruturas celulares ocorre na região do vermelho visível e no infravermelho que são mostrados em proteínas fotorreceptoras responsáveis pelos efeitos biológicos, que não são bem conhecidas; estudos têm sugerido que alguns elementos do sistema citocromo mitocondrial assim como porfirinas da célula absorvem esta luz em forma de energia (KOMAROVA *et al*, 2000).

O laser de baixa potência tem sua ação através de uma conversão foto-química e a absorção de energia pelos fotoreceptores. Este tipo de reação é bem conhecida por receptores especializados tais como rodopsina e clorofila. A absorção através de moléculas não especializadas (moléculas que absorvem luz em certos comprimentos de onda, sendo que a absorção da luz não é específica) é bastante usada. A molécula que está absorvendo luz, transfere esta energia para outra molécula, ativando a célula e causando reações químicas no tecido circunvizinho. Este tipo de reação é usado em terapia fotodinâmica (KARU 1999).

## **1.2- Efeito do Laser “*in vitro*”**

Segundo BERKI, 1988 a presença de uma lesão leva à queda da concentração de oxigênio e nutrientes no local, dificultando desta forma a divisão celular. A energia do LBP, provavelmente, é absorvida intracelularmente e convertida em energia metabólica.

KARU, 1989 concluiu que fotoreceptores primários são componentes da cadeia respiratória, o que explica a universalidade dos efeitos do LBP na estimulação do metabolismo celular, dependentes da dose de luz. Em baixas doses, a irradiação causa regulação das reações do metabolismo celular e com altas doses ocorrem danos

fotodinâmicos. A magnitude do efeito de bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação, o que explica porque o efeito nem sempre é possível.

Em 1999, POURREAU-SCHENEIDER *et al*, estudaram as modificações na dinâmica do crescimento e ultraestrutura dos fibroblastos humanos gengivais, após o tratamento com laser de Hélio-Neônio onde foi observado através de microscopia eletrônica de transmissão, que a irradiação com laser de baixa potência promoveu crescimento e hiperplasia mitocondrial, desenvolvimento de microfilamentos citoplasmáticos e da matriz perinuclear.

NARA *et al*, 1990 estudaram cultura de fibroblastos pulpar humano com dose aplicada de 0,02 a 2 J /cm<sup>2</sup> e 0,05 W/ cm<sup>2</sup> com laser de Arseneto de Gálio Alumínio (As-Ga-Al), comprimento de onda de 900nm e obtiveram um aumento da proliferação celular quando as densidades de energias depositadas estavam entre 0,04 e 0,20 J /cm<sup>2</sup>.

Segundo FRESHNEY, 1990 o estudo *in vitro* tem sido muito utilizado devido a facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub> podem ser obtidos de maneira precisa, além de conseguir amostras homogêneas; contudo existem dificuldades em elaborar protocolos viáveis para as células uma vez que elas precisam de ambiente estéril e asséptico para sua sobrevivência.

Em 1991 FRIEDMANN *et al*, em seus experimentos descreveram um mecanismo capaz de responder a ação estimulante do laser de He-Ne ( $\lambda = 632 \text{ nm}$ ) e o diodo laser ( $\lambda = 780 \text{ nm}$ ), com baixa potência em cultura de células. A irradiação laser intensifica o gradiente eletroquímico transmembrana na matriz mitocondrial. A eficiência da força do próton ocorre devido a alta concentração de cálcio encontrado na matriz mitocôndrial de fibroblastos irradiados, aumentando a proliferação das células cultivadas e a produção de colágeno tipo 1. A densidade de potência e o tempo de exposição ao laser de He-Ne são fatores importantes, assim como a dose de energia total em fotobiomodulação de fibroblastos humanos *in vitro*. O tempo de exposição e densidade de potência, determinam o efeito da irradiação laser, ocorrendo uma inibição ou excitação podendo ser observado com o mesmo laser e as mesmas células (VAN BREUGEL 1992). A irradiação com laser He-Ne aumenta o nível de adenosina trifosfato (ATP) em células HeLa, desta forma aumentando a monocamada de células,

fazendo com que as mesmas cheguem a um crescimento confluyente mais rapidamente (KARU 1995).

LUBART *et al*, 1993 observaram o efeito de vários comprimentos de onda na proliferação de fibroblastos e obtiveram que a luz laser com comprimentos de onda de 540nm e de 600nm a 900nm acelerou significativamente a mitose dessas células, aumentando desta forma a velocidade de produção do colágeno e fibroblastos.

HRNJAK *et al*, 1995 verificaram a bioestimulação em culturas de fibroblasto embrionário humano, com dose única do laser de He-Ne contínuo com densidade de energia de 0,5; 1 e 2J/cm<sup>2</sup>. SKINNER *et al*, 1996 observaram em seu experimento uma bioestimulação no metabolismo do colágeno em cultura de fibroblasto embrionário humano irradiado. A produção do procolágeno de fibroblasto foi monitorada pela síntese de 3H (hidroxiprolina) e replicação do ácido dextrorribonucléico (DNA) que foram acompanhados pela incorporação de timidina. Os autores obtiveram uma significativa estimulação na função fibroblástica com doses baixas 0,99 e 0,52 J/cm<sup>2</sup>, com laser pulsado de baixa potência de Arseneto de Gálio (AsGa).

Rigau, em 1996 estudou o efeito de um laser *Argon:Day* emitindo comprimento de onda em 633nm no comportamento e na morfologia de fibroblastos de linhagem primária em cultivo. Trabalhou com um aparelho com potência óptica de saída de 38mW, com fluência de 2J/cm<sup>2</sup>. A autora verificou que esse tipo de laser induziu vários efeitos biológicos nos fibroblastos dos grupos irradiados como: formação de colônias, movimento de quimiotaxia e quimiocinética.

Estudos com células *in vitro* têm obtido resultados inconsistentes com relação aos efeitos do laser a nível bioquímico. Fibroblastos são as células mais amplamente testadas no estudo dos efeitos biológicos dos lasers de baixa potência, pois um possível efeito bioestimulante nessas células implicará em efeitos relevantes em várias patologias (KIMURA *et al*, 1997).

Em estudos utilizando radiação emitida por um diodo laser ( $\lambda = 60\text{nm}$ ) sobre duas linhagens primárias de fibroblastos humanos, uma originária de tecido normal outra de cicatriz hipertrófica, WEBB *et al*, 1998 demonstraram um significativo aumento na proliferação celular de fibroblastos da linhagem normal em relação aos controles não irradiados, utilizando densidade de energia de 2,4 e 4 J/cm<sup>2</sup>.

LOPES *et al*, 1999 observaram uma proliferação significativa para cultura primária de fibroblastos de gengiva humana, cultivados com “déficit” nutricional e irradiados comparados com os grupos controle cultivados com o mesmo meio e não irradiados.

GROSSMAN *et al*, 2000 obtiveram um efeito proliferativo utilizando densidade de energia entre 0,45 a 0,95 J/cm<sup>2</sup> com um diodo laser (780nm ) em queratinócitos cultivados.

A ação do laser de He-Ne (180 mJ/cm<sup>2</sup> ) sobre células CHO associada com polygem (6µg/ml), uma proteína animal, cujos ingredientes ativos são uma combinação de Hormônio de Crescimento (GH), Fator de Crescimento Eitelial (EGF), Fator de Crescimento- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), Fator de Crescimento Ácido-Fibroblasto (FGF) entre outros fatores de crescimento, demonstrou aumento significativo no número médio de colônias das células CHO (FAROUK 2000).

### **1.3- Organelas Citoplasmáticas**

#### **1.3.1 - Mitocôndria**

As mitocôndrias, presentes em todas as células eucariontes, são organelas envoltas por dupla membrana e conversoras de energia para forma utilizável no direcionamento das reações celulares. São organelas responsáveis por ocupar uma fração expressiva do volume celular total de modo geral. Descreve-se normalmente as mitocôndrias como cilindros rígidos e alongados, com diâmetro compreendido entre 0,5 e 1 µm; são ainda móveis e plásticas, variando constantemente sua forma, fundindo-se umas com as outras e se separando novamente. Do tamanho aproximado de uma bactéria, a mitocôndria é a usina elétrica da célula eucariótica e gera energia pela combinação do oxigênio a moléculas dos alimentos sob forma de ATP (ALBERTS *et al*, 1997).

A mitocôndria é constituída por dois compartimentos, delimitados por membrana externa e interna, a qual se projeta para dentro da cavidade mitocondrial formando invaginações denominadas cristas mitocondriais. A câmara interna da mitocôndria é preenchida pela matriz mitocondrial que é homogênea, mas em alguns casos apresenta material filamentososo delgado e pequenos grânulos de alta densidade que se ligam ao  $Mg^{2+}$  e o  $Ca^{2+}$  (Figura 1).

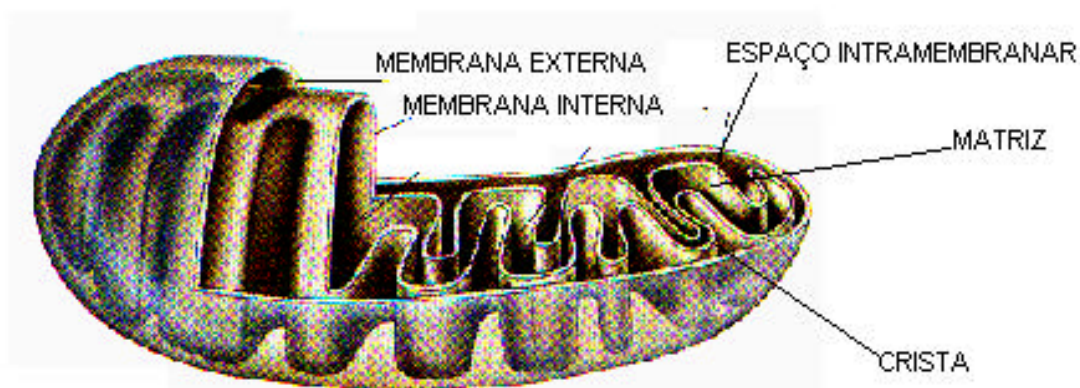


Figura 1. Esquema da Mitocôndria: estrutura cilíndrica que possui material genético próprio DNA e é responsável pela produção de energia na forma de ATP. Biology Raven, 1992.

Mergulhados na matriz encontram-se os ribossomos, todas as enzimas solúveis envolvidas no ciclo de Krebs, além do DNA e da maquinaria para a síntese de proteínas. Os componentes relacionados a cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa para a síntese de ATP, utiliza a energia fornecida pela transferência de elétrons durante a respiração aeróbica, bem como proteínas transportadoras específicas envolvidas na penetração de metabólitos como ADP (adenosina di-fosfato), ATP e fosfato (GUYTON *et al*, 1997).

As mitocôndrias estão presentes em todas as células, com exceção dos eritrócitos e dos queratinócitos terminais, onde se perderam por autofagia. As mitocôndrias contêm o sistema enzimático que gera ATP através do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. As células que gastam grande quantidade de energia, como as dos músculos estriados ou dos túbulos renais, têm grande número de mitocôndrias. Além da produção de ATP, as mitocôndrias também funcionam de forma a regular a concentração de certos íons do citosol, como  $Mg^{2+}$  e o  $Ca^{2+}$  função que compartilham com o retículo endoplasmático (ROSS *et al*, 1993).



A conformação interna das mitocôndrias pode variar entre dois estados extremos. Quando a concentração externa de ADP é baixa, ou a cadeia respiratória é inibida, as mitocôndrias encontram-se no estado ortodoxo, conformação encontrada nos cortes de tecidos. Neste caso, a matriz ocupa quase toda a mitocôndria e a câmara externa é pequena. No entanto se ADP é adicionado ao meio, produz uma súbita contração do compartimento interno, chamado estado condensado, que corresponde a uma mitocôndria fosforilando ativamente. Essas alterações devem-se ao fato de que a respiração celular e a fosforilação não geram somente ATP, mas também  $H_2O$ , que se acumula na camada externa (ALBERTS *et al*, 1997).

### 1.3.2- Núcleo

O núcleo é separado do citoplasma por um envelope consistindo de duas membranas. O conteúdo nuclear se comunica com o citosol por meio de aberturas – os poros nucleares. O DNA, em uma célula eucariótica, está seqüestrado no núcleo, que ocupa em torno de 10% do volume celular total. Os poros nucleares operaram com um mecanismo de transporte seletivo para as proteínas do RNAs que são excessivamente grandes para se difundirem através desses canais. (ROSS *et al*, 1993)

O envelope é diretamente conectado à extensa rede de membranas do retículo endoplasmático e é sustentado por duas redes de filamentos intermediários: uma, chamada de lâmina nuclear, que forma um envoltório fino, subjacente à face interna da membrana nuclear, enquanto o outro, menor, regularmente organizado, envolve a membrana nuclear externa (ALBERTS *et al* 1997).

As células se dividem através de dois processos (mitose e meiose) que são fundamentalmente diferentes. A mitose é um processo de divisão celular pelo qual as células somáticas se dividem, garantindo que cada célula filha receba um conjunto de células diplóide, exatamente como o da célula mãe. Na meiose o processo dá origem a um gameta com metade do material genético (ROSS *et al* , 1993) (Figura 2).

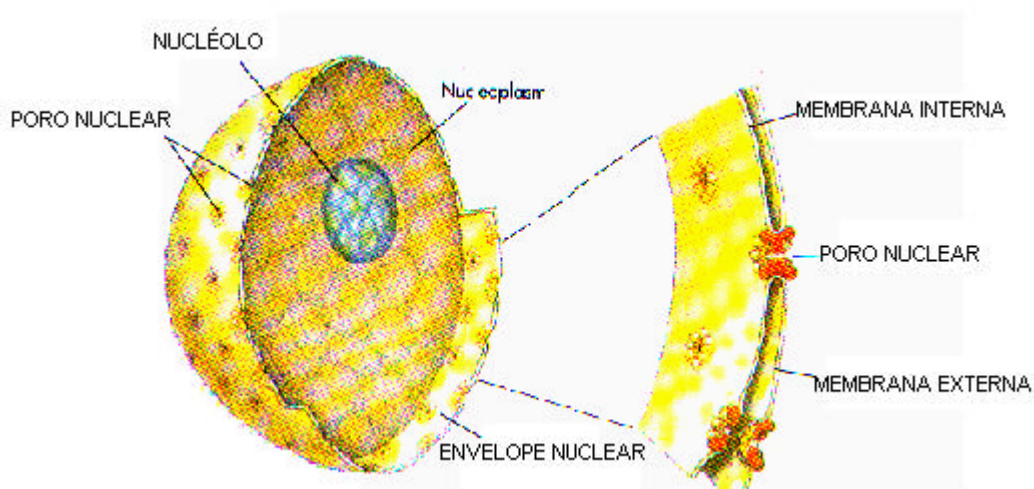


Figura 2- Esquema da estrutura do núcleo , o DNA está seqüestrado no núcleo. Raven Biology, 1992.

### 1.3.3- Citoesqueleto

Nas células eucarióticas superiores, devido à especialização e à complexidade de suas estruturas internas, existe a necessidade de mantê-las em locais apropriados no interior da célula e também controlar seus movimentos. Devido a este fato, as células eucarióticas possuem um esqueleto interno denominado citoesqueleto, que dá a forma às células, organizando as estruturas celulares e transportando-as de uma parte à outra da célula. O citoesqueleto é composto de uma rede de filamentos de proteínas, sendo os filamentos de actina e microtúbulos os mais importantes. Os filamentos de actina, permitem as células eucarióticas individuais se deslocarem, e participarem ativamente na contração muscular em animais. Os microtúbulos são os principais geradores da força em cílios e flagelos que são longas projeções da superfície celular, em forma de chicote, que servem como instrumento de propulsão. O próprio interior da célula está em constante movimento e o citoesqueleto fornece a maquinaria para os movimentos intracelulares, como o transporte das organelas de um lugar para outro, a segregação dos cromossomos nas duas células-filhas durante a mitose e a separação das células animais durante a divisão celular (ALBERTS *et al* 1997) (Figura 3).

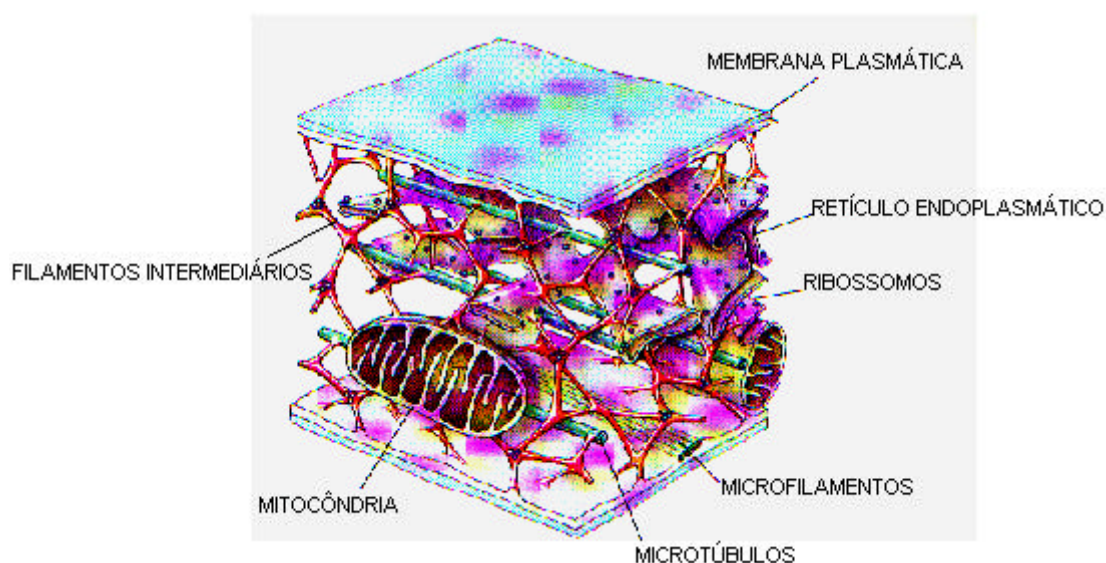


Figura 3 : Esquema do citoesqueleto: responsável por controlar os movimentos da célula. Biology Raven, 1992.

## 1.4- Microscopia de Fluorescência

O microscópio de fluorescência é semelhante a um microscópio óptico comum, exceto que a luz utilizada, passa por dois conjuntos de filtros, um para filtrar a luz antes dela atingir a amostra e outro para filtrar a luz obtida da amostra. O primeiro filtro é selecionado de forma a permitir apenas a passagem de comprimentos de onda que excitem o corante fluorescente, enquanto o segundo filtro bloqueia a passagem daqueles comprimentos de onda diferentes dos emitidos pelo corante. Um composto iluminado com determinado comprimento de onda é visualizado através de um filtro, permitindo a passagem de luz do comprimento de onda de emissão (ALBERTS et al 1997).

Uma característica importante desta técnica é a melhoria da qualidade da amostra, com a diminuição de dano à estrutura celular. Para tanto são utilizados marcadores fluorescentes específicos para os mais diversos fins como, marcação de organelas e até atividades metabólicas. A microscopia de fluorescência tem possibilitado adquirir informações sobre a organização e a dinâmica de estruturas

celulares, havendo portanto alguns fatores limitantes em estudos bidimensionais com a utilização de dupla marcação para estudos de interação, ligação e associação de proteínas, lipídeos, enzimas, DNA (ácido dextrorribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) (HERMAN *et al* 1993).

Contudo a fluorescência provou ser uma ferramenta versátil para um vasto campo de aplicações, podendo ser utilizada no estudo de interações moleculares em química analítica, bioquímica, biologia celular, fisiologia, nefrologia, cardiologia, fotoquímica e ciência ambiental. Ela é uma técnica não invasiva, que apresenta vantagem em relação a outros métodos de investigação, pois sua sensibilidade, rapidez e segurança para a obtenção dos resultados não afetam as amostras durante o processo (REICHMAN 2000).

As substâncias fluorescentes gozam da propriedade de emitir luz quando excitadas por radiações de certos comprimentos de onda. Com a utilização de corantes fluorescentes é possível identificar certas substâncias não fluorescentes normalmente presentes nas células (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2000). Análises revelam que moléculas fluorescentes absorvem luz em um determinado comprimento de onda emitindo um comprimento de onda mais longo (REICHMAN 2000; ALBERTS *et al* 1997).

## **1.5- Marcadores Biológicos Fluorescentes**

### **1.5.1- JC-1**

O JC-1 é um marcador específico para mitocôndria e consiste de uma sonda lipofílica que nos permite analisar o potencial de membrana devido a intensidade de fluorescência, bem como a atividade mitocondrial através de sua conformação morfológica. As mitocôndrias são sensíveis a irradiações com vários comprimentos de onda de luz visíveis, sendo que a ativação do consumo do oxigênio acarreta mudanças nas propriedades eletroquímicas, bioquímicas e ópticas de mitocôndrias isoladas (KARU, 1999).

Análise do potencial de membrana mitocondrial, usando densidades separadas de frações de eritrócitos submetidos a uma situação de estresse, através de citofluorimetria após incubação com JC-1, um marcador fluorescente específico para

mitocôndria, mostrou um decréscimo significativo do potencial bem como o efeito oxidativo com aumento na densidade celular (DEDOV et al, 2001).

MANTEIFEL *et al* 1997, observaram alterações ultraestruturais em mitocôndrias de linfócitos humanos irradiados com laser He-Ne com densidade de potência de  $56\text{J}/\text{cm}^2$ , sendo que houve um aumento de 20% no número de perfis mitocôndriais na secção celular sem aumento em sua área total e que o número de mitocôndrias foi reduzido.

A utilização de JC-1 na avaliação do potencial de membrana de mitocôndrias de células CHO, irradiadas com laser diodo Arseneto de Gálio Alumínio (Ga-Al-As),  $\lambda=635\text{ nm}$  e potência de  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ , permitiu identificar alterações na morfologia e funcionalidade desta organela. (BORTOLETTO, 2001; MOREIRA, 2001).

### 1.5.2- DAPI

A condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo foram estudadas através da coloração com DAPI que é um marcador fluorescente específico para o núcleo este marcador nos possibilita visualizar o processo mitótico celular.

A irradiação com laser de He-Ne causa aumento da frequência de aberrações cromossômicas em células diplóides de fibroblastos humano pois a irradiação com o laser semiconductor comprimento de onda  $632\text{ nm}$  e  $660\text{nm}$  aumenta a quebra de DNA. Porém estes lasers não causam mutações através da ação direta no DNA, a energia destes lasers é bem inferior, para causar rupturas nas ligações covalentes da molécula (KARU *et al*, 1999).

A condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo podem ser estudadas morfologicamente pela coloração com DAPI (4', 6'- diamidino, 2'-phenylindole-  $5\mu\text{M}$ ;) utilizando microscopia de fluorescência. Desta forma LAMBOLEY *et al* 2000, em seu trabalho observou vários agentes indutores de apoptoses em dois tipos de hepatócitos, em hepatoma humano (Hep3B) e hepatócitos normais de rato.

Dependendo da concentração das células em culturas, obtém-se um efeito bioestimulativo; segundo HSIN-SU *et al* 1996, o efeito do laser de He-Ne com densidade de energia de  $1,5\text{ J}/\text{cm}^2$  em queratinócitos humanos induz a produção de

interleucina 1 $\alpha$  e 8 (IL-1 $\alpha$  e IL-8) ocorrendo um aumento significativo nos níveis da IL-1 $\alpha$  e IL-8 em relação ao grupo não irradiado.

### 1.5.3- Rodamina –Faloidina

Para a marcação dos filamentos intermediários do citoesqueleto, utilizamos da rodamina-faloidina e com parâmetros de intensidade de fluorescência podemos observar a organização e a dinâmica do citoesqueleto. Para identificação do citoesqueleto vários marcadores fluorescentes podem ser utilizados, dentre eles a faloidina rodamina. A marcação fluorescente de actina é uma importante ferramenta para a investigação da dinâmica do citoesqueleto *in vitro*. Sondas moleculares, fluorescentes derivadas de falotoxinas marcam seletivamente filamentos de actina-F, tendo a vantagem de serem solúveis em água. Este fluoróforo permite marcar cultura de células íntegras com rompimento mínimo das células. As falotoxinas apresentam afinidade por filamentos grandes e pequenos apresentando vantagens adicionais sobre os anticorpos tais como: 1) as propriedades de ligação não mudam com a variabilidade de espécies diferentes, inclusive plantas e animais; e 2) sua marcação não específica é desprezível, assim o contraste entre áreas marcadas e não marcadas é altamente puro (DEDOV *et al*, 2001)

Em estudo baseado na microscopia confocal, após dupla marcação da bactéria e das células actínicas vermelhas com fluoresceína conjugada com faloidina ASHORN *et al* 2000, observaram a reorganização do citoesqueleto induzido pela *Helicobacter pylori* em distensão em cultura de células epiteliais devido a produção de vacúolos de citocinas.

## **2.OBJETIVOS:**

- Analise do efeito bioestimulador do laser semiconductor emitindo a radiação no comprimento de onda 830 nm em células CHO-K1;
- Análise das alterações morfológicas de células submetidas a radiação laser utilizando técnicas de marcação fluorescente para núcleo, mitocôndria e citoesqueleto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura de Células

Estudamos o efeito do laser de baixa potência (LBP) em células fibroblásticas através de técnicas de microscopia de fluorescência com marcadores específicos para mitocôndria, núcleo e citoesqueleto.

##### 3.1.1- *Linhagem Celular*

As células estudadas são células fibroblásticas isoladas de tecido epitelial normal proveniente de ovário de Hamster chinês.

Fibroblastos são as células mais amplamente testadas nos estudos dos efeitos do LBP, pois o efeito bioestimulatório destas células implica em efeitos importantes em um processo cicatricial. (KIMURA *et al*, 1997)

**a) Células CHO- K1-** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ; RJ), gentilmente cedidas pela Dra. Técia Maria Ulisses de Carvalho.

Para a manutenção e propagação da linhagem celular, foram necessários soluções tampão e meios de cultura abaixo descritos:

##### **a) Soluções Tampão:**

- **Tampão Fosfato** (PBS -Fisher)

Solução A: 2,76g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  para 100ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Solução B: 5,36g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 7,17  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ou 2,84g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para 100ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

33ml de solução A + 67 ml de solução B= pH7,1

A cada 100ml de tampão fosfato 0,1 M; 900ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada; 9g de NaCl. Para corrigir o pH, utilizam-se as soluções A e B.

- **Tampão PHEM** (Pipes-epes-EGTA-  $\text{MgCl}_2$ - Sigma)



10,36g de Pipes; 3,25 de Hepes; 1,9g de EGTA; 0,27g de  $MgCl_2$  para 500ml de  $H_2O$  destilada. Com pH 6,8 ou 7,2.

- ***Solução tamponada de paraformaldeído 10% (Sigma)***

Aquece-se 80ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,1 até 65° C em um erlenmeyer. No início do aquecimento adiciona-se 10g de paraformaldeído, agitando-se continuamente. A solução permanecerá turva. Adiciona-se gotas de hidróxido de sódio 2M com a solução sendo agitada, até que se obtenha o clareamento da solução. Após o resfriamento, completa-se até 100ml.

- ***Solução Tampão de Hank (Merck)***

8 g de NaCl; 1g de glucose; 0,4 de KCl; 0,2 de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,06 de  $KH_2 PO_4$ ; 0,06g de  $Na_2 HPO_4 \cdot 2 H_2O$  para 1 litro de  $H_2O$  destilada.

**b)Enzima Tripsina (Gibcibrill – USA)**

0,1% de tripsina; 0,05% de EDTA para 100ml de  $H_2O$  destilada.

**b) F12 Nutrient Mixture- (Gibcibrill – USA)**

Utilizada para células CHO-K1, na composição básica deste meio contém L-glutamina, não contém bicarbonato de sódio que é adicionado no preparo para o uso deste meio. A conservação foi em câmara fria de 2 a 8°C . A suplementação foi realizada com soro fetal bovino (SFB) a 5%

### **3.2- Crescimento e Manutenção de Culturas de Células**

Partindo-se inicialmente de um estoque de células mantido em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de cultura de células ( $5 \times 10^5$  células/ml), e adicionados 3 ml de meio de cultura, suplementado com 10% de SFB. A propagação celular foi efetuada quando a densidade de células formava uma monocamada confluenta. A troca de meio de cultivo deu-se a cada três dias, o crescimento celular foi acompanhado por meio da observação em microscópio invertido Olympus CK40

### **3.3 - Congelamento e Descogelamento celular - Criopreservação**

Para o congelamento as células foram removidas da garrafa de cultura com auxílio da tripsina, que é uma protease secretada pelas células acinosas do pâncreas sob a forma de proenzima inativa, que digere as proteínas com maior rapidez. Supõe-se que atue principalmente nas ligações peptídicas das quais participa o grupo carboxila da arginina ou lisina. Assim sendo, a enzima destrói a trama protéica que liga as células e este processo chama-se tripsinização. Após este procedimento foram centrifugadas a 2500 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em meio Ham F12 contendo 3% de SFB e 1% de DMSO (dimetil-sulfóxido), sendo transferido para criotubos e estocado em nitrogênio líquido. Para o descongelamento a ampola foi mantida em banho maria a 37° C, com agitação para inativação da substância crioprotetora (DMSO), o conteúdo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura com 5% de SFB e centrifugado a 2500 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 2 ml de meio enriquecido com 5% de SFB e em seguida foi incubado na estufa de CO<sub>2</sub>.

### **3.4 - Controle de Células Viáveis**

A maioria dos testes de viabilidade baseiam-se no comprometimento da integridade da membrana, determinado pela penetração do corante Azul de Trypan normalmente retido nas células viáveis; os ensaios usados demonstram a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo o objetivo é medir a sobrevivência das células (KIBITEL *et al*, 1998). Desta forma as células submetidas a radiação laser foram monitoradas através da coloração de azul de Tripan, nos indicando a integridade da membrana celular e possibilitando a contagem do número de células viáveis; em intervalos de tempos variáveis.

### 3.5 - Contagem Celular

Para cada experimento uma alíquota de 25µl da suspensão celular ( $1,5 \times 10^4$  células/ml) foi plaqueada em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis, onde o número de células por poço foi padronizado. As culturas foram incubadas a 37° C por 24 horas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A contagem celular foi realizada para a obtenção de gráficos de viabilidade celular, com o objetivo de analisar o efeito do LBP sobre a linhagem celular CHO-K1. Foram utilizados de 0,4% de azul de Tripán, adicionando-se 10 µl a cada poço contendo 990µl de PBS. As placas foram levadas ao microscópio invertido para a contagem do número de células.

### 3.6 - Irradiação das Placas

No período de 12 horas após o plaqueamento e cultivo celular, as irradiações foram realizadas com aparelho diodo laser emitindo radiação no comprimento de onda de 830nm e densidade de energia de 2 J/cm<sup>2</sup>, potência de 10mW de maneira pontual durante 3 minutos e 20 segundos (Figura 4). Os grupos irradiados receberam 4 doses da irradiação laser durante 48 horas em um intervalo de 12 horas. As culturas foram monitoradas durante uma semana, e as placas do grupo controle foram mantidas as mesmas condições do grupo irradiado.

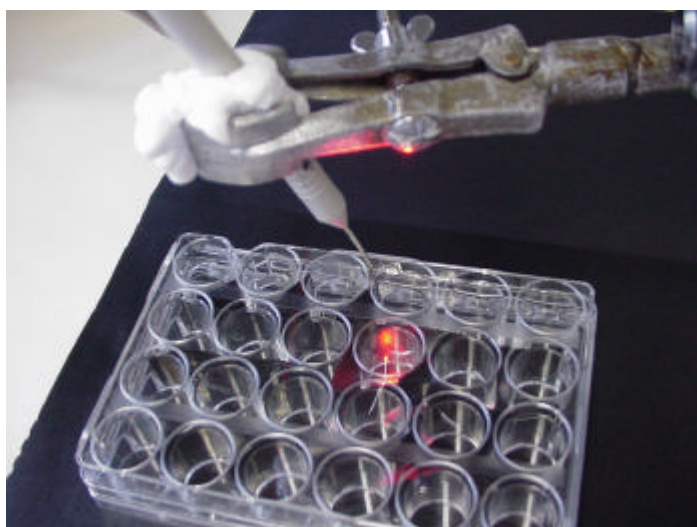


Figura 4. Esquema da irradiação laser

### **3.7-Análise Estatística**

A média foi obtida nos experimentos com 48 amostras no total para cada marcador fluorescente, sendo divididos dois grupos; o grupo de células irradiadas e o grupo de células controle. Desta forma foi elaborado um gráfico através do programa Excel (Figura 5).

Para obtenção do desvio padrão foi utilizado o programa Prisma e apresentado no histograma. O test t de Student paramétrico para dados não pareados, foi realizado para verificar a significância das amostras no programa GraphPad Instat (Figura 6).

### **3.8- Procedimento para Marcação e Análise das Culturas**

#### **3.8.1- Mitocôndria:**

Após a irradiação as culturas de células CHO-K1 sobre lamínulas foram lavadas em tampão PHEM. Para acompanhar as alterações mitocondriais as células foram incubadas com JC-1 (5,5',6,6',-tetracloro-1,1',3,3' – tetraetilbenzimidazol carbocianina iodido - Molecular Probes Inc. USA na concentração de 0,1  $\mu$ M por 30 minutos, Fixadas com 4% paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,2). As lamínulas foram montadas sobre a lâmina com N-propil-galato e vedadas com esmalte no escuro e observadas em microscópio de epifluorescência. O JC-1 é um marcador específico para mitocôndria e consiste de um sonda lipofílica que nos permite analisar o potencial de membrana devido a intensidade de fluorescência, bem como a atividade mitocondrial através de sua conformação morfológica.

#### **3.8.2- Núcleo:**

Após a irradiação a cultura de células CHO-K1 foram fixadas com 4% paraformaldeído em 0,1M de tampão fosfato (pH 7,2). As células foram marcadas com 0,5  $\mu$ l de DAPI (4', 6'- diamidino, 2'phenylindole- 5 $\mu$ M;

Molecular Probes) diluídos 100µl de PBS, incubados por 5 minutos, lavados com PBS . As lamínulas foram montadas sobre lâmina com N-propil galato, vedadas com esmalte no escuro e observadas em microscopia de epifluorescência. A condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo foram estudadas através da coloração com DAPI que é um marcador específico para o núcleo este marcador nos possibilitou visualizar o processo mitótico celular.

**3.8.3- Citoesqueleto:** Visualização dos filamentos intermediários - As células sobre lamínulas foram lavadas em tampão PHEM e fixadas com 4% paraformaldeído, 0,1% glutaraldeído e 0,1% Triton X100 em 0,1M de tampão fosfato (pH 7.2) por 30 minutos, em seguida as células foram lavadas com tampão PHEM. Incubadas com faloidina rodamina (1:100-PHEM) por 1 hora no escuro. Novamente lavadas em tampão PHEM. As lamínulas foram montadas sobre lâmina com N-propil galato, vedadas com esmalte no escuro e observadas em microscopia de epifluorescência. Através de parâmetros de intensidade de fluorescência podemos observar a organização e a dinâmica do citoesqueleto.

## 4- RESULTADOS

### 4.1 Proliferação Celular

A análise da ação da radiação do diodo laser ( $\lambda = 830 \text{ nm}$  e  $DE = 2 \text{ J/cm}^2$ ), demonstrou aumento na proliferação celular da linhagem CHO-K1, ocorrendo um pico máximo no 4º dia de experimento. Observa-se que o número inicial de células foi de aproximadamente  $1,5 \times 10^4$  células/ml; no grupo controle o número de células atinge o máximo em  $2,8 \times 10^4$  células/ml, enquanto no grupo irradiado atinge  $5,2 \times 10^4$  céls/ml.

O declínio decorrente no 5º dia resulta do processo de morte natural das células uma vez que o meio de cultura permanece o mesmo desde o 1º dia de irradiação (não ocorrendo manutenção neste período). Apresentaram o seguinte perfil nos tempos terapêuticos, conforme descrito com a figura abaixo:

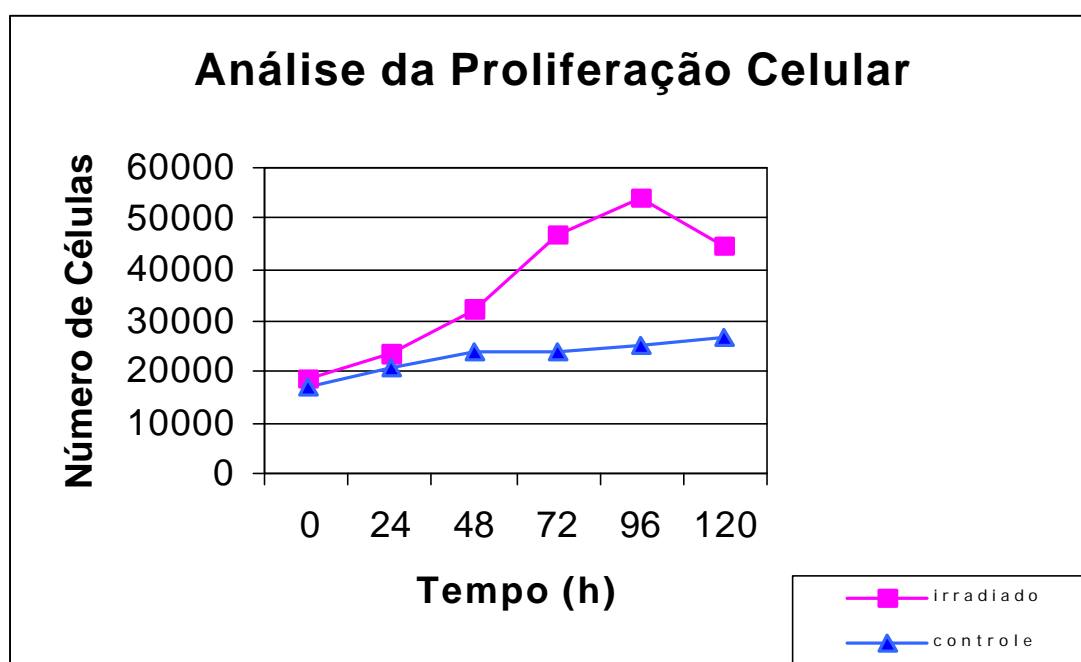


Fig. 5- Gráfico da análise da proliferação celular obtido da média obtida de 48 amostras.

#### 4.1.2- Análise Estatística

A curva de crescimento obtida da média das amostras através do programa Excel possibilita comparar o grupo irradiado com o grupo não irradiado (Figura 5).

O desvio padrão demonstrado no histograma obtido através da média de um total de 48 amostras. O teste t de Student foi realizado para verificar a significância das amostras e obtivemos resultados significante nos tempos de 72 e 96 horas de experimento, como pode ser observado no histograma (\*) (Figura 6).

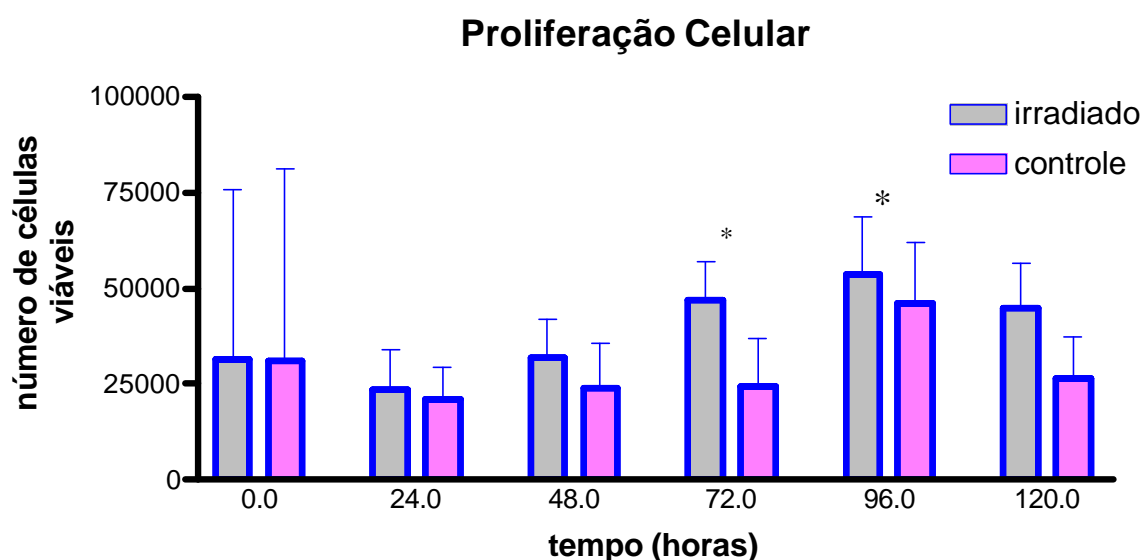


Figura 6- Histograma demonstrando o desvio padrão do grupo controle e do grupo irradiado. \* Significante  $p > 0,05$

## 4.2 - Marcadores Fluorescentes

### 4.2.1 *JC-1 : Marcador para Mitocôndrias*

A visualização das mitocôndrias de células fibroblásticas CHO através da marcação com JC-1 nos permitiu verificar o potencial de membrana mitocôndrial. A marcação de mitocôndrias com a sonda fluorescente, revelou a presença intensa de atividade mitocondrial em células controle e células irradiadas Fig. 5 e Fig. 6, respectivamente; entretanto é possível verificar que algumas células do grupo irradiado apresentam alterações na distribuição de suas mitocôndrias com migração para a região perinuclear e aspecto granular como pode ser notado na figura 6.

As células irradiadas e as células do grupo controle apresentam-se com um alto potencial de membrana, identificadas através da coloração mais amarelada demonstrando uma alta atividade mitocondrial que se manteve nos dois grupos até o quarto dia de experimento (Fig. 5, 6, 7, 8, 9, 10), sendo que na figura 7 referente ao 3º dia de experimento observa-se uma pequena redução do potencial de membrana (seta); as mitocôndrias encontram-se dispersas no citoplasma e com aspecto filamentosos. Foi possível observar através da conformação das mitocôndrias que o grupo de células irradiadas, apresentam forma enovelada e próximas ao núcleo, enquanto que as células do grupo controle se apresentam uniformes e com forma filamentosas. Na figura 8 as mitocôndrias das células irradiadas encontram-se localizadas na região perinuclear com aspecto granular e com alto potencial de membrana, enquanto que as mitocôndrias da periferia embora com aspecto granular possuem baixo potencial de membrana.

No 4º dia de experimento observa-se que algumas células do grupo controle apresentam-se com alto potencial de membrana e outras com baixa atividade mitocondrial, já no grupo irradiado (fig.10) podemos notar um intenso agrupamento das mitocôndrias na região perinuclear com alta atividade mitocondrial.



#### ***4.2.2- DAPI: Marcador Fluorescente para núcleo***

A identificação do núcleo em células CHO-K1 com a utilização do marcador fluorescente DAPI nos mostrou uma divisão celular mais intensa nas células do grupo irradiado em relação ao grupo controle. Na figura 11 podemos observar nas células do grupo controle no primeiro dia de experimento uma atividade mitótica, com intensa marcação dos cromossomos. No núcleo das células pertencentes ao grupo irradiado no primeiro dia de experimento, demonstrado na figura 12, podemos notar uma condensação da cromatina e organização dos cromossomos para uma divisão celular. A condensação da cromatina e fragmentação do núcleo foram identificadas através da microscopia de fluorescência o que nos possibilitou analisar as frequências de mitoses da população de células irradiadas em relação as células do grupo controle.

No núcleo das células do grupo controle no quarto dia de experimento (fig.13) observa-se uma cromatina difusa e presença de células com núcleo fragmentado. A quantidade de células em divisão é menor em relação ao grupo irradiado. Nota-se um aumento no número de células do grupo irradiado e intensa atividade mitótica, com a cromatina condensada e melhor preservação das células (fig. 14) em relação ao grupo controle.

As células do grupo controle no quinto dia de experimento (fig.15) apresentam um comprometimento da integridade celular, a cromatina se encontra de maneira difusa, não sendo observada atividade mitótica. As células do grupo irradiado no quinto dia de experimento (fig.16) apresentam atividade mitótica e uma cromatina bem preservada em relação ao grupo controle.

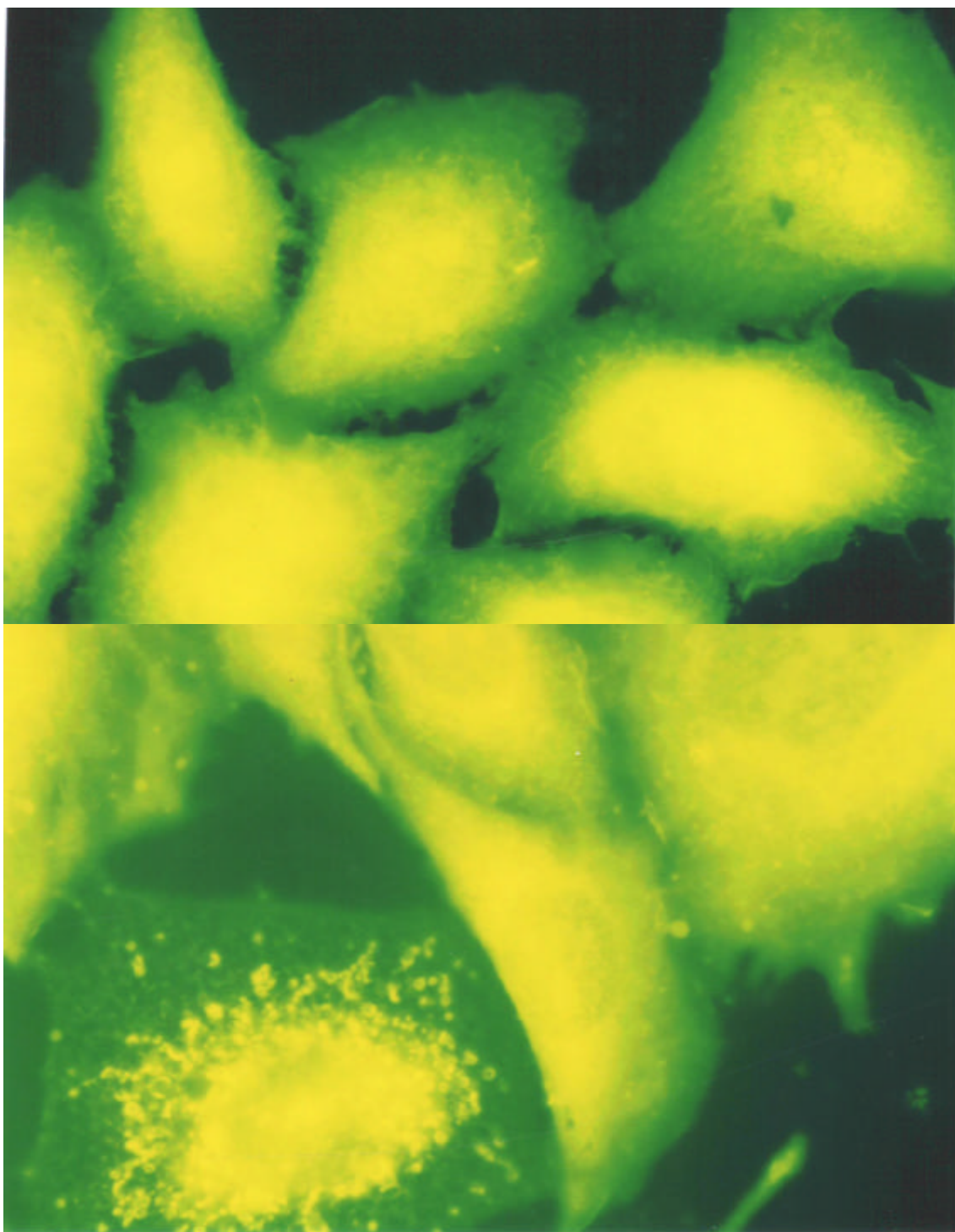
#### ***4.2.3- Faloidina Rodamina: Marcador Fluorescente para Citoesqueleto***

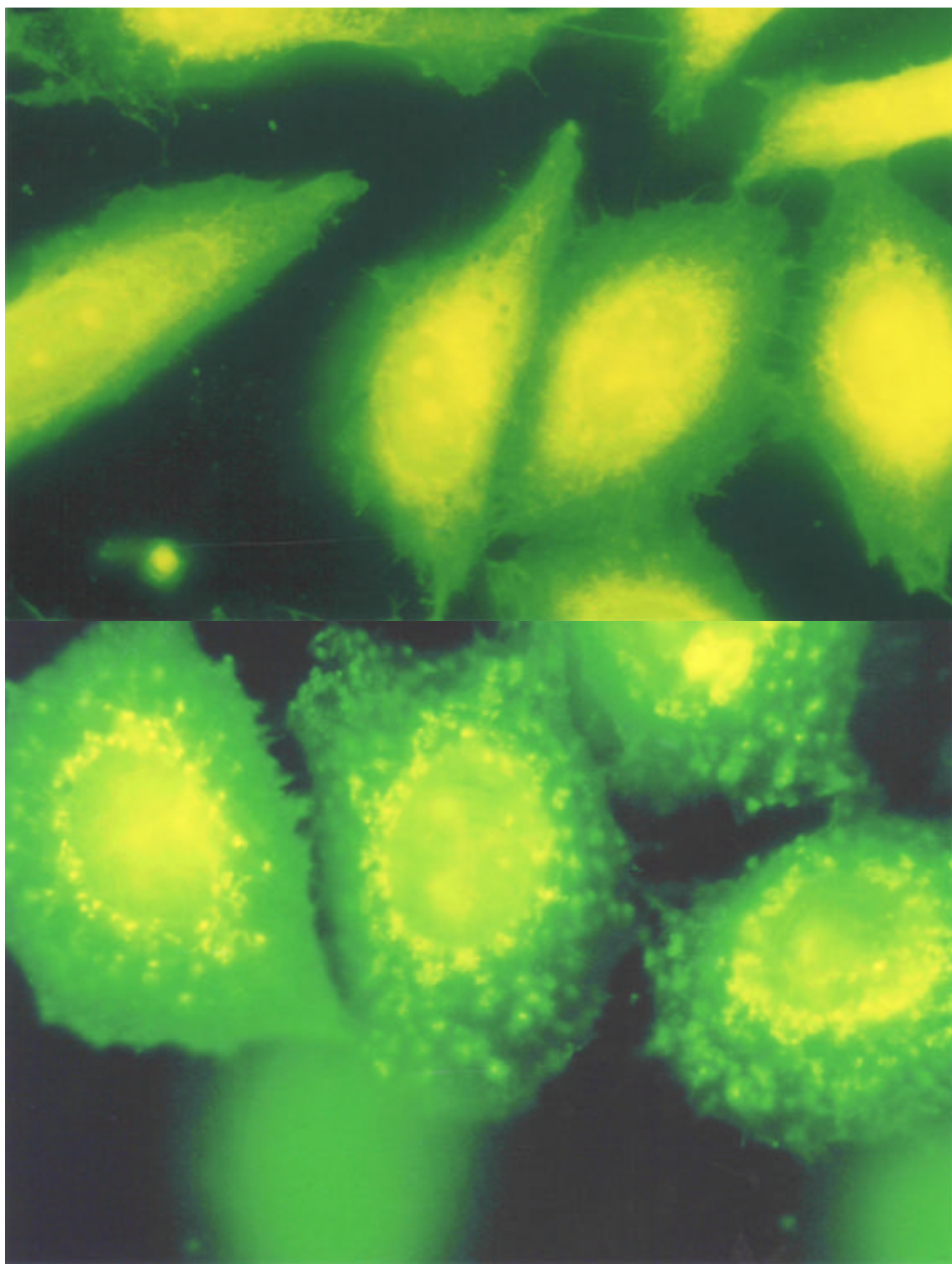
O citoesqueleto foi observado com a microscopia de fluorescência e análise foi realizada com base na organização das proteínas dos filamentos intermediários do citoesqueleto. No primeiro dia de irradiação os filamentos intermediários apresentam-se desorganizados em relação ao grupo controle (Fig. 17 e 18). Os filamentos intermediários das células do grupo controle apresenta perfeita distribuição no citoplasma das células; o citoesqueleto do grupo irradiado apresenta-se com uma leve perturbação dos filamentos intermediários, ocorrendo ainda a desorganização da disposição dos feixes paralelos do citoesqueleto celular.

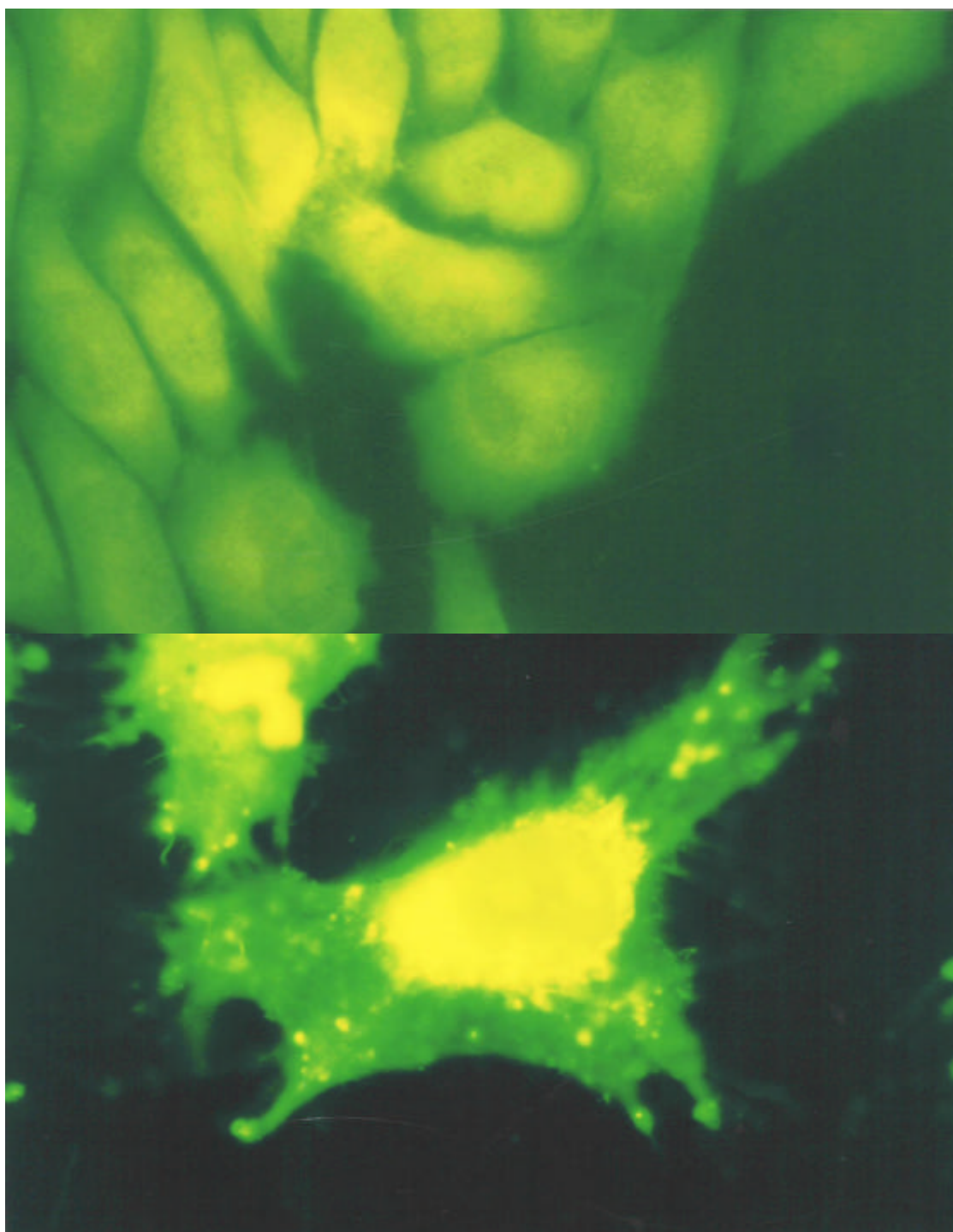
No segundo dia de experimento demonstrado na figura 19, notamos uma desnaturação das proteínas dos filamentos intermediários, ocorrendo uma marcação difusa da proteína, enquanto que no grupo controle (fig. 20) o citoesqueleto apresenta suas proteínas dispostas de maneira uniforme, ou seja, nota-se a distribuição paralela e organizada dos filamentos intermediários.

No terceiro dia, nas células do grupo controle (fig. 21) os filamentos intermediários permanecem intactos, ocorrendo marcação menos intensa que no 1º dia. Nas células do grupo irradiado (fig. 22) observa-se reorganização dos feixes de filamentos intermediários.

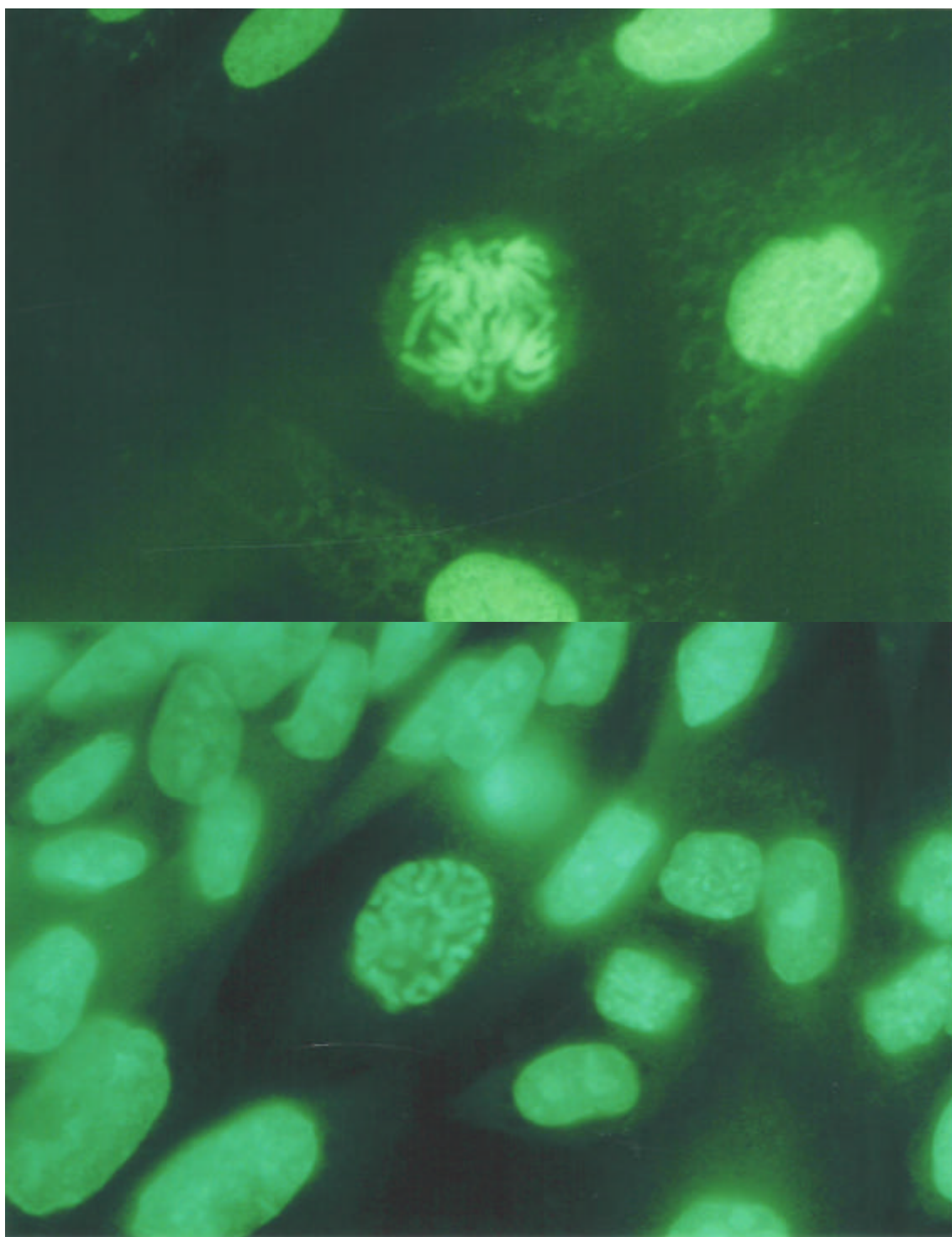
No quarto dia de experimento, nas células do grupo controle (fig. 23) nota-se a disposição inalterada dos filamentos intermediários, enquanto que no grupo de células irradiadas podemos notar um completo restabelecimento da organização dos filamentos intermediários (fig. 24).

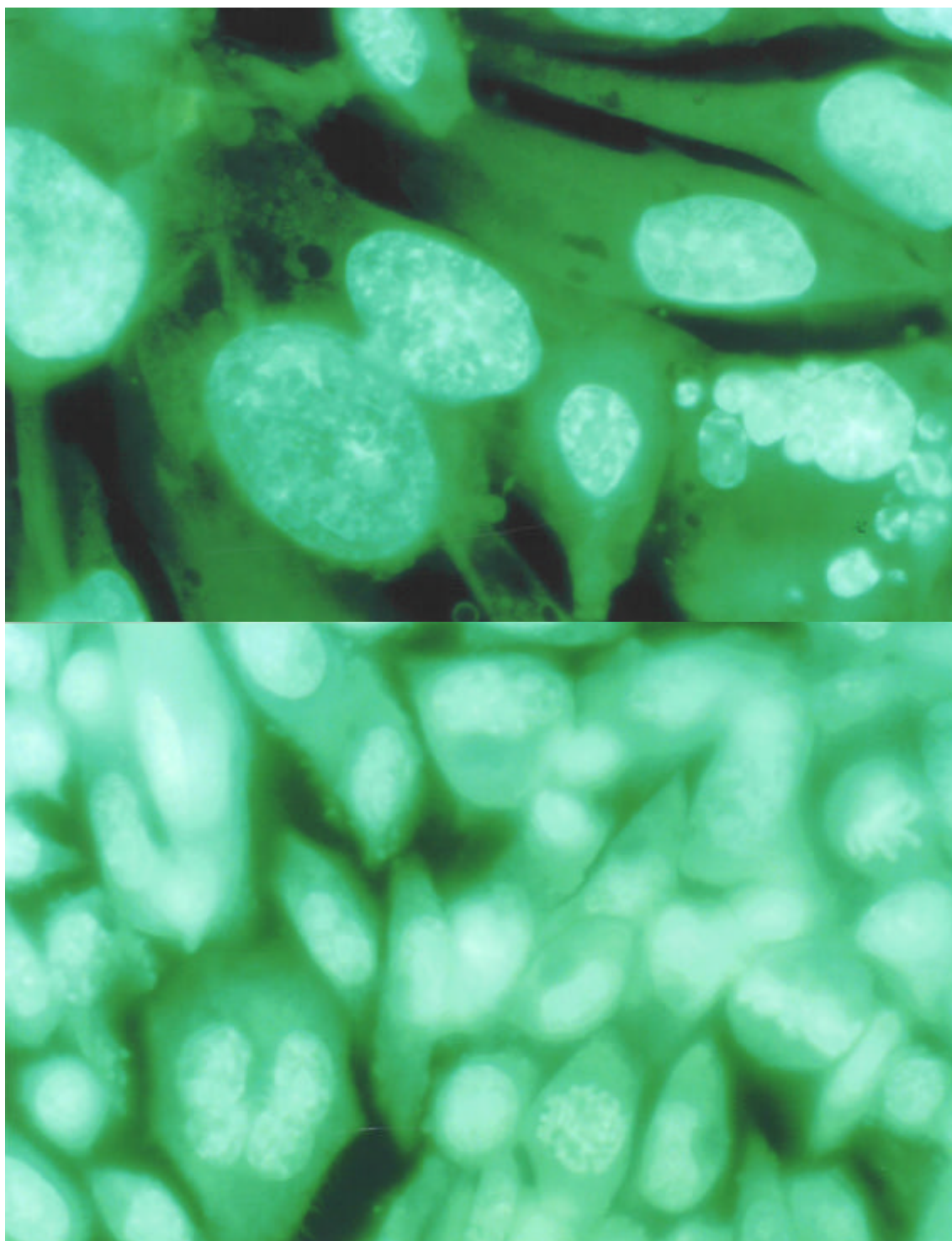


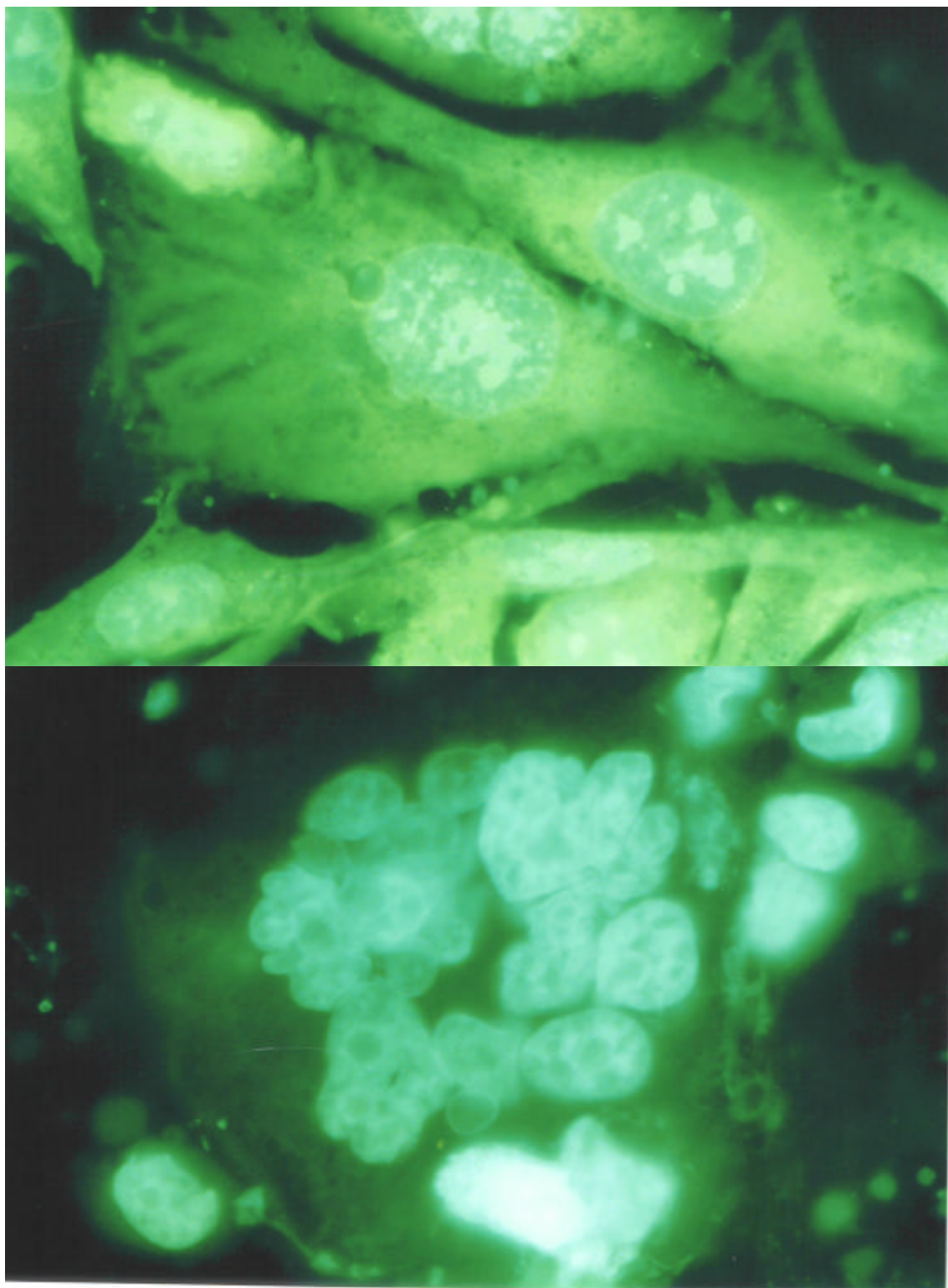




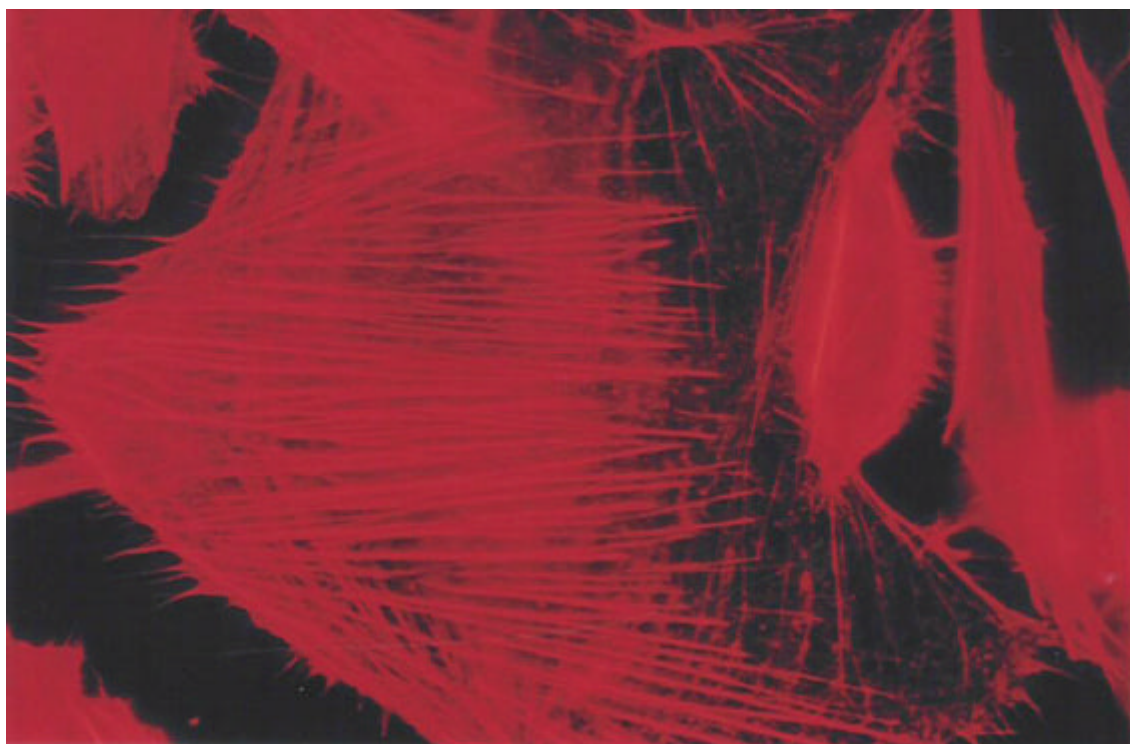




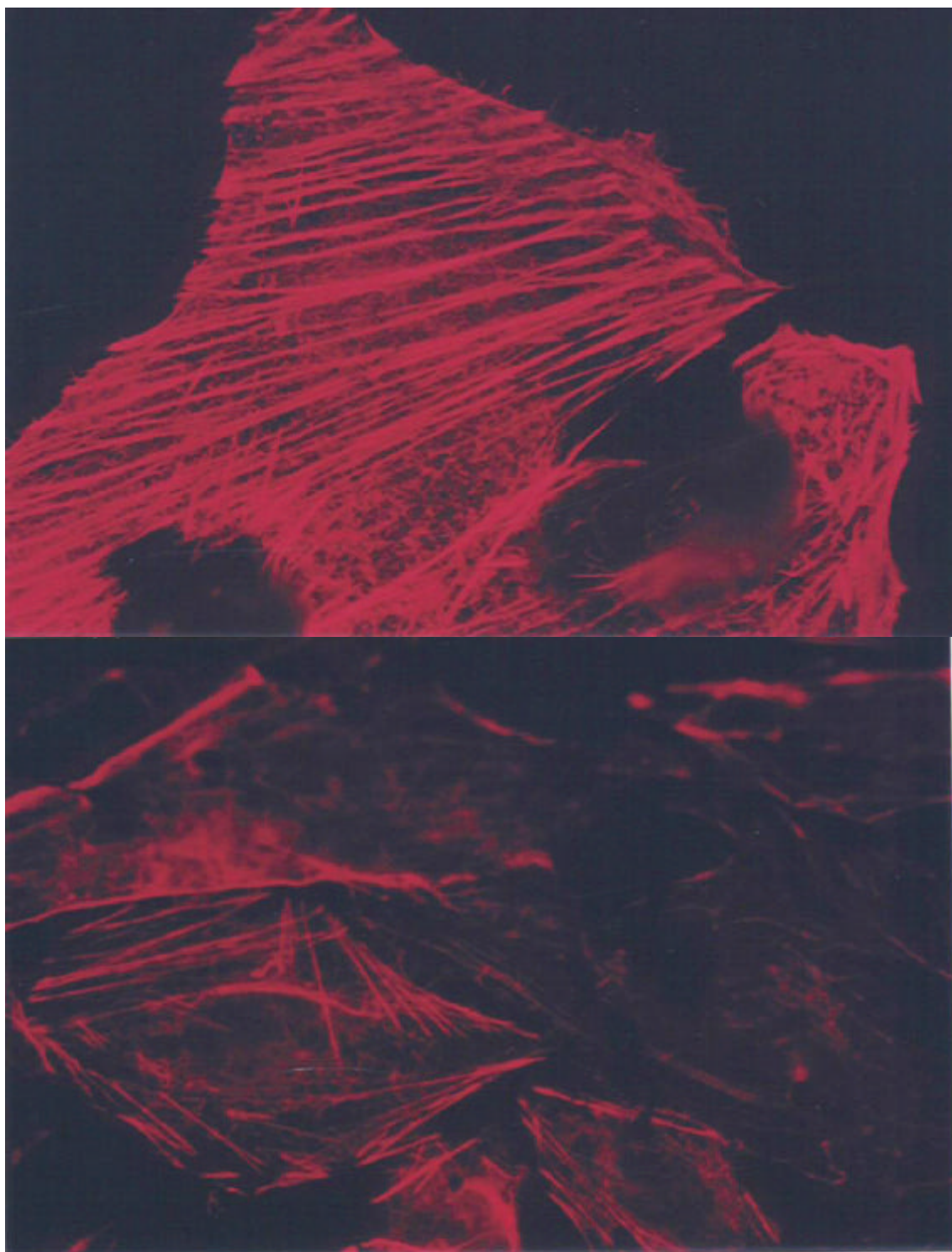






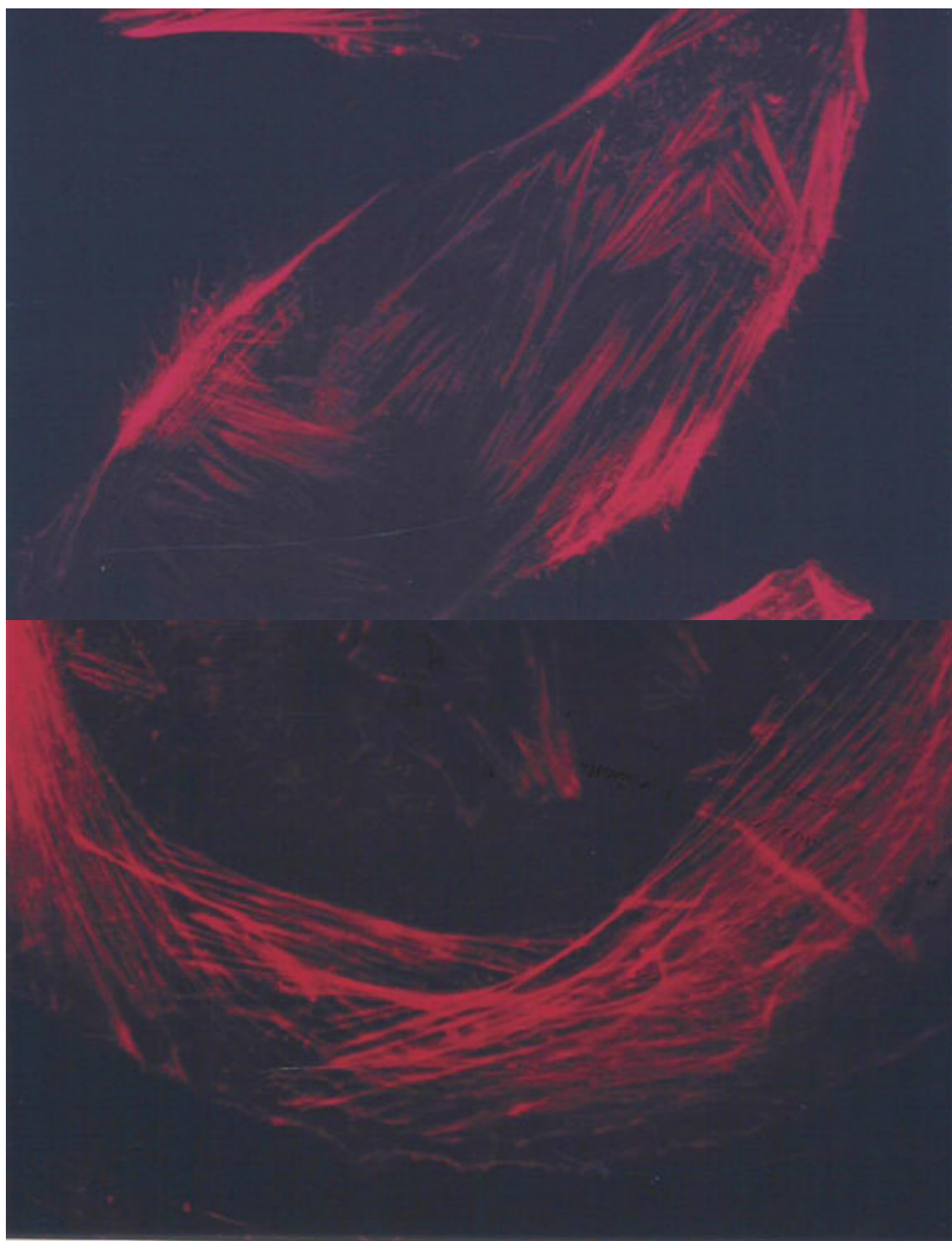












## 5- DISCUSSÃO

O uso do LBP tem sido recomendado por muitos autores para o tratamento de úlceras ou feridas cutâneas com o intuito de acelerar o processo de cicatrização das feridas cutâneas (BOSATRA, 1984; ANNEROTH *et al* 1988; NARA *et al* 1991; ENWEMEKA, 1990; LUBART *et al*, 1993; TATARUNAS, 1996; YANG *et al*, 1997; REDDY *et al*, 1998; MARCK 2000; WALKER *et al*, 2000).

Estudos do efeito do laser em cultura de células nos fornece um modelo simples e informativo sobre os aspectos significativos do uso da terapia a laser no sistema “*in vitro*”, fornecendo simulação mais acurada das condições “*in vivo*”; vários tipos celulares tem sido usados para este estudo em sistemas biológicos (WEBB *et al*, 1998; DOYLE *et al*, 1998). Para avaliar a ação do LBP utilizamos células CHO-K1, que são células fibroblásticas provenientes de Ovário de Hamster Chinês.

Estudos com cultura de fibroblasto tem revelado o efeito bioestimulador do LBP, dependendo da dosimetria aplicada e da situação em que as células se encontravam (LOPES, 1999). O Laser de Baixa Potência não apresenta ação quando aplicado em órgão ou célula em condição de normalidade, e estudos “*in vivo*” demonstraram que não ocorre alterações significativas nos resultados obtidos em tecidos em homeostase quando irradiados (EL SAYED, 1996; DYSON, 1991). Em nosso experimentos utilizamos células fibroblásticas de ovário de Hamster sob uma situação de estresse, ou seja, suplementando o meio de cultura somente com 5% de soro fetal bovino.

A utilização do laser em culturas de células em busca de respostas para entendermos o mecanismo da ação do LBP, tem colaborado muito para estudarmos este mecanismo. Irradiamos células CHO-K1 com doses baixas e obtivemos um efeito bioestimulador significativo do grupo irradiado em relação ao grupo controle. Para se obter um efeito bioestimulador é necessário que se administre doses baixas (densidade de energia de 2 a 4 J/cm<sup>2</sup>) do laser operando na região do vermelho e infravermelho, sendo que sob doses altas de energia as células são destruídas (LUBART *et al*, 1992;

KARU, 1995; RIGAU, 1996). Observamos este fato em nosso experimento e identificamos quais os efeitos que o LBP apresenta em células CHO-K1 durante um processo bioestimulador utilizando sondas fluorescentes específicas para mitocôndrias (JC-1), núcleo (DAPI) e citoesqueleto (rodamina –faloidina).

O laser emitido na região do visível foi mais utilizado na terapia de cicatrização de feridas, com o advento dos diodos laser semicondutores os clínicos começaram a trabalhar com comprimentos de onda no infravermelho próximo, devido ao baixo custo do equipamento. Os dados da literatura nos indicam que os efeitos produzidos pelo LBP são dependentes das doses administradas. Parâmetros de irradiação como dose de energia e densidade de potência são altamente relevantes para a obtenção de bons resultados.

Os efeitos do LBP depende da densidade de energia “*in vitro*” e sua influência depende do estado fisiológico da célula no momento da irradiação, bem como da frequência e número de irradiações, sendo o efeito do LBP cumulativo. (LUBART, 1992; LOPES *et al*, 1999; KARU, 1995; SKINNER *et al*, 1996; GROSSMAN *et al*, 1998). Em nosso experimento podemos notar que o efeito do laser se intensificou após serem aplicadas 4 doses num período de 48 horas com intervalos de 12 horas entre uma aplicação e outra, ocorrendo um maior número de células nas 72 horas da primeira aplicação do LBP, sendo que estes resultados estão de acordo com os dados da literatura (LUBART, 1992; LOPES *et al*, 1999; KARU, 1995; RIGAU, 1996; SKINNER *et al*, 1996; GROSSMAN *et al*, 1998).

Muitos trabalhos em cultura de células, divulgam que o efeito bioestimulador do LBP, ocorre através da ativação da produção de ATP e incremento do processo mitótico devido excitação da respiração celular e das porfirinas endógenas. (BENEDICENTI, 1982; FRIEDMANN *et al*, 1991; KIMURA *et al*, 1997; CONLAN *et al*, 1996). Em nosso trabalho podemos visualizar esse efeito através da utilização de marcadores específicos do núcleo (DAPI), a condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo pode ser estudada morfológicamente por esta coloração (LAMBOLEY *et al*, 2000). A fluorescência usada para visualizar o núcleo da célula pode ser utilizada para calcular o número total de células na cultura (PLATOSHYN *et al*, 2000). Observamos em nosso experimento que o processo de divisão celular foi intenso no grupo irradiado em relação ao grupo controle até o quarto dia de experimento.

Certos comprimentos de onda causam efeitos bioquímicos e biofísicos muito diferentes podendo ativar vários processos celulares. O grupo não exposto a irradiação permaneceu com sua população inalterada, sendo que no grupo de células irradiadas houve um aumento da sua população sendo observado uma espécie de “fragmentação” no núcleo das células irradiadas, concordando com os resultados obtidos por YING-BO SHUI *et al*, 2000.

A função central da mitocôndria é de manter a energia estável da célula, sendo que esta organela é alvo do estudo dos efeitos produzidos pelo LBP., considerando que 90% da energia produzida pelas células ocorre nessa estrutura, a energia liberada durante as reações de oxidações na cadeia respiratória é armazenada como gradiente eletroquímico, consistindo de um potencial elétrico transmembrana negativo, tal energia é utilizada para a síntese de ATP pelas mitocôndrias (COSSARIZZA, 1997; MOREIRA *et al*, 2001). Como resposta obtemos alterações na estrutura mitocondrial e aumento de ATP pelas mitocondrias (BENEDICENTI, 1982; KARU, 1987; CONLAN *et al*, 1996; FRIEDMANN *et al*, 1991; KARU, 1995; WILDEN, 1998).

Observamos em nosso trabalho que as células irradiadas exibiam um alto potencial de membrana de mitocôndrias durante todo o experimento pois a utilização de JC-1 permite visualizar alterações na morfologia, funcionalidade e alterações no potencial de membrana destas organelas. A excitação do processo de respiração celular foi observada durante todo o período do experimento através do marcador fluorescente (desde o primeiro dia de irradiação, prolongando seu efeito até o quinto dia de experimento) nas células irradiadas com LBP em relação ao grupo controle, como menciona MORIMOTO *et al*, 1994; TIANO *et al*, 1996; DEDOV *et al*, 2001).

KARU *et al* 1989 concluíram que fotorreceptores primários são componentes da cadeia respiratória, e que doses baixas causam redução do metabolismo celular, sendo que seu efeito de bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação, estes resultados concordam com resultados descritos pela literatura, pois tendo em vista que utilizamos doses baixas do diodo laser em fibroblastos em situação de estresse, observamos a ação bioestimulatória do LBP com clareza e nitidez.

O potencial de membrana mitocondrial e a bioenergia durante o processo de diferenciação celular na cultura de fibroblastos foi alterado conforme menciona KOMAROVA *et al*, 2000; BORTOLETTO, 2000); pois notamos que as células



irradiadas além de apresentarem uma reflexão fluorescente mais intensa, indicando um alto potencial de membrana, tiveram sua conformação morfológica alterada, pois as mitocôndrias deste grupo apresentaram-se de forma enovelada e próximas ao núcleo indicando intensa atividade metabólica, enquanto que as células do grupo controle apresentam-se uniformemente dispostas. Este fato corrobora com trabalhos de WEI YU *et al*, 1997; KARU *et al*, 1995, 1997) pois a maior intensidade de fluorescência presente nos grupos irradiados indica um aumento na síntese de ATP.

Pouco se tem estudado a respeito da ação do LBP no citoesqueleto da célula, devido a este fato, em nosso trabalho nos baseamos na organização do citoesqueleto da célula irradiada em relação ao grupo controle (ROTSCH *et al*, 2000). A marcação com rodamina-faloidina não interfere no crescimento e na cinética das células, sendo que parâmetros cinéticos mostram variações consideráveis entre as células vizinhas e dentro de uma única célula. (SUND *et al*, 2000) permitindo analisar a cinética da célula através de parâmetros de intensidade de fluorescência e analisar a conformação e organização do citoesqueleto durante um processo de irradiação (ASHORN *et al*, 2000).

Visualizamos a disposição das proteínas actínicas dos filamentos intermediários presentes nas células CHO-K1. No primeiro dia de irradiação já notamos diferença na organização das proteínas dos filamentos intermediários das células irradiadas em relação ao grupo controle, pois nas células do grupo irradiados apresentam-se de maneira desorganizadas, ou seja em várias direções; enquanto as células do grupo controle apresentam-se dispostas paralelamente.

No segundo dia de experimento podemos notar através da intensidade de fluorescência que os filamentos intermediários das células irradiadas sofreram uma desestabilização das proteínas do citoesqueleto, enquanto que os filamentos intermediários das células do grupo não irradiado apresentam-se intactos como no primeiro dia de experimento. Nos terceiro e quarto dias de experimento o citoesqueleto das células do grupo irradiado se restabeleceu, pois a disposição dos filamentos intermediários se encontram organizados.

Contudo como já foi mencionado pouco se tem na literatura a respeito da ação do LBP no citoesqueleto celular, mas sabe-se que algo acontece com as células durante a bioestimulação, e estudos se fazem necessários a medida que novos parâmetros de observação são questionados, como o porquê desta perturbação sofrida no citoesqueleto

durante o processo de bioestimulação e de que forma este citoesqueleto se restabelece tão brilhantemente após o uso do Laser de Baixa Potencia.

## 6- CONCLUSÕES

Em nosso trabalho podemos concluir que o laser diodo ( $\lambda = 830\text{nm}$ ):

- provoca bioestimulação significativa em células CHO-k1 na dose utilizada ( $2\text{J}/\text{cm}^2$ ), produzindo alterações nas organelas estudadas;
- Ocorreu um aumento na condensação da cromatina mais rápido e conseqüente aumento na atividade mitótica em células irradiadas;
- Houve excitação na atividade metabólica e mudança na conformação e localização das mitocôndrias irradiadas;
- Ocorreu perturbação na disposição dos feixes intermediários que se restabeleceram após o uso do laser nas doses utilizadas.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS B; BRAY D; LEWIS J; RAFF M; ROBERTS K; WATSON JD. **Molecular Biology of the cell**. Ed. Londres, 1997.
2. ASHORN M; CANTET F; MAYO and MEGRAUD F. **Cytoskeletal rearrangements induced by Helicobacter pyloristrains in epithelial cell culture: possible role of the cytotoxin**. Dig Dis Sci Sep; v.45, n.9, p. 1774-80, 2000.
3. ANNEROTH G; HALL G; RUDEN H; ZETTERQVIST L. **The effects of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats**. Br J Oral Maxillofac Surg. v.26, p.12-17, 1988.
4. BASFORD, JR. **Low Intensity Laser Therapy: Still not na established clinical tooll**. Laser surgery and Medicine. Principes & Practice. Ed. Carmen A Pauliafito. Wiley-liss, A John Wiley & Son , Inc NY, 1996.
5. BERKI T. **Biological effect of low-power Helium Neon (He-Ne) laser irradiation**. Lasers Med Sci. v.3, p.35, 1988.
6. BENEDICENTI A. **La valutazione del effecto del la luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo**. Gênova: Langa Grafica. p.71-83, 1982.
7. BOSATRA M; JUCCI A; OLLIARO P; QUACCI D; SACCHI S. **Dermatologia, Basel**. v.168, p.157-62, 1984.
8. BORTOLETTO R. **Efeito da radiação do laser de baixa potência no potencial de membrana de mitocôndrias em células in vitro**. 2000. 35p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2000.

9. CONLAN MJ; RAPLEY JW; COPP CM. **Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation.** A review. Jclin Periodontol, v.23, p.492-496, 1996.
10. COSSARIZZA A. **Measure of Mitochondrial Membrane Potencial with the fluorescent Probe JC-1.** Workshop. March Modina Italy, 1997.
11. DONATO AC; BORAKS S. **Laser Clínico: Aplicações práticas em odontologia.** São Paulo : Rob, 158p, 1993.
12. DOYLE A; GRIFFITHS JB. **Cell and tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.** John Wiley & Sons Ltda, 1998.
13. DEDOV VN; COX GC; ROUFOGALIS BD. **Visualisation of mitochondria in living neurons with single and two-photon fluorescence laser microscopy.** Micron Oct; v.32, n.7, p.653-60, 2001.
14. DYSON M. **Cellular and subcellular aspects of low level laser therapy.** Progress in Laser therapy. J. Wiley & Sons. p. 221, 1990.
15. EL SAYED SO; DYSON M. **Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation.** Lasers Surg Med. v.19, p. 433-437, 1996.
16. ENWEMEKA CS, RODRIGUEZ O, GALL N, WALSH N. **Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons.** J Clin Laser Med Surg. p.47-52, 1990.
17. FAROUK AH, AL-WATBAN. **Effect of He-Ne Laser (632.8nm) and Polygenon CHO Cells.** Jounal of clinical Laser Medicine & Surgery, v.18 n. 3, p.145-150, 2000.

18. FRESHNEY RI. **Biology of the cultured cell.** A manual of basic technique. 2 ed  
New York: Wisley-Liss. p..347, 1990.
  
19. FRIEDMANN H; LUBART R; LAULICHT I. **Laser-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in the cytoplasm responsible for cell atimulation or cell damage.** J. Photochem. Photobiol. B: Biol, v.11, p. 87-95, 1991.
  
20. GENOVESE WJ. **Laser de baixa Intensidade: Aplicações terapeuticas em odontologia.** São Paulo :. Lovise, 61p, 1991.
  
21. GROSSMAN N; SCHINEID N; REUVENI H; HALEVY and LUBART . **780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocytes cultures: involvement of reactive oxygen species.** Lasers Surg Med. V..22, p.212-218, 1998.
  
22. GROSSMAN N; SCHINEID N; REUVENI H; HALEVY AND LUBART. **He-Ne (633nm) Low Power Laser Irradiation Stimulates Proliferation of Keratinocyte Cultures Involving Reactive Oxygen Species.** Lasers in the Life Sciences. v..9, p.111-126, 2000.
  
23. GUYTON AC; HALL JE. **Tratado de fisiologia Médica,.** Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 9ª ed. 830p, 1997.
  
24. HERMAN B; LEMASTERS JJ. **Opitcal Microscopy: Everging methods and Aplication academic.** Press: New York 1993.
  
25. HRNJAK M, KULJIC-KAPULICA N; BUDISIN A; GISER A. **Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro.** Vojnosanit Pregl Nov-Dec; v.52, n.6, p. 539-46, 1995.
  
26. HSIN-SU Y, KEE-LUNG C, CHIA-LI Y, JUI-WHEN C, GWO-SHING C. **Low energy Helium-Neon laser irradiation stimulates interleukin -1a and**

- interleukin-8.** Release from cultured human Keratinocytes. J Invest Dermatol. V.107, n.4, Oct, 1996.
27. JANSEN BJH; VAN RUISSEN F; DE JONGH G; ZEEUWEN PLJM and SCHALKWIJK J. **Serial Analysis of gene Expression in differentiated cultures of human Epidermal keratinocytes.** The Journal of Investigative Dermatology. 116(1) January, p.12-22, 2001.
28. JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro :Guanabara Koogan. 7<sup>a</sup> ed. 260p, 2000.
29. KARU T. **Photobiochemistry of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light. II.** SRCTL, v.8, p. 1-54, 1985.
30. KARU T, RYABYKH TP, FEDOSEYEVAS GE, PUCHKAVA NI. **Helium-Neon laser induced respiratory bust of phagocyte cells.** Lasers Surg Med. v..9, p.585-588, 1989.
31. KARU T; PYATIBRAT; KALENDO G. **Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology v.27, p. 219-223, 1995.
32. KARU T; BAKEEVA LE; MANTEIFEL VM. **Could irradiation with monochromatic lighth of visible spectral reguion cause genetic effects?** www. Photobiology 1999.
33. KARU T. **Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells.** J. Photochem. Photobiol. B: Biol v. 49, p. 1-17, 1999.
34. KIBITEL J; HEJMADI V; ALAS L; O'CONNOR A; SUTHERLAND BM AND YAROSH. **UV-DNA Damage in Mouse and Human Cells Induces the**

- Expression of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$** . Photochemistry and Photobiology, v.67, n.5, p.541-546, 1998.
35. KIMURA Y; IWASE T; MORIOKA T and WILDER-SMITH. **Possible platelet-derived growth factor involvement on helium-neon laser stimulated wound healing in rats**. Lasers life Sci. v.7, p. 267-284, 1997.
36. KOLÁROVÁ H; DITRICHAVÁ D; WAGNER J. **Penetration of laser light into the skin in vitro**. Lasers in Surgery and medicine v.24, p.231-235, 1999.
37. KOMAROVA SV; ATAULLAKHANOV F.I. and GLOBUS RK. **Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts**. Am J. Physiol Cell Physiol v.279, p. C1220-C1229, 2000.
38. LAGAN KM; CLEMENTS BA; MCDONOUGH S; BAXTER GD. **Low intensity laser therapy (830nm) in the management of minor postsurgical wounds: A controlled clinical study**. Lasers in surgery and medicine v.28, n.1, p 27-32; 2001.
39. LAMBOLEY C; BRINGUIER AF; FELDMANN G. **Induction of apoptosis in normal cultured rat hepatocytes and in Hep3B, a human hepatoma cell line**. Cell Biol Toxicol; v.16, n.3, p. 185-200, 2000.
40. LOPES AL. **Análise in vitro da proliferação de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. 131p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 1999.
41. LUBART R, WOLLMAN Y, FRIDMANN H, ROCHKIND AND LAULICHT. **Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures**. J. Photocem. Photobiology B: Biology v.12, p.305-310, 1992.



42. LUBART R, FRIEDMANN H, PELED I, GROSSMAN N. **Ligth effect on fibroblast proliferation.** Laser therapy. V.5, p. 55-57, 1993.
  
43. MANTEIFEL V; BAKEEVA L; KARU T. **Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria.** Journal of photochemistry and photobiology. B: Biology, v.38, p.25-30, 1997.
  
44. MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. **Long-Term effects of He-Ne Laser Radiation: Changes in Ultrastructure of Chodriome in Successive Generations of Yeast Cells Torulopsis sphaerica.** Lasers in the life Sciences, v.9, p.153-169, 2000.
  
45. MARK DW; RUMPF S; BAXTER D; HIRST DG and LOWE AS. **Effect of low-intensity Laser Irradiation (660nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin.** Lasers in Surgery and Medicine. V.26, p.41-47, 2000.
  
46. MESTER E; TRELLES MA; MESTER A & MAYAYO E. **Laserterapia. Revision de datos experimentales y resultados clínicos.** Int. Clinica Làser. p.13-8, 1983.
  
47. MOREIRA ME, SORENSEN AC; HEARD KJ; HARKEN AH; BANERJEE A; CAIRNS CB. **Reduction in the mitochondrial energy potential by inhibition of electron transport in human vascular smooth muscle cells.** Acad Emerg Med May; v.8, n.5, p. 548, 2001.
  
48. MORIMOTO Y; ARAI T; KIKUCHI M; NAKAJIMA S; NAKAMURA H. **Effect of low-Intensity on Mitochondrial Respiration.** Lasers Surgery and Medicine. V.15 p.191-199, 1994.

49. NARA Y , MATOMOT S, MORIOKA T. **Regulatory action of low intensity laser on mitogenesis of cultured lymphocytes using concanavalin.** Surg Med Sci. V.13, p.293-298, 1991.
  
50. PLATOSHYN O; GOLOVINA AV; BAILEY CL; LIMSUWAN A; KRICK, STEFANIE; JUHASZOVA M, SEIDEN JE; RUBIN L J and JASON X. **Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation.** Am J Physiol Cell Physiol., 2000.
  
51. POURREAU-SCHNEIDER N; AHMED A; SOUDRY M; JACQUEMIER J; KOPP F; FRANQUIN JC; MARTIN PM. **Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts.** Am J Pathol. V.137, n.1, p.171-178, 1990.
  
52. RAVEN PH; JOHNSON GB. **Biology.** St. Louis : Mosby-Year Book, 3<sup>a</sup> ed. 1217p, 1992.
  
53. POURREAU-SCHNEIDER N; SOUDRY M; REMUSAT M; FRANQUIN JC; MARTIN PM. **Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblast.** Am J Pathol. V.137, n.1, p.171-178, 1990.
  
54. REDDY GK; STEHNO-BITTEL and ENWEMEKA CS **Laser Photostimulation of Collagen Production in Healing Rabbit Achilles Tendons.** Lasers in Surgery and Medicine v.22, p.281-287, 1998.
  
55. REICHMAN J. **Handbook of optical filters for fluorescence microscopy.** Chroma Technology Corp. p.37. 2000.
  
56. ROTSCH C and RADMACHER. **Drug-Induce Changes of Cytoskeletal Structure and Mechanics in Fibroblasts: An Atomic Force Microscopy Study.** Biophysical Journal, v.78, p.520-535, 2000.

57. RIGAU J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** Reus. Tese (Doutorado em Histologia). Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili.
58. ROSS MH; ROMRELL. **Histologia Texto e Atlas.** 2º ed. Ed. Panamericana. 1993
59. SKINNER SM; GAGE JP; WILCE PA; SHAW RM. **A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture.** Aust Dent Jun; v.41, n.3, p.188-92, 1996.
60. SUND SE; AXELROD D. **Actin Dynamics at the living Cell submembrane Imageg by total Internal Relection Fluorescence photobleaching.** Biology Jounal. V.79 p.1655-1669, 2000.
61. TATARUNAS AC. **Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico, utilização do laser de baixa potência GaAs-SHLD (904nm).** São Paulo : USP. (Dissertação de mestrado apresentada à faculdade de medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo), 1996.
62. TRELLES MA and MESTER A. **Ulceras crônicas en las extremidades inferiores.** Inv Clin Laser I. v.2, p.32, 1984.
63. TIANO L; FIDELI D; BALLARINI P; SANTORI G; FALCIONO G. **Mitochondrial membrane potential in density-separated trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro.** Biochim Biopgys Acta Jun v.1, n. 1505 (2-3), p. 226-37, 1996.
64. VACCA, R. A & Cols- **Increase in cytosolic and mitochondrial protein synthesis in rat hepatocytes irradiated in vitro by He-Ne laser.** Journal of photobiology B: Biology. v.34, p.197-202, 1996.

65. VAN BREUGEL HHFI; BAR PRD. **Power density and exposure time of HeNe laser irradiation more important than energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts in vitro.** Lasers Surg Medicine. V.12, p.528-537, 1992.
66. WALKER MD; RUMPF S; BAXTER GD; HIRST DG; LOWE AS. **Effect of Low-Intensity Laser Irradiation (660nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin.** Lasers in Surgery and Medicine v.26, p.41-47, 2000.
67. WALSH LJ. **The Current status of low level laser therapy in dentistry.** Part 1. Soft tissue applications. Austrian Dental Journal ; v.42, n.4, p.247-54, 1997.
68. WEBB C; DYSON M; LEWIS WHP. **Stimulatory effect on 660nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture.** Lasers Surg Med. V.22, p.294-301, 1998.
69. WEI YU; NAIM JO; MCGOWAN M; IPPOLITO LAZAFAME RJ. **Photomodulation of Oxidative Metabolism and Electron Chain Enzymes in Rat Liver Mitochondria.** Photochemistry and photobiology, v.66, n.6, p.866-871, 1997.
70. WILDEN L AND KARTHEIN R. **Import of Radiation Phenomena of Electrons and Therapeutic Low-Level Laser in Regard to the Mitochondrial Energy Transfer.** Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery. Mary Ann Liebert, Inc v.16, n.3, p.159-165 1998.
71. YANG J; XIA J; XIA, Y. **The effect of He-Ne laser on the revascularization of the distal part of the subdermal vascular network skin flap.** Chug Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih. v. 13, n.1, p.48-50, 1997.
72. YING-BO SHUI; HIROSHI S; JIE-HONG P; IKUHO H; MASAMIK; YOSHIHISA Y; KEIICHI H; NOBUO T and KAZUYUKI S. **Morphological Observation on Cell Death and Phagocytosis Induced by Ultraviolet**

**Irradiation in a Cultured Human** Lens Epithelial Cell Line. Available online at <http://www.idealibrary.com.on>, 2000.