

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

“Estudo *in vitro* da Biomodulação de Células Endoteliais em Resposta a
Diferentes Dosimetrias do Laser de Semicondutor Fosfeto de
Índio-Gálio-Alumínio.”

Ritchelli Ricci

Dissertação de Mestrado apresentada
ao 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
2003

**Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

“Estudo *in vitro* da Biomodulação de Células Endoteliais em Resposta a
Diferentes Dosimetrias do Laser Semicondutor Fosfato de
Índio-Gálio-Alumínio.”

Ritchelli Ricci

Dissertação de Mestrado apresentada
ao programa de Pós-Graduação em
Engenharia Biomédica, como
complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina
Chavantes.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristina
Pacheco Soares.

São José dos Campos, SP
2003

R379e

Ricci, Ritchelli

Estudo *in vitro* da Biomodulação de Células Endoteliais em
Resposta a Diferentes Dosimetrias do Laser de Semicondutor
Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio/ Ritchelli Ricci.
São José dos Campos: UniVap, 2003.
121p.: il.; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba,
2003.

1. Lasers 2.Células endoteliais 3. Dosimetria I. Chavantes,
Maria Cristina, Orient. II.Soures, Cristina Pacheco, Co-orient.
III.Título

CDU: 535..374

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

Assinatura:

Data

“Estudo *in vitro* da Biomodulação de Células Endoteliais em Resposta a Diferentes Dosimetrias do Laser de Semicondutor Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio.”

Ritchelli Ricci

Banca Examinadora

Prof. Dr. Egberto Munin, Presidente (Univap) _____

Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Chavantes, Orientadora (Univap) _____

Prof. Dr.^a Cristina Pacheco Soares, Co-orientadora (Univap) _____

Prof. Dr. Pablo Pomerantzeff (INCOR) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D

São José dos Campos, 5 de dezembro de 2003.

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus amados pais,

JORGE RICCI e LEILA REGINA DA CONCEIÇÃO RICCI,

cuja dedicação e amor infindáveis me dão sustentação para buscar meus ideais.

Ao meu amor,

MARCELO DE CASTRO PAZOS,

homem maravilhoso, sempre presente em todos os momentos, e que me mostra dia após dia a plenitude do amor verdadeiro.

Aos meus tão queridos sogros,

LUIS GUILLERMO PAZOS GARCIA e LEONTINA DE CASTRO PAZOS,

que se doaram fazendo com que o caminho no percurso deste trabalho fosse menos sinuoso.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Chavantes, pelo imenso incentivo e aprendizado que me proporcionou, e por me oferecer à possibilidade de conhecer um novo universo, através de ensinamentos referentes ao nosso trabalho e ensinamentos de vida;

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Cristina Pacheco Soares, por permitir que eu realizasse meu trabalho no Laboratório de Cultura de Células (IP&D), de sua responsabilidade, e pela prontidão com que me auxiliou em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, Diretor do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) pela possibilidade de realizar meu trabalho neste instituto;

À Prof.^a Dr.^a Helena B. Nader, do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), que gentilmente cedeu a linhagem de células endoteliais (CIPs);

À Prof.^a Msc. Isabel Neves, do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP), pela atenção dispensada durante o estágio realizado no laboratório, para aquisição da linhagem CIPs;

Ao Prof. Dr. Ismar Newton Cestari, da Divisão de Bioengenharia do INCOR-HCFMUSP (Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo), que abriu as portas de seu laboratório, esclarecendo-me dúvidas pertinentes aos meus experimentos;

Ao Prof. Dr. Egberto Munin e ao aluno Leandro Procópio, do Laboratório de Laser de Alta Potência (IP&D), pelo esclarecimento de dúvidas e auxílio nos experimentos para realização da Curva Gaussiana do laser utilizado;

Aos meus irmãos, Rafael Ricci, Jorge Ricci Junior e ao meu primo-irmão Alessandro Donizetti Conceição, que muito me auxiliaram, sempre contribuindo de uma forma ou de outra;

Às minhas queridas amigas Karina Dubieux Figueiredo e Nara Shoji, pela imensa ajuda e carinho a mim dispensados nestes últimos anos;

Ao amigo Paulo Recco, pela alegria contagiante, energia positiva e incentivo que muito me ajudaram no transcorrer deste trabalho;

Às amigas do Laboratório de Cultura de Células, Zélia Mendes e Marta Falcão, que através da experiência e carinho me transmitiram calma nos momentos de impaciência;

Às colegas do Laboratório de Cultura de Células, em especial à Roberta Eller, pela colaboração na execução dos experimentos;

Aos meus queridos primos Julle Janay Conceição, Gisele Lanzillot Conceição e Paulo Vinícius Conceição, pelo grande incentivo e carinho, mesmo à distância;

Às minhas tias, Judite da Conceição e Juraci Conceição, pelo constante apoio e pensamento positivo;

Às minhas avós, Judite da Motta Ricci e Maria José, mulheres fortes, cada qual a sua maneira e que sempre me serviram de exemplo;

Aos meus avôs Francisco Ricci e Paulo Conceição, *in memoriam*.

“Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam”.

(Henry Ford)

“A inovação é uma reiterada série de fracassos”.

(Prof. Dr. Judah Folkamn)

Resumo

A Terapia Laser de Baixa Potência, empregada na bioestimulação da angiogênese, pode se transformar “a posteriori”, em mais um recurso em cirurgias cardíacas para recuperação de áreas isquêmicas do coração. A análise dos resultados dos efeitos do Laser de Baixa Potência (LBP) é de fundamental importância, pois pode possibilitar futuramente, cirurgias cada vez menos invasivas, num grupo crescente de pacientes cardíacos que vem aumentando exponencialmente no país e no mundo. Quando se emprega o Laser de CO₂ de alta potência, na Revascularização Transmiocárdica com Laser (RTML), para tratamento de isquemia do miocárdio, ocorrem efeitos secundários ainda não totalmente esclarecidos, dentre eles, o processo neoangiogênico. Acreditamos ocorrer simultaneamente às reações fotomecânicas do Laser Cirúrgico de CO₂, um possível efeito secundário, provavelmente pelo chamado Efeito Residual do Laser, que pode ocasionar efeito biomodulador, promovendo maior proliferação celular e conseqüente vascularização da área adjacente. Neste trabalho analisamos o efeito do LBP na proliferação de células endoteliais, através do acompanhamento da resposta proliferativa das culturas celulares em função do emprego do Laser Fosfato de Índio-Gálio-Alumínio (685 nm), com fluências 2; 4 e 8 J/cm² e potências 10 e 20 mW. Observamos aumento da proliferação celular em todas as dosimetrias, sendo que dentre as fluências aplicadas, o maior crescimento celular foi ocasionado com o emprego de 8J/cm² (P<0,05). Utilizando a técnica de Microscopia de Fluorescência, observamos que a privação parcial de nutrientes causa desorganização de elementos do citoesqueleto, levando ao comprometimento da proliferação celular. O emprego do Laser nestas células, em stress nutricional, demonstrou reorganização dos filamentos de actina do citoesqueleto, associada ao aumento proliferativo. Nossos resultados podem ser uma contribuição, haja vista que são necessários novos estudos sobre os efeitos fotobioquímicos do LBP. Através de trabalhos complementares, será possível inferir se o efeito Residual do Laser Cirúrgico é capaz de biomodular resposta na região tratada durante cirurgias para recuperação de áreas isquêmicas do miocárdio.

Palavras chave: *Laser de Baixa Potência, angiogênese cardíaca, cultura de células endoteliais.*

Abstract

The Low Level Laser Therapy used on angiogenesis biostimulation, may become “a posteriori” another source in cardiac surgeries to recover ischemic areas of the heart. The analysis of the results of Low Power Laser (LLL) effects, is of fundamental importance, due to a possible less invasive surgeries in the future in an exponentially growing group of cardiac patients in this country and around the world. When High Level CO₂ Laser is applied in Transmyocardial Laser Revascularization (TMRL) to treat ischemic myocardium, still not totally understood the secondary effects that may occur, although probably one of them is the neoangiogenic process. We believe, that simultaneously to the photomechanic reactions of the CO₂ surgical laser (800W), a possible secondary effect takes place, probably by the so called “Residual Effect of Laser” capable of incurring biomodulatory effect, promoting an increase on cell proliferation and consequently vascularization of the adjacent zone. This work analyzed the effect of LLL on endothelial cell proliferation by the accompaniment of the proliferative response of cell cultures as a function of the application of a 685 nm Low Level Semiconductor Laser (InGaAlP), with fluences of 2; 4 and 8 J/cm² and powers of 10 and 20 mW. We observed a higher proliferation in all dosimetries, being 8 J/cm² the most expressive one (P<0,05). Fluorescence microscopy of the cells, showed a disorganization of the cytoskeleton elements of the partially deprived nutrient cells, which compromise cellular proliferation. The irradiation of nutritional stressed cells, showed a reorganization of the actin filaments cytoskeleton associated with augmented cell proliferation. Our results may be a contribution, and new studies are necessary to understand all the biochemical effects of the LLL. Together with complementary studies, it will be possible to infer whether the Residual Effect of Surgical Laser, is capable to modulate the response on the treated zone during surgeries for the recovery of ischemic areas of the myocardium.

Key words: Low Level Laser, cardiac angiogenesis, endothelial cells culture.

Sumário

1.	Introdução	01
2.	Revisão de Literatura	03
2.1.	Laser	04
2.2.	Definições Gerais do Laser	07
2.3.	Lasers de Alta Potência	08
2.4.	Laser CO ₂	09
2.5.	Heart Laser	10
2.6.	Lasers na Cardiologia	10
2.7.	Revascularização Transmiocárdica com Laser de CO ₂ (RTML)	12
2.8.	Crterios para Realização da RTML com Laser de CO ₂	14
2.9.	Energia do Laser	14
2.10.	Resultados da RTML com CO ₂	15
2.11.	Estudos Experimentais com Raios Laser	15
2.12.	Neoangiogênese	17
2.13.	Efeito Residual do Laser Cirúrgico de Alta Potência	19
2.14.	Lasers de Baixa Potência	20
2.15.	Interação Laser de Baixa Potência -Tecido	22
2.16.	Métodos de Análise da Proliferação Celular	24
2.17.	Endotélio Vascular e Células Endoteliais	26
2.18.	Fibroblastos	29
2.19.	Células Endoteliais e Fatores de Crescimento	29
2.20.	Isquemia Celular	31
2.21.	Cicatrização	32
2.22.	Laser de Baixa Potência em Células Endoteliais	34
2.23.	Mitocôndrias e Laser de Baixa Potência	35
3.	Objetivo	38
4.	Material e Métodos	41
4.1.	Material	41

4.2.	Crescimento e Manutenção de Culturas de Células	43
4.3.	Controle de Células Viáveis	43
4.4.	Plano de Trabalho	44
4.5.	Privação de Soro Fetal Bovino (SFB)	44
4.6.	Curva Gaussiana do Laser Thera Lase® ($\lambda = 685$ e 830 nm)	45
4.7.	Plaqueamento das Células	45
4.8.	Contagem Celular	46
4.9.	Irradiação do Subcultivo Celular em Placa de 24 Poços	47
4.10.	Procedimento para Microscopia de Fluorescência.....	48
4.11.	Método Estatístico	49
5.	Resultados	50
5.1.	Curva Gaussiana do Laser Thera Lase®	51
5.2.	Análise da Proliferação Celular	54
5.3.	Tabelas Referentes à Contagem do Número de Células	55
5.4.	Método Estatístico	60
5.5.	Curvas de Crescimento da Linhagem CIPs com 0%, 5% e 10% SFB	65
5.6.	Microscopia de Fluorescência	76
6.	Discussão	87
7.	Conclusão	101
8.	Direcionamentos Futuros	103
9.	Referências Bibliográficas	105

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Coeficiente de absorção para diferentes tecidos em função do comprimento de onda	05
Figura 2.2 - Corte histológico de VE, mostrando trave de fibrose miocárdica intersticial, perpendicular ao epicárdio (setas) que se estende a partir da região subepicárdica (SE) em direção ao endocárdio (tricroômico de Masson, aumento original X 5) (DALLAN et al., 1999).....	17
Figura 2.3 - Corte histológico do VE, mostrando vasos sangüíneos neoformados de pequeno calibre (setas), em meio à trave de fibrose intersticial (tricroômico de Masson, aumento original X 63). (DALLAN et al., 1999).....	18
Figura 2.4 - Curva Gaussiana e Efeito Residual do Laser Cirúrgico	20
Figura 2.5 - Atuação do Laser visível e infravermelho e resposta Fotoquímica	37
Figura 4.1 - Esquema de irradiação das placas de 24 poços (Nunc) com o Laser (Thera Lase [®]) $\lambda = 685 \text{ nm}$	47
Figura 5.1 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 0% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação LBP. Filamentos de actina alterados, observando-se fragmentação destas estruturas. (X 1.000)	77
Figura 5.2 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 0% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação LBP. Filamentos de actina alterados, observando-se fragmentação destas estruturas e aparente perda de adesão (X 1.000)	77

5.3 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação. Filamentos desorganizados e perda das fibras de stress (<i>stress fibers</i>) (X 1.000)	79
5.4 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação. Filamentos desorganizados, perda das fibras de stress (<i>stress fibers</i>) e ausência de filamentos de actina em algumas regiões (X 1.000).	79
5.5 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 10% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação com LBP. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de stress (<i>stress fibers</i>) e âncoras de adesão celular (X 1.000).....	81
5.6 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 10% de suplementação de Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação com LBP. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de stress (<i>stress fibers</i>) e âncoras de adesão celular (X 1.000).....	81
5.7 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação de Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 2 J/cm ² e potência 20 mW. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de stress (X 1.000).....	83
5.8 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação de Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 8 J/cm ² e potência 20 mW. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de stress (X 1.000)	83
5.9 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5 % de suplementação de Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 2 J/cm ² e potência 20 mW . Filamentos de actina-F com distribuição homogênea.(X 500)	85
5.10 - Filamentos de actina-F de Células Endoteliais CIPs, com 5 % de suplementação de Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 8 J/cm ² e potência 20 mW . Filamentos de actina com distribuição homogênea e projeções do citoesqueleto semelhantes a espículas de actina(X 500)	85

Lista de Tabelas

Tabela 5.1 - Medida da intensidade de energia (mV) captada por um multímetro em função da posição do feixe Laser medido por um translador em milímetros (mm). Números referentes às curvas Gaussianas plotadas.....	51
Tabela 5.2 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 0% de suplementação de SFB, e subgrupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm^2 e 10 mW de potência.....	55
Tabela 5.3 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 5% de suplementação de SFB, grupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm^2 e 10 mW de potência.....	56
Tabela 5.4 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 10% de suplementação de SFB, grupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm^2 e 10 mW de potência.....	56
Tabela 5.5 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo não submetido à irradiação Laser, com concentração de inicial de $1,0 \times 10^4$ células, subcultivadas em meio com 5% SFB.....	57
Tabela 5.6 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 2 J/cm^2 e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....	57
Tabela 5.7 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 2 J/cm^2 e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....	58

Tabela 5.8 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 4 J/cm^2 e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....58

Tabela 5.9 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 4 J/cm^2 e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....58

Tabela 5.10 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 8 J/cm^2 e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....59

Tabela 5.11 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 8 J/cm^2 e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB.....59

Tabela 5.12 - Média da contagem celular para os grupos controle e irradiado e seus subgrupos com 0%; 5% e 10 % de suplementação com SFB.....60

Tabela 5.13 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^3$) dos grupos controle e Laser (DE= 2 J/cm^2 e P=10 mW), com diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino. Teste Mann-Whitney.....61

Tabela 5.14 - Média da contagem celular para os grupos controle e irradiado com diferentes fluências e potências, com 5 % de suplementação com SFB.....61

Tabela 5.15 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^4$) dos grupos controle e Laser (DE=2, 4 e 8 J/cm² e P=10 e 20 mW), em meio com Soro Fetal Bovino a 5%. Teste Mann-Whitney.....62

Tabela 5.16 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^4$) irradiadas com Laser (DE=2, 4 e 8 J/cm² e P=10 e 20 mW), em meio com Soro Fetal Bovino a 5%. Teste Kruskal-Wallis.....63

Lista de Gráficos

Gráfico 5.1 – Laser InGaAlP, operando no comprimento de onda 685 nm	53
Gráfico 5.2 – Laser GaAlAs, operando no comprimento de onda 830 nm	53
Gráfico 5.3 – Média do número de células do grupo controle, sem irradiação Laser, nos subgrupos com 0%, 5% e 10% de suplementação com SFB.....	65
Gráfico 5.4 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 0% de suplementação de SFB.....	66
Gráfico 5.5 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 5% de suplementação de SFB.....	67
Gráfico 5.6 – Média dos números de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 10% de suplementação de SFB.....	68
Gráfico 5.7 – Média do número de células grupos controle e irradiado, com fluência $2\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 10 mW, com 5% de suplementação com SFB.....	69
Gráfico 5.8 - Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência $2\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 20 mW, com 5% de suplementação de SFB.....	70
Gráfico 5.9 - Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência $4\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 10 mW, com 5% de suplementação de SFB.....	71
Gráfico 5.10 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência $4\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 20 mW, com 5% de suplementação de SFB.....	72

Gráfico 5.11 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência $8\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 10 mW, com 5% de suplementação de SFB.....73

Gráfico 5.12 – Média do número de células com 5% de suplementação de SFB, nos grupos controle e irradiado com fluência $8\text{J}/\text{cm}^2$ e potência 20 mW, em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento.....74

Gráfico 5.13 – Porcentagem do crescimento das células com 5% de suplementação de SFB irradiadas em relação ao grupo controle. Irradiação realizada com LBP, com fluências 2; 4 e $8\text{J}/\text{cm}^2$ e potências 10 e 20 mW, em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento.....75

Lista de Abreviaturas e Símbolos

GaAs: Arseneto de gálio

GaAlAs: Arseneto de gálio alumínio

ATP : Adenosina trifosfato

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

Ca^{2+} : Íon cálcio

CIPs: Célula endotelial de aorta de coelho

CO_2 : Dióxido de carbono

CW: modo contínuo

D.E.: Densidade de Energia

D.P. : Densidade de Potência

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E: Energia

Er: Érbio

EROs : Espécies reativas de oxigênio

f: frequência

F: Fahrenheit

FAK: adesão focal kinase

FDA: Food and Drug Administration

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

HeLa : Linhagem celular de carcinoma cervical humano

He-Ne : Hélio-neônio

Ho: Hólmio

Hz: Hertz

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

InAlGaP : Fosfeto de índio-gálio-alumínio

J : Joules

K^+ : Íon potássio

M: Molar

Mg^{2+} : Íon magnésio

mJ: milijoule

mW: Miliwatts

μ l: Microlitro

μ m: Micrometro

μ M: Micromolar

Na^+ : Íon sódio

NaCl : Cloreto de sódio

Nd: Neodímio

nm: Nanômetro

$O_2^{\bullet-}$: Íon superóxido

1O_2 : Oxigênio singlete

O_2 : Oxigênio

P: Potência

PBS: Salina tampão fosfato

pH: Potencial de hidrogênio

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

S₀: Estado de energia singlete fundamental

S₁ : Primeiro estado singlete excitado

SFB: Soro Fetal Bovino

T₁: Estado triplete

TFD : Terapia fotodinâmica (PDT)

TGF- β : Fator de crescimento transformante - β

UV: Ultravioleta

VIS: Visível

W: Watts

YAG: Yttrium-Aluminum-Garnet

X 2.000: Aumento de 2.000 vezes

X 4.000: Aumento de 4.000 vezes

l : Comprimento de onda

c : Velocidade da luz no vácuo

h : Constante de Planck

n: Frequência

1 - Introdução

1 – Introdução

Nos Estados Unidos, mais da metade de todas as mortes foram causadas por doenças cardiovasculares, e no Brasil, essa patologia torna-se a primeira causa *mortis* desde a década de 60 (BAYER, 1984). Conforme Fuster (1999), a incidência de mortalidade em nosso país alcançou 377,3 óbitos por 100.000 habitantes em 1996. Doenças cardiovasculares vêm ocupando o maior índice de internação e é a principal causa de morte no Estado de São Paulo (LAURENTI; BUCHALLA, 2001).

Uma técnica que vêm sendo empregada em pacientes com doenças cardiovasculares é conhecida por Revascularização Transmiocárdica com Laser de CO₂ (RTML), esta é capaz de induzir a formação de neoangiogênese através do estímulo em áreas do miocárdio, atingidas por isquemia (oxigenação insuficiente), inobstante sem apresentar o infarto do miocárdio confirmado. A RTML também pode ser usada em combinação com a cirurgia convencional de revascularização miocárdica (bypass), para aumentar o fluxo sanguíneo nas áreas do miocárdio, para as quais a ponte coronária não é capaz de ajudar o suficiente, nestes pacientes graves, altamente sintomáticos. A energia do Laser é aplicada no miocárdio, a fim de criar canais na região do ventrículo esquerdo e/ou zonas privadas de oxigênio (CHAVANTES; OLIVEIRA; DALLAN, 1999).

Quando se emprega o Laser de CO₂ (800 W) de alta potência na RTML, ocorrem efeitos secundários ainda não totalmente esclarecidos, dentre eles, o processo neoangiogênico (DALLAN *et al.*, 1999). Este trabalho propõe analisar o efeito do Laser de Baixa Potência (LBP) na proliferação de células endoteliais, como sendo um possível efeito secundário da RTML, pelo chamado Efeito Residual do Laser ou Laser Terapia Simultânea, descrita por Ohshiro e Calderhead (1991).

Nas últimas décadas, a Terapia Laser de Baixa Potência ou Biomodulação ganhou atenção aumentada na Europa e Ásia no tratamento de vários processos patológicos, particularmente na cicatrização de feridas e reparo tecidual. Inúmeros experimentos e estudos clínicos vêm demonstrando que a irradiação com LBP na região visível e infravermelha contribui para biomodulação de processos celulares (KIPSHIDZE, 2001_a).

2 – Revisão de Literatura

2.1 - LASER

A palavra LASER é um acrônimo de “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”. A emissão estimulada foi descrita pela primeira vez por Einstein, em 1917, de forma teórica. A primeira possibilidade de aplicação desse fenômeno, à amplificação de ondas curtas ou microondas, foi desenvolvida por Townes, em 1951, e teve confirmação experimental em 1954 (MAILLET, 1987).

A luz Laser possui algumas características que a diferencia de outras fontes luminosas, como:

- **Monocromaticidade:** a luz produzida por um Laser é monocromática, a maior parte da radiação emitida pelo aparelho de uso terapêutico agrupa-se em uma faixa espectral muito estreita centrada em determinado comprimento de onda;
- **Colimação:** os raios de luz emitidos pelo Laser são paralelos, praticamente inexistindo qualquer divergência da radiação emitida ao longo da distância percorrida;
- **Coerência:** os fótons emitidos pelos aparelhos Laser estão em fase, apresentando coerência temporal e espacial.

As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por sua frequência, comprimento de onda e energia. A radiação eletromagnética é mais facilmente caracterizada pela frequência (f) ou pelo seu comprimento de onda (λ), que podem ser relacionados com a velocidade da luz (c) (BRUGNERA; PINHEIRO, 1998).

$$f = c / \lambda \text{ [Hz]}$$

f = frequência

c = velocidade da luz

λ = comprimento de onda

Para compreender a interação da radiação Laser com o tecido biológico é necessário levar em consideração as propriedades ópticas do tecido, o comprimento de onda da radiação de excitação, a densidade de potência (irradiância) e de energia (fluência) entregues a este tecido. Com estes parâmetros, todos os possíveis efeitos causados pela radiação no tecido podem ser previstos através de modelos físicos e matemáticos, levando-se em consideração as principais variáveis biológicas, tais como, tipo de célula, perfusão sanguínea, condução térmica, entre outras. Variando-se os parâmetros acima mencionados, quatro efeitos podem ocorrer quando a radiação óptica atinge o tecido, o Fotoquímico, o Fototérmico, o Fotomecânico e o Fotoelétrico. Curvas de absorção para diferentes tecidos biológicos em função do comprimento de onda foram propostas sendo apresentadas na figura 2.1 (JACQUES, 1992).

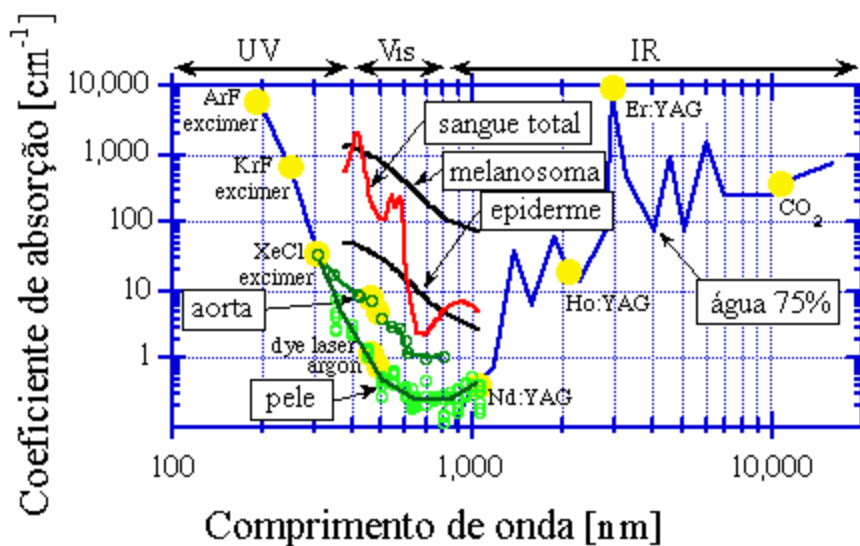


Figura 2.1 - Coeficiente de absorção para diferentes tecidos em função do comprimento de onda.

Efeito Fototérmico

Na interação fototérmica, segundo McKenzie (1990), a molécula ao absorver energia luminosa vibra produzindo alta concentração de calor, que devido à difusão térmica se propaga através do tecido. A energia absorvida pela molécula depende de sua estrutura, do

comprimento de onda da radiação e da densidade de energia e potência depositados na região. O Efeito Fototérmico pode ocasionar vaporização, coagulação, corte. Dentre os Lasers que podem ocasionar este efeito temos Laser contínuos com alta potência, como o Nd:YAG, CO₂, Argônio.

Efeito Fotomecânico-acústico

Este efeito é essencialmente não térmico e provocado por pulsos curtos de alta energia. Os altos níveis de energia do pulso Laser, resultam em processos de rápida expansão ou ondas de choque capazes de causar ruptura intermolecular. A quebra da molécula causada por uma onda de choque acústica ocorre pela conversão de fótons de alta energia em energia vibracional (cinética), provocando processos fotoablativos não térmicos.

Efeito Fotoionizante

Este processo só ocorre com tecidos que apresentem elevado coeficiente de absorção em um determinado comprimento de onda, possibilitando concentrar altíssima densidade de energia em um referido ponto. O Efeito Fotoionizante causa quebra da estrutura quaternária do DNA, tendo como exemplo os Excimer Lasers, muito utilizados na Oftalmologia.

O Laser apresenta parâmetros físicos de grande relevância para sua correta utilização, tais como: potência (P), energia (E), densidade de energia (DE) e densidade de potência (DP).

Efeito Fotoquímico

O princípio básico do efeito fotoquímico está associado à estimulação de cromóforos presentes nos tecidos biológicos após a absorção de energia fornecida por fótons, agindo sobre as moléculas. O Efeito Biomodulador pode ser Bioestimulatório ou Bioinibitório. A fotobiomodulação de cultivo celular e tecido biológico, baseado na excitação de fluoróforos endógenos tem como um de seus principais alvos o citocromo da mitocôndria. Pode ocorrer também a bioestimulação de cromóforos exógenos, como na Terapia Fotodinâmica (PDT), onde as moléculas de corante são excitadas pela irradiação Laser. O efeito fotoquímico é um efeito basicamente não térmico.

2.2 - Definições Gerais do Laser

Potência

A potência útil do aparelho é expressa em watts (W), sendo que em Laser Terapia de Baixa Potência LTBP, é expressa comumente em miliwatts (mW).

Densidade de Potência (DP) ou Irradiância ou “Intensity”

Irradiância é o termo utilizado como sinônimo para densidade de potência (DP), que é definida como sendo a potência óptica de saída do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm², ou seja, a densidade de potência é a relação entre a potência administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio ou *spot*. Assim sendo, a densidade de potência pode ser descrita pela fórmula:

$$DP = P/A \text{ [W/cm}^2\text{]}$$

$$P = \text{potência útil}$$

$$A = \text{área de irradiação}$$

O cálculo da DP depende da área de saída do feixe laser. No caso de geometria circular, esta área é obtida pela fórmula da área do círculo, para o raio do feixe laser a ser utilizado:

$$A = \pi \cdot r^2 \text{ [cm}^2\text{]}$$

Energia

A energia é descrita em Joules (J), e corresponde à potência aplicada em um determinado período de tempo:

$$E = P \times T [J]$$
$$E = \text{Energia}$$
$$P = \text{Potência}$$
$$T = \text{Ttempo}$$

Densidade de Energia (DE) ou Fluência ou “Dose”

É a relação entre a energia administrada por um emissor laser e a superfície de irradiação do raio de luz ou *spot*.

$$DE = E/A [J/cm^2]$$
$$DE = \text{Densidade de Energia}$$
$$E = \text{Energia}$$
$$A = \text{Área}$$

2.3 - Lasers de Alta Potência

Os Lasers de Alta Potência, também chamados de Lasers Cirúrgicos, são os mais frequentemente empregados em procedimentos médicos. Dependendo do coeficiente de absorção do tecido podem ocasionar carbonização, vaporização, coagulação ou desnaturação de suas proteínas (CHAVANTES; JATENE, 1990). Existem diversas

vantagens em utilizar Laser em cirurgia, como diminuição do sangramento, da infecção, da dor, redução do surgimento de edema e precisão em corte cirúrgico, além do emprego em diversas áreas de atuação. O Laser de Alta Potência pode também ocasionar outros efeitos não-dependentes de calor, criando alterações ou destruição irreversíveis no tecido, como efeito fotoablativo, fototérmico, fotomecânico, entre outros (GENOSE, 1991).

Dentre os Lasers mais empregados atualmente na medicina estão o de Neodímio YAG (Nd:YAG); o de Hólmio YAG (Ho:YAG), os Excimers e o Laser de CO₂.

2.4 - Laser CO₂

O Laser de CO₂ produz uma luz invisível, na região do infravermelho médio, com comprimento de onda de 10.600 nm. O meio excitado é uma mistura de gases incluindo N₂ (nitrogênio), He (hélio) e CO₂ (dióxido de carbono) e a forma de excitação é por meio de descarga elétrica. A molécula de CO₂ é excitada pelo choque mecânico com elétrons e com as moléculas de N₂ e He.

A radiação no comprimento de onda deste Laser é totalmente absorvida pela água e transformada em calor. A penetração é da ordem de 0,2 mm, permitindo utilizar-se o CO₂ para cortar e vaporizar o "tecido vivo", com mínima interferência nos tecidos adjacentes. Este Laser quando conduzido por fibras ópticas tem sua utilização clínica inviável devido ao alto custo (CHAVANTES; JATENE, 1990).

São Lasers eficientes, de simples operação devido ao seu baixo consumo e eventuais manutenções, de preferência preventivas, sendo estas mais eficazes. Podem ser operados em diferentes modos: CW ou modo contínuo, pulsado ou superpulsado (GENOVESE, 1991).

2.5 - Heart Laser

Quando o CO₂ apresenta-se no modo ultrapulsado, temos o chamado Heart Laser, que utiliza braços articulados, revestidos internamente por material dielétrico, com espelhos e prismas que refletem a luz laser até o microscópio ou "hand piece". O Laser de CO₂ superpulsado apresenta raios de maior potência com 800 W de potência de pico e 400 W de potência média. Quando interage com o tecido este Laser tem um efeito fotomecânico-acústico.

O efeito fotomecânico é essencialmente não térmico e provocado por pulsos curtos de alta energia, com largura máxima de 10⁻⁶ segundos. Os altos níveis de energia do pulso Laser, resultam em processos de rápida expansão ou ondas de choque capazes de causar ruptura intermolecular (DYER; AL-DHAHIR, 1990).

2.6 - Lasers na Cardiologia

Infelizmente, ainda hoje no país, a maioria dos cardiologistas e cirurgiões cardíacos ou médicos em geral, desconhecem que o Prof. Radi Macruz é considerado o "Pai do Laser na Cardiologia", sendo que o INCOR foi o precursor reconhecido internacionalmente, como a instituição pioneira e continuamos trilhando o caminho para o desenvolvimento de novas técnicas menos invasivas, através da integração do SCML INCOR e IP&D-UNIVAP, que continuam a beneficiar inúmeros pacientes, tanto no país quanto em outros cantos ao redor do mundo (CHAVANTES, 2003)¹.

No Brasil, MACRUZ *et al.* (1979), utilizaram retalhos de aorta humana obtidas em necropsia, tendo estudado a ação dos raios laser sobre placas de ateroma. ARMELIN *et al.*, em 1981, confeccionaram na Divisão Experimental do Instituto do Coração - Hospital das

Clínicas - FMUSP, um modelo de cateter para a condução do Laser, com a finalidade de introduzi-lo no sistema cardiovascular e aplicá-lo em vasos obstruídos por ateroma.

Dallan *et al.* (1983), trabalharam com o Laser de argônio no Instituto do Coração de São Paulo; realizaram trabalho experimental com 5 cães, utilizando raios laser na tentativa de realizar soldadura em anastomose venosa, concluindo que esse procedimento seria uma forma alternativa a métodos tradicionais de sutura.

As primeiras experiências em artérias coronárias humanas foram realizadas por Choy, em 1984. Mirhoseini e Cayton propuseram em 1981, o uso dos raios Laser visando à criação de canais transmiocárdicos. Esses autores utilizaram laser de CO₂ de 450 W, em modelo de isquemia miocárdica aguda, através da ligadura do ramo interventricular anterior da artéria coronária esquerda de cães. Verificaram ausência de mortalidade nos cães tratados com raios Laser e taxa de mortalidade de 83% no grupo controle. Após dois anos, Mirhoseini *et al.* (1983), relataram o emprego dessa técnica em um paciente submetido a revascularização clássica do miocárdio. O ramo interventricular anterior da artéria coronária esquerda estava ocluído e a parede anterior do VE estava hipocinética. Os raios Lasers foram aplicados nessa região da parede cardíaca, que apresentou melhora da contratilidade no pós-operatório.

Okada *et al.* (1986), utilizaram Laser de dióxido de carbono (85W) para criar seis orifícios na parede anterior do ventrículo esquerdo de um paciente de 55 anos, portador de pericardite constritiva e angina refratária ao tratamento clínico. Os autores relataram significativa melhora clínica, decorridos nove meses da intervenção, sem outras complicações.

A partir de 1988, foi desenvolvido no *San Francisco Heart Institute*, Califórnia, (EUA) um Laser de CO₂, de altíssima potência (800 W), sincronizado ao eletrocardiograma (ECG), que só penetrava na parede miocárdica durante a diástole por meio de um simples pulso. A possibilidade da criação de canais transmiocárdicos em cerca de 40 ms, eliminou a necessidade de circulação extra corpórea (CEC) com parada cardíaca, durante as cirurgias cardíacas.

Desde 1990, esse Laser de CO₂ vem sendo empregado em corações humanos durante as contrações usuais de seu músculo ventricular, sendo a técnica cirúrgica

denominada Revascularização Transmiocárdica com Heart Laser (RTML). Nesse período, mais de 4.000 procedimentos cirúrgicos com laser foram realizados em mais de 80 Serviços Internacionais de Cirurgia Cardíaca, ganhando credibilidade e o reconhecimento do F.D.A. (DALLAN *et al.*, 1999).

No Brasil, a RTML foi iniciada, em 1995, por Galantier e colaboradores no Hospital Albert Einstein. No período de abril de 1995 a junho de 1996, esses autores submeteram 17 pacientes a RTML e, em 2 deles associaram à revascularização miocárdica convencional. Foram efetuadas, em média, 35 perfurações no ventrículo esquerdo, sendo 31 (90%) eficazes; houve 3 óbitos imediatos e 5 tardios. Três (17,6%) dos pacientes não apresentaram nenhuma melhora da angina e 6 (35%) tiveram melhora de pelo menos 1 a 2 grupos funcionais na classificação da angina. Os autores concluíram que a escolha inadequada com a má condição clínica pré-operatória desses pacientes e a presença de lesão coronária suboclusiva foram fatores que predispuseram aos resultados imediatos desfavoráveis, já que a presença de circulação colateral proporciona melhores resultados tardios (GALANTIER, 1996). É relevante enfatizar que uma equipe multidisciplinar auxiliar, não só durante o procedimento, como anterior a este, evita eventuais intercorrências no trans e pós operatório desses pacientes (CHAVANTES, 2003)².

Inobstante, no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP, a RTML através do laser de CO₂ foi iniciada em fevereiro de 1998, com sucesso neste mesmo tipo de intervenção; contudo, a dosimetria e o número proporcionais de canais foram indubitavelmente um fator positivo na neovascularização das regiões previamente isquêmicas, com mínimo percentual de morbidade e mortalidade dentro deste grupo de indivíduos de alto risco sem outras possibilidades de tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

2.7 - Revascularização Transmiocárdica com Laser de CO₂ (RTML)

A técnica denominada Revascularização Transmiocárdica a Laser de CO₂ (RTML) é capaz de realizar a formação de nova circulação através do estímulo em áreas do miocárdio, atingidas por isquemia (oxigenação insuficiente), inobstante sem infarto

confirmado. Atualmente, em estágio de investigação, a RTML é destinada a promover o fluxo sanguíneo no músculo cardíaco pela aplicação de uma fonte de energia de laser de CO₂ diretamente nas áreas do miocárdio privadas de oxigenação suficiente. A revascularização a Laser pode ser Transmiocárdica (minitoractomia) ou Transcutânea (endocárdica - angioplástica) via cateter inserido através da artéria femural.

Estudos clínicos-cirúrgicos preliminares indicaram uma redução significativa na severidade da angina pectoris, melhora na qualidade de vida e evidências de melhora no fluxo sanguíneo do músculo cardíaco em pacientes que vinham sendo não-responsivos a outras terapias (CHAVANTES; OLIVEIRA; DALLAN, 1999).

A RTML também pode ser usada em combinação com a cirurgia convencional de revascularização miocárdica para aumentar o fluxo sanguíneo para áreas do miocárdio para as quais a ponte coronária não é capaz de ajudar o suficiente, imediatamente. A energia do laser é aplicada no miocárdio para criar canais na região do ventrículo esquerdo e/ou zonas privadas de oxigênio.

Na RTML cirúrgica, um cirurgião cardiovascular aplica o laser no coração através de uma toracotomia. Estudos de acompanhamento pós-procedimento, inclusive scans radioativos, confirmaram a diminuição da dor, o aumento da capacidade física e melhor perfusão miocárdica por pelo menos 12 meses entre os participantes do estudo.

Num estudo randomizado, comparando o procedimento convencional cirúrgico versus RTML a Laser Cirúrgico, encontrou-se que há uma melhora na sintomatologia, qualidade de vida e evidências de melhor fluxo sanguíneo no miocárdio em pacientes que foram submetidos a RTML. Além disto, ocorreu a melhora do grau da angina, que permaneceu ausente por pelo menos dois anos após RTML.

Apesar dos resultados preliminarmente promissores da RTML, estudos mais abrangentes sobre a técnica são necessários antes que ela possa ser rotineiramente recomendada a pacientes com *Angina pectoris* severa e não-responsiva. Os pesquisadores necessitam descobrir a ação químico-física, bem como entender mais profundamente os mecanismos subjacentes, os quais produzem as respostas desejadas de modo que possam determinar o melhor tamanho possível de canal e fonte de energia, para fazer a RTML tão efetiva quanto possível (DALLAN *et al.*, 1999).

2.8 - Critérios para Realização da RTML com Laser de CO₂

Pacientes são considerados bons candidatos para protocolos de investigação para RTML se preencherem os seguintes critérios:

1. *Angina pectoris* severa e persistente apesar do uso de vasodilatadores;
2. Candidatos sem indicação a angioplastia transluminal percutânea devido ao péssimo e generalizado estado de suas artérias coronarianas;
3. Candidatos não indicados a revascularização miocárdica cirúrgica por falta de rede venosa aceitável (safena, mamária, epigástrica) e impossibilidade de retirada de artéria radial (Fenômeno de Raynaud);
4. Pacientes já revascularizados anteriormente, bem como previamente submetidos a angioplastia percutânea transluminal coronária (APTC), sem sucesso, contudo com sintomatologia persistente apesar do uso de medicamentos cardíacos (CHAVANTES; OLIVEIRA; DALLAN, 1999).

2.9 - Energia do Laser

Quando o pulso do raio Laser atinge o coração, a sua energia é transferida para o tecido alvo, o miocárdio. A absorção dessa energia pela água tecidual provocará a formação de vapor, na forma de bolhas. A passagem da água do estado líquido para o gasoso provoca sua expansão volumétrica, abrindo espaço em meio ao tecido e criando o canal (DALLAN, 1999). A RTML empregou inicialmente 40 J/cm². A seguir, a intensidade da energia foi aumentada ou diminuída, de acordo com a superfície do epicárdio e com o sucesso da criação dos pertuitos, que são observados como se fora “bolhas” devido a turbulência através da ecocardiografia transesofágica. Atualmente no INCOR, não se emprega mais do que 25 J/cm² efetivo, reduzindo assim a instabilidade hemodinâmica que fora verificada nos primeiros procedimentos adotados (CHAVANTES, 2003)³.

2.10 - Resultados da RTML com CO₂

O conceito de sucesso neste tipo de procedimento consiste na redução de dois graus na classe de angina, segundo o critério internacional empregado na Instituição. A melhora dos sintomas anginosos é inquestionável e indubitável.

A melhora na qualidade de vida após a RTML é significativa, foi relacionado na tese de doutorado do Dr. Lisboa, através de questionários submetidos a comunicação de ética do INCOR-HC/FMUSP. Foram consideradas a retomada aos seus afazeres domésticos, sociais e de trabalho, tais resultados sugerem fortemente as vantagens clínicas proporcionadas pela RTML, a esses pacientes com doença arterial coronária obstrutiva e difusa, que já esgotaram a terapêutica convencional no tratamento da angina.

2.11 - Estudos Experimentais com Raios Laser

Canais realizados com laser de CO₂ em cães, porcos e ovelhas, examinados horas após sua confecção, já continham células vermelhas sangüíneas e fibrina. O mesmo resultado foi observado em canais realizados em cães com o Holmium: YAG laser. Canais obtidos através do Excimer laser em corações de ovelhas, encontravam-se completamente obstruídos por coágulos após 72 horas. Diante dessas evidências, resta-nos discutir se o modelo obtido em animais é superponível ao coração humano (CHAVANTES *et al.*, 1994).

A primeira crítica, ao empregar-se corações de animais em estudos de doenças humanas, reside na comparação entre corações saudáveis e doentes. Esse argumento tem relevância não apenas pela variação na estrutura miocárdica de ambos, mas especialmente porque a resposta à agressão é diferente. Em termos de estrutura, a quantidade de colágeno presente no coração humano doente é superior à dos corações normais dos animais. Essa diferença pode ser significativa, pois o colágeno contém menos água e é mais resistente à

ablação do que o músculo cardíaco. Isso é importante porque os raios Laser habitualmente usados na RTML contam primariamente com a absorção da água para realizar a ablação.

Outra diferença estrutural é que o coração humano freqüentemente apresenta uma camada gordurosa epicárdica substancial. O tecido adiposo apresenta grande quantidade de água e o Laser de CO₂ é altamente absorvido por esta. Esta alta absorção pode causar problemas nos procedimentos onde se emprega Lasers infra-vermelhos, especialmente os Lasers de CO₂ (CHAVANTES *et al.*, 1994).

Apesar desses argumentos considerando as variações entre corações humanos e de animais, os exames histológicos sugerem que essas diferenças podem ser mínimas. A aparência do tecido cardíaco após RTML com Laser de CO₂, nos dois tipos de corações, é similar. As cicatrizes dos canais também são semelhantes, assim como a resposta angiogênica local (CHAVANTES *et al.*, 1994).

Recentemente foi observado que a Revascularização Transmiocárdica Mecânica parece não promover angiogênese fisiologicamente significativa ou arteriogênese em corações de porcos com isquemia crônica e não pode ser recomendada neste momento, para tentativas clínicas. Mecanismos Laser-mediados em comprimentos de onda na região infravermelha do espectro eletromagnético podem ser importantes para induzir neovascularização terapêutica com técnicas diretas de Revascularização Miocárdica (HUGLES *et al.* 2002).

Wei Li, *et al.* em 2001, concluíram através do emprego do Heart Laser em cães, que a RTML induziu angiogênese correlacionada com a expressão de metalloproteinases-2 ativa de matriz e Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF).

Keith em 1999 realizou um estudo demonstrando que a resposta molecular para RTML com CO₂ se deve ao aumento na produção de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) endógeno, promovendo assim, a angiogênese.

2.12 - Neoangiogênese

Recentemente, contudo, tem sido enfatizado o achado, freqüente em casos de necropsia ou nos trabalhos em animais de laboratório (sacrificados sem a liberação dos vasos ocluídos), da estimulação da angiogênese pela aplicação do Heart Laser no tecido miocárdico. A presença de tecido de granulação representado por fibrose, neoformação vascular e infiltrado inflamatório linfomononuclear, observado no coração de um paciente do protocolo do INCOR, falecido 14 meses após a RTML, vem reforçar essa hipótese (Figuras 2.2 e 2.3), sem qualquer aspecto de efeito fototérmico-mecânico local (DALLAN *et al.*, 1999).

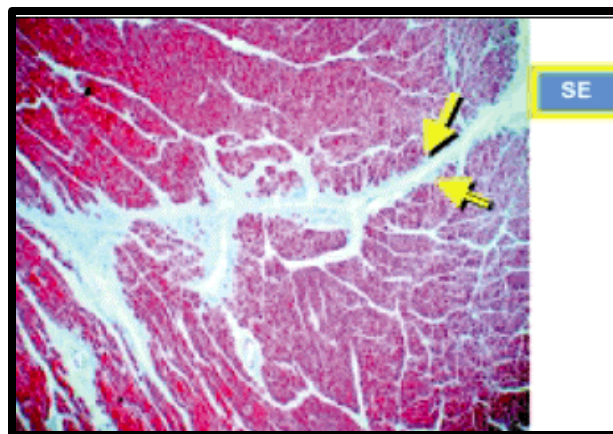


Figura 2.2 - Corte histológico de VE, mostrando trave de fibrose miocárdica intersticial, perpendicular ao epicárdio (setas) que se estende a partir da região subepicárdica (SE) em direção ao endocárdio (tricroômico de Masson, aumento original X 5) (DALLAN *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm mostrado evidências de que a RTML pode favorecer a angiogênese no miocárdio isquêmico. Isso pressupõe a hipótese que a lesão miocárdica, criada pelos canais, induz uma resposta inflamatória local que, por sua vez, libera citocinas e fatores de crescimento, além de estimular os receptores desses fatores. As evidências de um processo de crescimento vascular desencadeado pela RTML, só existem a partir da segunda ou terceira semanas após o procedimento cirúrgico, com aumento progressivo de vasos neoformados após esse período (DALLAN *et al.*, 1999).

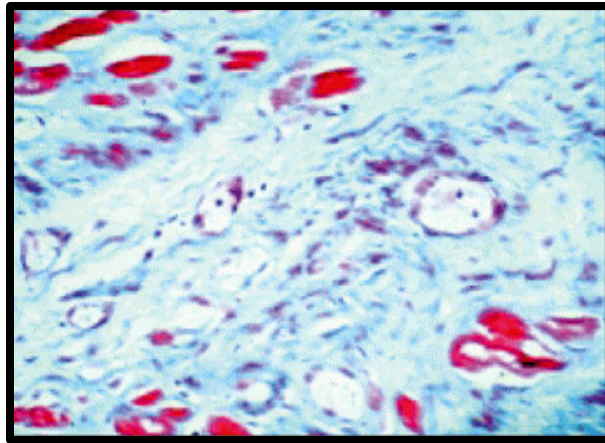


Figura 2.3 - Corte histológico do VE, mostrando vasos sangüíneos neoformados de pequeno calibre (setas), em meio à trave de fibrose intersticial (tricroômico de Masson, aumento original X 63). (DALLAN *et al.*, 1999).

2.13 - Efeito Residual do Laser Cirúrgico de Alta Potência

Quando o Laser de Alta Potência começou a ser utilizado em Medicina, observou-se que os pacientes submetidos a esse tipo de procedimento relatavam menor desconforto no pós-operatório e os médicos relataram menor quadro de edema pós-cirúrgico e melhor cicatrização tecidual, quando comparado ao tratamento de cirurgia convencional, tal fato suscitou alguns questionamentos por parte dos membros da equipe do INCOR, envolvidos na RTML com CO₂. Tendo em vista estudos que estavam sendo realizados com Laser de Baixa Potência (LBP) nesta instituição, surgiu então, a hipótese de que o Heart Laser estaria bioestimulando a zona adjacente à área tratada durante a RTML, com possível produção de substâncias neoangiogênicas. Outro efeito relatado na literatura e em trabalhos realizados no INCOR seria o efeito antiálgico do LBP (KAJITA, 2002; CHAVANTES *et al.*, 2003_a; NARA, 2003; BAPTISTA, 2003), este efeito poderia também contribuir para o sucesso na melhora da angina de pacientes pós RTML. As observações dos membros do INCOR foram baseadas no trabalho de Ohshiro e Calderhead, que em 1991, levantaram a suspeita de que o Laser poderia ter algum outro efeito adicional até então desconhecido, até que, propuseram chamar esse efeito de “Efeito X do Laser”. Esses autores propuseram que a explicação para esse efeito seria a distribuição espacial de energia gaussiana que a maioria dos Lasers apresentam. A figura 2.4 exemplifica o Perfil Gaussiano de um feixe Laser, sendo que o pico de energia concentra-se na região central do feixe, decrescendo gradualmente à medida que se aproxima da periferia lateral. Ela representa também os efeitos típicos da interação Laser-tecido biológico, evidenciando estes efeitos em função da variação da densidade de energia. As últimas zonas do gráfico, não mostram alteração macroscópica na estrutura tecidual (OHSHIRO; CALDERHEAD, 1998), ainda que os dados da literatura comprovem efeitos sobre o mesmo. Esses efeitos são conhecidos atualmente como “Terapia com Laser de Baixa Potência” ou “Laser Terapia” (OHSHIRO; CALDERHEAD, 1998), e podem ocorrer simultaneamente às reações fotomecânicas do Laser cirúrgico, na periferia da Curva Gaussiana. Ohshiro e Calderhead, 1991, relataram

este efeito como “Laserterapia Simultânea”, que também pode ser denominada “Efeito Residual do Laser Cirúrgico”.

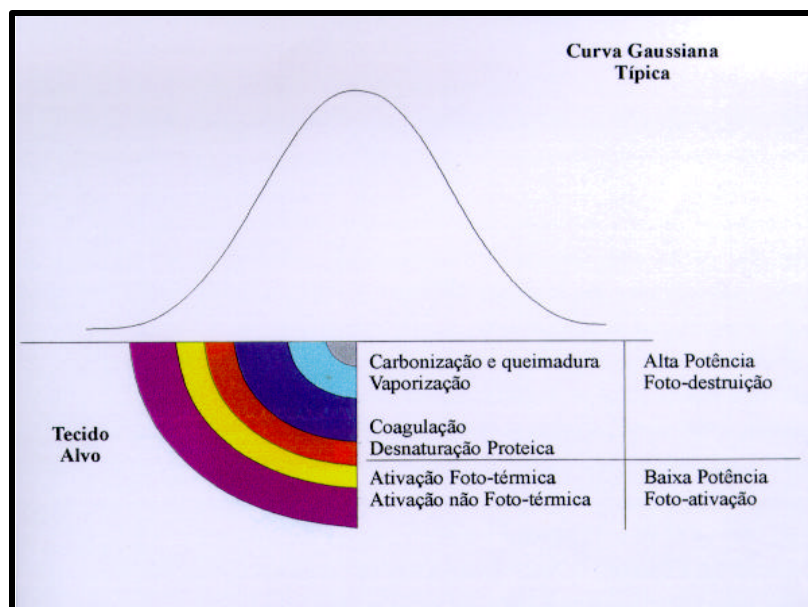


Figura 2.4 - Curva Gaussiana e Efeito Residual do Laser Cirúrgico.

2.14 - Lasers de Baixa Potência

O primeiro Laser da história foi construído por Theodore Maiman em 1960 na Califórnia-USA (MAIMAN, 1960), era um Laser de Rubi, operando em 694,3 nm. Já em 1961, foi fundado na Universidade de Cincinnati através do pioneirismo do Prof. Dr. Leon Goldman, o primeiro laboratório de Laser voltado para aplicações médicas (GOLDMAN, 1981), onde as primeiras experiências em animais foram realizadas e posteriormente aplicadas em pacientes com problemas dermatológicos.

Em 1962, Patel desenvolveu o primeiro Laser com finalidade terapêutica, um Hélio-Neônio (He-Ne) com comprimento de onda de 632,8 nm (PÖNTINEN, 1992). Contudo os primeiros Lasers Terapêuticos comerciais só apareceram no final da década de 70.

As primeiras aplicações clínicas com Laser operando em Baixa Potência foram relatadas em 1966 por Endre Mester de Budapeste, Hungria, que publicou um resumo em inglês, dos primeiros trabalhos científicos realizados em pele de ratos com Laser operando em 694 nm, através da ação estimulatória, não térmica (MESTER, 1966). O grupo de Mester do Hospital Semmelweis apresentou os primeiros relatos de casos clínicos sobre “Bioestimulação com Laser” em úlceras crônicas de membros inferiores, usando lasers de Rubi e de Argônio, tendo publicado seus primeiros artigos ainda em 1966 (MESTER, 1966). Ele produziu um grande volume de trabalhos científicos, experimentais e clínicos, tendo o Laser He-Ne, como tema central, contudo, devido a dificuldade do idioma, a pouca divulgação e a não reprodutividade de seus resultados, provocando inicialmente críticas e descréditos no meio científico durante mais de uma década (MESTER, 1971).

Em 1973, seguindo a mesma linha de Mester, Heinrich Plogg de Fort Coulombe – Canadá, apresentou um trabalho sobre “O uso do Laser em acupuntura sem agulhas”, para atenuação de dores (BAXTER, 1994). A partir do final dessa década começaram a ser desenvolvidos lasers semicondutores, dando origem ao primeiro diodo operando na região do infravermelho próximo (904 nm), constituído de um cristal de Arseneto de Gálio (GaAs). As vantagens dos Lasers semicondutores sobre o He-Ne é que, além de serem compactos estes dispositivos podem operar de forma contínua ou pulsada, enquanto que o He-Ne só pode operar em modo contínuo (CW). O efeito da fotobioestimulação com Laser pulsado foi tema de diferentes trabalhos, sendo que segundo MORRONE *et al.* (1998), a aplicação *in vivo* da radiação contínua revela melhores resultados que a radiação pulsada no processo de cicatrização.

Em 1981, apareceu pela primeira vez o relato da aplicação clínica de um diodo Laser de GaAlAs, publicado por Calderhead (1981), do Japão, que comparava a atenuação de dor promovida por um diodo Laser e o Laser de Nd:YAG, (cristal de $Y_3Al_5O_{12}$, dopado com Neodímio), operando em 1064 nm (CALDERHEAD, 1981).

A partir dos anos 90, diferentes substâncias dopantes foram introduzidas na tecnologia para obtenção de diodos Laser, gerando e ampliando a faixa de comprimento de onda. Com estes dispositivos hoje se pode ter aparelhos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com rara necessidade de manutenção, além do seu baixo custo. Os comprimentos de onda mais utilizados estão entre 600 e 1000 nm (janela óptica), pois os Lasers situados nesta região do espectro eletromagnético, são relativamente pouco absorvidos e conseqüentemente apresentam boa transmissão na pele e nas mucosas (RIGAU, 1996). Com o emprego de comprimentos de onda acima de 630 nm, ocorre favorecimento da penetração da luz no tecido alvo, pois incorre na diminuição de absorção pela hemoglobina, garantindo maior profundidade de penetração nas células.

2.15 - Interação Laser de Baixa Potência - Tecido

Quando irradiamos um tecido com um Laser, introduzimos energia em um sistema biológico vivo, que utiliza e transforma essa energia para seu consumo. A dose de irradiação ou densidade de energia é o parâmetro mais importante na terapia com este tipo de laser. A fluência tem seus limites mínimos e máximos. Se a dose for demasiadamente baixa (menor que $0,1\text{J}/\text{cm}^2$), ou muito alta (maior que $10\text{J}/\text{cm}^2$) não se obtém estimulação e no segundo caso pode produzir bioinibição (KANA *et al.*, 1981). Os diodos Lasers empregados na bioestimulação operam abaixo de 1W de potência e irradiâncias entre 0,01 e $100\text{ mW}/\text{cm}^2$ (TRELLES *et al.*, 1989).

Desde o surgimento da Terapia Laser de Baixa Potência, centrada principalmente na cicatrização de úlceras crônicas, muitos trabalhos vêm sendo realizados visando estudar o efeito bioestimulante, que esta luz exerce sobre os tecidos (RIGAU, 1996). O Laser acelera a mitose e a ação que se observa, principalmente na reparação cicatricial das lesões, ocorre por aumentar a microvascularização e formação abundante de tecido de granulação. Essa luz produz ainda alterações na estrutura mitocondrial, multiplicação da produção de

colágeno e aumento do tecido conjuntivo, por aumento na captação de glicina e prolina pelos fibroblastos. (TRELLES; MAYAYO, 1984). Em 1983, Mester observou que, na periferia de zonas irradiadas com doses de $1\text{J}/\text{cm}^2$, produzia-se estímulo do crescimento de pêlo, contudo, se a dose irradiada aumentava acima de $2\text{J}/\text{cm}^2$, inibia-se este fenômeno, até produzir sua queda. Estabeleceu-se então a existência de um provável efeito bioestimulante produzido pelas doses de Laser de pequena intensidade, levando Mester e Kovács em 1974, a experimentar esta radiação em diferentes sistemas biológicos, assim como em aplicação clínica em pacientes, tratando principalmente úlceras cutâneas crônicas resistentes aos tratamentos médicos clássicos (KOVÁCS; MESTER; GOROG, 1974).

Os efeitos terapêuticos dos Lasers sobre os diferentes tecidos biológicos são muito amplos, podem induzir efeitos tróficos-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, os quais revelaram um aumento na microcirculação local (MIRÓ *et al.*, 1984; MAIER; HAINA; LANDTHALER, 1990), no sistema linfático (LIEVENS, 1986; 1988; 1990; 1991), proliferação de células endoteliais (KIPSHIDZE *et al.*, 2001_a; SCHINDL *et al.*, 2003), epiteliais (STEINLECHNER; DYSON, 1993) e fibroblastos (LUBART *et al.*, 1995; WEBB; DYSON; LEWIS, 1998, CHAVANTES *et al.*, 2003_b; RICCI *et al.*, 2002), assim como uma elevação da síntese de colágeno por parte dos fibroblastos (ENWEMEKA *et al.*, 1990; SKINNER *et al.*, 1996). Muitos estudos clínicos foram publicados confirmando esses efeitos observados em estudos desenvolvidos em laboratório (TRELLES *et al.*, 1989; BIHARI; MESTER, 1989; ROCHKIND *et al.*, 1989; BAXTER, 1994; KAMEYA *et al.*, 1995; TANG *et al.*, 1997; REDDY *et al.*, 1998).

A ação dos diferentes comprimentos de onda no metabolismo celular vem sendo estudada por diversos autores. Já se sabe, que a ação desses Lasers varia segundo a posição que ocupam no espectro de radiações eletromagnéticas, e que sua ação sobre as células é bem distinta de acordo com os comprimentos de onda utilizados nas regiões do visível e do infravermelho (KARU, 1987).

Nos estudos *in vivo*, há dificuldade na identificação dos efeitos específicos do Laser, pois muitos fatores são relevantes no processo de cicatrização e muitas variáveis modificam os efeitos do Laser nos tecidos (KIMURA *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* em cultura de células apresentam resultados consistentes no que concerne aos efeitos do Laser

(COLVER; PRIESTLEY, 1989; HEIN *et al.*, 1992; MARTIN *et al.*, 1988), porém relativamente pouco é conhecido sobre os efeitos do Laser a nível bioquímico (KARU *et al.*, 1988; 1989). O estudo *in vitro*, utilizando cultura de células primárias tem apresentado resultados satisfatórios, embora a quantidade de material em cultura seja pequena (FRESHNEY, 1990). Através da observação da morfologia celular, dos efeitos na membrana, da atividade celular e do índice de proliferação, pode-se avaliar o dano celular (KAWAHARA *et al.*, 1968). Além destas vantagens, a realização de ensaios em culturas de células apresenta os seguintes recursos: (1) resposta imediata ou de curto prazo, tais como alterações na permeabilidade de membrana ou perturbação de vias metabólicas; e (2) sobrevivência em longo prazo (FRESHNEY, 1990).

A célula possui um limiar de sobrevivência, que depende de sua linhagem e do seu estado fisiológico. Quando se trabalha respeitando o limiar de determinada célula, oferecendo uma baixa intensidade de potência do Laser, a energia fornecida será utilizada pela própria célula de maneira a estimular sua membrana ou suas mitocôndrias. Desta forma, a célula será induzida à biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, a isso denomina-se Laser Terapia de Bioestimulação, com Laser de Baixa Potência (ALMEIDA-LOPEZ, 1999).

2.16 - Métodos de análise da proliferação celular

Quando desejamos determinar o efeito de qualquer alteração da proliferação celular no meio de cultura, ou seja, sua capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método mais indicado é contar o número de células antes e após o tratamento, de preferência a cada 24 horas. Para indicar se uma população celular está crescendo ou não, o melhor parâmetro é contar o número de células por placa de cultura.

De acordo com Schmalz (1994), vários métodos basearam-se na exclusão do corante Azul de Trypan, o qual penetra nas células mortas, com lesão da membrana celular, enquanto isso não ocorre nas células vivas, que apresentam membrana íntegra. Em 1990,

Pollard sugeriu que a determinação do número celular fosse realizada usando-se um contador eletrônico de partículas ou através de um hemocitômetro.

O primeiro método é mais preciso e pode ser usado para contar baixas concentrações celulares. O segundo requer maior densidade e é mais propenso a erro de amostragem. Entretanto, permite uma estimativa visual do estado das células e pode ser usado para estimar a viabilidade celular, quando combinado com a exclusão do corante azul de Trypan. Para a contagem, as células são ressuspensas e diluídas em Azul de Trypan. Uma gota de suspensão celular é adicionada aos dois lados do hemocitômetro: isso é feito para determinar a viabilidade celular, já que o número de células que não se coram são aquelas que apresentam a membrana intacta, ou seja, as células vivas.

Baserga (1990), relatou que células em cultura podiam crescer por aumento no tamanho da célula ou por aumento de seu número. A contagem de células em uma placa de Petri nos diz quanto a célula cresceu, e informa se as células estão ou não proliferando.

Segundo Daniel (1998) a maioria dos testes de viabilidade baseiam-se no rompimento da integridade da membrana, determinado pela penetração de um corante ao qual a célula normalmente é impermeável (azul de Trypan, eritrosina, nigrosina), ou a liberação de um corante ou isótopo radioativo. Os ensaios em longo prazo são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica ou irradiação Laser.

Schmalz (1994) afirmou que podem ser usados dois tipos de células: (1) linhagens de células permanentes derivadas de coleções tipo cultura (ou de fontes comerciais) e (2) linhagem de células primárias, derivadas de *explants*, e estabelecidas em cada laboratório individualmente. O autor afirma que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação que se deseja. Primeiramente, o autor preconiza o uso de métodos mais simples, baseados nos efeitos de membrana ou no índice de proliferação celular. Caso haja necessidade de informações mais detalhadas, dever-se-á aplicar métodos mais sofisticados, baseados na atividade celular. Esse autor acredita que o uso do índice de proliferação para registrar o dano celular é um dos métodos mais antigos e mais comumente utilizados. As vantagens da contagem direta é que a mesma é fácil de realizar e pode ser combinada com um corante vital, a fim de excluir as células mortas.

Comparadas às linhagens fibroblásticas, as endoteliais ainda não apresentam um grande número de trabalhos realizados com o emprego do LBP, e os parâmetros dosimétricos para biomodulação de células endoteliais ainda não estão estabelecidos. Sendo estas células tão importantes no processo cicatricial quanto os fibroblastos, devido ao processo angiogênico, faz-se necessário mais estudos sobre a participação das células endoteliais na neoangiogênese e reparação tecidual, após bioestimulação com LBP.

2.17 - Endotélio Vascular e Células Endoteliais

O endotélio tem importante papel na modulação do tônus vasomotor coronário e na contração miocárdica por meio da síntese e do metabolismo de agentes vasodilatadores e vasoconstritores (LOSCALZO; WELCH, 1995). A disfunção endotelial tanto pode incluir aspectos relacionados com a vasodilatação como com a vasoconstrição.

A súbita oclusão de uma artéria coronária causa profundas alterações no miocárdio, irrigado por estas, bem como na estrutura e na função da região da própria artéria ocluída. Assim, os conceitos sobre fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio (I.A.M) foram enriquecidos, por evidências de que o endotélio tem papel relevante durante o I.A.M., embora esse papel ainda não esteja totalmente esclarecido.

A vasculatura humana foi por muitos anos vista como um sistema relativamente estático e somente durante o século XX, ultrapassamos a ignorância nesta área. A descoberta do óxido nítrico (NO) - molécula sintetizada pelo endotélio vascular -, que é um vasodilatador endógeno, permitiu novo entendimento do comportamento biológico vascular.

O aminoácido L-arginina foi identificado, por Palmer e colaboradores, como o precursor fisiológico do NO. Modificações estruturais induzidas nesse substrato levaram à síntese de vários antagonistas competitivos de NO, tais como o N^G-nitrometil-L-arginina éster (L-NAME) e o N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), que são instrumentos úteis na caracterização dos efeitos fisiológicos desse radical (MONCADA; HIGGS, 1993).

Ao longo dos últimos anos, inúmeras observações demonstraram que o NO inicialmente descoberto no sistema vascular é uma molécula ativa em vários processos em todo o corpo humano (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Em relação ao sistema cardiovascular, a participação do NO tem sido implicada em inúmeros processos fisiológicos, tais como regulação do tônus vascular e da contratilidade miocárdica, efeitos antitrombóticos da vascularização e regulação da interação endotélio-leucócitos, regulação da integridade endotelial e de sua permeabilidade, e regulação da proliferação celular vascular (COHEN, 1995).

Ma et al., observaram que a liberação basal de NO encontra-se diminuída após isquemia miocárdica, bem como na lesão de reperfusão. Essa anormalidade na liberação de NO parece ser o mecanismo primário de lesão ao endotélio e aos miócitos determinada pelos neutrófilos (MA; WEYRICH; LEFER, 1993).

Estudos *"in vitro"* e *"in vivo"* indicam que tanto a isquemia como a reperfusão miocárdicas causam disfunção da vasodilatação mediada pelo endotélio, sugerindo que a ação do NO encontra-se prejudicada nestas condições. Não está ainda devidamente esclarecido se a produção de NO encontra-se reduzida nessas circunstâncias, ou se o mesmo é inativado pela presença de radical livre de oxigênio _superóxido_, o qual é produzido no momento da perfusão (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWEL, 1995).

O endotélio pode secretar várias substâncias vasoconstritoras, cujo papel fisiológico *"in vivo"* não está ainda bem caracterizado. O peptídeo endotelina-1 (ET-1), o mais potente vasoconstritor conhecido, é um dos principais fatores constritores do endotélio (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Prostaglandina H_2 e radicais superóxido derivados do endotélio podem ter importância em condições patológicas, como hipertensão arterial e após lesão vascular. Vários estímulos, hipóxia, norepinefrina, trombina e aumentos de fluxo podem liberar, simultaneamente, NO e fatores vasoconstritores.

As células endoteliais, que formam o revestimento dos vasos sanguíneos, têm notável capacidade de ajustar seu número e arranjos, a fim de satisfazerem requerimentos locais. Quase todos os tecidos dependem de suprimento sanguíneo, e o suprimento de sangue depende das células endoteliais. Elas criam um sistema adaptável de suporte à vida,

que se espalha para todas as regiões do corpo. Se não fossem as células endoteliais se estendendo e remodelando "*ad terminum*" a rede de vasos sanguíneos, o crescimento de tecidos e a reparação seriam impossíveis. Estudos do embrião revelam que as artérias e veias se desenvolvem de pequenos vasos construídos somente de células endoteliais e lâmina basal: o tecido conjuntivo e músculo liso são adicionados mais tarde, quando requeridos, sob influência de sinais de células endoteliais. Em todo o sistema vascular do adulto, as células endoteliais retêm a capacidade de divisão celular e movimento. Se, por exemplo, uma parte da parede da aorta é danificada e as células endoteliais removidas, células vizinhas proliferam e migram para recobrir a superfície exposta, num processo de renovação por simples duplicação de células pré-existentes (ALBERTS *et al.*, 1997).

As células endoteliais não somente reparam o revestimento dos vasos sanguíneos estabelecidos, mas também criam neoformações vasculares. Elas fazem isso nos tecidos embrionários, para acompanhar o crescimento; nos adultos, para suportar os ciclos recorrentes de remodelagem e reconstrução, e em tecidos adultos danificados a fim de dar suporte à reparação vascular tecidual. Vasos novos sempre se originam como brotos capilares, que proliferam de ínfimos vasos pré-existentes. Esse processo de angiogênese ocorre em resposta a sinais específicos. Experimentos em cultura mostram que as células endoteliais, num meio contendo fatores de crescimento adequados, formarão espontaneamente tubos capilares mesmo se estas estiverem isoladas de todos os outros tipos de células. O primeiro sinal da formação de tubo na cultura é o aparecimento na célula de um vacúolo alongado, que é de início completamente rodeado pelo citoplasma. Células contíguas desenvolvem vacúolos similares, e eventualmente, as células orientam os seus vacúolos a manterem paridade (extremidade com extremidade), de forma que se tornam contínuos de célula para célula, formando uma cana e mais tarde uma rede capilar (FOLKMAN; HAUNDENSCHILD, 1980).

2.18 - Fibroblastos

Fibroblastos são as células mais amplamente utilizadas nos estudos dos efeitos do LBP, pois o efeito bioestimulatório destas células implica em efeitos importantes no processo cicatricial (KIMURA *et al.*, 1997).

O fibroblasto é uma célula do tecido conjuntivo derivada do mesênquima. Na família de células do tecido conjuntivo também se encontram as células cartilaginosas e os osteoblastos. Todas secretam matriz colagenosa extracelular e juntamente são responsáveis pela armação estrutural do corpo celular dos tecidos, bem como células adiposas e células do músculo liso, que parecem também ter a mesma origem comum. Células do tecido conjuntivo desempenham uma parte central no suporte e reparo de quase todo o tecido ou órgão.

Os fibroblastos são as células menos especializadas do tecido conjuntivo. Estão dispersas no tecido conjuntivo por toda parte do corpo, onde secretam uma matriz extracelular não rígida, que é rica em colágenos do tipo I e/ou tipo II. Quando um tecido é danificado, os fibroblastos bem próximos migram para a área da ferida, proliferam e produzem grandes quantidades de matriz colagenosa, que ajuda a isolar e reparar o tecido lesionado (ALBERTS *et al.*, 1997).

Sua capacidade de prosperar frente à injúria, junto com seu estilo solidário de vida, pode explicar porque os fibroblastos são as células mais fáceis de crescer em cultura. (BALL *et al.*, 2001).

2.19 - Células Endoteliais e Fatores de Crescimento

Todos os vasos sangüíneos apresentam na sua superfície interna uma camada de células endoteliais. As principais funções destas células são: manter a barreira de

permeabilidade; elaborar moléculas antitrombóticas e protrombóticas; regular o fluxo de sangue através da formação de vasoconstritores e de vasodilatadores.

A angiogênese ocorre frente a fatores de crescimento, dentre os quais salienta-se o Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), o Fator de Crescimento Fibroblástico Básico (bFGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), e fatores estimulantes da multiplicação de granulócitos e monócitos (GM-CSF). Entre as citocinas, realce para a interleukina 6 (IL-6) e a interleukina 8 (IL-8) (LUO, 2001).

Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é essencial para angiogênese fisiológica e patológica, e é atualmente o principal enfoque em estudos no desenvolvimento de drogas para o tratamento de diversas doenças humanas. Acredita-se que o VEGF seja responsável pela sobrevivência da célula endotelial *in vivo* e pela síntese de óxido nítrico e prostaciclina, sendo estes mediadores chaves de um efeito protetor vascular. A proteção vascular pode ajudar a melhorar a perspicácia nos mecanismos subjacentes de ações cardiovasculares de VEGF e desenvolver aproximações terapêuticas modernas para doenças cardiovasculares.

Em embriogênese, o Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) é essencial para diferenciação da célula endotelial (vasculogênese) e pelo brotamento de novos capilares de vasos preexistentes (angiogênese) (TOLENTINO *et al.*, 1996). Também acredita-se que o VEGF representa um papel chave na angiogênese pós-natal e em patofisiologia humana incluindo o câncer, artrite reumática, desordens de neovascularização oculares, e doença cardiovascular. Ao contrário de muitas doenças em qual VEGF-dirigido contribui para progressão da doença, através da neovascularização, em isquemia do coração e doença vascular periférica o problema é uma provisão de sangue insuficiente. Um recente desenvolvimento foi o uso de VEGF para estimular formação de artéria colateral em regiões com um déficit vascular, com a chamada "Terapia Angiogênica" (ZACHARY, 2001).

2.20 - Isquemia celular

A isquemia é uma diminuição no suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial ou da drenagem venosa em um tecido. Deve ser distinguida da hipóxia que pode levar a anóxia, que é uma causa extremamente comum e um dado extremamente importante de lesão incorrendo na morte celular, prejudicando a respiração oxidativa aeróbica. Ao contrário da anóxia, durante a qual a produção glicolítica de energia se extingue, a isquemia compromete a oferta de substratos metabólicos, incluindo a glicose. Por esta razão a isquemia tende a lesar os tecidos mais rapidamente que a anóxia. O processo isquêmico é o fator mais comum de lesão celular na Medicina Clínica e tem sido estudado extensamente no ser humano, em animais de laboratório e em sistemas de cultura (CHOI, 1996).

A lesão celular é reversível até certo ponto, mas, se o estímulo persistir ou for intenso o suficiente desde o início, a célula atinge o "ponto de não retorno", e sofre lesão celular irreversível e morte celular. Por exemplo, se o suprimento sanguíneo para um segmento do coração for interrompido por 10 a 15 min e depois restaurado, as células miocárdicas sofrem lesão, mas geralmente podem recuperar-se e voltar a funcionar satisfatoriamente. Porém se o fluxo sanguíneo não for restabelecido até 1 h depois, ocorre a lesão irreversível e as fibras miocárdicas morrem. Alterações morfológicas de lesão letal ou simples infarto demoram mais tempo para desenvolver-se, que as de lesão reversível. Por exemplo, tumefação celular é uma alteração morfológica reversível, e pode ocorrer em questão de minutos. Entretanto, alterações inequívocas de morte celular à microscopia óptica não ocorrem no miocárdio antes de 10 a 12 h após de isquemia total ou conhecido por infarto do miocárdio. Ainda assim, sabemos que a lesão irreversível pode se dar dentro de 20 a 60 min. Obviamente, as alterações ultraestruturais (microscopia eletrônica) são visíveis mais cedo, que às alterações evidenciadas à microscopia óptica (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Vários mecanismos bioquímicos podem incorrer em lesão da membrana celular, como o aumento do cálcio intracelular, levando a ativação de proteases, que podem danificar elementos do citoesqueleto. Os filamentos do citoesqueleto servem de âncoras que

conectam as membranas plasmáticas ao interior celular (ALBERTS *et al.*, 1997). A adição de certos aminoácidos, principalmente glicina, protege *in vitro* as células hipóxicas de lesão irreversível da membrana, sugerindo que a perda desses aminoácidos predispõe a uma lesão estrutural da membrana celular. A glicina também permite que as células com depleção de ATP resistam aos efeitos letais do cálcio elevado e, portanto, permaneçam viáveis por mais tempo (DONG *et al.*, 1998).

2.21 - Cicatrização

A superfície celular e as interações de adesão estão envolvidas na regulação de vários processos como cicatrização, embriogênese, crescimento celular e diferenciação (FOLKMAN; MOSCONA, 1978). Durante o processo de cicatrização, as células endoteliais formam novos capilares, para garantir o aporte sanguíneo, quando as células nos tecidos são privadas de oxigênio, são liberados fatores angiogênicos que induzem a formação destes novos capilares. Provavelmente por essa razão, aproximadamente todas as células num vertebrado estão localizadas a 50 μ m de um capilar. De forma semelhante, depois de um ferimento, uma explosão de crescimento capilar é estimulada na vizinhança do tecido danificado. Irritantes ou infecções locais também provocam uma proliferação de novos capilares, sendo que a maior parte regride ou desaparece, quando a inflamação diminui. O modelo animal é amplamente utilizado para observação do processo de cicatrização, inclusive após o emprego do LBP (AL-WATBAN, 1994).

A angiogênese também é um ponto relevante no aparecimento de um tumor. O crescimento de um tumor sólido é limitado pelo seu suprimento de sangue: se ele não fosse invadido por capilares, um tumor dependeria da difusão de nutrientes da sua vizinhança e não poderia crescer além de um diâmetro de uns poucos milímetros. Para desenvolver-se mais, uma neoplasia deve induzir a formação de uma rede capilar, que invada a massa tumoral (ALBERTS *et al.*, 1997).

Em todos os casos as células endoteliais invasoras devem responder a um sinal produzido pelo tecido que requer suprimento sangüíneo. A resposta das células endoteliais inclui pelo menos quatro componentes. Primeiro, as células devem romper a lâmina basal que circunda um vaso sangüíneo existente; mostrou-se que as células endoteliais produzem proteases durante a angiogênese, que as capacitam a digerir e criar o seu caminho através da lâmina basal do capilar parental ou vênula. Segundo, as células endoteliais devem mover-se em direção a fonte do sinal dado. Terceiro, elas devem proliferar. Quarto, elas devem formar tubos ou vasos sangüíneos. Em certas circunstâncias, alguns dos componentes desta resposta complexa podem ser evocados, mesmo na ausência de outros. Mas existem também fatores de crescimento identificados, que podem evocar juntos todos os quatro componentes da resposta angiogênica. O mais importante entre esses fatores é uma proteína conhecida como *fator de crescimento endotelial vascular* (VEGF – um parente distante do *fator de crescimento derivado de plaquetas* [PDGF]). O VEGF atua seletivamente sobre as células endoteliais para estimular a angiogênese em muitas circunstâncias diferentes, e parece ser o agente pelo qual alguns tumores adquirem um próspero suprimento sangüíneo. Outros fatores de crescimento, incluindo alguns membros da família do *fator*

de crescimento de fibroblasto, também estimulam a angiogênese, mas ao mesmo tempo influenciam outros tipos de células, além das endoteliais. Fatores angiogênicos tais como esses, são liberados durante reparação dos tecidos, inflamação e crescimento dos tecidos; eles são constituídos por vários tipos de células, incluindo macrófagos, mastócitos e células adiposas. Alguns inibidores naturais também foram identificados, podendo bloquear a formação de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN; HAUNDENSCHILD, 1980). Assim, tanto a angiogênese quanto o controle da proliferação celular em geral, parecem ser regulados por combinações complexas de sinais, ao invés de um único fator como se acreditava na década passada.

2.22 - Laser de Baixa Potência em Células Endoteliais

Recentemente, a irradiação Laser de Baixa Potência (LPLI) tem sido proposta para o tratamento de restenose pós-endovascular. Isso demonstrou ser altamente efetivo na inibição experimental da formação neointimal. Embora vários mecanismos, incluindo rápida endotelização do vaso tratado, tenham sido propostos para explicar o efeito anti-restenótico, é possível que a LPLI estimule não-especificamente a liberação ou secreção de fatores de crescimento, em particular fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na região da injúria vascular. Este efeito seria de particular significância porque a habilidade do endotélio em regenerar-se é relativamente pobre, e a regeneração endotelial acelerada pode reduzir a taxa de restenose em animais experimentais.

VEGF, também conhecido como fator de permeabilidade vascular, é um secretado mitogênico específico pelas células endoteliais e um estimulador angiogênico extremamente potente. Recentes estudos têm demonstrado, que o local de entrega do VEGF

aumenta a re-endotelização e restaura a atividade endotelial em conjunto com a disfuncional do endotélio após injúria mediada por balão em coelhos (KIPSHIDZE *et al.*, 2001_b).

Aumento na secreção de Fator de Crescimento de Endotélio Vascular (VEGF) foi observado em células de músculo liso e fibroblastos quando irradiadas com Laser He-Ne, com 0,5 e 2,1 J/cm², respectivamente. O meio de cultura condicionado das culturas Laser-tratadas, foi adicionado a linhagem HuC EC, célula endotelial de vasos coronários humanos, estimulando o crescimento dessas células em cultura (KIPSHIDZE *et al.*, 2001_a).

SCHINDL *et al.*, em 2003, publicaram um trabalho demonstrando o efeito do Laser diodo de Baixa Potência, em 670 nm, com irradiância entre 10 e 65 mW/cm² e fluências entre 2 e 8 J/cm² em células endoteliais de veia umbilical humana. Observaram uma proliferação celular mais pronunciada com fluência de 8 J/cm² e irradiâncias de 20 e 65 mW/cm². Esses autores concluíram que a irradiação Laser de Baixa Potência influencia a proliferação de células endoteliais e pode contribuir assim para o aumento da angiogênese e a aceleração do processo de cicatrização de feridas *in vivo* (SCHINDL *et al.*, 2003).

2.23 - Mitocôndrias e Laser de Baixa Potência

Várias linhas de pesquisa evidenciam que as mitocôndrias são sensíveis à irradiação com luz visível monocromática. A iluminação de mitocôndrias isoladas de fígado de rato aumenta a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e o consumo de oxigênio. Irradiação com luz nos comprimentos de onda de 415 nm, 602 nm, 633 nm, 650 e 725 nm incrementam a síntese de ATP. Luz em comprimentos de 447, 511 e 554 nm não influencia a taxa desse processo. O consumo de oxigênio é ativado pela iluminação com luz em 365 e 436 nm, mas não em 313, 546 e 577 nm. A irradiação com luz em 633nm aumenta o potencial de membrana mitocondrial e o gradiente de prótons, causando mudanças nas propriedades ópticas da mitocôndria, modifica alguns NADH-unidos (NADH, forma reduzida de nicotinamida adenosina dinucleotídeo), reações desidrogenase e aumentando a taxa de troca ADP/ATP (ADP, adenosina difosfato) (KARU, 1995).

Investigações sobre o consumo de ATP no conteúdo de células inteiras (mitocôndrias não isoladas) receberam muito menos atenção. Irradiação de leveduras de células em $\lambda = 633$ nm ativa o consumo de O_2 e aumenta a atividade de NADH desidrogenase e citocromo oxidase c. Aumento da síntese de ATP, de células de adenocarcinoma mamário (R3230AC), após irradiação em $\lambda = 630$ nm foram observados em controle do experimento “somente luz” durante a investigação do mecanismo de ativação fotodinâmico de certas substâncias químicas. Irradiação de linfócitos periféricos humanos com luz em 820 nm aumenta a quantidade de ATP nestas células (KARU, 1995).

Karu, Pyatibrat e Kalendo realizaram um trabalho medindo o nível de ATP na proliferação e não-proliferação de células HeLa. Inicialmente, os níveis de ATP foram mensurados em culturas em diferentes tempos após exposição a luz em 632,8 nm. A quantidade de ATP sintetizado pelas células em diferentes fases de crescimento das culturas celulares foram comparados. Os dados obtidos demonstraram que a irradiação de células cultivadas *in vitro* aumenta a quantidade de ATP. Este resultado não é surpreendente, dado os resultados em extrasíntese de ATP luz-induzida em mitocôndria isolada. Mais inesperado é que o conteúdo do ATP celular não muda durante os primeiros 15 min depois de irradiação e aumenta significativamente somente após 20-25 min depois da irradiação. Os resultados de experimentos de mitocôndria isolada de fígado mostram claramente que ambos, o consumo de O_2 e a extrasíntese de ATP, começam assim que se acende a iluminação e param quando a luz é apagada (KARU, 1995).

O aumento na síntese de ATP em culturas celulares sustenta a hipótese de que o primeiro fotorreceptor responsável por captar os efeitos do Laser de Baixa Potência está localizado na mitocôndria (KARU, 1988, 1989, 1996). Acredita-se que o foto-sinal seja aceito pelos componentes da cadeia respiratória, citocromo oxidase a e a_3 e provavelmente NADH-desidrogenase, e sua excitação eletrônica é o primeiro passo da transmissão e amplificação do foto-sinal na cadeia. A cascata de reações bioquímicas é necessária para transmitir o sinal da mitocôndria, via citoplasma para a membrana celular (KARU, 1999). O aumento do ATP celular está associado ao mecanismo de proliferação celular induzido pela irradiação Laser.

Quando o Laser de Baixa Potência é empregado operando na região visível do espectro eletromagnético, ocorre primariamente a fotobioestimulação da mitocôndria na célula e quando a irradiação situa-se na região infravermelha do espectro, ocorre primariamente a estimulação da membrana citoplasmática. Em ambos casos, após a foto-recepção, ocorrem a transdução e amplificação de sinais e posterior foto-resposta, onde pode ocorrer proliferação, diferenciação ou síntese de proteínas, incluindo fatores de crescimento celular (figura 2.5).

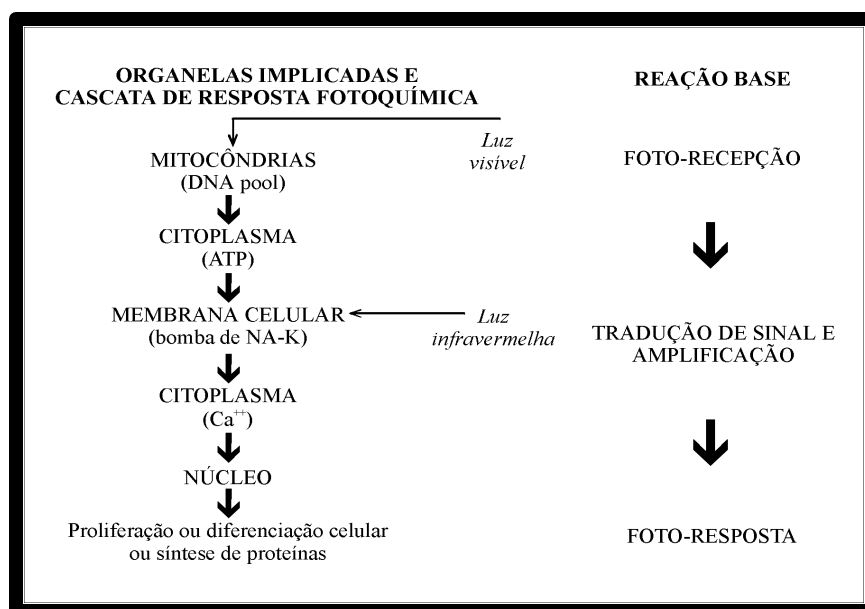


Figura 2.5 – Atuação do Laser visível e infravermelho e resposta Fotoquímica (KARU *et al.*, 1995).

3 – Objetivo

3 – Objetivo

1. Realizar a curva de crescimento celular da linhagem CIPs (células endoteliais de aorta de coelho), verificando o limiar de sobrevivência dessa linhagem em diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (SFB) e avaliar o emprego do Laser de Baixa Potência Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) nas células em homeostase e em *stress* nutricional;
2. Analisar o efeito do Laser de Baixa Potência InGaAlP, nas células em *stress* nutricional nas diferentes dosimetrias aplicadas, traçando possíveis comparações das culturas irradiadas com potências 10 e 20 mW e fluências 2; 4 e 8 J/cm²;
3. Observar e analisar os efeitos da privação do SFB e da radiação Laser nos filamentos de actina do citoesqueleto das células endoteliais através da Técnica de Microscopia de Fluorescência.

4 - Material e Métodos

4 - Material e Métodos

4.1 - Materiais

Linhagem Celular: CIPs - células endoteliais de aorta torácica de coelho, clone – linhagem cedida gentilmente pela prof^a. Dr.^a Helena B. Nader - UNIFESP, estabelecidas pelo Dr. Buonassisi (BUONASSISI, 1973). Apresenta inibição de crescimento por densidade de saturação, cerca de 15 dias após o subcultivo. Quando observada ao microscópio óptico, possui forma oval ou poligonal, com citoplasma escuro ao redor do núcleo central, contendo dois ou mais nucléolos. Já o citoplasma periférico aparece mais claro e o contorno das células é bem definido.

Meio de Cultura: Ham F12 (Gibco BRL) com Penicilina/Estreptomicina - Na composição básica do meio de cultura Ham F-12 são encontrados todos os aminoácidos fundamentais, L-glutamina, D-glicose, indicador vermelho fenol, vitaminas e vários outros sais orgânicos. Esse meio é acrescido de Penicilina/Estreptomicina liofilizada em pó, 10.000U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por ml, em solução de cloreto de sódio 0,9% (Sigma Chemical Co.). O meio de cultura é conservado em câmara fria de 2 a 8° C.

Soro Fetal Bovino (Cultilab - Campinas, SP) - Utilizado a 10% na suplementação de meios de cultura. Composição: Soro Fetal Bovino inativado estéril, contendo proteínas, albumina, globulina á um e dois e â globulina, glicose, uréia, creatinina e hemoglobulina. Conservado à - 20°C.

EBSS (Solução Salina Balanceada de Earle, sem cálcio e sem magnésio) - preparada em nosso laboratório, com pH 7,2 e contendo NaCl 116mM; KCl 5mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,46mM; NaH₂PO₄.1 H₂O 1mM; NaHCO₃ 8mM (todos da Merck, Darmstadt, Alemanha); D-glucose 1% e vermelho de fenol 0,01% (Sigma

Chemical Co.) em um litro de água recém destilada e passada em sistema de ultrapurificação. Conservada em câmara fria de 2 a 8° C e utilizada a 37°C.

Pancreatina - Solução Estoque pH 7,2; 5 g de Viocase (Sigma) e 1,7 g de NaCl (Merck) em 200 ml de água ultrapura, recém destilada. Foram congeladas alíquotas de 1,5 ml a -20°C e cada uma delas foi diluída em 10 ml de EBSS, no momento da utilização.

Rodamina Faloidina - corante fluorescente para citoesqueleto, composto de uma toxina de cogumelo conjugada com um corante laranja-fluorescente, a tetrametilrodamina (TRITC). Geralmente usadas em concentrações de nanomolar, as falotoxinas são sondas convenientes para marcar, identificar e quantificar a actina-F em fixação com formaldeído em cultivo celular (Molecular Probes Inc. USA).

Corante Azul de Trypan 0,4% (Gibco BRL) – Corante vital para teste de integridade de membrana celular. Conservada em câmara fria de 2 a 8° C.

Garrafas plásticas de 25cm² (Corning) e garrafas plásticas de 25cm² (NUNC) – para propagação celular.

Placas de 24 poços (Nunc) – Utilizadas para irradiação das células e posterior análise do efeito bioestimulatório.

Capela de fluxo laminar, modelo Veco: Capelas esterilizadas por fluxo contínuo de ar e solução esterilizante para manipulação asséptica das células.

Microscópio invertido Leica DM IL: microscópio óptico para análise de forma, tamanho, crescimento da cultura e viabilidade das células.

Microscópio Leica DLMB: Microscópio de fluorescência.

Incubadora Forma Scientific: com controle automático de temperatura, e pressão de gases (CO₂ e O₂).

Laser Diodo Thera Lase® DMC Equipamentos: Laser semiconductor Emissor visível ($\lambda = 685$ nm) e infravermelho ($\lambda = 830$ nm). Tensão de operação: 90-240 V (automático). Classe de Segurança IV.

- ◇ Emissor visível: comprimento de onda: 610-690 nm; potência do emissor: 50 mW; meio ativo: InGaAlP; área do feixe: 2 mm²;
- ◇ Emissor infravermelho: comprimento de onda: 810-830 nm; potência do emissor: 100 mW; meio ativo: GaAlAs; área do feixe: 2 mm².

4.2 - Crescimento e Manutenção da Cultura de Celular

Partindo-se inicialmente de uma ampola de células estocada em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de cultura de células (5×10^4 células/ml), e adicionado 3 ml de meio de cultura Ham F-12, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As células foram então incubadas em estufa com manutenção automática da atmosfera úmida em 5% de CO₂ a 37°C. As células foram ainda subcultivadas nas garrafas, para estoque através de pancreatinização, quando a densidade de células formava uma camada confluenta. A troca do meio de cultura realizou-se dia sim, dia não (figura 4.1); o crescimento celular foi acompanhado por meio da observação em microscópio invertido Olympus CK40.

4.3 - Controle de Células Viáveis

As células submetidas à radiação Laser foram monitoradas através do Teste de Exclusão do Azul de Trypan, indicando a integridade da membrana celular e possibilitando a contagem do número de células viáveis em intervalos de tempo variáveis. Nesta técnica, a morte da célula é definida como uma mudança nas propriedades da membrana, tal que em

uma célula morta, este corante se difunde rapidamente para dentro do citoplasma da mesma, enquanto que em uma célula viva, sua membrana plasmática não permite a penetração deste corante. Para o subcultivo celular nas placas de 24 poços, após pancreatinização, as células eram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura, para então 90 μ l dessa solução ser acrescida de 10 μ l de Azul de Trypan, para posterior contagem na Câmara de Neubauer.



Figura 4.1 – Manipulação da cultura celular em capela de fluxo laminar.

4.4 - Plano de Trabalho

Este estudo foi dividido em duas etapas, sendo que na primeira etapa do trabalho (Etapa I), as células endoteliais da linhagem CIPs, foram subcultivadas com diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino (SFB). Pela análise das curvas de crescimento celular, foi observado o comportamento das células mantidas em meio Ham-F12 a 10% SFB (condição ideal de suplementação), a 5% SFB (suplementação parcial) e 0% SFB (privação total). Os grupos com diferentes concentrações do SFB foram irradiados com Laser de Baixa Potência InGaAlP, operando no comprimento de onda 685 nm, com fluência 2 J/cm²

e 10 mW de potência. O objetivo dessa etapa, do presente trabalho, foi encontrar em qual concentração de SFB o Laser apresenta melhor efeito.

Na segunda etapa do trabalho, foram utilizadas somente células mantidas em meio a 5% de SFB, tendo em vista o efeito estatisticamente significativo do Laser nesta linhagem com suplementação parcial de SFB. Nesta etapa, foram realizados experimentos com diferentes dosimetrias do Laser de Baixa Potência InGaAlP, operando em 685 nm. Foram aplicadas três densidades de energia 2; 4 e 8 J/cm² e duas potências 10 e 20 mW para cada fluência.

4.5 - Privação de Soro Fetal Bovino (SFB)

Utilizou-se meio Ham F-12 (Gibco) para CIPs, sem suplementação, ou seja, com 0% de Soro Fetal Bovino e com apenas 5% de Soro Fetal Bovino, empregando o teste de exclusão do azul de Trypan em intervalos de tempo variáveis de no mínimo 24 e no máximo 144 horas, para verificação do limiar de sobrevivência destas linhagens em situação de *stress* nutricional.

4.6 - Curva Gaussiana do Laser Thera Lase[®] (λ = 685 e 830 nm)

Para que houvesse confiabilidade na energia entregue pelo Laser nas culturas irradiadas, realizou-se previamente o experimento da Curva Gaussiana do Laser de Baixa Potência Thera Lase[®], no Laboratório de Laser de Alta Potência do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D – UNIVAP).

Utilizou-se para tanto, suportes para fixação do Laser e um multímetro para rastrear e medir a energia em cada ponto, partindo de uma periferia a outra e passando pelo centro de energia do Laser. Para que o Laser se movimentasse com precisão, utilizou-se um Translador, que permitiu que a energia fosse captada pelo detetor a cada 0,05 mm. Na saída da fibra do Laser, utilizou-se um Pin-Hole de 100 μm, a uma distância de 3 mm, para que o

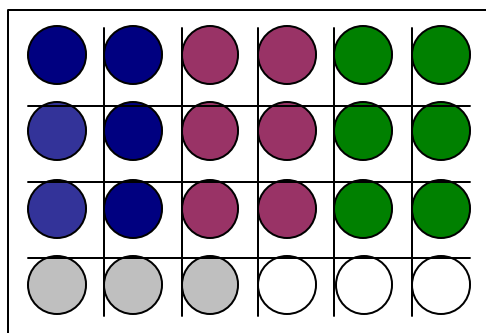
feixe se mantivesse perfeitamente colimado até a chegada no detector. A distância da saída do Laser até o detector foi de 3 mm.







4.7 - Plaqueamento das Células

As células endoteliais, linhagem CIPs mantidas em garrafas plásticas (Corning) com 25cm², em meio Ham F-12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, foram transferidas para a placa de 24 poços para a realização dos experimentos, através de pancreatinização, quando a densidade de células formou uma monocamada confluenta. Para cada experimento uma densidade de 10³ ou 10⁴ célula/ml foi subcultivada em placas de 24 poços. As células foram incubadas a 37° C por 12 horas em atmosfera com 5% de CO₂, para então serem submetidas à radiação Laser e monitoradas através de coloração com azul de Trypan em intervalos de 24 horas após o plaqueamento. A cultura foi monitorada diariamente para certificação da ausência de contaminação e verificação na coloração e viscosidade do meio, a cor do meio a cada dois dias passava de rosa claro (cor característica do Ham-F12 com vermelho de fenol) para amarela, devido ao consumo de nutrientes do meio pelas células. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, mantendo-se assim o nível de nutrientes tanto para as células controle, quanto para as com privação de nutrientes.

No momento da irradiação, o meio de cultura contendo indicador de pH (vermelho de Fenol), foi substituído por EBSS, uma solução incolor, para que não houvesse interferência da cor do meio de cultura durante a irradiação Laser. Os poços da placa foram separados por barreiras opacas, para que as células não recebessem irradiação espalhada.

Esquema de plaqueamento:



-  2 J/cm² a 10 mW
-  2 J/cm² a 20 mW
-  4 J/cm² a 10 mW
-  4 J/cm² a 20 mW
-  8 J/cm² a 10 mW
-  8 J/cm² a 20 mW

* barreira opaca separando todos os poços.



controle

4.8 - Contagem Celular

A contagem celular foi realizada para obtenção de gráficos de viabilidade celular, com o objetivo de analisar o efeito do LBP sobre a linhagem celular CIPs. Foi utilizado o corante Azul de Trypan em meio Ham F-12, adicionando-se 20 μ l a cada poço contendo 480 μ l de meio de cultura. As placas foram levadas ao microscópio invertido para a contagem do número de células.

A contagem celular foi realizada em intervalos de 24 horas após o plaqueamento, em quadruplicata para os testes de privação de soro fetal bovino e para os demais experimentos, onde variou-se a dosimetria do Laser. Utilizou-se a contagem em quatro campos, objetiva de 20X do microscópio e fator de correção de 234,3.

4.9 - Irradiação do Subcultivo Celular em Placa de 24 Poços

No período de 12 horas após o plaqueamento e cultivo celular, as irradiações foram realizadas com o Laser de Baixa Potência InGaAlP Thera Lase®, no comprimento de onda de 685nm (vermelho) com doses de irradiação de 2 J/cm², 4 J/cm² e 8 J/cm², no modo contínuo (CW), e potências de 10 e 20 mW. Os poços irradiados receberam 4 doses da irradiação Laser em um intervalo de 12 horas (figura 4.2). Os grupos controle foram mantidos sob as mesmas condições que os irradiados, porém sem serem submetidos à irradiação. Todas as placas foram monitoradas durante uma semana.

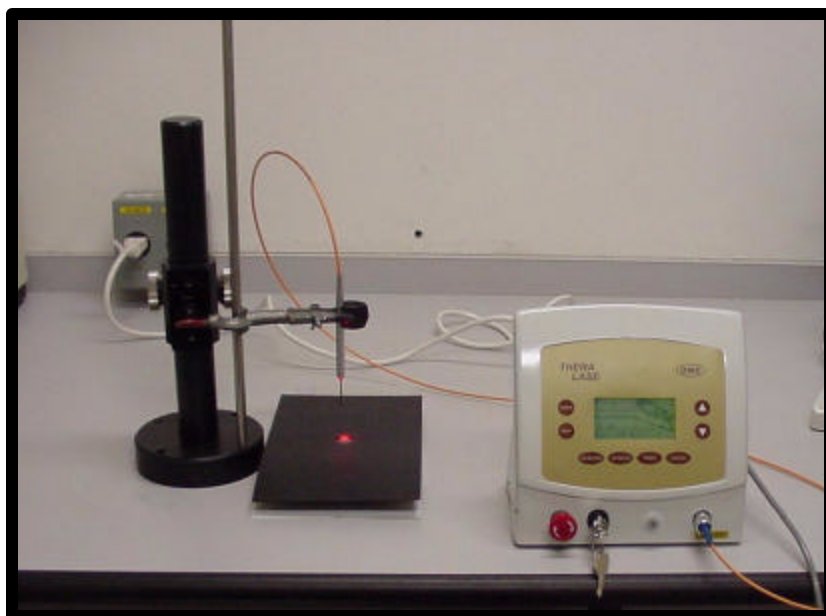


Figura 4.2 - Esquema de irradiação das placas de 24 poços (Nunc) com o Laser (Thera Lase[®]) $\lambda = 685 \text{ nm}$.

A tabela a seguir apresenta os parâmetros do Laser de Baixa Potência InGaAlP, utilizado na irradiação das células endoteliais da linhagem CIPs:

Comprimento de onda (λ)	= 685 nm
Fluências (DE)	= 2; 4 e 8 J/cm²
Irradiâncias (DP)	= 5,5 e 11,1 mW/cm²
Área (A)	= 1,8 cm² *
Potências (P)	= 10 e 20 mW
Tempo (t)	= 180 - 1.454 s
Modo de irradiação	= contínuo (CW)

* área do poço da placa de 24 (Nunc).

4.10 - Procedimento para Microscopia de Fluorescência

Citoesqueleto:

Para a visualização dos filamentos de actina-F, as células sobre lamínulas foram lavadas em tampão PHEM e fixadas com 4% de paraformaldeído; 0,1 % de glutaraldeído e 0,1% Triton X em 0,1 M de Tampão Fosfato (pH 7,2) por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas minuciosamente com tampão PHEM. Após esse procedimento, as células foram incubadas com Rodamina Faloidina (1:100 - PHEM) por uma hora no escuro e novamente lavadas com tampão PHEM. As lamínulas foram então montadas sobre lâmina com N-propil galato, vedadas com esmalte no escuro e observadas no microscópio de epifluorescência. Através de parâmetros de intensidade de fluorescência pôde-se observar a organização do citoesqueleto.

4.11 – Método Estatístico

Por meio das curvas de crescimento obtidas da média das amostras, comparou-se o grupo controle e o irradiado e seus subgrupos com diferentes concentrações de SFB para a linhagem CIPs. As variâncias dos dados obtidos dos experimentos de privação de SFB e irradiação foram comparados pelo Teste de Bartlett, sugerindo que as diferenças entre elas não foram significantes, portanto obedecendo distribuições homocedásticas. Por esta razão foram aplicados testes não-paramétricos do programa de informática GraphPad InStat®.

Foi utilizado o Teste Mann-Whitney, para avaliar o aumento da proliferação celular dos grupos irradiados em relação ao controle. As comparações entre os grupos controle e irradiado foram realizadas a partir de 96 horas, pois não ocorrem mudanças significantes até esse período (ALMEIDA-LOPES, 2001). O teste estatístico foi aplicado separadamente para os tempos 120 e 140 horas, para cada concentração do SFB.

Para compararmos os diferentes grupos em cada tempo, usamos o teste não paramétrico para “k” amostras independentes de Kruskal-Wallis, complementado quando necessário pelo teste de comparações múltiplas.

O nível de rejeição para hipótese de nulidade foi fixado sempre em valor menor ou igual do que 0,05 (5%). Quando a estatística calculada apresentou significância usamos um asterisco (*) para caracterizá-la e quando não significativa (ns).

As médias foram calculadas e apresentadas a título de informação. Não se calculou desvios-padrão, pois usando-se testes não-paramétricos, estamos pressupondo que as variáveis em causa não se comportam como Curva de Gauss e portanto não há sentido o seu cálculo.

O Método Estatístico contou com a orientação e correção do bioestatístico Prof. Dr. Elias Rodrigues de Paiva (Universidade Federal do Estado de São Paulo - UNIFESP).

5. Resultados

5.1 – Curva Gaussiana do Laser Thera Lase®

Realizou-se a medição da Curva Gaussiana em ambos comprimentos de onda, 685 e 830 nm, verificando-se previamente às irradiações das culturas, que o Laser utilizado respeita uma Gaussiana, concentrando sua energia no centro do feixe. A tabela 5.1, mostra os valores referentes às Curvas Gaussianas do Laser de Baixa Potência utilizado, nos comprimentos de onda de operação deste Laser, de acordo com seu princípio ativo.

Tabela 5.1 - Medida da intensidade de energia (mV) captada por um multímetro em função da posição do feixe Laser medido por um translador em milímetros (mm). Números referentes às curvas Gaussianas plotadas.

InGaAlP (685 nm)		GaAlAs (830 nm)	
Feixe Laser (mm)	Intensidade (mV)	Feixe Laser (mm)	Intensidade (mV)
10,70	0,2	10,4	0,01
10,75	0,3	10,45	0,01
10,80	1,0	10,50	0,5
10,85	2,1	10,55	1,3
10,90	4,0	10,60	2,3
10,95	8,6	10,65	3,3
11,00	15,4	10,70	5,4
11,05	24,0	10,75	8,9

11,10	35,4	10,80	15,2
11,15	44,2	10,85	28,3
11,20	57,7	10,90	40,8
11,25	64,9	10,95	53,2
11,30	73,6	11,00	69,6
11,35	77,0	11,05	76,4
11,40	79,6	11,10	80,5
11,45	77,9	11,15	79,3
11,50	77,2	11,20	76,1
11,55	72,4	11,25	76,5
11,60	64,7	11,30	60,8
11,65	53,5	11,35	60,9
11,70	38,6	11,40	48,5
11,75	29,7	11,45	35,6
11,80	20,7	11,50	22,9
11,85	15,4	11,55	14,5
11,90	11,5	11,60	8,9
11,95	7,6	11,65	5,4
12,00	4,9	11,70	2,3
12,05	3,2	11,75	1,0
12,10	2,3	11,80	0,2
12,15	1,6	11,85	0,1
12,20	0,8	11,90	0,0
12,25	0,4	----	----
12,30	0,01	----	----
12,35	0,02	----	----
12,40	0,00	----	----

Com os dados coletados plotou-se os gráficos referentes aos resultados, utilizando-se o programa Origin[®]:

Gráfico 5.1 - Laser InGaAlP, operando no comprimento de onda 685 nm.

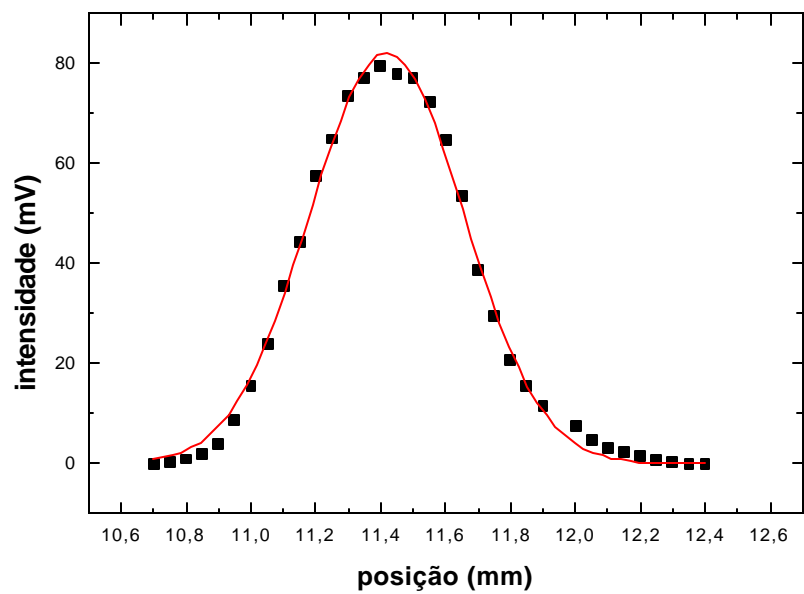
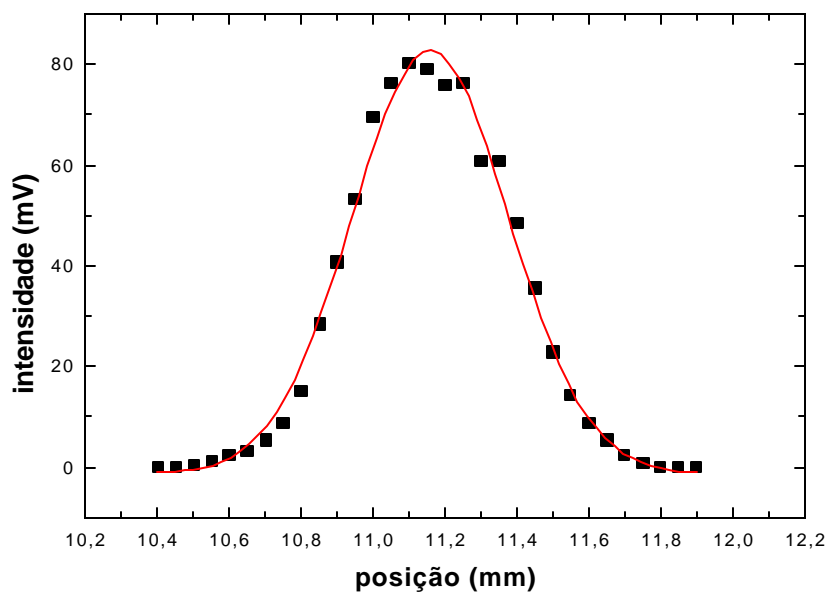


Gráfico 5.2 - Laser GaAlAs, operando no comprimento de onda 830 nm.



5.2 – Análise da Proliferação Celular

Na Etapa I do trabalho, as células da linhagem CIPs, foram suplementadas com 0%, 5% e 10% SFB e divididas em dois subgrupos, o controle e o irradiado com Laser InGaAlP. Observou-se, nesta primeira etapa, que as células mantidas em meio com 10% de SFB não apresentaram aumento na proliferação quando irradiadas tampouco as células sem suplementação com SFB (0%). Por outro lado, as células mantidas em meio com 5% de SFB, apresentaram aumento proliferativo após a irradiação, e um maior aumento do número de células no grupo irradiado foi observado a partir do 4º dia, ou seja, 96 horas após o plaqueamento.

Na Etapa II do trabalho, onde as células suplementadas com 5% de SFB foram irradiadas com diferentes dosimetrias do Laser InGaAlP (685 nm), a análise das irradiações mostrou que ocorre aumento da proliferação celular do grupo controle em relação ao irradiado em todas as dosimetrias empregadas, com maior aumento após o 4º dia, ou seja, 96 horas após o plaqueamento.

O aumento menos significativo, nesta segunda etapa do trabalho, foi observado quando empregou-se 2 J/cm² e potências de 10 e 20 mW. Após 120 horas do plaqueamento as células irradiadas com 2 J/cm² e potências de 10 mW não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($P > 0,05$). Após 144 horas, as comparações entre os grupos irradiados com estas dosimetrias e o controle apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Quando empregou-se 4 J/cm² de fluência e potências de 10 e 20 mW, mantendo-se o número inicial de plaqueamento em $1,0 \times 10^4$, ocorreu crescimento significativo da proliferação celular do grupo Laser em relação ao controle, a partir das 120 horas do plaqueamento ($P < 0,05$).

A dosimetria onde observa-se o maior incremento na proliferação celular dentre os grupos irradiados, ocorre quando é empregado 8 J/cm² de fluência e potências de 10 e 20 mW, após 120 horas do plaqueamento, apontando o efeito significativo do Laser no aumento do número de células viáveis nos grupos irradiados ($P < 0,05$).

Em termos de percentagem, observou-se que em 168 horas, ocorreu um aumento de 22,13% do grupo irradiado com 2 J/cm² de fluência e potência 10 mW, em relação ao controle e um aumento de 26,21% do grupo irradiado com 2 J/cm² e 20 mW, considerados estatisticamente significantes ($P < 0,05$). No grupo das células irradiadas com 4 J/cm² de fluência e potência de 10 mW ocorreu aumento de 55,97% em relação ao controle ($P < 0,05$), e no grupo onde empregou-se 4J/cm² e 20 mW, houve um aumento de 70,48% em relação ao grupo não irradiado, estatisticamente significantes ($P < 0,05$). Quando empregou-se 8 J/cm² e 10 mW de potência, ocorreu uma elevação substancial de 92,37% em relação ao grupo controle após 168 horas do plaqueamento ($P < 0,05$), e um potente crescimento de 97,45% no grupo irradiado com 8 J/cm² e 20 mW em relação ao grupo controle, não irradiado, considerados estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

5.3 – Tabelas Referentes à Contagem do Número de Células

As tabelas 5.2; 5.3 e 5.4 são referentes à Etapa I do trabalho e apresentam a contagem do número de células viáveis e a média do número de células ($\times 10^3$), dos grupos controle e irradiados com 2 J/cm² e 10 mW em diferentes concentrações do soro fetal bovino (0%; 5% e 10% SFB).

Tabela 5.2 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 0% de suplementação de SFB, e subgrupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm² e 10 mW de potência:

Grupo controle com 0% SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5
48	0,2	0,1	0,1	0,3	0,17
72	0	0,1	0,06	0,1	0,07
96	0,1	0,1	0,06	0,06	0,08
120	0	0,06	0	0,06	0,03
144	0	0	0	0	0
Grupo irradiado com 2J/cm ² e 10 mW com 0% SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	0,8	0,5	0,5	0,7	0,63
48	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3
72	0,2	0,1	0,1	0,1	0,13
96	0,1	0,1	0,2	0,1	0,13
120	0,06	0	0,1	0,06	0,05
144	0	0	0	0	0

Tabela 5.3 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 5% de suplementação de SFB, grupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm² e 10 mW de potência:

Grupo controle com 5 % SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7
48	6,2	3,9	4,2	5	4,83
72	6,2	8,1	7,5	10,9	8,17
96	8,5	10,5	9,5	12,3	10,2
120	10,6	12,1	11,8	13	11,87
144	12,8	14,9	12	13,5	13,3
Grupo irradiado com 2 J/cm ² e 10 mW com 5 % SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,1	1	1,7	1,2	1,25
48	5,2	7,4	4,4	6,8	5,95
72	6	8,7	13,5	7,9	9,03
96	9,5	8,8	16	8,3	10,65
120	15,2	10,7	18,9	11,4	14,05
144	18,8	15,2	21,2	16	17,8

Tabela 5.4 – Número de células e média ($\times 10^3$) do grupo com 10% de suplementação de SFB, grupos controle e irradiado com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm² e 10 mW de potência:

Grupo controle com 10 % SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,9	2,3	2,7	1,7	2,15
48	7,5	11	11,9	12	10,6
72	15,6	13,2	11,1	10,9	12,7
96	21,6	22,9	18,2	20,8	20,87
120	20	23,9	21,6	22,6	22,03
144	23,3	24,8	22,5	23,5	23,53
Grupo irradiado com 2 J/cm ² e 10 mW com 10 % SFB					
Tempo (h)	número de células (X 1000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,6	1,9	2,5	2,5	2,13
48	7,7	10,5	13,5	11,8	10,87
72	12,6	14	12,1	11	12,43
96	19	21,4	22,8	20	20,8
120	19,4	21,8	24	21,6	21,7
144	21,1	23,3	25,1	22,6	23,03

As tabelas 5.5 a 5.11 são referentes à Etapa II do trabalho e apresentam a contagem do número de células viáveis e a média do número de células ($\times 10^4$), dos grupos mantidos com meio a 5% SFB, controle e irradiados com fluências 2; 4 e 8 J/cm² e potências 10 e 20 mW:

Tabela 5.5 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo não submetido à irradiação Laser, com concentração de inicial de $1,0 \times 10^4$ células, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo controle com 5% SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1	1,1	1,2	1,3	1,15
48	1,7	1,5	1,4	1,7	1,57
72	1,8	1,4	1,6	1,7	1,9
96	1,9	1,6	1,7	1,9	1,77
120	2,9	3,1	3	3,2	3,05
144	3,5	3,7	3,9	3	3,7
168	3,7	3,9	4,2	4	3,95

Tabela 5.6 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 2 J/cm^2 e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 2 J/cm^2 e 10 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,1	1	1,3	1,3	1,17
48	1,4	1,3	1,2	1,5	1,35
72	1,5	1,4	1,3	1,6	1,45
96	1,7	1,5	1,6	1,8	1,65
120	3,1	3,6	3,4	3,4	3,37
144	4,6	4,2	4	4,3	4,27
168	5,1	4,8	4,5	4,8	4,8

Tabela 5.7 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 2 J/cm^2 e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 2 J/cm^2 e 20 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,1	1,2	1,3	1,4	1,25
48	1,2	1,3	1,2	1,5	1,3
72	1,4	1,5	1,3	1,6	1,45
96	1,6	1,7	1,9	1,9	1,77
120	3,2	3,7	3,5	3,5	3,47
144	4,4	4,2	4	4,3	4,23
168	5	5,1	4,8	5,1	5

Tabela 5.8 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 4 J/cm^2 e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 4J/cm ² e 10 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,3	1,2	1,1	1,4	1,25
48	1,4	1,5	1,5	1,7	1,53
72	1,5	1,5	1,6	1,8	1,6
96	1,8	1,9	2	2,1	1,95
120	3,4	3,8	3,7	3,7	3,65
144	4,4	4,7	4,6	4,7	4,6
168	6,1	6,4	5,9	6,2	6,15

Tabela 5.9 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 4 J/cm² e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 4J/cm ² e 20 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,2	1,2	1,1	1,4	1,23
48	1,6	1,5	1,5	1,8	1,6
72	1,7	1,6	1,6	1,9	1,7
96	1,9	1,9	2	2,2	2
120	3,8	3,9	3,7	4	3,85
144	4,8	4,9	4,6	4,9	4,8
168	6,7	6,9	6,5	6,8	6,73

Tabela 5.10 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 8 J/cm² e potência 10 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 8J/cm ² e 10 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,2	1,3	1,3	1,5	1,33
48	1,7	1,7	1,6	1,9	1,73
72	1,7	1,7	1,8	2	1,8
96	2	2	2,3	2,3	2,15
120	3,9	4	4,1	4,2	4,05
144	5,2	5,3	5,2	5,5	5,3
168	7,6	7,3	7,8	7,6	7,57

Tabela 5.11 – Número de células e média ($\times 10^4$) do grupo irradiado com Laser InGaAlP com fluência 8 J/cm² e potência 20 mW, subcultivadas em meio com 5% SFB:

Grupo irradiado com 8J/cm ² e 20 mW com 5% de SFB					
Tempo (h)	número de célula (X 10000)				média
0	1	1	1	1	1
24	1,2	1,3	1,2	1,5	1,3
48	1,6	1,7	1,7	1,9	1,73
72	1,7	1,8	1,8	2	1,83
96	2	2	1,9	2,2	2,03
120	4	4,2	3,9	4,2	4,07
144	5,1	5,2	5,3	5,4	5,25
168	7,3	7,9	8,1	7,6	7,73

5.4 - Método Estatístico

Etapa I – Linhagem CIPs mantida com 0%; 5% e 10% de SFB

A tabela 5.12 mostra a média do número de células da linhagem CIPs ($\times 10^3$), subcultivadas em meio Ham F-12 com 0%, 5% e 10% de soro fetal bovino, nos tempos 120 e 144 horas.

Tabela 5.12 - Média da contagem celular para os grupos controle e irradiado e seus subgrupos com 0%; 5% e 10 % de suplementação com SFB.

Laser InGaAlP ($\lambda = 685 \text{ nm}$) DE =2 J/cm ² e P =10 mW			Média do n.º de células $\times 10^3$	
Grupos	Tratamento	SFB	120 h	144 h
C ₀	controle	0%	0,03	0,00
C ₅	controle	5%	11,87	13,30
C ₁₀	controle	10%	22,03	23,53
L ₀	laser	0%	0,05	0,00
L ₅	laser	5%	14,05	17,80
L ₁₀	laser	10%	21,70	23,03

SFB= Soro Fetal Bovino

Na tabela 5.13 observamos que o Teste de Mann-Whitney mostrou diferença estatisticamente significativa, quando o grupo de células endoteliais, com 5% SFB controle (C₅) foi comparado ao irradiado (L₅), 120 horas após o plaqueamento. Isso indica que o Laser promove aumento estatisticamente significativo ($P = 0,03$), na proliferação celular das células em privação parcial de SFB (5%) da linhagem CIPs, quando irradiadas com Laser InGaAlP, com fluência 2 J/cm² e 10 mW de potência.

Tabela 5.13 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^3$) dos grupos controle e Laser (DE=2 J/cm² e P=10 mW), com diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino. Teste Mann-Whitney.

	120 h			144 h		
Grupos	Média (x 10 ³)		Mann-Whitney	Média (x 10 ³)		Mann-Whitney
	ctrl	Laser		ctrl	Laser	
C₀ x L₀	0,03	0,05	0.48 ns	0,00	0,00	>0.05 ns
C₅ x L₅	11,87	14,05	0.69 ns	13,30	17,80	0,03 *
C₁₀ x L₁₀	22,03	21,70	0,89 ns	23,53	23,03	0,69 ns

Etapa II – Linhagem CIPs mantida com 5% de suplementação com SFB

A tabela 5.14 mostra a média da contagem celular da linhagem CIPs, em situação de privação parcial de SFB (5%), submetidas as fluências 2; 4 e 8 J/cm² e potências 10 e 20 mW e o grupo controle (não irradiado).

Tabela 5.14 - Média da contagem celular para os grupos controle e irradiado com diferentes fluências e potências, com 5 % de suplementação com SFB.

5% de suplementação com SFB			Média do n.º de células x 10 ⁴		
Laser InGaAlP (λ = 685 nm)			120 h	144 h	168 h
Grupos	DE (J/cm ²)	P (mW)			
C₀	controle	controle	3,00	3,70	3,93
II₁₀	2	10	3,37	4,27	4,80
II₂₀	2	20	3,47	4,20	4,97
IV₁₀	4	10	3,63	4,59	5,13
IV₂₀	4	20	3,80	4,77	6,70
VIII₁₀	8	10	4,00	5,23	7,57
VIII₂₀	8	20	4,03	5,20	7,77

Para a análise da irradiação Laser nas diferentes dosimetrias empregadas, aplicou-se o Teste Mann-Whitney, separadamente para cada dosimetria utilizada, nos tempos 120, 144 e 168 horas.

Tabela 5.15 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^4$) dos grupos controle e Laser (DE=2, 4 e 8 J/cm² e P=10 e 20 mW), em meio com Soro Fetal Bovino a 5%. Teste Mann-Whitney.

Grupos	120 h			144 h			168 h		
	Média ($\times 10^4$)		Mann-Whitney	Média ($\times 10^4$)		Mann-Whitney	Média ($\times 10^4$)		Mann-Whitney
	ctrl	Laser		ctrl	Laser		ctrl	Laser	
C₀ x II₁₀	3,05	3,37	0,06 ns	3,73	4,27	0,03 *	3,95	4,80	0,03 *
C₀ x II₂₀	3,05	3,47	0,03 *	3,73	4,23	0,03 *	3,95	5,00	0,03 *
C₀ x IV₁₀	3,05	3,65	0,03 *	3,73	4,60	0,03 *	3,95	6,15	0,03 *
C₀ x IV₂₀	3,05	3,85	0,03 *	3,73	4,80	0,03 *	3,95	6,73	0,03 *
C₀ x VIII₁₀	3,05	4,05	0,03 *	3,73	5,30	0,03 *	3,95	7,57	0,03 *
C₀ x VIII₂₀	3,05	4,07	0,03 *	3,73	5,25	0,03 *	3,95	7,73	0,03 *

Podemos observar na tabela 5.15, o aumento estatisticamente significativo do grupo irradiado em relação ao controle em todas as dosimetria aplicadas. Não ocorre aumento significativo do grupo irradiado, apenas em 120 horas, quando empregamos o Laser com fluência 2 J/cm² a 10 mW de potência.

Com base nos resultados estatísticos, podemos inferir que o Laser InGaAlP, operando no comprimento de onda 685 nm, apresenta-se eficaz no aumento da proliferação celular da linhagem CLPs, em todas dosimetrias aplicadas, após 144 horas do plaqueamento.

A tabela 5.16 mostra a comparação das médias do número de células em resposta as diferentes dosimetrias do Laser InGaAlP aplicadas. A estatística foi aplicada em cada tempo separadamente com o intuito de observar a ação do Laser em 120, 144 e 168 horas. Foi aplicado o Teste Kruskal-Wallis.

Tabela 5.16 - Médias do número de células viáveis ($\times 10^4$) irradiadas com Laser (DE=2, 4 e 8 J/cm² e P=10 e 20 mW), em meio com Soro Fetal Bovino a 5%. Teste Kruskal-Wallis.

	120 h			144 h			168 h		
Grupos	Média do n°. de células ($\times 10^4$)		KW $\chi^2 =$ 18,75 *	Média do n°. de células ($\times 10^4$)		KW $\chi^2 =$ 20,27 *	Média do n°. de células ($\times 10^4$)		KW $\chi^2 =$ 21,46 *
II₁₀ x II₂₀	3,37	3,47	>0,05	4,27	4,23	>0,05	4,80	5,00	>0,05
II₁₀ x IV₁₀	3,37	3,65	>0,05	4,27	4,60	>0,05	4,80	6,15	>0,05
II₁₀ x IV₂₀	3,37	3,85	>0,05	4,27	4,80	>0,05	4,80	6,73	>0,05
II₁₀ x VIII₁₀	3,37	4,05	< 0,05*	4,27	5,30	< 0,05*	4,80	7,57	< 0,05*
II₁₀ x VIII₂₀	3,37	4,07	< 0,05*	4,27	5,25	< 0,05*	4,80	7,73	< 0,01*
II₂₀ x IV₁₀	3,47	3,65	>0,05	4,23	4,60	>0,05	5,00	6,15	>0,05
II₂₀ x IV₂₀	3,47	3,85	>0,05	4,23	4,80	>0,05	5,00	6,73	>0,05
II₂₀ x VIII₁₀	3,47	4,05	>0,05	4,23	5,30	< 0,05*	5,00	7,57	>0,05
II₂₀ x VIII₂₀	3,47	4,07	>0,05	4,23	5,25	< 0,05*	5,00	7,73	< 0,05*
IV₁₀ x IV₂₀	3,65	3,85	>0,05	4,60	4,80	>0,05	6,15	6,73	>0,05
IV₁₀ x VIII₁₀	3,65	4,05	>0,05	4,60	5,30	>0,05	6,15	7,57	>0,05
IV₁₀ x VIII₂₀	3,65	4,07	>0,05	4,60	5,25	>0,05	6,15	7,73	>0,05
IV₂₀ x VIII₁₀	3,85	4,05	>0,05	4,80	5,30	>0,05	6,73	7,57	>0,05
IV₂₀ x VIII₂₀	3,85	4,07	>0,05	4,80	5,25	>0,05	6,73	7,73	>0,05
VIII₁₀ x VIII₂₀	4,05	4,07	>0,05	5,30	5,25	>0,05	7,57	7,73	>0,05

* Teste de Kruskal-Wallis

Podemos observar com os resultados dos cálculos estatísticos que ocorreu aumento na proliferação celular estatisticamente significativa dos grupos irradiados com 8 J/cm² e potências 10 e 20 mW em relação aos irradiados com 2 J/cm² e potência 10 mW, após 120 horas do plaqueamento. Observa-se um aumento com alta significância ($P < 0,01$), na proliferação celular das células irradiadas com 8 J/cm² em relação as irradiadas com 2 J/cm² e 10 mW, após 168 horas do plaqueamento. Observamos também aumento significativo do número de células do grupo irradiado com 8 J/cm² e 20 mW em relação ao irradiado com 2 J/cm² e 20 mW, após 144 horas do plaqueamento ($P < 0,05$).

Os cálculos estatísticos evidenciam que encontra-se na fluência 8 J/cm² a melhor dosimetria empregada neste trabalho, quando utilizamos o Laser InGaAlP (685 nm) para o aumento da proliferação celular da linhagem CIPs em privação parcial de soro (5% SFB).

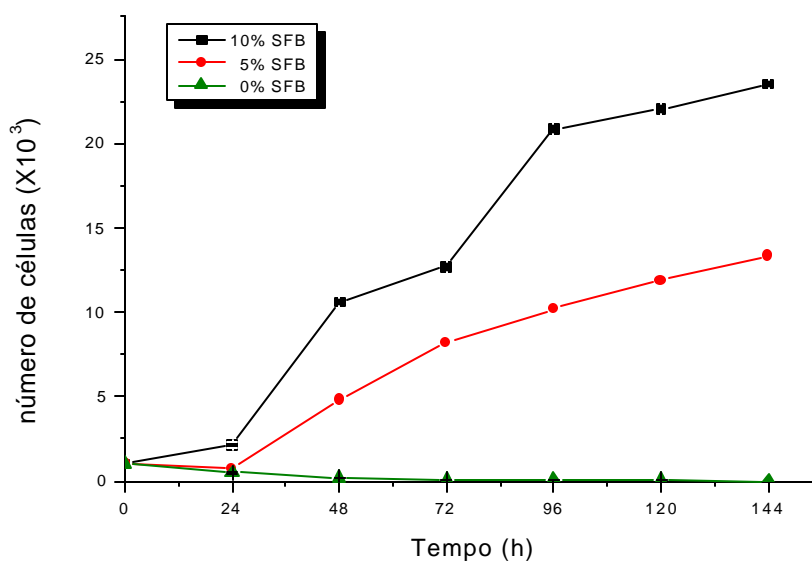
Os gráficos revelam claramente uma resposta eficaz quando utilizamos a radiação Laser durante o stress nutricional parcial na linhagem celular, particularmente com a maior fluência empregada comparada ao grupo controle, que não recebeu irradiação, sendo que os resultados estatísticos confirmaram que esse aumento na proliferação celular é significativo.

Ao dobrarmos a fluência, identificamos quase que uma duplicação do percentual encontrado, para potência 10 mW, sendo possível inferir, para ambas potências utilizadas, 10 e 20 mW, que a proliferação celular é diretamente proporcional a dose empregada na cultura celular, conforme observa-se no gráfico 5.13.

5.5 - Curvas de Crescimento da Linhagem CIPs com 0%, 5% e 10% SFB

O gráfico 5.3 apresenta as curvas de crescimento das células endoteliais, da linhagem CIPs, cultivadas em meio Ham-F12, com diferentes concentrações de soro fetal bovino (0%, 5% e 10%) que não receberam irradiação, com concentração inicial de plaqueamento de $1,0 \times 10^3$ células. No grupo com SFB a 5%, a diminuição da concentração do SFB, reduziu o crescimento celular e ocasionou comprometimento na adesão celular após o plaqueamento, que pode ser observado em 24 horas, onde enquanto as células com 10% de SFB apresentaram uma média de $2,1 \times 10^3$ células, o grupo mantido com 5% de SFB apresentou uma média de apenas $0,7 \times 10^3$ células. Nos grupos com 0% de SFB, a falta de nutrientes levou ao comprometimento na adesão celular e ao declínio progressivo da proliferação celular a partir do subcultivo. No 6º dia, ou seja, 144 horas após o plaqueamento, a falta de nutrientes ocasionou a morte celular do grupo mantido em meio a 0% SFB, já o grupo mantido a 5% SFB apresentou uma média de $17,8 \times 10^3$ células e o grupo mantido a 10% SFB, apresentou média de $23,0 \times 10^3$ células.

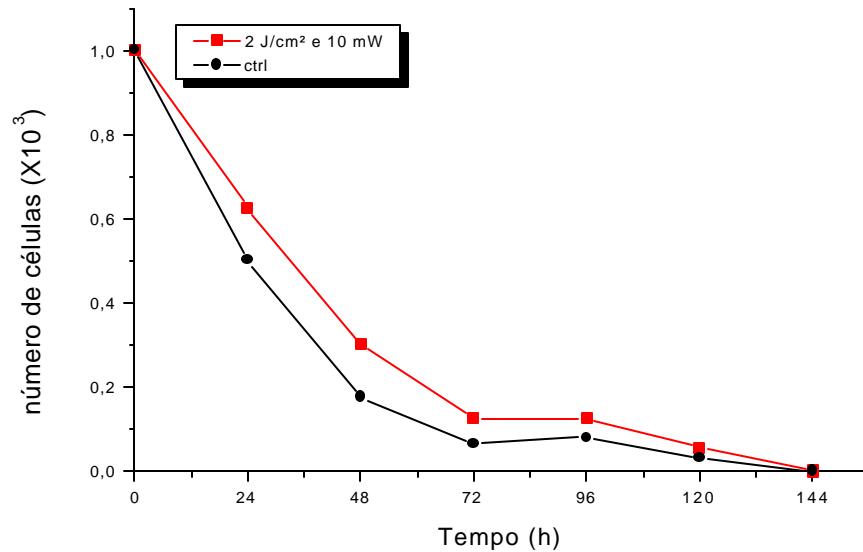
Gráfico 5.3 – Média do número de células do grupo controle, sem irradiação Laser, nos subgrupos com 0%, 5% e 10% de suplementação com SFB.



Etapa I – Linhagem CIPs mantida com 0%; 5% e 10% de SFB

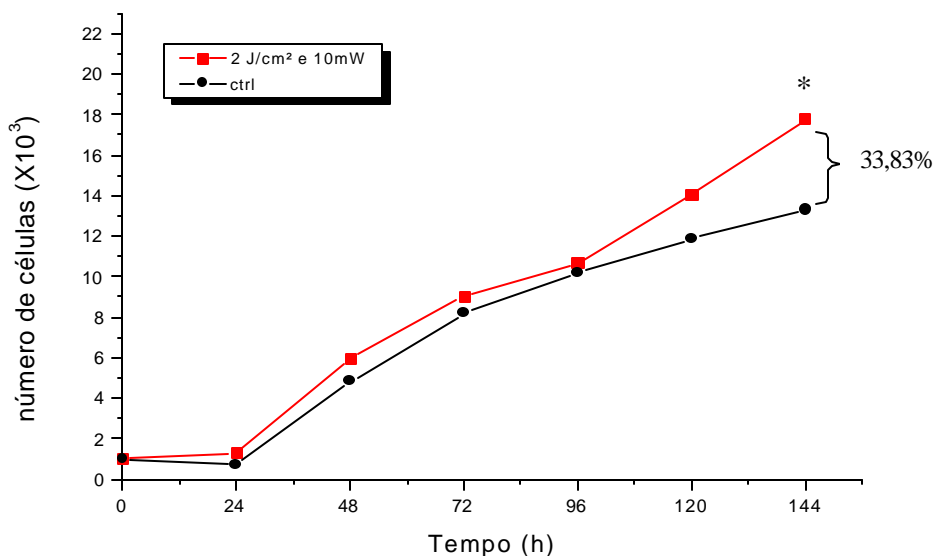
Após a irradiação da linhagem CIPs com 0% de suplementação com o SFB, empregando-se o Laser InGaAlP ($\lambda = 685$ nm), com fluência de 2 J/cm^2 e potência 10 mW, o número inicial de 1×10^3 células, não mostrou aumento proliferativo. Em situação de privação total de SFB, tanto no grupo controle quanto no grupo irradiado, o número de células apresentou declínio progressivo, culminado em morte celular total, após 144 horas do plaqueamento, como mostra o gráfico 5.4.

Gráfico 5.4 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 0% de suplementação de SFB.



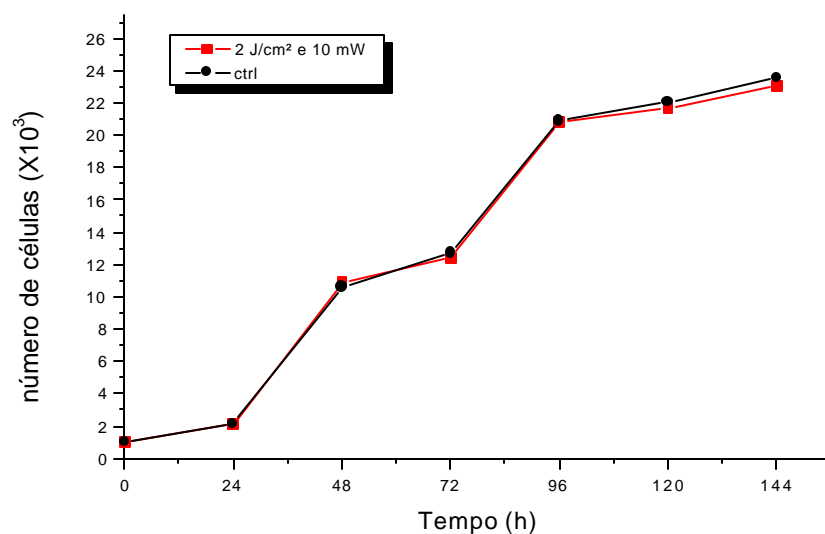
No gráfico 5.5, observamos que as células da linhagem CIPs com 5% de suplementação com SFB, apresentaram grande aumento na proliferação quando irradiadas com Laser InGaAlP ($\lambda = 685$ nm), com fluência de 2 J/cm² e potência 10 mW, sendo que, após 144 horas do plaqueamento, o número inicial de 1 x 10³ células do grupo controle foi para 13,3 x 10³ células enquanto o grupo irradiado teve um aumento significativo, onde as 1 x 10³ células plaqueadas chegaram a 17,8 x 10³ células. Observamos após 144 horas, um aumento de 33, 83% na proliferação das células irradiadas com o Laser em relação ao grupo controle, sem irradiação.

Gráfico 5.5 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 5% de suplementação de SFB.



O gráfico 5.6, mostra que as células endoteliais da linhagem CIPS com 10% de SFB, quando irradiadas com o Laser InGaALP ($\lambda = 685$ nm), com fluência de 2 J/cm² e potência 10 mW, não apresentam aumento na proliferação celular. Observou-se no 6º dia, ou seja, 144 horas após o plaqueamento, que a concentração inicial de $1,0 \times 10^3$ células no grupo controle, chegou a $23,5 \times 10^3$ células e o grupo irradiado, chegou a $23,0 \times 10^3$ células, não havendo, portanto, diferença significativa entre o crescimento do grupo com 10% SFB irradiado em relação ao grupo controle ($P = 0,69$).

Gráfico 5.6 – Média dos números de células dos grupos controle e irradiado em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento, com 10% de suplementação de SFB.



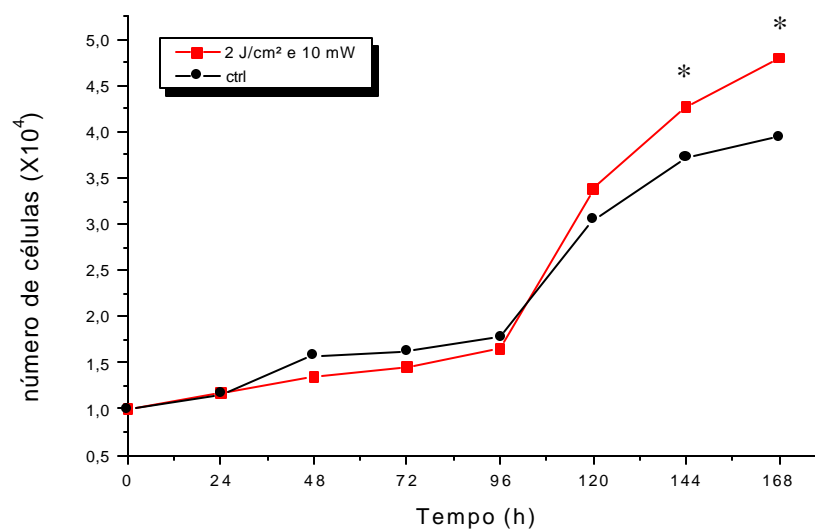
Etapa II – Linhagem CIPs mantida com 5% de suplementação com SFB

Para esta etapa do trabalho, os experimentos foram realizados utilizando-se uma concentração inicial de plaqueamento de $1,0 \times 10^4$ células, tanto para os grupos controle, quanto para os irradiados.

O gráfico 5.7 apresenta a linhagem CIPs mantida em meio Ham-F12 com 5% de SFB, onde observa-se um aumento proliferativo do grupo irradiado em relação ao controle

a partir do 4º dia, ou seja, 96 horas após o plaqueamento. No 7º dia, temos uma média final de $3,93 \times 10^4$ células no grupo controle e uma média de $4,8 \times 10^4$ células, no grupo irradiado com fluência 2 J/cm^2 e potência 10 mW . As irradiações ocorreram em quatro sessões, com intervalo de 12 horas a partir do plaqueamento, considerado tempo zero. Observa-se aumento estatisticamente significativo a partir de 144 horas.

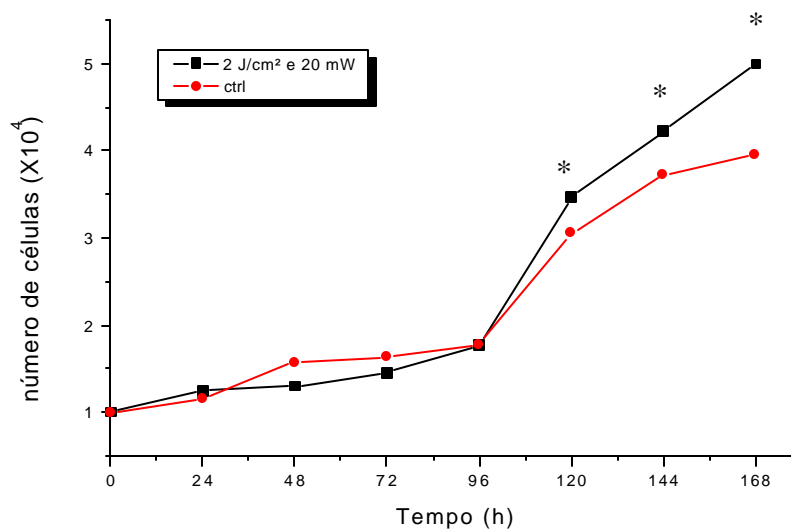
Gráfico 5.7 – Média do número de células grupos controle e irradiado, com fluência 2 J/cm^2 e potência 10 mW , com 5% de suplementação com SFB.



O gráfico 5.8 apresenta as células endoteliais mantidas a 5% SFB, em dois grupos, o controle e o irradiado com 2 J/cm^2 e potência 20 mW . Observa-se, no 7º dia, ou seja, após

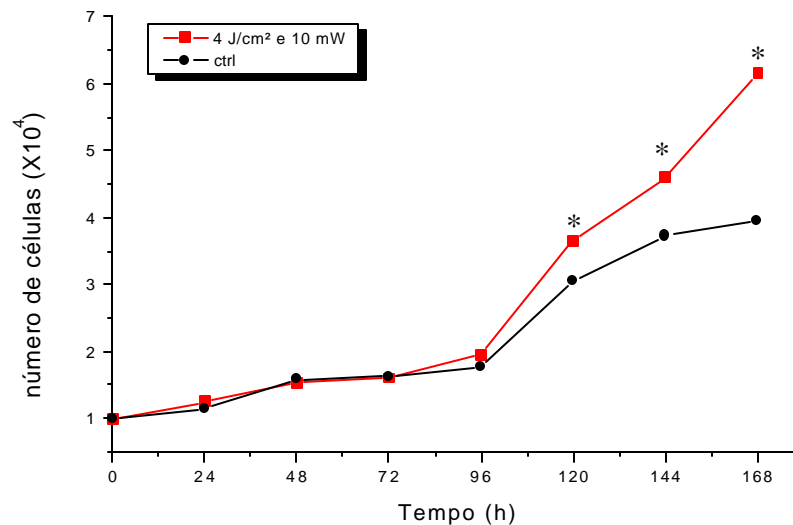
168 horas do plaqueamento uma média de $3,93 \times 10^4$ células no grupo controle e $4,96 \times 10^4$ células no grupo irradiado. As irradiações ocorreram em quatro sessões, com intervalo de 12 horas a partir do plaqueamento. Observa-se aumento estatisticamente significativo a partir de 120 horas.

Gráfico 5.8 - Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência 2 J/cm^2 e potência 20 mW, com 5% de suplementação de SFB.



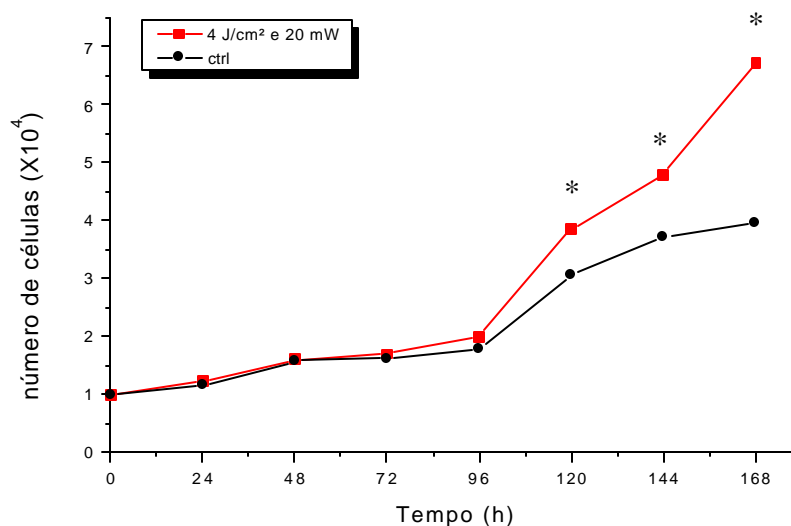
O gráfico 5.9 mostra a linhagem CIPs controle e irradiada com 4 J/cm² de fluência e potência 10 mW, onde observa-se incremento na proliferação celular do grupo irradiado a partir do 4º dia, sendo que em 168 horas do plaqueamento, o número inicial de plaqueamento de 1 x 10⁴ células atingiu a média de 5,13 x 10⁴ células, ocorrendo crescimento significativo do grupo irradiado com o Laser InGaAlP em relação ao grupo controle, a partir de 120 horas. As irradiações ocorreram em quatro sessões, com intervalo de 12 horas a partir do plaqueamento.

Gráfico 5.9 - Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência 4 J/cm² e potência 10 mW, com 5% de suplementação de SFB.



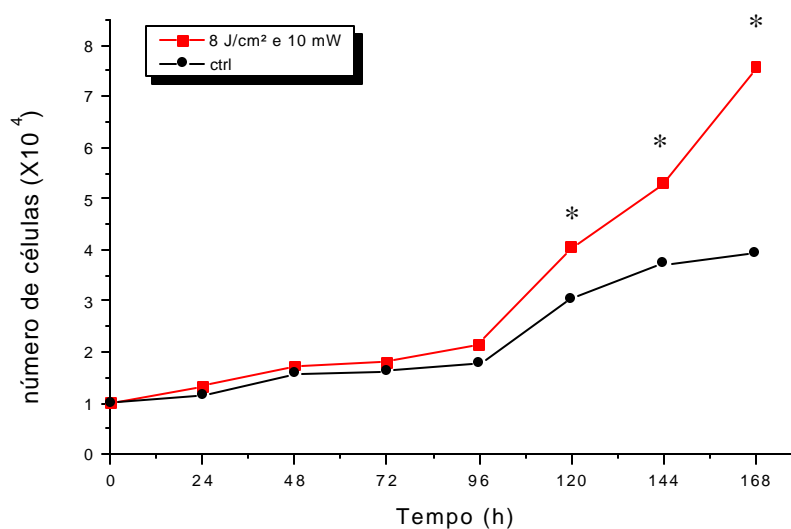
O gráfico 5.10 apresenta os grupos controle e irradiado da linhagem CIPs, quando do emprego de 4 J/cm² de fluência e potência 20 mW. Os resultados indicam aumento proliferativo do grupo irradiado após 96 horas do plaqueamento com número inicial de 1 x 10⁴. Em 168 horas do plaqueamento o controle chegou a 3,93 x 10⁴ células e o grupo irradiado foi para a média de 6,7 x 10⁴ células, indicando crescimento significativo do grupo Laser em relação ao controle, a partir de 120 horas (P= 0,03). As irradiações ocorreram em quatro sessões, com intervalo de 12 horas a partir do plaqueamento.

Gráfico 5.10 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência 4J/cm² e potência 20 mW, com 5% de suplementação de SFB.



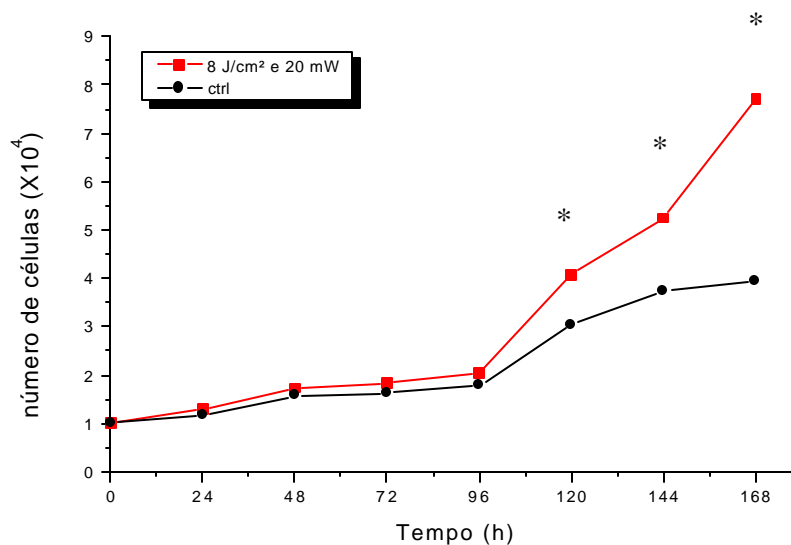
No gráfico 5.11 temos a linhagem CIPs mantida em meio Ham F-12 com 5% SFB, em dois grupos: o controle e o submetido a irradiação com 8 J/cm² de fluência e potência 10 mW. Em 168 horas do plaqueamento, o número inicial de 1 x 10⁴ células, chega a média de 7,56 x 10⁴ células no grupo irradiado com potência 10 mW, enquanto o controle atinge apenas a média de 3,93 x 10⁴ células. Os números apontam o efeito significativo do Laser no aumento do número de células viáveis nos grupos irradiados após 120, 144 e 168 horas do plaqueamento.

Gráfico 5.11 – Média do número de células dos grupos controle e irradiado, com fluência 8J/cm² e potência 10 mW, com 5% de suplementação de SFB.



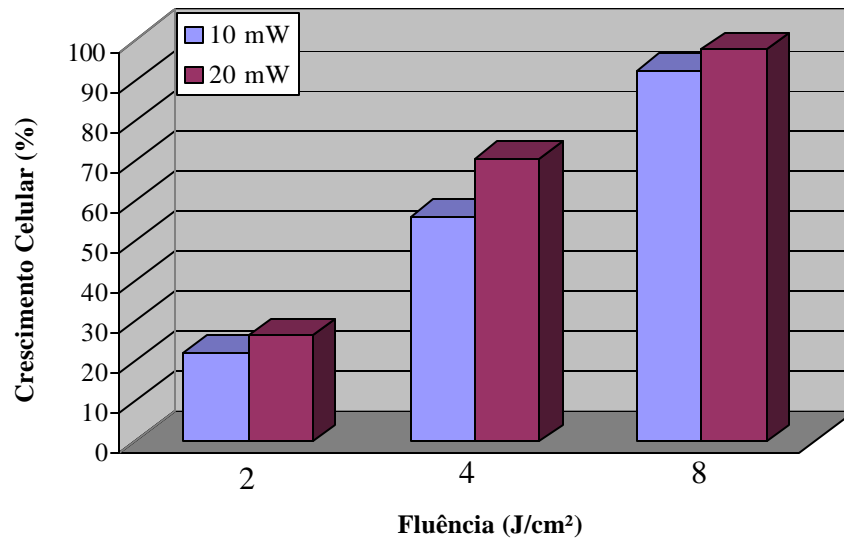
No gráfico 5.12 temos o emprego da fluência 8 J/cm^2 e 20 mW de potência, onde pode-se observar aumento estatisticamente significativo do grupo irradiado em relação ao controle após o 4º dia do experimento. Em 168 horas do plaqueamento, o número inicial de $1,0 \times 10^4$, chega a média de $7,76 \times 10^4$ células, contra a média de apenas $3,93 \times 10^4$ células do grupo controle, indicando o efeito significativo do Laser nesta dosimetria, sobre a proliferação celular, após 120 horas do plaqueamento.

Gráfico 5.12 – Média do número de células com 5% de suplementação de SFB, nos grupos controle e irradiado com fluência 8 J/cm^2 e potência 20 mW , em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento.



O gráfico 5.13 representa a porcentagem de crescimento celular da linhagem CLPs em relação ao grupo controle (sem irradiação) em função das fluências ministradas 2; 4 e 8 J/cm², com as potências 10 e 20 mW do Laser InGaAlP (685 nm). Quando a fluência 2 J/cm² e potência 10 mW são empregadas, observa-se um aumento de 22,13% da proliferação celular do grupo irradiado em relação ao controle, já com a mesma fluência e potência 20 mW, o aumento é de 26,21%. Com a fluência 4 J/cm² e potência 10 mW, observa-se aumento de 55,97% e para potência 20 mW, um aumento de 70,48%. Observa-se o maior aumento da porcentagem de proliferação do grupo irradiado em relação ao controle com a fluência 8J/cm², com aumento de 92,37% com a potência 10 mW e 97,45% para potência 20 mW.

Gráfico 5.13 – Porcentagem do crescimento das células com 5% de suplementação de SFB irradiadas em relação ao grupo controle. Irradiação realizada com LBP, com fluências 2; 4 e 8J/cm² e potências 10 e 20 mW, em 4 sessões em intervalos de 12 horas após o plaqueamento.



5.6 – Microscopia de Fluorescência

Faloidina Rodamina : Marcador Fluorescente para Citoesqueleto

O citoesqueleto foi observado através de Microscopia de Fluorescência, após 108 horas do plaqueamento e a análise foi realizada com base na organização dos filamentos de actina desta estrutura celular. O citoesqueleto do grupo com 0% de SFB, ou seja, em *déficit* nutricional total, apresentou alterações (figura 5.1), ocorrendo a desfragmentação e ausência das fibras de stress (*stress fibers*) de actina. Observamos também, alterações na adesão celular (figura 5.2), provavelmente associada à perda de pontos de adesão focal quinase (FAK).

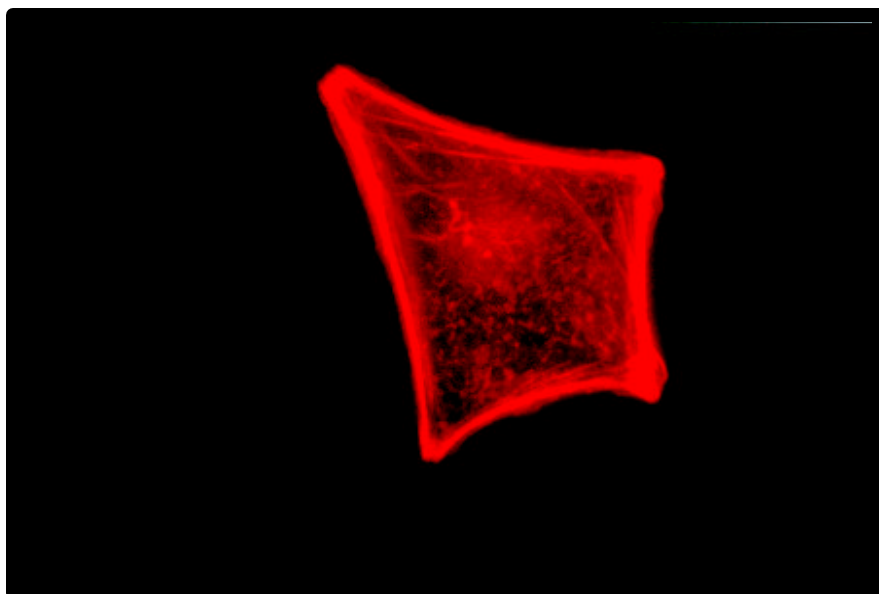
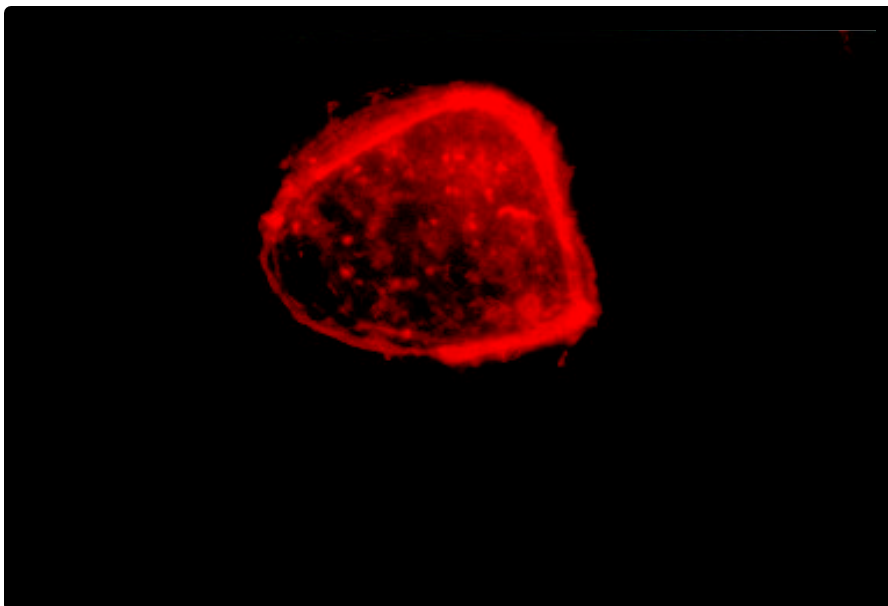
Nas células subcultivadas em situação de privação parcial de nutrientes, 5% SFB, observamos uma desorganização da disposição dos filamentos de actina-F, e até mesmo ausência destes filamentos em algumas regiões (figuras 5.5 e 5.6).

No grupo com 10% de suplementação com SFB, observamos fibras de stress distribuídas por toda célula, e uma distribuição dos filamentos de actina que sugere a presença de vários pontos de adesão focal quinase (figuras 5.3 e 5.4).

Nos grupos irradiados, dos subcultivos com 5 % de soro, os filamentos de actina do citoesqueleto celular, apresentaram distribuição homogênea no citoplasma, verificamos novamente a presença de fibras de stress, que sugerem integridade celular (figuras 5.7 e 5.8). No aumento de 2.000 X, observamos num campo maior, grande número de células, após 108 horas (Figura 4.9) e espículas projetadas pelo citoesqueleto, sugerindo adesão celular (figura 4.10). Este efeito vem revelar que as células irradiadas com LBP passam a ter melhores possibilidades de manter-se íntegras, propiciando influência benéfica e capacitando-as nos processos de proliferação celular.

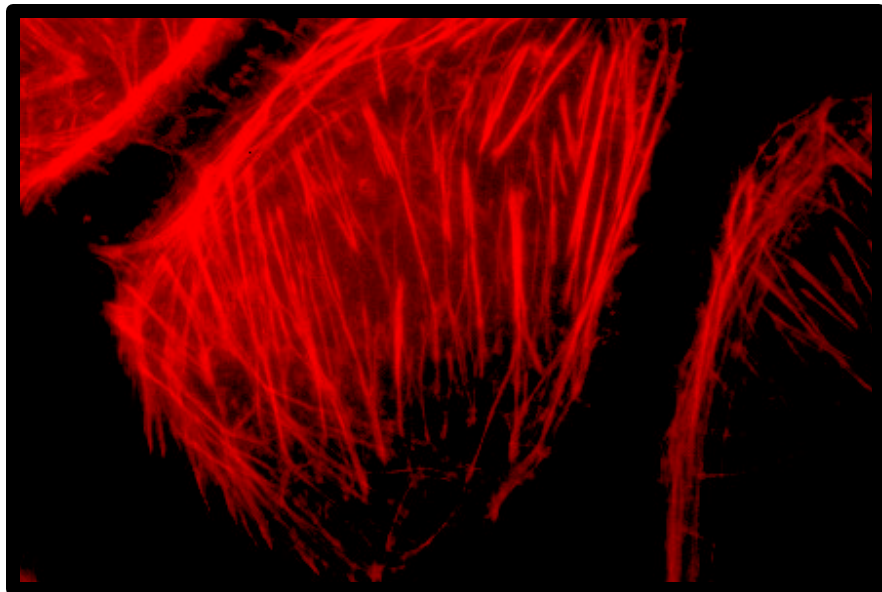
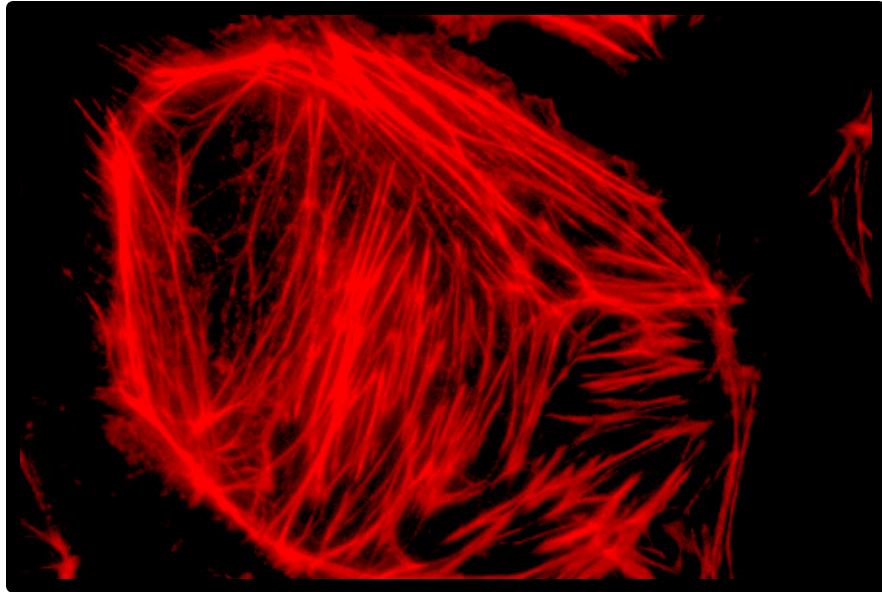
Figura 5.1. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 0% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação LBP. Filamentos de actina alterados, observando-se fragmentação destas estruturas (1.000 X).

Figura 5.2. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 0% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação LBP. Filamentos de actina alterados, observando-se fragmentação destas estruturas e aparente perda de adesão (1.000 X).



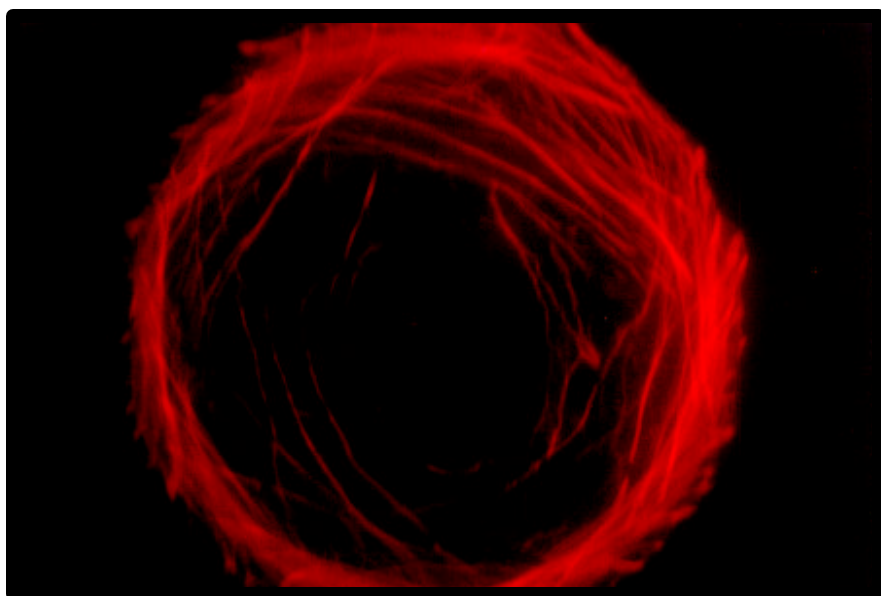
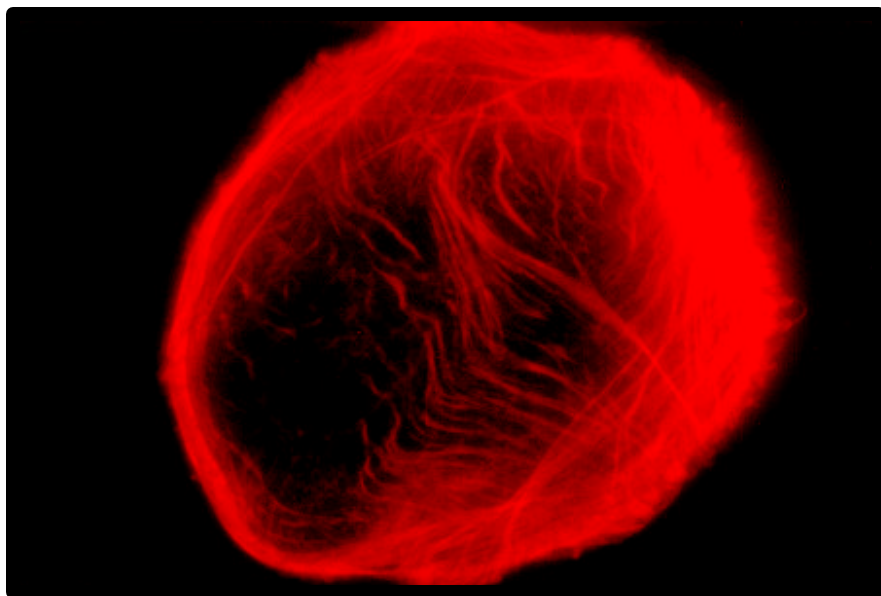
5.3. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 10% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação com LBP. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de stress (*stress fibers*) e âncoras de adesão celular (1.000 X).

5.4. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 10% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação com LBP. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de *stress* (*stress fibers*) e âncoras de adesão celular (1.000 X).



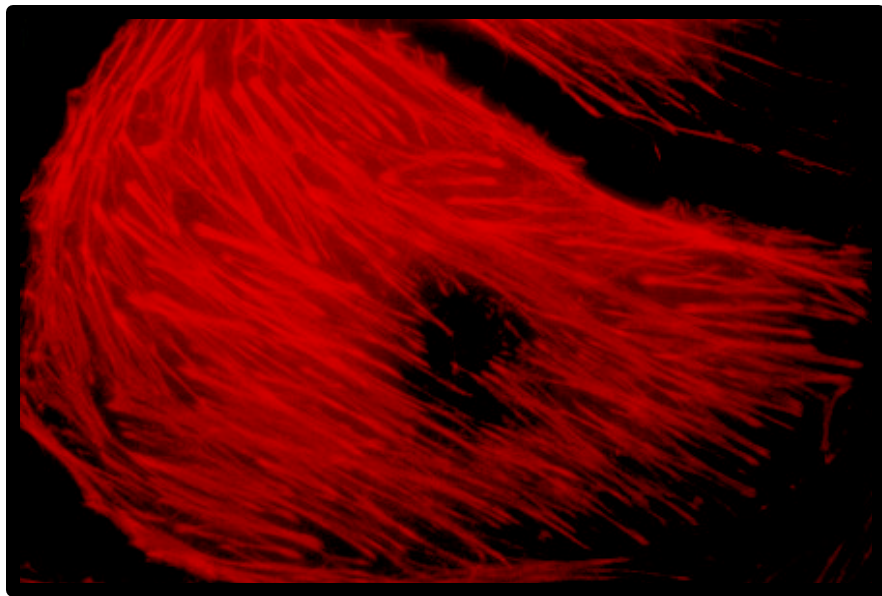
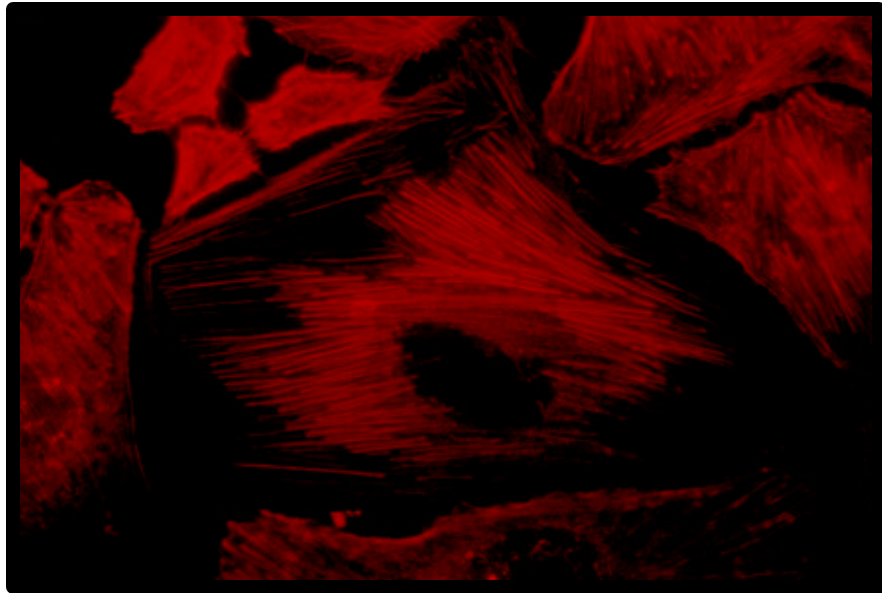
5.5. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 5% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação. Filamentos desorganizados e perda das fibras de stress (*stress fibers*) (1.000 X).

5.6. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 5% de suplementação com Soro Fetal Bovino, não submetidas à irradiação. Filamentos desorganizados, perda das fibras de stress (*stress fibers*) e ausência de filamentos de actina em algumas regiões (1.000 X).



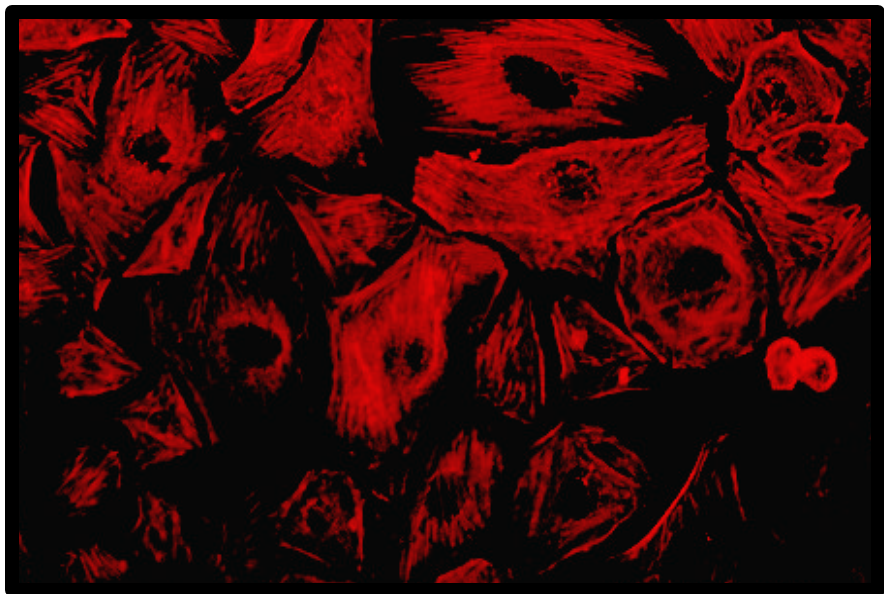
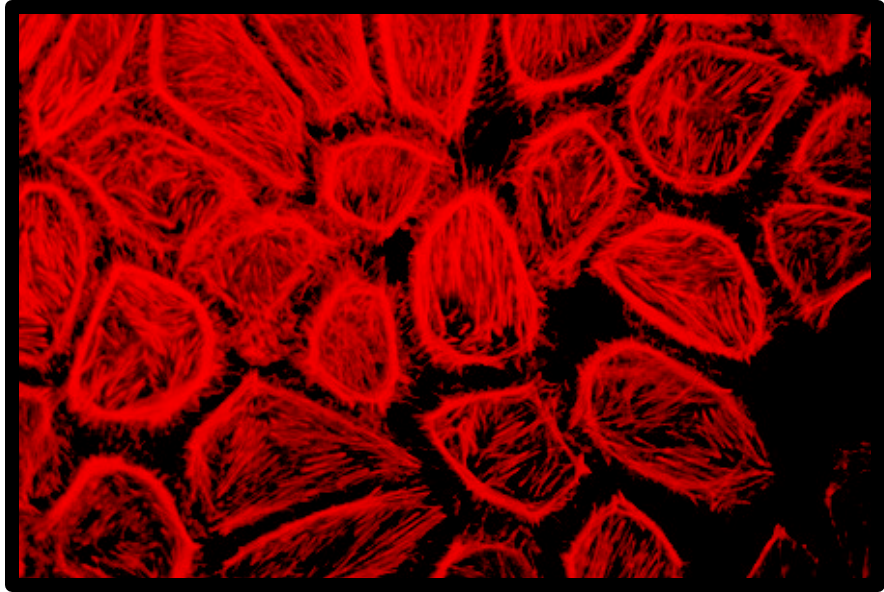
5.7. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 5% de suplementação com Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 2 J/cm² e potência 20 mW. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de *stress* (1.000 X).

5.8. Filamentos de actina de Células Endoteliais, linhagem CIPs, com 5% de suplementação com Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 8 J/cm² e potência 20 mW. Filamentos de actina com distribuição homogênea, presença de fibras de *stress* (1.000 X).



5.9. Filamentos de actina de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação com Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 2 J/cm² e potência 20 mW . Filamentos de actina com distribuição homogênea (X 500).

5.10. Filamentos de actina de Células Endoteliais CIPs, com 5% de suplementação de Soro Fetal Bovino, submetidas à irradiação com Laser InGaAlP (685 nm), fluência 8 J/cm² e potência 20 mW . Filamentos de actina com distribuição homogênea e projeções do citoesqueleto semelhantes a espículas de actina (X 500).



6 - Discussão

Em nosso trabalho, utilizamos o comprimento de onda 685 nm, pois diversas pesquisas apontam a luz visível como maior fator de ativação na indução de proliferação celular (BOULTON; MARSHAL, 1986; VAN BREUGEL; BAR, 1992; GRAHAM; ALEXANDER, 1990; KARU *et al.*, 1990).

Experimentos *in vitro*, mostram que a principal resposta celular para Biomodulação Laser-induzida ocorre nas variações do comprimento de onda entre 635 nm e 805 nm (LUBART, 1997; SROKA, *et al.*, 1999). Vários estudos aparecem para fornecer evidências que o Laser de Baixa Potência é capaz de modificar processos celulares de maneira comprimento de onda dependente (KARU, 1987; GHALI; DYSON, 1992; SROKA *et al.*, 1999), porém, os mecanismos iniciais da interação entre os diferentes comprimentos de onda e os tecidos, ainda não estão completamente compreendidos (BASFORD, 1995).

Em nosso estudo, cultivamos a linhagem CIPs (células endoteliais de aorta de coelho) em diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB), para analisar os efeitos da irradiação Laser de Baixa Potência sob a proliferação celular *in vitro*. Nossos resultados experimentais demonstram que as células cultivadas em situação de *déficit* nutricional total (0% SFB) apresentaram menor adesão ao substrato, não levando a proliferação celular. Nas células em situação normal (10% SFB) e em privação parcial (5% SFB), nossos resultados apontam diferença estatisticamente significativa entre o crescimento destas culturas ($P < 0,05$). A cultura em meio com 5% SFB apresentou aproximadamente a metade do número de células viáveis em relação a cultura em homeostase (10% SFB), após 120 horas do plaqueamento, demonstrando uma situação de *stress* nutricional na suplementação com 5% SFB.

Em um estudo com fibroblastos de gengiva humana, Almeida-Lopes *et al.*, (2001), cultivaram estas células com diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino. As células cultivadas em meio livre de soro não apresentaram crescimento, enquanto as células que cresceram em meio contendo apenas 5% SFB, apresentaram uma taxa de crescimento significativamente menor que as células que cresceram em concentração ideal de soro (10%). Neste estudo utilizaram células crescendo em 5% SFB (*déficit* nutricional), a qual

foi representante de células em stress e células crescendo em condições ideais de cultura (10 % SFB), representando células normais.

Os resultados obtidos em nossos experimentos com diferentes concentrações de soro fetal bovino, também apontam diferença estatisticamente significativa entre o crescimento das culturas suplementadas com 5% e com 10% SFB ($P < 0,05$). As culturas em meio livre de soro também não apresentaram crescimento em nossos experimentos.

No presente trabalho, irradiamos a linhagem CIPs em diferentes concentrações de SFB, com Laser Fosfeto de índio-gálio-alumínio, com fluência 2 J/cm² e potência 10 mW. As células em *déficit* nutricional total não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos controle e irradiado, culminando em morte celular total após 144 horas do plaqueamento. Na cultura em homeostase (10% SFB), não observamos diferenças entre as curvas de crescimento das células do grupo controle e irradiado ($P > 0,05$). Já nas células em situação normal de *stress* nutricional (5% SFB) observamos aumento estatisticamente significativo do grupo irradiado em relação ao controle após 120 horas do plaqueamento ($P < 0,05$). Isto corrobora com o fato de que a Terapia à Laser empregando Baixa Potência intensifica as funções celulares, quando a célula se encontra em condição de *stress* (ALMEIDA-LOPES *et al.*, 2001).

Karu *et al.*, em 2001, avaliaram a adesão de células HeLa após radiação desta cultura em suspensão, utilizando um Laser diodo, no comprimento de onda 820nm, pulsado, com fluências de 8 a 120 J/m². As células receberam tratamento com doadores de óxido nítrico (NO), sódio nitroprusside (SNP) e NaNO₂. Nas células irradiadas em suspensão, ocorreu aumento da adesão célula-substrato dose-dependente, sendo 60 J/m² a melhor dose encontrada. O tratamento das células com SNP ou NaNO₂ antes da irradiação, elimina a estimulação da adesão Laser-induzida. O pré-tratamento das células com SNP, não apenas elimina a estimulação da adesão Laser-induzida, mas inibe a adesão das células irradiadas (não ocorrendo inibição da adesão das células não irradiadas). Isto sugere que a modulação da atividade da cadeia respiratória (provavelmente a alteração da atividade da enzima citocromo oxidase c) está envolvida no aumento da adesão celular Laser-induzida (2001_b).

Van Breugel *et al.* (1992), demonstraram que cultura de fibroblastos humanos, quando em monocamada possuem vários picos de absorção, entre eles no comprimento de onda de 630 nm. Neste trabalho os fibroblastos foram irradiados com Laser HeNe e potências que variaram de 0,55 a 5,98 mW com tempos de irradiação de 0,5 e 10 minutos. Os resultados demonstraram que a potência Laser de 2,91mW pode aumentar a proliferação celular, já a potência 5,98 mW não revela qualquer efeito. Esses pesquisadores defendem neste trabalho que o tempo de exposição e a densidade de potência, ou seja, a fluência determina os efeitos da irradiação Laser, obtendo-se estimulação e inibição das propriedades celulares, com o mesmo Laser nas mesmas condições.

Em nosso trabalho também observamos que o principal fator para aumento da proliferação celular foi a fluência aplicada, pois quando dobramos a densidade de energia de 2 J/cm² para 4 J/cm² obtivemos efeito proliferativo estatisticamente significativo a partir das 120 horas do plaqueamento (P< 0,05), sendo que com a primeira fluência houve aumento estatístico apenas após 144 horas. Já quando dobramos a potência de 10 mW para 20 mW, mantendo a fluência constante em 2, 4 ou 8 J/cm², não houve diferença estatisticamente significativa para essas potências (P>0,05). Contudo, comparando-se as diferentes densidades de energia entre si, obtivemos diferenças estatisticamente significantes em todas dosimetrias após 168 horas (P< 0,05).

Boulton e Marshall (1986), usaram 90-180 mJ/cm² por dia e observaram aumento na proliferação celular. Alguns trabalhos tem relatado fechamento acelerado de feridas e reparos de injúrias leves de tecidos usando doses próximas a 450 mJcm² por dia, enquanto outros tem usado doses muito mais altas para produzir efeito clínico. Kana *et al.* (1981), encontraram que 4 J/cm² diariamente por nove dias foi uma ótima dosagem para produzir aumento na taxa de fechamento de ferida e formação de colágeno. Surinchack *et al.* (1983), usou 4,2 J/cm² por 14 dias em incisão em pele de rato mostrando incremento temporário na resistência à ruptura.

Muitos têm investigado os efeitos fotobiológicos em tecidos animais e vegetais (GAMALEYA, 1987). Alguns dos efeitos encontrados parecem contraditórios. Em pintainhos neonatos, a radiação com Baixa Potência inibe a divisão celular na lente, mas aumenta a mitose nas células epiteliais no pigmento da retina (YEW *et al.*, 1982).

Maior número de fibroblastos foram vistos na região de cicatrização de feridas após irradiação com He-Ne (DYSON; YOUNG, 1986). Fibroblastos de pele humana foram cultivados por Boulton e Marshall (1986), e expostos a luz coerente de comprimento de onda 633 com 90 mJ/cm^2 , tendo número de células aumentado significativamente quando comparado com o grupo controle não irradiado. Aumento na síntese de colágeno por fibroblastos foi demonstrado (ABERGEL, 1984).

A irradiação Laser de Baixa Potência com comprimento de onda 780 nm incrementa a proliferação de queratinócitos *in vitro*, com um aparente envolvimento de espécies reativas de oxigênio, e também acelera a cicatrização de feridas (GROSSMAN *et al.*, 1998).

Apesar da grande quantidade de trabalhos que defendem a eficiência da Terapia Laser de Baixa Potência, a variação na metodologia e dosimetria dos trabalhos publicados revelam uma enorme discrepância e ainda existe uma restrita explicação dos problemas clínicos do Laser, na expressão da dose. Existem trabalhos que relatam ausência de efeitos do Laser de Baixa Potência, contudo a controvérsia clínica é responsável por acaloradas discussões no meio científico (KARU, 1999).

Colver e Priestley (1989), relataram a ausência de efeito do laser HeNe *in vitro* sob os componentes da cicatrização de feridas, onde foram testados os efeitos da irradiação Laser de Baixa Potência na proliferação de cultura de células e sob vários aspectos de seu metabolismo, não tendo observada nenhum efeito positivo significativo.

Para investigar a natureza desta influência na cicatrização de feridas foram estudados sete componentes do processo de cicatrização *in vitro*: fibroblasto de pele humana, proliferação celular de célula epitelial e endotelial, migração celular de *explantes* de pele, contração do colágeno, síntese de colágeno e secreção de glicosaminoglicanas (GAG). Estes pesquisadores usaram um Laser HeNe emitindo um feixe de diâmetro de 1 mm e comprimento de onda de 633 nm. Não encontraram nenhum efeito significativo da irradiação He-Ne, inclusive a proliferação celular de todas as linhagens não foi afetada pela irradiação (COLVER; PRIESTLEY, 1989). É importante notar que no trabalho de Colver e Priestley, a energia entregue para as células foi entre $37,5$ e 450 mJ/cm^2 por dia, para os experimentos de proliferação celular. O que provavelmente explica o fracasso nestes

experimentos de Colver e Priestley são as baixas doses tanto de potência quanto de fluência usadas, sendo a potência 5 mW e as fluências entre 37,5 e 450 mJ/cm², ou seja, 0,375 e 0,45 J/cm², por dia. Outro fator relevante nos resultados obtidos por esses autores, provavelmente se deve ao fato de que a célula assimila mais efetivamente a energia Laser quando em situação de stress nutricional, estes pesquisadores durante os experimentos de proliferação celular utilizaram as linhagens em homeostase, ou seja, com 10% de suplementação com SFB.

Quando utilizamos o Laser InGaAlP ($\lambda = 685$ nm), DE= 2 J/cm², P= 10 mW, na linhagem endotelial CIPs com 10% de suplementação com SFB, assim como nos experimentos de Colver e Priestley, também não observamos aumento na proliferação celular do grupo irradiado em relação ao controle, haja vista que as células encontravam-se em homeostase.

Um estudo realizado por Kipshidze *et al.* (2001), demonstrou que a irradiação Laser de Baixa Potência aumenta a produção de fator de crescimento derivado de endotélio vascular (VEGF) por células do músculo liso de veia safena humana (SMC), fibroblastos de pele humana e cardiomiócitos humanos, bem como estimula o crescimento de células endoteliais de vasos coronários humanos (EC) em cultura. As células foram mantidas em meio com 2% de SFB durante os experimentos. Foi utilizado um Laser HeNe, no modo contínuo e irradiâncias de 0,10 a 6,3 J/cm² e uma potência constante de 5 mW. Os autores concluíram que estes dados podem ter importante significado para o estabelecimento de novos métodos de reparo vascular pós-angioplastia endoluminal e fotoangiogênese miocárdica.

Inibição ou estimulação do crescimento celular, diferenciação, migração e fagocitose são alguns dos efeitos de diferentes doses de luz em diferentes comprimentos de onda, que tem sido demonstrado *in vitro* (STEINLECHER; DYSON, 1993; KRONEMANN *et al.*, 1999; KARU, 1989; BOULTON; MARSHAL, 1986; RICCI, 2002) em vários tipos de células.

Em nosso estudo as células endoteliais em situação de *déficit* nutricional parcial (5% SFB) apresentaram diferentes respostas quando variou-se as fluências aplicadas, sendo que as células apresentaram maior proliferação quando irradiadas com fluência 8J/cm² em

relação as fluências 2 e 4 J/cm². Este trabalho também mostrou que a potência 20 mW teve maior efeito bioestimulatório que a potência 10 mW, para todas densidades de energia.

Kipshidze *et al.*, em 2001_a, demonstraram usando um Laser HeNe (5 mW) a produção de VEGF por células de músculo liso (0,5 J/cm²), fibroblastos (2,1 J/cm²) e cardiomiócitos (1,05 J/cm²). O foco deste trabalho foi a investigação da possibilidade da Laser Terapia de Baixa Potência (LTBP) estimular não especificamente a liberação ou secreção de fatores de crescimento, em particular o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF).

O efeito Bioestimulatório na proliferação celular da linhagem CIPs observado neste trabalho, pode ser possivelmente explicado, entre outros fatores, pelo aumento de fatores de crescimento no meio de cultura das células irradiadas. Observou-se também aumento na proliferação celular em nosso estudo com células fibroblásticas de origem cardíaca, após Bioestimulação com LBP, esse trabalho foi apresentado durante o Simpósio Brasileiro de Metodologias Integradas no Estudo da Biologia e Evento de Microscopia e Microanálise no Mercosul (RICCI, 2002).

O VEGF também é conhecido como um fator de permeabilidade vascular e um secretado mitogênico específico para células endoteliais e um estimulador angiogênico extremamente potente (CALLOW, 1994; ISNER; LOSORDO, 1999).

Acredita-se que o TGF- β (fator de crescimento transformador β) estimula a angiogênese através da regulação de VEGF (KHANNA *et al.*, 1999; BERSE, 1999), o qual é conhecido por ser o mais potente fator angiogênico. A quantidade relativa de VEGF produzido em resposta a citocinas, como o TGF- β , provavelmente contribui significativamente para a angiogênese (KIPSHIDZE *et al.*, 2001_b).

Há uma hipótese de que o aumento na proliferação celular pode ser devido ao TGF- β induzir o VEGF mRNA, o qual tem demonstrado ser ativador da proteína tirosinoquinase (SEKO, 1999; MARUYAMA *et al.*, 1999).

O efeito da LTBP pode ser de particular significância, porque a habilidade de regeneração do endotélio é relativamente pobre (DOORNECAMP *et al.*, 1996) e foi demonstrado que a aceleração da regeneração endotelial pode reduzir a taxa de restenose em animais experimentais (DE SCHEERDER., 1998).

O TGF- β Laser-induzido pode desempenhar um papel significativo na remodelação e reparo de tecido cardíaco, portanto a indução de VEGF promove angiogênese em coração isquêmico (KIPSHIDZE *et al.*, 2001_a).

O VEGF mRNA, vem sendo demonstrado como ativador da proteína tirosinoquinase, estas por sua vez estão relacionadas a adesão e proliferação celular. A proteína tirosinoquinase faz parte de uma família de receptores de superfície celular, para a maioria dos fatores de crescimento polipeptídicos e a fosforilação da tirosina da proteína tem sido particularmente estudada como mecanismo de sinalização envolvido no controle do crescimento e desenvolvimento de células animais (COOPER, 2001).

Respostas celulares a sinais extracelulares, incluindo fatores de crescimento, freqüentemente envolvem mudanças no movimento e na forma celular. Por exemplo, alterações na proliferação celular induzidas por fatores de crescimento, desempenham papéis críticos em processos como cicatrização de feridas e desenvolvimento embrionário (COOPER, 2001). Estes aspectos do comportamento celular são controlados principalmente pelo citoesqueleto de actina. Portanto, a remodelação do citoesqueleto de actina representa o elemento-chave da resposta de muitas células a fatores de crescimento e outros estímulos extracelulares.

A principal proteína do citoesqueleto, na maioria das células é a actina, cujas fibras medem aproximadamente sete nm de diâmetro e vários micrômetros de comprimento. No interior da célula os filamentos de actina são arranjados de forma organizada, formando feixes ou redes tridimensionais com propriedades de géis semi-sólidos. Cada monômero de actina (actina globular [G]) apresenta sítios de ligação que medeiam as interações com dois outros monômeros de actina, de modo que os monômeros de actina polimerizam-se para formar os filamentos (actina filamentosa [F]) (COOPER, 2001).

Em nosso trabalho, utilizamos o corante fluorescente Rodamina Faloidina para marcarmos filamentos de actina-F do citoesqueleto, a fim de observarmos possíveis alterações desta estrutura celular nas diferentes concentrações de Soro Fetal Bovino e o efeito da irradiação Laser de Baixa Potência na organização dos filamentos de actina-F.

Nas células em meio de cultura sem soro, observamos a desorganização no arranjo e estrutura dos filamentos de actina-F, provavelmente devido a ausência do soro que possui

fatores de crescimento essenciais para o desenvolvimento celular, já que a remodelação do citoesqueleto de actina representa o elemento chave da resposta da célula a fatores de crescimento. Ocorreu aparente perda das adesões focais e das fibras de estresse, conforme observado nas figuras 4.1 e 4.2.

Investigações experimentais sobre a modulação das propriedades de adesão de células pela luz Laser de Baixa Potência evidenciam que a eficiência de plaqueamento e motilidade de células, bem como a aderência de *salmonella* por linfócitos, aumentam após a irradiação. A adesão célula-substrato foi encontrada como sendo dependente da dose e do comprimento de onda da luz contínua (CW). Doses baixas de potência dos Lasers Rubi (694 nm), Alexandrita (755 nm) e Nd: YAG (1064 nm e 532 nm) induzem mudanças na adesão celular pela modulação da adesão focal celular. A interação de adesão entre as células e matriz extracelular desempenha um papel regulador no processo de reparação de feridas. A radiação Laser de Baixa Potência no visível e infravermelho-próximo é conhecida por estimular cicatrização de tecido e regeneração tecidual. Os mecanismos moleculares, assim como o efeito da radiação Laser sob a adesão celular ainda não estão totalmente estabelecidos. Acredita-se que a ação da luz Laser na adesão celular é o resultado da absorção pela mitocôndria, seguida pela transdução do fotosinal desta para a membrana da célula e para o núcleo (STEINLECHER; DYSON, 1993; KARU *et al.*, 1985; 2001_a).

Nossos resultados de Microscopia de Fluorescência sugerem uma desorganização dos filamentos de actina-F nas células em *stress* nutricional, esses filamentos, por sua vez, estão ligados à adesão celular. Para que ocorra proliferação celular é necessário que as funções ligadas à adesão não estejam comprometidas, em outras palavras, a adesão está diretamente ligada a proliferação celular. Nas culturas irradiadas, com todas as dosimetrias empregadas ($DE = 2; 4 \text{ e } 8 \text{ J/cm}^2$) e ($P = 10 \text{ e } 20 \text{ mW}$), com Laser no comprimento de onda 685 nm, no modo contínuo, observamos claramente a reorganização dos filamentos de actina no grupo das células em *stress* nutricional (5% SFB), o que acreditamos estar relacionado a maior proliferação das culturas Laser-tratadas.

A superfície da célula e as interações de adesão estão envolvidas na regulação de processos como embriogênese, crescimento e diferenciação celular, morfogênese, e até

mesmo a formação de metástase. Recentes estudos sugerem que as interações célula-matriz são mediadas por receptores de membrana, ou integrinas. As integrinas e as moléculas de adesão focal pertencem a uma grande família de glicoproteínas (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999). A adesão das integrinas da matriz extracelular induz a fosforilação de tirosina na adesão focal quinase (FAK). Neste caminho, a migração e a proliferação celular são regulados (CALDERWOOD; SHATTIL; GINSBERG, 2000).

No presente trabalho, quando irradiamos as células endoteliais com o Laser semiconductor de InGaAlP, uma das explicações para o aumento na proliferação celular pode ser a síntese de fatores de crescimento, que levam a ativação de vias de transdução de sinais ligadas a proliferação celular.

Karu *et al.* (1995), demonstraram que irradiação de células HeLa com Laser HeNe, aumenta a quantidade de adenosina trifosfato (ATP). Neste trabalho, as células foram irradiadas com 100 Jm^{-2} por 10 s em várias fases do crescimento celular (fase *lag*, fase *log* e fase “*plateau*”), observando-se que o nível máximo de ATP induzido em células, pela irradiação é dependente da fase de crescimento da cultura. Neste experimento a quantidade máxima de ATP atinge o nível máximo no meio da fase *log* (72 horas após o plaqueamento). O aumento do nível de ATP celular induzido pela luz em 632,8 nm pode ser devido a síntese de novos nucleotídeos adenina e a fosforilação de adenosina difosfato (ADP) e de adenosina monofosfato (AMP).

No trabalho acima descrito, Karu *et al.*, irradiaram células HeLa em homeostase, ou seja, em condições ideais de cultura, em nossos resultados experimentais com a linhagem CIPs em condições ideais (10% SFB), não observamos mudança na proliferação celular, porém não podemos afirmar indubitavelmente que não houve efeito bioestimulatório, haja vista que podem ocorrer efeitos que necessitam de métodos de análise mais específicos, como é o caso da mensuração do ATP por análise da bioluminescência, baseada na medida da luz produzida pela reação de luciferin-luciferase.

Karu *et al.* (1995), observaram a influência da radiação com Laser HeNe (632,8 nm) nas correntes iônicas de canais simples, através de membrana celular de células (neurônio de rato, cardiomiócitos de porco da guiné, células gliais de cérebro de rato, células endoteliais de artéria pulmonar de bovino). Utilizando a técnica de Patch-Clamp

observaram em todas linhagens, que correntes iônicas de canais simples nas células aderidas, são influenciados pela irradiação HeNe (5 mW). Embora a natureza dos canais sensíveis a luz não tenha sido estudada em detalhes, estes canais podem ser de potássio dependente de ATP e/ou canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , isto devido ao fato de que é conhecido que um aumento no nível de ATP intra-celular suprime a atividade de abertura dos canais de potássio dependentes de ATP (ASHCROFT; ASHCROFT, 1990; ASHFORD *et al.*, 1994).

A dependência de ATP na corrente dos canais sensíveis a luz sustentam a hipótese de que o primeiro receptor responsável pelos efeitos do Laser de Baixa Potência está localizado na mitocôndria, segundo Karu (KARU, 1990; 1992). Desde o trabalho de Arwanitaki e Chalozonitis, em 1947 é reconhecido que a mitocôndria de células de mamíferos possuem fotossensibilidade. Acredita-se que, o foto sinal é aceito pelos componentes da cadeia respiratória (citocromo A/A₃ e NADH – desidrogenase) e sua excitação eletrônica é o primeiro passo da transmissão e amplificação do fotossinal na cadeia (KARU, 1996). A cascata de reações bioquímicas é necessária para transmitir o sinal da mitocôndria, via citoplasma para a membrana celular (KARU *et al.*, 1988; 1989; 1996).

O efeito proliferativo que o Laser exerceu em nossos experimentos sobre a linhagem de células endoteliais, foi o resultado de uma seqüência de eventos fotobioquímicos, entre eles nos parece um provável aumento de ATP. A irradiação Laser de Baixa Potência também pode ter influenciado nas correntes iônicas de canais simples, das células endoteliais irradiadas, porém para confirmação destas hipóteses faz-se *mister*, futuramente, o emprego de técnicas de mensuração de ATP e de correntes iônicas para a constatação destas possíveis atuações do LBP em nossos experimentos. Uma outra técnica usualmente empregada para analisar os efeitos do Laser em cultura de células é a medida do consumo de oxigênio.

Wei Yu *et al.*, em 1997, mediram consumo de oxigênio, potencial fosfato e mudança de energia de mitocôndria de fígado de rato após fotoirradiação. Utilizaram um Laser Argônio ($\lambda = 660$ nm) e uma densidade de potência de 10 mW/cm², observando aumento significativo no consumo de oxigênio nas fluências 0,6 J/cm² e 1,2 J/cm² ($P < 0,05$) e aumento da atividade de NADH nas fluências 0,6 J/cm²; 1,2 J/cm²; 2,4 J/cm² e 4,8 J/cm²

($P < 0,05$). Segundo estes autores, esse aumento no consumo de oxigênio está associado ao aumento de oxigenação do citocromo oxidase c, da cadeia respiratória mitocondrial (YU *et al.*, 1997)

Karu *et al.* (2001_a), irradiaram células HeLa suspensas em meio suplementado com 10% SFB, com diodo (820 ± 10 nm), com fluências de 16-120 J/cm². Observaram que a radiação pulsada modula a adesão celular, os radicais livres e os processos redox, estando esta envolvida na interação célula-matriz, provavelmente em algum(s) estágio(s) da transdução do fotosinal. Ambos tipos de reações na cadeia respiratória, o aumento do fluxo de elétrons e produção de espécies reativas de oxigênio, causam *stress* oxidativo transitório no citoplasma.

Outros pesquisadores estudaram o *stress* oxidativo causado pelas alterações nas funções mitocondriais (DALTON; SHERTZER; PUGA, 1999). Sob irradiação, quando a cadeia respiratória é ativada, taxas mais altas de fluxo de elétron e utilização de oxigênio, acoplada com a maior oxidação da coenzima Q, promoverá altas taxas de formação superóxido em ambos pontos de escape de elétrons. Um terço do total de O₂⁻ produzido ao longo do transporte de elétrons da cadeia ocorre no nível de NADH-desidrogenase e dois terços ocorre no nível de ubiquinol-citocromo oxiredutase c (BOVERIS; CHANCE, 1973). O excesso de geração de espécies reativas de oxigênio perturba o balanço redox celular. A alteração transitória no balanço redox (potencial redox) foi considerada como o estágio crucial na resposta secundária da célula a irradiação (KARU *et al.*, 1988).

Em nosso trabalho, observamos aumento da proliferação celular em células irradiadas, em 685 nm, com fluências de 2, 4 e 8 J/cm², submetidas a *stress* nutricional, que também pode ser explicada, entre outras hipóteses, pelo efeito da irradiação Laser no consumo de oxigênio e na fosforilação oxidativa mitocondrial, participando das leis básicas do Processo Fotobioquímico.

Nosso estudo teve como alvo principal a investigação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos no processo neoangiogênico, após a Revascularização Miocárdica com Laser de CO₂. Uma das possibilidades é que ocorra um efeito bioestimulatório que induza a neoformação de vasos sanguíneos pelo aumento da proliferação de células endoteliais. Este efeito bioestimulatório pode ocorrer devido a

existência de um Efeito Residual do Laser de Alta Potência, neste caso o Laser de CO₂, descrito por Ohshiro e Calderhead (1991).

Novas abordagens para o aumento da angiogênese no miocárdio isquêmico pela introdução de fatores de crescimento, como por exemplo, o fator de crescimento derivado de endotélio vascular (VEGF) e o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), estão sendo adaptados e têm sido encontrados efeitos benéficos em pacientes com angina severa (LOSORDO *et al.*, 1998). O Laser de Baixa Potência tem demonstrado modular vários processos biológicos em cultura de tecidos e modelos animais. (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996; KARU, 1998; 1999). A irradiação Laser tem efeitos como aumento da respiração mitocondrial e síntese de ATP (MORIMOTO, 1994; YU, 1997), aceleração do processo de cicatrização de feridas (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996) e promoção do processo regenerativo de músculo esquelético após injúria (BIBIKOVA; ORON, 1993; WEISS; ORON, 1992). Após irradiação na zona de injúria de músculo esquelético, foram observados diminuição da resposta inflamatória (BIBIKOVA; ORON, 1993) e aumento da neoformação de vasos sangüíneos (BIBIKOVA; BELKIN; ORON, 1994).

O estímulo a arteriogênese primária inclui o processo inflamatório, onde uma invasão de monócitos e outras células sangüíneas brancas participam da produção de fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de fibroblastos, com subsequente crescimento vascular (SCHAPER; BUSCHAMANN, 1996; SCHAPER; ITO, 1999). Há uma hipótese de que o uso de energia Laser aumenta a resposta inflamatória, aumentando a arteriogênese em comparação com meios mecânicos, como é o caso dos Lasers Ho:YAG (Holmium:YAG) e CO₂ que situam-se na região infravermelha do espectro e usam ablação termal para criar canais transmiocárdicos (HUGLES *et al.*, 2002).

Hugles *et al.* (2002), realizaram um trabalho comparando a Revascularização Transmiocárdica Mecânica e a Laser. Concluíram que a Revascularização Transmiocárdica com implante mecânico (TMI), não parece promover angiogênese fisiologicamente significativa em isquemia crônica do coração de porcos, entretanto, o Laser Ho: YAG, produz um grande aumento de neovascularizações na zona miocárdica isquêmica destes animais.

O fato da RTM mecânica não produzir efeitos neoangiogênicos tão significativos quanto a RTM com Laser, sustenta a hipótese da ocorrência de um possível Efeito Residual do Laser de CO₂ neste procedimento cirúrgico, conforme suspeita que nos motivou a desenvolver o presente estudo.

Yaakobi em 2001, observou redução na área e dilatação do ventrículo esquerdo em corações de ratos após isquemia miocárdica crônica, quando utilizaram um diodo Laser (804 nm) e 5 mW/cm² de irradiância. Foi observada maior formação dos vasos sanguíneos no coração do grupo irradiado em comparação aos ratos não irradiados.

O que evidenciamos em nossos experimentos, foi que o Laser de Baixa Potência pode Bioestimular células endoteliais em cultura, causando um aumento significativo da proliferação celular, o que pode ser um provável caminho da neovascularização Laser-induzida, através da estimulação de zonas previamente hipoperfundidas.

Vários pesquisadores investigam os mecanismos de ativação da neoangiogênese, após RTM com Laser (KEITH *et al.*, 1999; WEI LI *et al.*, 2001; CHERIAN *et al.*, 2000; HUGLES *et al.*, 2000) e já existem estudos sobre o emprego da TLBP na atenuação de zonas afetadas após infarto miocárdial em modelo animal (ORON, 2001; YAAKOBI, 2001). Porém, as vias iniciais dos mecanismos que ocasionam a neovascularização miocárdica pós-RTML, ainda não estão completamente compreendidas, fazendo-se necessário estudos mais aprofundados sobre os efeitos fotobioquímicos envolvidos, para que haja melhor elucidação deste processo num futuro próximo.

7 - Conclusão

7 - Conclusão:

1. Podemos inferir neste estudo que o Laser InGaAlP (685 nm) com fluência 2 J/cm^2 e potência 10 mW promove crescimento estatisticamente significativo em células endoteliais da linhagem CIPs, em estado de *déficit* nutricional parcial (5% soro fetal bovino). Este Laser, nesta dosimetria, não supre a deficiência de nutrientes desta linhagem em meio de cultura sem soro fetal bovino e não interfere na proliferação celular das culturas irradiadas em homeostase;
2. Este Laser de Baixa Potência, neste comprimento de onda, promove bioestimulação em células da linhagem CIPs em estado de *déficit* nutricional parcial, nas fluências 2; 4 e 8 J/cm^2 e potências 10 e 20 mW, sendo a densidade de energia o parâmetro mais significativo frente as respostas de proliferação celular e encontrando-se em 8 J/cm^2 a fluência mais eficaz no processo bioestimulatório.
3. Ocorre após a irradiação das células endoteliais em estado de *déficit* nutricional parcial, uma reorganização dos filamentos de actina-F do citoesqueleto, possivelmente associada à adesão focal celular. Acreditamos que isto ocorra pela atuação do Laser nas vias de transdução de sinais. Não podemos deixar de sinalizar que a magnitude do efeito bioestimulatório depende fundamentalmente do estado fisiológico inicial da célula, antes da irradiação Laser.

8 – Direcionamentos Futuros

Estes resultados dos fenômenos fotobiológicos nos levam a acreditar que no início deste milênio, após o desenvolvimento de estudos mais amplos e experimentos *in vivo*, descortinar-se-á a possibilidade do emprego, em determinados casos, da Laser Terapia de Baixa Potência na Fotobioremodelação Celular Miocárdica, em procedimentos de Revascularização Cardíaca. Tais avanços, transformarão num futuro próximo a Fotomedicina em uma nova arma terapêutica, menos invasiva e com maior “*cost effectiveness*”, tanto para as instituições hospitalares, quanto para os pacientes; vindo desta forma melhorar a qualidade de vida destes coronariopatas.

8 - Referências Bibliográficas

8 - Referências Bibliográficas

ABERGEL, R.P. Control of connective tissue metabolism by lasers; recent developments and future prospects. **J Am Acad Dermatol**, v.11, n.6, p.1142-1150, 1984.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1179-1181 p.

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

ALMEIDA-LOPEZ, L. **Análise *in vitro* da Proliferação celular de fibroblastos de Gengiva Humana tratados com Laser de Baixa Potência**. 1999.2-30p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

AL-WATBAN, F.A.H.; ZHANG, Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. **Laser Therapy**, p. 119-124, 1994.

ARMELIN, E.; MACRUZ, R.; GOMES, O.M. *et al.* Novo cateter intravascular para aplicação do raio laser. **Arq Bras Cardiol**, v.37, p.125, 1981.

ASHCROFT, S.J.; ASHCROFT, F.M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. **Cel Signalling**, v.2, p.197-214, 1990.

ASHFORD, M.L.J. *et al.* Cloning and functional expression of a rat heart K_{ATP} channel. **Nature**, v.370, p.456-459, 1994.

BALL, D.J. *et al.* Decreased efficiency of trypsinization of cells following Photodynamic Therapy. **Photochem Photobiol**, v.73, n.1, p.47-53, 2001.

BAPTISTA, I. M.C. **Análise do Efeito do Laser de Baixa Potência, na Prevenção de Deiscência Incisional em Cirurgia Cardíaca**. 2003. Tese (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

BASERGA, R. **Cell growth and division - a practical approach**. Philadelphia: IRL Press, 1990, p.1-16.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers Surg Med**, v.16, n.4, p.331-342, 1995.

BAXTER, G.D. **Therapeutic Lasers - theory and practice**. Singapore: Churchill Livingstone, 1994. p.1-21.

BAYER, R. Ethics, policts, and access to health care: a critical analysis of the President's Commission for the study of ethical problems in medical and biomedical and behavioral research. **Cardozo Law Rev Winter**, v.6, n.2, p.303-320, 1984.

BERSE, B. Hypoxia augments cytokine transforming growth factor-beta (TGF-beta) and (IL-1) induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. **Cin Exp Immunol**, v.115, n.1, p.176-182, 1999.

BIBIKOVA, A.; ORON, U. Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat. Rec.**, v.235, p.374-380, 1993.

BIBIKOVA, A.; BELKIN, V.; ORON, U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. **Anat Embryol**, v.190, p.597-602, 1994.

BIHARI, J.; MESTER, A.R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neon Laser Plus infrared lasers, and noncoherent light: Preliminary report of a randomized double blind comparative study. **Laser therapy**, v.1, n.2, p.97, 1989.

BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne Laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment *in vitro*. **Lasers Life Sci**, p.125-34, 1986.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effects of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v.134, n.3, p.707-716, 1973.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998. 28-42 p.

BUONASSISI, V. Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. **Exp Cell Res**, v.76, n.2, p.363-368, 1973.

CALDERHEAD, R.G. **The Nd:YAG and GaAlAs lasers: a laser comparative analysis in pain therapy**. In: ATSUMI K; NIMSAKUL N LASER TOKYO: Japan Society for Laser Medicine, 1981. P. 21.

CALDERWOOD, D.A.; SHATTIL, S.J.; GINSBERG, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. **J Biol Chem**, v.275, n.30, p.2607-2610, 2000.

CALLOW, A.D. Vascular permeability factor accelerates endothelial regrowth following balloon angioplasty. **Growth Factors**, v.10, n.3, p.223-228, 1994.

CHAVANTES, M.C.; JATENE, A.D: Uso do Laser na Medicina Cardiovascular. **Rev Bras Cardiol**, 1990.

CHAVANTES, M.C. *et al.* Acute effects of Transmyocardial Revascularization on left ventricular function in intractable angina. **Am Soc Laser Med Surg**, p.6-7, 1994.

_____.; OLIVEIRA, A.S.; DALLAN, L.A. Effects of Transmyocardial revascularization in Intractable Angine. **Laser Surg Med**, v.11, p. 6-7, 1999.

_____.; BAPTISTA, I.M.C; ZANGARO, R.A.; PACHECO, M.T.T.; OLIVEIRA, S.A. Prevention of wound Dehiscence in Cardiothoracic Surgery Using Low Power Laser Therapy. **Lasers Med Sci**, v.18, (Suppl. Ad.) S3, 2003_a.

_____.; RICCI, R.; PAZOS, M.C.; PACHECO-SOARES, C.; PACHECO, M.T.T. Can the Laser Residual Effect of Heart Laser Surgery. **Lasers Med Sci**, v.18 (Suppl. Ad.) LT9, 2003_b.

CHERIAN, S.M. *et al.* Ultrastructural and immunohistochemical analysis of early myocardial changes following Transmyocardial Laser Revascularization. **J Card Surg**, v.15, n.5, p.341-346, 2000.

CHOI, D.W. Isquemia-induced neuronal apoptosis. **Curr Opin Neurobiol**, v.6, p.667, 1996.

CHOY, D.S. Human coronary laser recanalization. **Clin Cardiol**, v.7, n.7, p.377-381, 1984.

COHEN, R.A. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. **Prog Cardiovasc Dis**, v.38, p.105-128, 1995.

COLVER, G.B. PRIESTLEY, G.C. Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing "*in vitro*". **Br J Dermatol**, v. 121, p. 179-186, 1989.

CONLAN, M.J; RAPLEY, J.W.; COBB, C.M. Bioestimulation of wound healing by Low Energy Laser irradiation: a review. **J. Clin Periodontol**, v.23, p. 492-496, 1996.

COOPER, G.M. **A célula: uma abordagem molecular**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 547-584p.

COTRAN R.S.; KUMAR V.; COLLINS T. **Robbins - Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 2-14p.

DALLAN, L.A. *et al.* **Anastomose veno-venosa com raios laser: estudo comparativo experimental**. In: Anais do XXXIX CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 1983, Salvador, BA. Anais...Salvador, 1983.

_____.; CHAVANTES, M.C. *et al.* Transmyocardial Laser Revascularization. **Arq Bras Cardiol**, v.72, n.4, p.441-450, 1999.

DALTON, T.P.; SHERTZER, H.G.; PUGA, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.39, p.67-101, 1999.

DANIEL, R. L. A. P. **Análise comparativa da citotoxicidade *in vitro* do iodofórmio e do hidróxido de cálcio empregando-se dois veículos diferentes**. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado em Endodontia - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWEL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v.369, p.131-135, 1995.

DE SCHEERDER, I.K. Intravascular low power red laser light as an adjunct to coronary stent implantation evaluated in a porcine coronary model. **J Invasive Cardiol**, v.10, n.5, p.263-268, 1998.

DONG, Z. *et al.* Development of porous defects in plasma membranes of ATP depleted Mabin-Darby canine Kidney cells and its inhibition by glycine. **Lab Invest**, v.78, p.657, 1998.

DOORNECAMP, N.G.F.; BORST, C.; POST, J. Endothelial cell recovery and intimal hyperplasia after endothelium removal with or without smooth muscle cell necrosis in the rabbit carotid artery. **J Vas Res**, v.33, p.146-155, 1996.

DYER, P.E.; AL-DHAHIR, R.K. Transient photoacoustic studies of laser tissue ablation. In: Jacques S. L. & Katzir, SPIE, Bellingham. **Laser Tissue Int**, p. 46-60, 1990.

DYSON, M.; YOUNG, S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. **Lasers Med Sci**, v.1, p.125-129, 1986.

ENWEMEKA, C.S. *et al.* Morphometries of collagen fibril populations in He-Ne laser photostimulated tendons. **J Clin Laser Med Surg**, p. 47-52, 1990.

FOLKMAN, J.; MOSCONA, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, v.273, p.345-349, 1978.

FOLKMAN, J.; HAUNDENSCHILD, C. **Nature**, v.288, p.551-556, 1980.

FRESHNEY, R. I. **Biology of the cultured cell: A manual of basic technique**. 2 ed. New York: Wiley- Liss, 1990. 347p.

FUSTER, V. Understanding the coronary disease process and the potential for prevention: a summary. Review. **Prev Med**, v.29, p.59 –100, 1999.

GALANTIER, M. *et al.* Revascularização Transmiocárdica a Laser. **Rev Bras Cir Cardiovas**, v.11, p.67-74, 1996.

GAMALEYA, N.F. **Laser Biomedical research in the USSR.** In: LASER APPLICATIONS IN MEDICINE AND BIOLOGY. 3 ed., New York: Wolbarsht, 1987. 173p.

GENOVESE, W. J. **Revisão laser.** 2 ed. São Paulo: Pancast, 1991. 23-56p.

GHALI, L.; DYSON, M. The direct effect of light therapy on endothelial cell proliferation in vitro. **EXS**, v.61, p.411-414, 1992.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v.285, n.5430, p.1028-1032, 1999.

GOLDMAN, L. **The biomedical laser: technology & clinical applications.** New York: Springer Verlag, 1981. 5-25 p.

GRAHAN, D.J.; ALEXANDER, J.J. The effects of argon laser on bovine aortic endothelial and smooth muscle cell proliferation and collagen production. **Curr Surg**, v.47, n.1, p.27-30, 1990.

GROSSMAN, N. *et al.* 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures, involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg Med**, v.21, p. 212-218, 1998.

HEIN, R. *et al.* Laser light of low power density does not influence chemotaxis and collagen synthesis of human dermal fibroblasts. **Laser Med Sci**, v.7, p.79-83, 1992.

HUGLES, G.C.; KYPSON, A.P.; YIN, B. Induction of angiogenesis after TMR: a comparison of holmium: YAG; CO₂ and excimer lasers. **Ann Thorac Surg**, v.70, p.504-509, 2000.

HUGHES, G.C. *et al.* A comparison of Mechanical and Laser Transmyocardial Revascularization for induction of angiogenesis and arteriogenesis in chronically ischemic myocardium. **J Am College Cardiol**, v.39, n.7, p.1220-1228, 2002.

ISNER, J.M.; LOSORDO, D.W. Therapeutic angiogenesis for heart failure. **Nat Med**, v.5, n.5, p.491-492, 1999.

JACQUES, S.L. Laser-tissue interactions: photochemical, photothermal and photomechanical. **Surg Clin North Am**, v.72, p.531-558, 1992.

KAJITA, G. T. **Efeitos do Laser de Baixa Potência no Membro Pós-Safenectomizado em Diabéticos Submetidos a Revascularização Miocárdica.** 2002. Tese (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

KAMEYA, T. *et al.* Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. **Laser Therapy**, v.7, p.33-36, 1995.

KANA, J.S.; HUTSCHENREITER, G.; HAM, D.; WAIDELICH, W. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Arch Surg**, v. 116, 293-6, 1981.

KARU, T. *et al.* Photobiochemistry of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light. **I. SRCTL**. V. 7, p.1-37, 1985.

KARU, T. *et al.* Photobiological fundamentals of low power laser therapy. **IEEE J Quantum Electron**, v.23, p.1703, 1987.

_____. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. **Laser Life Sci**, v.2, n.1, p.53-74, 1988.

_____. Helium-Neon laser-induced respiratory burst of phagocyte cells. **Lasers Surg Med**, v.9, p.585-588, 1989.

_____. Effects of visible radiation on culture cells. **J Photochem Photobiol**, v.52, p.1089, 1990.

_____. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. **J Photochem Photobiol**, v.12, n.3, p.305-310, 1992.

_____.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **J Photochem Photobiol**, v.27, n.3, p.219-223, 1995.

_____. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of HeLa cells in vitro. **Lasers Surg Med**, v.18, n.2, p.171-177, 1996.

_____. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers Life Sci**, v.2, n.1, p. 53-74, 1998.

_____. A suitable model for wound healing: how many times are we to stumble over the same block? Letter to Editor, **Lasers Surg Med**, v.25, p.283; 1999.

_____. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J Photochem Photobiol**, v.49, n.1, p.1-17, 1999.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDU, G. Cell attachment to extracellular matrices is modulated by pulsed radiation at 820 nm and chemicals that modify the activity of enzymes in the plasma membrane. **Lasers Surg Med**, v.29, n.3, p.274-281, 2001_a.

_____. Donors of NO and pulsed radiation at $\lambda = 820$ nm exert effects on cell attachment to extracellular matrices. **Toxicol Lett**, v.121, n.1, p.57-61, 2001_b.

KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA J.R.M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. **Int Dent J**, v.18, n.2, p.443-467, 1968.

KEITH, A. Up-regulation of vascular endothelial growth factor RNA and angiogenesis after Transmyocardial Laser Revascularization. **Ann Thorac Surg**, v.68, p.825-829, 1999.

KHANNA, A. *et al.* Augmentation of the expression of proangiogenic genes cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. **Cardiovasc Radiat Med**, v.1, p.265-269, 1999.

KIMURA, Y. *et al.* Effects of nanosecond pulsed Nd: YAG laser irradiation on dentin resistance to artificial caries-like lesions. **Lasers Surg Med**, v. 20, n.1, p.15-21, 1997.

KIPSHIDZE, *et al.* Low-Power Helium:Neon Laser Irradiation Enhances Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Endothelial Cells *in vitro*. **Lasers Surg Med**, .28, p.355-364, 2001_a.

KIPSHIDZE, N. *et al.* Effect of short pulsed nonablative infrared laser irradiation on vascular cells in vitro and neointimal hyperplasia in a rabbit balloon injury model. **Circulation**, v.104, n.15, p.1850-1855, 2001_b.

KOVÁCS, I.B.; MESTER, E.; GÖRÖG, P. Stimulation of wound healing with laser beam in the rat. **Experientia Basel**, v. 3, n.11, p.127-6, 1974.

KRONEMANN, N. *et al.* Aggregating human platelets stimulate expression of vascular endothelial growth factor in cultured vascular smooth muscle cells through a synergistic effect of transforming growth factor beta (1) and platelet-derived growth factor (AB). **Circulation**, v.100, p.855-860, 1999.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C.M. Myths about cardiovascular diseases. **Arq Bras Cardiol**, v.76, n.2, p.99-110, 2001.

LIEVENS, P.C. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY**. Proceeding... Bologna, Itália. 1986, p. 171-174.

_____. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. **LASER.J Eur Med Laser Ass**, v.1, n.2, p.12, 1988.

_____. The effect of a combined He:Ne and I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. **Laser News**, v.3, n.3, p.3-9, 1990.

_____. The effect of I.R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med Sci**, v.6, p. 189-191, 1991.

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Prog Cardiovasc Dis**, v.38, p.87-104, 1995.

LOSORDO, D.W. *et al.* Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of ph VEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. **Circulation**, v.98, n.25, p.2800-2804, 1998.

LUBART, R.; FRIEDMANN H.; SINYKOV M.; GROSSMAN N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v.7, p. 101-106, 1995.

LUBART, R. *et al.* Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers Surg Med**, v.21, n.5, p.493-499, 1997.

MA, X.L.; WEYRICH, A.S.; LEFER, A.M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. **Circ Res**, v.72, p.403-412, 1993.

MACRUZ, R. *et al.* Possibilidades terapêuticas do raio "LASER" em ateromas. **Arq Bras Cardiol**, v.32, p.176, 1979.

MAIER, M.; HAINA D.; LANDTHALER, M. Effect of low laser on the growth and regeneration of capillaries. **Laser Med Sci**, v.5, p.381-386, 1990.

MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in ruby. **Nature**. V.187, p.493-494, 1960.

MARTIN, V.T.W.; CORTI, L.; VELUSSI, C. an experimental study of the healing effect of the HeNe laser and the infrared laser. **Laser Med Sci**, v.3, p.151-163, 1988.

MARUYAMA, K. *et al.* Interleukin-1 beta upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR via activation of protein tyrosine kinases. **Mol Cell Cardiol**, v.31, p.607-617, 1999.

MCKENZIE, A. L. Physics of thermal processes in laser-tissue interaction. **Phys Med Biol**, v.35, p.1175-1209, 1990.

MESTER, E. A. Laser sugar alkamazaea a gyogyezatban. **Orv Hetilap**, v.107, p.1012, 1966.

MIRHOSEINI, M.; CAYTON, M.M. Revascularization of the heart by laser. **J Microsurg**, v.2, p.253-260, 1981.

_____. Myocardial Revascularization by Laser. A clinical report. **Lasers Surg Med**, v.3, p.241-245, 1983.

MIRÓ, L.; COUPE, M.; CHARRAS, C.; JAMBON, C.; CHEVALIER, J.M. Estudio capiloroscóptico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. **Inv Clin Laser**, v.1, n.2, p.9-14, 1984.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A; PALMER, R.M.J. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, p.109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. The L-arginine - nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v.329, p.2002-2012, 1993.

MORIMOTO, Y. Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. **Lasers Surg Med**, v.15, n.2, p.191-199, 1994.

MORRONE, G. et al. Muscular trauma treated with a Ga-Al-As diode laser: In vivo experimental study. **Lasers Med Sci**, v.13, p.293-298, 1998.

OHSIRO, T.; CALDERHEAD, R.G. Laser therapy: a decade further on. **Laser Therapy**, v.10, p. 5-6, 1998.

OHSIRO, T.; CALDERHEAD, R.G. **Progress in laser therapy**. Chichester, London: John Wiley, 1991.

_____. The development of low reactive-level Laser Therapy (LLLT) and its present status. **J Clin Laser Med and Surg**, v.9, n.4, p.267-275, 1991.

OKADA, M. *et al.* Alternative method of myocardial revascularization by laser: experimental and clinical study. **J Med Sci**, v.32, p.151-161, 1986.

OLIVEIRA, A.S; DALLAN, L.A.O.; LISBOA, L.A.F.; CHAVANTES, M.C.; CESAR, L.A.M.; PARDI, M.M.; JATENE, A.D. Revascularização Transmiocárdica com Laser de CO₂. Experiência Clínica Inicial. **Arq Bras Cardiol**, v. 72 , p.441-445, 1999.

ORON, U.; AD, N. Impact of Low Laser Irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v.80, p.109-116, 2001.

POLLARD, J. W. Basic cell culture. In: POLLARD, J. W.; WALKER, J.M. **Methods in molecular biology: animal cell culture**. New Jersey: Humana Press, 1990. 1-12p.

PÖNTINEN, P.J. **Low level laser therapy as a Medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, 1992. 13-17 p.

REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. **Lasers Surg Med**, v.22, p.281-287, 1998.

RICCI, R.; CHAVANTES, M.C.; PACHECO-SOARES, C.; PAZOS, M.C.;PACHECO, M.T.T. **In vitro study of heart fibroblasts cells proliferation through bioestimulation with AsGa laser radiation.** In: SIMPÓSIO DE METODOLOGIAS INTEGRADAS NO ESTUDO DA BIOLOGIA, 2002, Curitiba, PR. Anais...Curitiba sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2002.

RIGAU, J. **Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular.** Reus, 1996. Tese de Doutorado em Histologia - Facultad de medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili.

ROCHKIND, P. *et al.* Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.

SCHAPER, W.; ITO, W.D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. **Circ Res**, v. 79, p. 911-9, 1996.

SCHAPER, W.; BUSCHAMANN, I. Arteriogenesis, the good and bad of it. **Cardiovasc Res**, v.43, p.865-867, 1999.

SCHINDL, A. *et al.* Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br J Dermatol**, v.148, n.2, p.334-336, 2003.

SCHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. **J Dent**, v.22, n.2, p.S6-S11, 1994.

SEKO, Y. Hypoxia induces activation and subcellular translocation of focal adhesion kinase [p125 (FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.262, n.1, p.290-296, 1999.

SHOJI, N. **Estudo Sobre o Efeito do Laser de Baixa Potência em Deiscência da Safenectomia Pós-Revascularização Miocárdica**. 2003. Tese (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

SKINNER, S. *et al.* A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Aust Dent J**, v.41, p.3, 1996.

SROKA, R. *et al.* Effect on mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelength. **Laser Surg Med**, v.25, p.263-271, 1999.

STEINLECHNER, C.W.B.; DYSON, M. The effects of low laser therapy on the proliferation of keratinocytes. **Laser Therapy**, v.5, p.65-73, 1993.

SURINCHAK, J.S.; ALAGO, M.L.; BELLAMY, R.F. Effects of low-level energy lasers on the healing of full thickness skin defects. **Lasers Surg Med**, v. 2, p.267-74, 1983.

TANG, J. *et al.* Morphologic changes in collagen fibbers after 830 nm diode laser welding. **Laser Surg Med**, v.21, p.438-443, 1997.

TOLENTINO, M.J. *et al.* Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in a rat model. **Ophthalmology**, v.103, n.11, p.1820-1828, 1996.

TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. Laser HeNe 632nm come attivatore della cicatrizzazione. **Bolletino Italia AIVPA**, v.23, n.2, 1984.

TRELLES, M.A. *et al.* The action of low-reactive level laser therapy (LLLT) on Mast Cells: a possible pain relief mechanism examined. **Laser Therapy**, v.1, n.1, p.27-30, 1989.

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

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.

WEI, L.I. *et al.* Transmyocardial Laser Revascularization induced angiogenesis correlated with the expression of matrix metalloproteinases and platelet-derived endothelial cell growth factor. **Eur J Cardiothorac Surg**, v.19, p.156-163, 2001.

WEISS, N.; ORON, U. Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. **Anat Embryol**, v.186, p.497-503, 1992.

YAAKOBI, T. Long-term effect of low energy laser irradiation on infarction and reperfusion injury in the rat heart. **J Appl Physiol**, v.90, n.6, p.2411-2419, 2001.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v.332, p. 411-415, 1988.

YEW, D.T.; LAW, S.T.L.; CHAN, Y.W. Effect of low dose laser on the chorioallantoic culture of retinal pigments cells. **Acta Radiol Oncol**, v.21, p.433-436, 1982.

YU, W. *et al.* Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochem Photobiol**, v.66, n.6, p.866-871, 1997.

ZACHARY, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.280, p.1375-1386, 2001.