



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITO DO LASER DE DIODO (808 nm) DE ALTA
POTÊNCIA NO CRESCIMENTO DE CULTURA
DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS**

CRISTIANE BAGGIO POLIDO

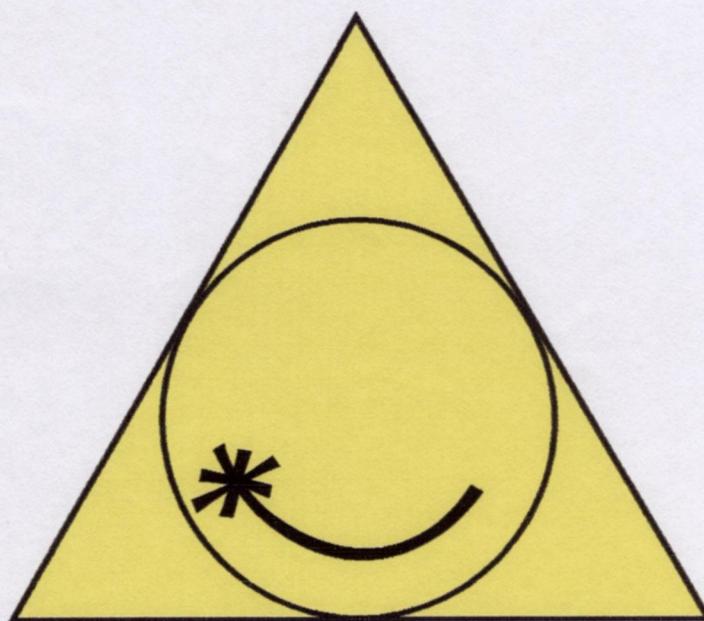
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional na área de Lasers em Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. Niklaus Ursus Wetter

Co-Orientadora:
Profa. Dra. Sheila Gouw-Soares

**São Paulo
2005**





**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM
ODONTOLOGIA**



Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

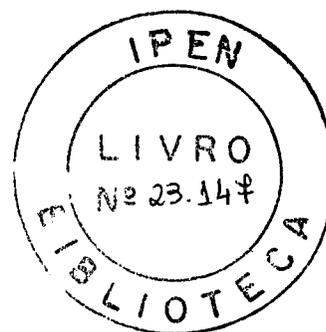
CRISTIANE BAGGIO POLIDO

*EFEITO DO LASER DE DIODO (808nm) DE ALTA POTÊNCIA NO CRESCIMENTO
DE CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS*

SÃO PAULO

2005

CRISTIANE BAGGIO POLIDO



***EFEITO DO LASER DE DIODO (808nm) DE ALTA POTÊNCIA NO CRESCIMENTO
DE CULTURA DE CÉLULAS DE FIBROBLASTOS HUMANOS***

Dissertação apresentada ao Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares e à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Lasers em Odontologia.

Orientador: Prof Dr. Niklaus Ursus Wetter

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sheila Gouw

SÃO PAULO

2005



PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 17/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Efeito do laser de diodo (808nm) de alta potência no crescimento de cultura de células de fibroblastos humanos*". de responsabilidade da Pesquisadora **Cristiane Baggio Polido**, sob orientação do Professor Doutor **Niklaus Ursus Wetter**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd" Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de março de 2005

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP

À minha mãe, Maria Lúcia , meu respeito e admiração.

Ao meu pai, Gilberto, por suas sábias palavras.

Ao meu marido Waldemar e à minha filha Bruna, pelo amor incondicional e pelo apoio constante.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo,

agradeço pelo pioneirismo da técnica do laser em nosso País, e
pelo incansável incentivo a pesquisa,

à sua dedicação à minha formação profissional, como mestre,
educador e mentor,

como idealizador de uma escola acadêmica e científica da qual
tenho a honra de integrar,

como incentivador dos seus inúmeros descendentes nesta área
tão promissora da Odontologia.

Ao senhor, só tenho a agradecer.

Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por todas as oportunidades da minha vida, inclusive a de realizar mais este desafio.

Ao **Professor e Orientador Niklauss Wetter**, pelo apoio e atenção dispensadas durante todo o Curso, mostrando-se sempre muito acessível e gentil.

À **Professora Denise Zzell** pela dedicação ao crescimento de novos colaboradores científicos do laser na áreas da Física e da Odontologia bem como ao enriquecimento de novas pesquisas.

À **Luciane**, pelo incansável apoio e dedicação ao trabalho, como amiga e como mestra. Pela disponibilidade e atenção em responder às minhas dúvidas.

À **Fernanda**, pela colaboração e essencial ajuda para que este trabalho se realizasse.

A **Professora Márcia Marques**, por disponibilizar o laboratório e incentivar tanto a pesquisa. Pelo apoio, dedicação e orientação, sem a qual nada teria sido possível.

Aos **professores do IPEN**, pelo engrandecimento na área da Física. Agradeço em meu nome e de todos os meus colegas.

Aos **professores e colegas da Faculdade de Odontologia da FOU SP**, pela agradável convivência, pela amizade, atenção e dedicação.

Aos **colegas de Mestrado**, pela grande amizade e agradável convivência durante todo o Curso. Pelos bons momentos e pelas construtivas conversas.

À **Cida**, por seu profissionalismo e dedicação ao curso de laser e pelo apoio aos alunos e a toda a equipe.

À **Lili**, pela delicadeza com que sempre atende a todos com seu suporte.

Ao **Aroldo**, sempre prestativo a qualquer pedido.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**“Há homens que lutam um dia e são bons
Há homens que lutam um ano e são melhores
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons
Mas há aqueles que lutam toda uma vida, e estes são os
imprescindíveis.”**

Bertold Brecht

RESUMO

O laser de baixa potência tem sido utilizado em tratamentos odontológicos visando melhorar a reparação cicatricial nos tecidos. Com o objetivo de comparar o efeito destes lasers com o laser de diodo de comprimento de onda de 808 nm em alta densidade de potência, usando a mesma dose, foi empregada uma linhagem de fibroblastos gengivais humanos *in vitro*. Os fibroblastos de gengiva humana cresceram em meio DME contendo 10% de soro fetal bovino (SFT). Assim foi proposto um modelo de estudo em que se trabalhou com fibroblastos em condições de déficit nutricional parcial (meio de cultivo DME com 5 % de soro fetal bovino), simulando-se situação de estresse celular. Células LMF foram dispostas em três placas de Petri e cultivadas nessa concentração de SFB. Após 48 horas, as placas foram divididas em cinco grupos e realizadas em triplicata: um grupo controle, um irradiado com densidade de potência de 250 mW/cm^2 , seguido dos outros grupos com densidades de 500 mW/cm^2 , 1000 mW/cm^2 e 1500 mW/cm^2 , respectivamente, irradiados com densidade de energia de 2 J/cm^2 , desfocado 1 cm, com respectivos tempos de 6,6 s, 4s, 2s, 1,33s. Foram realizadas duas irradiações com 12 horas de intervalo. A contagem celular foi feita 12 horas após o plaqueamento, quando ocorreu confluência de 50 % na maioria das placas, e outra após 16 horas. Por meio de análise estatística, concluiu-se que não houve diferença entre os grupos em relação ao grupo controle, apesar de uma melhor atuação no grupo quatro.

Palavras-chave: Laser de Alta Potência. Crescimentos de Células. Fibroblastos.

ABSTRACT

Low Level Laser Therapy (LILT) is used in odontologic treatments to improve wound healing. In the research we analyse the effect of LILT using diode laser irradiation at, 808 nm, *in vitro* in human fibroblasts. The gingival fibroblasts are grown in a DME medium with 10 % of fetal bovine serum (FBS), using growth conditions of partial nutritional deficit in order to simulate a stress condition. The fibroblasts were divided into five groups, control group, irradiation with 250 mW/cm², 500 mW/cm², 1000 mW/cm² and 1500 mW/cm², respectively. The energy density was in all cases 2 J/cm² and the fiber tip was kept at 1 cm from the cells, in order to achieve the respective irradiation intensities. Irradiation times were 6,6 s, 4s, 2s and 1,33s respectively. Two irradiations were applied with a 12 hour interval. The cellular count was done after 12 hours and after 16 hours. Statistically, there was no significant difference between the groups, although the mean value of group four was the highest.

Keywords: High Laser Therapy. Cells Grow. Fibroblast.

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

As-Ga	arsenieto de gálio
As-Ga-Al	arsenieto de gálio-alumínio
ATP	adenosina-trifosfato
ADP	adenosina-difosfato
C	Centígrado
cél	Célula
cels	Células
cm	Centímetro
cm ²	centímetro quadrado
λ	comprimento de onda
CO ₂	dióxido de carbono
DE	densidade de energia
DP	densidade de Potência
DME	<i>dulbecco's Modified Eagle</i> = Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	di-metil sulfóxido
DNA	<i>dexoribonucleic Acid</i> = Ácido desoxirrebonucleico
EDTA	<i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i> = Ácido etilendiamino tetracético
f	Frequência
FAF	fibroblast Activating Factor = Fator ativador de fbroblasto
g	Gama
Φ	diâmetro do feixe laser
Ga	Gálio
h	Horas
He-Ne	hélio Neônio
Hz	Hertz
J	Joule
Kg	Kilograma
m	Metro

min	Minutos
ml	Mililitro
μ l	Microlitros
mm	Milímetros
min/s	Minutos por Segundo
mW	Miliwatts
μ m	Micrômetro
N ₂	Nitrogênio
nm	Nanômetros
O ₂	Oxigênio
P	Potência
PBSA	<i>periodic Acid Schiff</i> = Coloração com o ácido periódico e reativo de Shiff
s	Segundo
SFT	soro Fetal Bovino
NA	Abertura numérica da fibra do laser
W	Watts
°C	graus Celsius
x100	Aumento de 100 vezes
x200	Aumento de 200 vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Escala de ondas eletromagnéticas	01
Figura 2	Descongelamento. Remoção células do nitrogênio líquido	23
Figura 3	Centrifugação do meio de cultura	24
Figura 4	Laser de diodo de 808 nm, marca comercial Lasering	26
Figura 5	Estufa (meio de cultura)	27
Figura 6	Posicionamento da fibra do Lasering para irradiação	28
Figura 7	Placa de meio de cultura em posição de irradiação	28
Figura 8	Distribuição das células nos poços das placas	31
Figura 9	Colocação do componente A, antes da incubação para fazer a leitura	31
Figura 10	Gráfico mostrando curvas do crescimento das células de cultura LMF, com o laser de diodo de alta potência desfocado, irradiado com $D_e = 2$ J/cm ²	33

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	5
3	REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1	Laser	6
3.1.1	Aspectos históricos.....	6
3.1.2	Introdução.....	7
3.1.3	Diferenças da ação entre luz visível e infravermelho.....	8
3.2	Cultura de células.....	9
3.2.1	Participação dos miofibroblastos	18
3.3	Comparação dos resultados na literatura.....	20
4	PROPOSIÇÃO / JUSTIFICATIVA	21
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	Cultivo celular.....	22
5.1.1	Obtenção da amostra.....	22
5.1.2	Descongelamento celular.....	23
5.1.3	Linhagem celular	23
5.1.4	CONTAGEM CELULAR	24
5.2	Laser utilizado.....	26
5.3	Grupos experimentais	27
5.3.1	Experimentos.....	29
5.3.2	Curvas de crescimento e de viabilidade celular	31
5.3.3	Análise estatística	32
6	RESULTADOS	33
7	DISCUSSÃO	35
8	CONCLUSÃO	38
	REFERÊNCIAS	39
	Anexos	

1 INTRODUÇÃO

A radiação laser é eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características bastante distintas daquelas de uma luz fluorescente ou de uma lâmpada comum.

A radiação laser é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda. É uma radiação com coerência espacial e temporal, onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo.

São estas características físicas, entre outras, que fazem o laser ter propriedades terapêuticas importantes (Laser de Baixa Potência ou Terapêutico).

O laser de diodo ou de semicondutor baseia-se no uso de arsenieto de gálio. O emprego de materiais mistos GaAs : (0,9 μ), GaAlAs : (0,7-0,9 μ m), InGaAsP : (1,2-1,6 μ m), permite alterar o comprimento de onda do laser de semicondutor (JGM ASSOCIATES, 1992).

O comprimento de onda é fator determinante da interação laser-tecido. O comprimento de onda pode variar desde o infravermelho distante até os raios gama dependendo do meio ativo que gera a radiação. (Fig. 1)

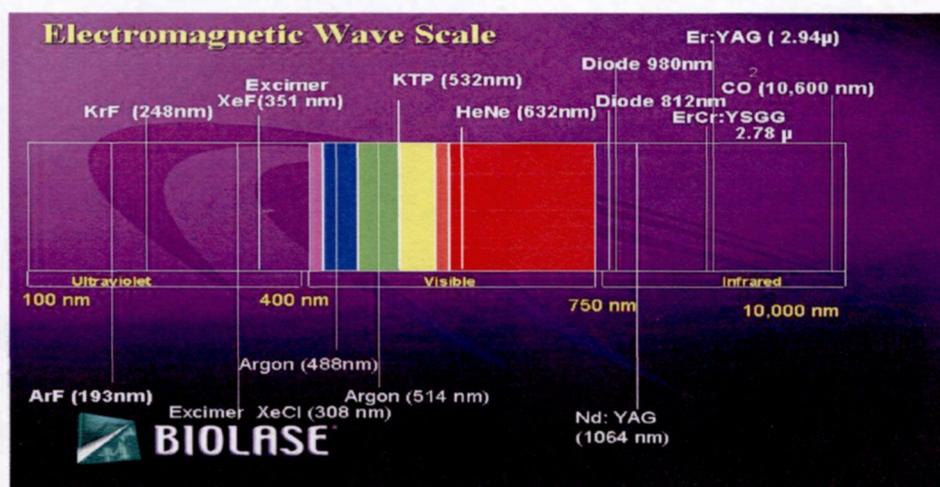


Figura 1: Escala de ondas eletromagnéticas

A moderna tecnologia do laser nos permite hoje realizar diversos procedimentos cirúrgicos com inúmeros sistemas de laser, cada um com indicações clínicas específicas. É necessária uma informação precisa sobre os equipamentos a serem usados, assim como os parâmetros de aplicações, como energia, taxa de repetição e potência.

A tecnologia laser, assim como os efeitos biológicos causados pela sua radiação, tem sido muito estudados nas diversas áreas da Odontologia. Os lasers podem ser divididos em dois grupos: os cirúrgicos (alta potência) e os não cirúrgicos (baixa potência). Na terapia com lasers de baixa potência a energia dos fótons absorvidos é transformada predominantemente em efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e no tecido.

Os lasers de baixa potência agem como moduladores teciduais (KARU et al., 1984; MARSHAL, 1972; MESTER; MESTER; MESTER, 1985), antiinflamatórios e analgésicos (TUNER; HODE, 1998; YLMAZ et al., 2002), podendo ser usados em diversos procedimentos nas mais distintas áreas odontológicas como em cirurgias orais, periodontia, dentística, ortodontia, pediatria, endodontia, semiologia entre outras.

Alguns efeitos da terapia com os lasers de baixa intensidade em nível celular já estão bem estabelecidos como a estimulação da atividade mitocondrial, (BAXTER, 1994; KARU et al., 1984; LOWE, 1998; KLIMA, 1998a, 1998b; MESTER; MESTER; MESTER, 1985), estimulação da síntese de DNA e RNA (KARU et al., 1984), variação do pH intra e extracelular, aceleração do metabolismo (DORTBUDAK et al., 2001; KLIMA, 1998a, 1998b), aumento da produção proteica e modulação da atividade enzimática.

O laser de baixa intensidade cada vez mais tem ficado conhecido em várias aplicações clínicas. Ao contrário dos lasers de alta potência, os “soft lasers” emitem luz em baixa densidade de energia e promove certas reações bioquímicas sem induzir a efeitos térmicos (KREISLER et al., 2003).

Dentre os lasers de baixa potência mais utilizados estão os semicondutores (AsGa e AsGaAl) e os lasers de HeNe. Os semicondutores idealizados e construídos por Mester (1969) e Marshall (1972), possuem diodo emissor constituído de Arseneto de Gálio (AsGa), cuja radiação apresenta comprimento de onda de 904 nm, correspondente a faixa do infravermelho no espectro eletromagnético. Hoje existem diodos que emitem luz em outros comprimentos de onda, inclusive na faixa do visível, como os Arseneto de gálio e alumínio (MESAWA et al., 1990).

Quando a célula tem a sua função debilitada esses efeitos são bastante evidentes (KARU, 1989). Estudos mostram que a terapia com o laser em baixa intensidade (LILT – Low Intensity Laser Therapy) tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos (VÉLEZ-GONZÁLEZ et al., 1994) por não serem visíveis ao olho humano, são até hoje, muito discutidos, e alguns modelos já foram propostos na literatura, na tentativa de desvendar o que realmente ocorre no tecido quando irradiados com baixa potência. O modelo mais aceito foi proposto em 1987 por Tina Karu, que sugeriu que ocorreram mudanças fotoquímicas em moléculas fotorreceptoras componentes da cadeia respiratória. Como resultado de fotoexcitação de estados eletrônicos, ocorreriam os seguintes fenômenos físicos e/ou químicos: alteração de propriedade redox, aceleração na transferência de elétrons, e mudanças na atividade bioquímica causando mudanças na atividade redox da mitocôndria.

Tem sido muito investigada a aplicação do laser na eliminação de endotoxinas no cemento ou na migração das células. Este efeito pode ser de suma importância para a cavidade bucal, pela estreita camada epitelial que permite a penetração do raio laser para as regiões da derme, oferecendo assim um estado privilegiado para tratamento das lesões.

Os lasers de baixa potência podem produzir efeitos em outras partes do corpo além do local de irradiação. Uma possível explicação para esse efeito sistêmico são as células do

tecido irradiado que possuem substâncias que são liberadas nos vasos sanguíneos e no sistema linfático (LONGO; MESTER, 1998, ROCKIND et al., 1998).

O comprimento de onda correto a ser utilizado com o laser de diodo tem benefícios para o paciente no pós-operatório, principalmente no que se refere às propriedades de coagulação e qualidade na incisão. A aplicação clínica do laser de diodo (980 nm) tem efeitos benéficos na prática odontológica (ROMANOS; NENTWIG, 1999).

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é analisar o efeito do laser de alta potência desfocado na proliferação de fibroblastos, utilizando a mesma densidade de energia de protocolos bem sucedidos no caso de lasers de baixa potência, porém com intensidade mais alta.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Laser

3.1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

O primeiro laser da história foi construído por Theodore Maiman, em 1960, era um laser de rubi, operando em 694,3 nm.

Um tipo especial de laser é o laser semicondutor, ou laser de diodo. Seus trabalhos datam de 1961, pouco tempo após o desenvolvimento do primeiro laser. É de enorme interesse econômico, pois suas dimensões são reduzidas e apresenta um alto grau de eficiência.

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).

O primeiro trabalho científico referente aos efeitos não térmicos do laser sobre a pele de ratos foi publicado em 1966 pelo grupo de estudo do professor Endré Mester que foi um dos pioneiros na pesquisa da aplicação do laser de baixa potência nas áreas biomédicas. Ele produziu um grande volume de trabalhos científicos, clínicos e experimentais, tendo o He-Ne, como tema central.

O laser operando em baixa potência foi considerado por Mester (1969), um bioestimulador, e por isso por um determinado período de tempo, encontramos na literatura essa terminologia utilizada como sinônimo para designar este tipo de laser, que também era

chamado de bioestimulação. Adotou esta terminologia porque basicamente utilizava essa terapia para acelerar o processo de cicatrização.

Os lasers terapêuticos mais utilizados nas décadas de 70 e 80 foram os de He-Ne com emissão na região do visível. Nesta região do espectro eletromagnético, a radiação laser apresenta pequena penetração nos tecidos biológicos.

A partir destes primeiros relatos, começaram a ser desenvolvidos lasers de diodo, semicondutores, dando origem ao primeiro diodo operando na região do infravermelho próximo ($\lambda = 904$ nm), constituído de um cristal de Arsenieto de Gálio (As-Ga). As vantagens deste sobre o He-Ne é que apresenta maior penetração no tecido biológico.

A partir dos anos 90, diferentes dopantes foram introduzidos na tecnologia para obtenção de um laser de diodo gerando uma larga faixa de comprimentos de onda.

Hoje, podem-se ter aparelhos pequenos, de fácil transporte e manuseio, com baixa frequência, além do baixo custo.

3.1.2. INTRODUÇÃO

Os lasers tiveram sua aplicação inicial no setor bélico, mas foram rapidamente introduzidos na área médica. As aplicações em oftalmologia e dermatologia foram as que incorporaram a tecnologia laser com maior rapidez.

Se a radiação de um laser de alta potência atingir um tecido alvo, dependendo do coeficiente de absorção deste tecido, ele poderá sofrer carbonização, vaporização, coagulação ou ainda ter suas proteínas desnaturadas ou degradadas.

Além dos efeitos foto-térmicos, existem outros efeitos não dependentes de calor, os quais criam igualmente alterações irreversíveis ou destruição do tecido, que são os efeitos foto-enzimáticos, foto-osmóticos e foto-iônicos (OHSHIRO; CALDERHEAD, 1998).

Os lasers de alta potência são muito usados na cavidade oral e em regiões periodontais. Dentre eles podemos citar o laser de diodo, CO₂, Nd: YAG, Er:YAG, Ho:YAG, argônio, dentre outros. Romanos et al. (1998), relata de acordo com o estado do tecido (inflamado, hiperplásico, com mais teor de fluidos ou sangue) e dos parâmetros do laser, é possível realizar um procedimento cirúrgico seguro sem complicações, sem a formação de cicatrizes e sem um alto índice de recorrência.

3.1.3 DIFERENÇAS DA AÇÃO ENTRE LUZ VISÍVEL E INFRAVERMELHO

A energia dos fótons de uma radiação laser absorvida por uma célula será transformada em energia bioquímica e utilizada em sua cadeia respiratória. Karu (KARU et al., 1984; KARU, 1987, 1989), descreveu um mecanismo de ação diferente para os lasers emitindo radiação na região do visível e do infravermelho próximo.

A luz visível induz a uma reação fotoquímica, ou seja, há uma direta ativação da indução de síntese de enzimas (BOLTON; YOUNG; DYSON, 1995), e essa luz tem como primeiros alvos os lisossomos e as mitocôndrias das células.

O mecanismo de interação do laser em nível molecular foi descrito inicialmente por Karu et al. (1984). Os incrementos de ATP mitocondrial que se produzem após a irradiação com laser, favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989, FRIEDMANN; LUBART; LAULICHT, 1991).

Em estados patológicos, o laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (KARU, 1989).

3.2. CULTURA DE CÉLULAS

O estudo *in vitro* utilizando cultura de células tem sido muito usado devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ podem ser obtido de maneira precisa, além de conseguir-se amostras totalmente homogêneas. As desvantagens desse método de estudo são, por exemplo, a necessidade de trabalhar em ambiente estéril e asséptico, o que limita algumas vezes o seu protocolo. Além disso, a quantidade de material obtido em cultura é bastante pequena; ainda assim o custo de um experimento realizado com célula em cultura é muito maior que o mesmo feito em animais (FRESHNEY, 1990).

Em Odontologia foram realizados estudos *in vitro* utilizando cultura de células por Kawahara, Yamagami e Nakamura (1968), para avaliar citotoxicidade de materiais dentários.

Através da observação da morfologia celular, efeitos na membrana, atividade celular e índice de proliferação, pode avaliar o dano celular. Em 1959, Bergman introduziu o método de contagem celular e de número de mitoses para avaliação do dano celular, onde mistura-se a suspensão celular e a solução teste em uma câmara de cultura apropriada. Esta consiste de um anel de vidro fixada a uma lâmina. Após a fixação e coloração da cultura de células e mitoses são controladas.

A cultura de células periodontais humanas permitem a avaliação primária da biocompatibilidade das raízes. A aderência de células progenitoras na superfície das raízes é um pré-requisito para a formação de novo colágeno. A formação do ligamento periodontal é seguida da eliminação da infecção. A produção de colágeno é proporcional ao número de células aderentes. A redução destas células *in vitro* pode estar relacionado às endotoxinas das

bactérias patogênicas periodontais as quais penetram nas raízes, fazendo-as inibir suas funções (KREISLER, 2001).

A aplicação do laser de diodo, com comprimento de onda de 810 nm, microscopicamente não causa alterações detectáveis na superfície das raízes, porque o coeficiente de absorção da água é pequeno. Kreisler et al. (2001), relatou que não há diferença entre culturas de migração da célula e crescimento da célula entre áreas onde o laser de diodo foi usado e aonde não foi. A aderência da célula foi um pouco maior no grupo em que foi usado o laser quando comparado ao grupo controle, entretanto a diferença não foi significativa, não apresentando relevância clinicamente. Observou também que o laser de diodo obteve uma superfície menos irregular em relação a fraca interação com estruturas mineralizadas.

Presumindo que as superfícies irradiadas pelo laser de diodo são ácidos resistentes, Oliveira et al. (2001), observou a homogênea resolidificação da área de ablação após o uso do laser de diodo. Cita também a versatilidade deste laser, assim como o seu baixo custo, permitindo ser utilizado para prevenção de cáries, em estudos para as pessoas de baixa renda.

Neiburger (1997), concluiu através de seus estudos que o laser de He-Ne de diodo, com uma fluência de $1,2 \text{ J/cm}^2$, aumenta o índice de cicatrização em tecido gengival humano. Afirma que a consistência depende de um nível apropriado de fluência (entre 1 e 20 J/cm^2), e do comprimento de onda usado, dependendo do laser a ser utilizado.

A comparação da contagem entre o início e o final das bactérias existentes revela que a irradiação com o laser de diodo tem uma grande consideração na eliminação das bactérias, principalmente a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, nas bolsas periodontais. Mortz et al. (1997), concluiu que a luz laser não só elimina a bactéria, mas também inativa as suas toxinas difundidas entre o cimento das raízes. Este sucesso depende diretamente do comprimento de onda, energia de pulso, frequência e o tamanho do spot usado com o laser de diodo.

Conclui-se que o laser de diodo pode ser controlado na profundidade de penetração, evitando necroses das bordas de tecidos duros e moles. Bach, Neckel e Mall (2000), mostram os benefícios do tratamento de periimplantites com o laser de diodo de alta potência, mostrando baixos índices de recorrência em falhas de implantes.

Muitos estudos vem sendo realizados com lasers de baixa potência na periodontia. Os lasers de baixa potência agem como ativadores da microcirculação local auxiliando na resolução de lesões inflamatórias, como aceleradores na cicatrização de alvéolos (NEIBURGER, 1997), como elemento coadjuvante no processo de cicatrização de gengivectomias ou ainda como inibidores na produção de PGE₂ (prostaglandina E₂) que é um estimulador de inflamação e reabsorção óssea (SAKURAI, 2000).

Muitos estudos “*in vitro*” indicam que os lasers podem causar danos severos às estruturas da superfície das raízes, assim como inibir a nova adesão celular quando um certo nível de energia é excedido (KREISLER et al., 2002).

Pollard (1990) sugeriu que a determinação do número celular fosse realizada usando-se um contador eletrônico de partículas ou através de um hemocítômero. O primeiro método é mais preciso e pode ser usado para contar baixas concentrações celulares. O segundo requer maior densidade celular e é mais propenso a erro de mostragem.

No mesmo ano, 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 população celular cresceu, porém não informa se as células estão ou não proliferando. 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.

Freshney (1990) revendo os ensaios em cultura de células colocou que podem ser divididos em duas classes: (1) Resposta imediata ou de curto prazo, tal como alteração na permeabilidade da membrana ou perturbação de uma via metabólica; e (2) sobrevivência a longo prazo, geralmente medida pela retenção da capacidade de auto-renovação ou sobrevivência em estado alterado, como por exemplo, transformação maligna. Os ensaios de curta duração são usados para medir a proporção de células viáveis após um determinado procedimento traumático. Os ensaios, a longo prazo, são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo é medir a sobrevivência.

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. O autor afirma que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação que se deseja.

Sabemos que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos nas mesmas condições. Apesar disso, a maioria dos trabalhos *in vitro* utilizam fibroblastos obtidos a partir de amostras de pele humana, ou ainda de animais, pela praticidade de se trabalhar com fibroblastos de linhagens já estabelecidas, menos sensíveis a variações e que se podem adquirir no mercado.

Linhagens de células obtidas de cultivos primários são mais delicadas e exigem um certo tempo de trabalho e grande dedicação antes de poder-se começar o experimento, propriamente dito. Por isso, poucos autores demonstram a atividade dos lasers de baixa potência sobre fibroblastos de mucosa humana, sobretudo em linhagem primária.

Pourreau-Schneider et al. (1989), já mostrava evidências de que o tratamento com o laser de He-Ne em lesões cutâneas e periodontais aceleravam o processo de cicatrização. A

baixa energia estimula a regeneração da pele, induzindo a uma atividade mitótica de células epiteliais.

A luminosidade do laser para reparo de feridas também ajuda na estimulação de replicação de fibroblastos, assim como no alívio da dor após irradiação (KATADA et al., 1992; PORREAU-SCHNEIDER et al., 1989).

Hall et al. (1994), observou clinicamente e macroscopicamente, em dias alternados, em igual período de tempo, reparação de tecidos irradiados com laser de He-Ne. Concluiu que é de suma importância à escolha adequada de energia a ser usada, e que esta energia varia entre os vários autores na literatura. Observou que o laser de baixa intensidade utilizado apresentou uma estimulação da resposta imunológica com influência positiva no controle de reparos, assim como um aumento na proliferação celular, porém com resultados não significativos. Em nenhum momento houve diferença clínica ou microscópica. Sugere mais estudos, comparando os vários parâmetros e não confirma a intensidade da influência do laser neste processo.

A absorção molecular da luz laser é um pré-requisito para qualquer efeito celular. É geralmente aceita a teoria de que o efeito do laser nas células é dose-dependente, assim como o comprimento de onda. A existência de uma “janela específica” para o comprimento de onda e doses de energia, são postuladas por vários autores (KREISLER et al., 2002).

Kreisler et al. (2002), relatou que apesar de incansáveis estudos, as reações bioquímicas não são totalmente compreendidas. Elas ainda necessitam de pesquisas sobre a biologia do laser nas reações histológicas básicas das células. A estimulação de fibroblastos gengivais pode ser benéfica na aceleração do processo de reparação.

Segundo Pereira et al. (2002), estudos experimentais mostram que o uso do laser acelera essa reparação. Este efeito pode ser visto e explicado pela atividade mitótica, assim

como as mudanças de síntese de colágeno. Concluiu que a redução do número de células pode estar atribuído a desnaturação de proteínas da superfície das raízes.

Pourreau-Schneider et al. (1989), através de linhagens de fibroblastos gengivais humanos, os quais ajudam a direcionar os efeitos biológicos do laser a nível celular, observou mudanças estruturais das células quando irradiadas. A maior modificação pode ser observada 48 hrs após o tratamento com o laser. Vários e diferentes efeitos podem ser vistos na sua aplicação, como a produção de colágeno, dependendo do comprimento de onda do laser usado. Por exemplo, o laser de Nd:YAG apresenta uma dramática redução na síntese de colágeno com alta energia; já os He-Ne e os Ga-As, estimulam a produção de colágeno com baixa energia.

Na literatura, os estudos comparando os efeitos do laser usando luz vermelha ou infravermelha mostram resultados diferentes. A maioria destes estudos mostra melhores resultados com o laser visível (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Dois outros aspectos do laser de baixa potência que pode ser citado quando relacionado com cultura de fibroblastos são a dosagem e as condições das culturas. Baixa fluência pode significar resultado sem efeito. Em contrapartida, alta fluência tem um efeito inibitório. A fluência ideal para ter respostas específicas dos fibroblastos *in vitro* é entre 2 J/cm² (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Pequenas diferenças de densidades de energia são capazes de agir diferentemente no crescimento das células. A resposta celular para a bioestimulação do laser de baixa potência depende da combinação entre comprimento de onda, densidade de energia, potência e tempo de irradiação. Muitos estudos tentam combinar o melhor destes parâmetros em diferentes tipos de células (PEREIRA et al., 2002). O grande número destas variáveis e parâmetros, às vezes pode tornar difícil à comparação dos resultados de diferentes investigações (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

O mecanismo de ação do laser de baixa potência, entretanto não está totalmente entendido (KREISLER et al., 2003).

Experimentos com cultura de células mostram que a irradiação com o laser de baixa pode aumentar a síntese de colágeno e de DNA (LOEVSCHELL; ARENHALT-BINDSTEV, 1994; BALBONI et al., 1986). Há um aumento de produção e um aumento na proliferação e migração de células (NOBLE et al., 1992).

Pourreau-Schneider et al. (1989), concluiu que o tratamento com o laser de He-Ne aumenta a replicação de fibroblastos gengivais humanos normais e induz a mudanças morfológicas a um nível estrutural: hiperplasia mitocondrial e hipertrofia, aparecimento de microfilamentos citoplasmáticos e deposição abundante de matriz fibrilar em regiões periféricas.

Pourreau-Schneider (1989), relatou que no tratamento das culturas com o laser de He-Ne, achou-se células predominantes como os miofibroblastos. São células que aparecem antes das 24 hrs após a irradiação com o laser. Em tecido gengival também se pode observar 48 hrs após a irradiação, um grande número de células, morfológicamente com aparência de miofibroblastos. A cultura de fibroblastos é morfológicamente similar a miofibroblastos. Estes por sua vez, são gerados de fibroblastos ou de células mesenquimais imaturas.

Katada et al. (1992), usou fibroblastos gengivais para análise, irradiando com laser de He-Ne, mostrando o efeito de crescimento nas diferentes potências e durações dos lasers, e os dias nas culturas após irradiação. Pode observar que a potência e a duração da irradiação não tem efeito nos primeiros dias da cultura, sendo este efeito conseguido gradualmente no dia 5. Os grupos irradiados mostram maior quantidade no crescimento das células com o grupo de maior energia quando comparado ao grupo controle.

A proliferação de fibroblastos e a sua ativação aumenta com a deposição de matriz extracelular e acompanha muitas doenças proliferativas. Em estudos com microscopia

eletrônica, pode-se identificar fibroblastos inativos e ativos em culturas de controle e em tecidos gengivais não tratados (SCHNEIDER et al., 1990). 24 hrs após a irradiação pelo laser de He-Ne, a maioria das células da cultura tratadas tem características de miofibroblastos. Isto caracteriza, (o recrutamento experimental de miofibroblastos após tratamento de fibroblastos com laser He-Ne), uma sequência de eventos que resulta na reação do estroma em processos patológicos e naturais. A aceleração do processo cicatricial pode ser atribuída a um efeito de estimulação na síntese de colágeno e o índice de epitelização.

Irradiações aplicadas a laser com potências diferentes e durações diferentes podem não ter efeito no crescimento das células. Em contrapartida, outras análises, como síntese de colágeno e índice de epitelização podem ser estimulado com diferentes níveis de potência do laser.

Hall et al. (1994), relata que é de suma importância a escolha adequada do comprimento de onda, mas a dose aplicada para a bioestimulação ocorrer, varia entre os autores na literatura. Observando clinicamente e macroscopicamente a reparação cicatricial, em dias alternados e no mesmo período de tempo, não se observou diferença significativa quando foi realizada irradiação com o laser de He-Ne, aplicando-se doses diferentes.

Comprovado pela literatura em diferentes estudos, pode-se afirmar que as células que são irradiadas em meio apresentando déficit nutricional têm seu crescimento igual ou maior que as células irradiadas dentro do padrão da normalidade (sem estar sob estresse). Usando a mesma fluência, o laser vermelho, apesar de apresentar penetração menor, induz a uma proliferação maior do que o He-Ne, quando as densidades de energia são diferentes. (ALMEIDA-LOPES et al., 2001).

Katada et al. (1992), em seus estudos, analisaram o crescimento e maturação de células osteoblásticas da calvária de ratos, estimuladas por laser de baixa potência. Observou

que para fibroblastos, a irradiação por Nd:YAG, não resultou em proliferação de células. Os efeitos dependem da potência do laser a ser usado.

Kreisler et al. (2001), após usar o laser de diodo com comprimento de onda de 810 nm para observar proliferação de células, pode observar em sua contagem, que o grupo onde o laser foi usado, houve um aumento insignificante do número de fibroblastos do que no grupo controle. Pode observar que diante da aplicação deste laser em questão não causou nenhuma alteração detectável na sua superfície. O resultado indicou que para a descontaminação das bolsas periodontais não facilitou e não obteve um aumento estatisticamente significativo na aderência celular.

Pereira et al. (2002), cita que irradiações com $3\text{J}/\text{cm}^2$ ou $4\text{J}/\text{cm}^2$ aumentam o número de células em três ou seis vezes quando comparadas ao grupo controle. A energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ aumenta esse crescimento, mas não tem efeito na síntese do procolágeno. Um laser específico, como o de diodo de 804 nm, pode estimular a proliferação de fibroblastos sem interferir na síntese de procolágeno. A luz vermelha tem uma penetração menor e um efeito melhor em relação a reparação cicatricial.

Segundo Pourreau-Schneider (1989), vários traumas mecânicos ou químicos provocam a multiplicação de fibroblastos entre os primeiros dias e o aparecimento de miofibroblastos entre os dias oito e vinte e um, dependendo do modelo. Os fibroblastos inativos têm uma alta concentração de retículo endoplasmático, enquanto os ativos, além de serem maiores que os inativos, compreendem a maior concentração da população de células.

Kreisler et al. (2003), em seu estudo com laser de baixa potência de 809 nm, tem seu efeito estimulatório na proliferação do ligamento periodontal fibroblástico. Entretanto, segundo o autor, pode-se concluir sendo relevante no tratamento da periodontite. A proliferação celular como resultado da estimulação do laser de baixa pode estar associada com a produção dos fatores de crescimento. Segundo Kreisler, mais investigações são necessárias

para poder elucidar os mecanismos moleculares para um aumento da proliferação dos ligamentos periodontais induzidos pelo comprimento de onda da luz laser.

Em um trabalho mais recente, usando o laser de baixa intensidade de Ga-Al-As, diodo de 904 nm, observando o crescimento de células fibroblásticas em déficit nutricional, pode-se observar mudanças na estrutura das organelas do citoplasma tratadas. O procolágeno não foi alterado pela irradiação, entretanto pode-se observar redução significativa na quantidade de proteínas das células irradiadas. (MARQUES et al., 2004)

3.2.1 PARTICIPAÇÃO DOS MIOFIBROBLASTOS

Os miofibroblastos são fibroblastos que se diferenciam para agir na contração da ferida assumindo um fenótipo contrátil. Uma vez executado seu papel, eles se desdiferenciam e voltam a ser fibroblastos.

Os fibroblastos normais não estão em contato uns com os outros. Os fibroblastos isolados tornam-se mais curtos, o tecido circundante não irá contrair de todo. Essas modificações levam os miofibroblastos a assemelhar-se, mas não a tornar-se uma célula muscular lisa.

Os miofibroblastos são células intermediárias entre fibroblastos e células musculares lisas, porém o mecanismo de 'utilização' ainda não está esclarecido. Eles parecem exercer esse estirão de duas maneiras:

- por encurtamento, como fazem as células musculares;
- por um mecanismo estacionário (HARRIS; WILD; STOPAAK, 1980).

Pouco se sabe dos mensageiros que induzem a diferenciação de fibroblastos a miofibroblastos. Há algo nas feridas que induzem essa modulação os miofibroblastos alinham-se ao longo de novos depósitos de matriz extra celular, formando uniões de célula à matriz para gerar forças de tensão da ferida produzindo a contração de si mesma.

A reparação tecidual envolve mecanismos complexos que abrangem eventos locais e sistêmicos, onde interferem em vários fatores como tipo de ferida, extensão tipo e quantidade de células. O laser de baixa potência tem diferentes ações segundo o momento de reparação e o tipo de paciente em que estamos utilizando.

3.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS NA LITERATURA

AUTOR	METODOLOGIA	ANÁLISE	LASER	DOSE	INTENSIDADE	ESTATÍSTICA
Almeida-Lopes	Fibroblasto humano	Morfologia Crescimento	Diodo 670 nm 780 nm	2-5 J/cm ²	10 mW/cm ² 30 mW/cm ² 50 mW/cm ²	Positivo
Miyajima	Fibroblasto humano	Contagem células	He-Ne 632 nm	2-3 J/cm ²	6 mW/3 min 6 mW/10 min 25 mW/3 min 25 mW/ 10 min	Positivo
Kreisler	Fibroblasto humano	Crescimento	GaAlAs 809 nm	1,96-7,84 J/cm ²	10mW/ 75-300s	Positivo
Pourreau-Schneider	Tecido gengival	Crescimento	He-Ne 632,8nm	1,2 J/cm ²	10 mW/ 10 min	Positivo
Pourreau-Schneider	Fibroblastos	Miofibroblasto	He-Ne 632 nm	1,2 J/cm ²	10 mW/10 min	Positivo
Katada	Fibroblasto humano	Crescimento	He-Ne 632 nm	2-3 J/cm ²	6 mW/3 min 6 mW / 10 min 25 mW/3 min	Positivo
Pereira	Cultura fibroblasto	Síntese pró-colágeno Crescimento	Diodo 904 nm	3-5 J/cm ²	120 mW	Positivo
Marques	Cultura fibroblasto	Síntese proteína Morfologia	Diodo 904 nm	3 J/cm ²	120 mW	Positivo

4 PROPOSIÇÃO

Há uma grande variação de parâmetros na literatura descritos, no que se refere aos efeitos do laser sobre o metabolismo celular de fibroblastos, células essas diretamente relacionadas com a reparação tecidual.

A literatura é um pouco escassa no que se refere a trabalhos relacionados ao comportamento da irradiação do laser de diodo de alta potência analisando fibroblastos.

Podemos encontrar vários trabalhos com lasers de baixa intensidade que demonstram que em condições de normalidade tecidual, não se pode observar nenhum efeito após a irradiação de laser nesses tecidos.

Sabe-se que o comportamento do fibroblasto humano de pele é diferente daquele observado no fibroblasto humano de mucosa, ainda que mantidos nas mesmas condições. Linhagens celulares obtidas de cultivos primários exigem grande dedicação antes de começar o experimento propriamente dito.

O objetivo do nosso estudo é comparar resultados na irradiação dos lasers de baixa intensidade e o laser de diodo de alta potência desfocado, observando a contagem do número de células fibroblásticas, analisando assim o comportamento da proliferação dos fibroblastos humanos.

Para isso é necessário primeiramente obter uma linhagem celular a partir de um cultivo primário de fibroblastos. Aplicar um protocolo onde *in vitro* se possa analisar condições de estresse com ou sem irradiação laser (grupo controle).

Com esse estudo iremos analisar o efeito do laser de alta potência desfocado, na proliferação de fibroblastos originados da linhagem celular, utilizando intensidades diferentes e comparando com os já existentes na literatura.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultivo Celular

5.1.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

O material para o cultivo celular foi obtido a partir de linhagem celular de fibroblastos de gengiva humana (LMF).

5.1.2 DESCONGELAMENTO CELULAR

Para o descongelamento, uma cápsula criogênica contendo células foi descongelada rapidamente em banho-maria a 37°C, agitando-o por 60 segundos (Figura 2) Para desativar a substância crioprotetora (DMSO), o conteúdo do cryovail foi transferido rapidamente para um tubo de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo e centrifugado a 1000 rpm durante cinco minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado ressuspendido em 1 ml de meio DME fresco e transferido para um frasco de plástico de 25 cm previamente identificado. Foi acrescentado 5 ml de meio DME, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB)

e 1% de solução antibiótica-antimicótica. As células foram mantidas em estufa de cultivo e monitoradas até que se observou seu crescimento utilizando-se microscópio invertido de fase.



Figura 2: Descongelamento. Remoção das células do nitrogênio líquido

5.1.3 LINHAGEM CELULAR

As células cresceram. A mudança de meio de cultivo foi entre dois e quatro dias. A confluência dos cultivos celulares foi verificada em microscópio de observação direta, quando se observou que a superfície do frasco estava recoberta de uma monocamada contínua de células. A confluência modula a atividade mitótica das células. As células em cultivo sofrem um fenômeno que se conhece por inibição de contato, pois quando uma célula contata ao seu redor com outras células e forma-se uma monocamada, inibe-se o processo mitótico (ALBERTS et al., 1989).

Para perpetuação dessa linhagem celular, essas células foram lavadas duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato pela ação de solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA, durante 1 minuto a 37°C (tripsinização). O conteúdo de cada frasco foi removido,

colocado em tubo de ensaio e centrifugado a 1000 rpm durante cinco minutos à temperatura ambiente em centrífuga (Excelsa Baby, modelo 206) – Figura3. O sobrenadante dos tubos foi descartado e as células que formarem o precipitado no fundo do tubo de ensaio foram ressuspensas com 4 ml de meio fresco (meio DME, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica). Em cada novo frasco foi depositado 1 ml dessa suspensão de células e acrescentado 3 ml de meio DME fresco. Esse procedimento indica uma nova passagem celular.



Figura 3: Centrifugação do meio de cultura

5.1.4 CONTAGEM CELULAR

Antes de começar os experimentos foi necessário fazer a determinação do número de células existentes no frasco original. A finalidade dessa determinação é conhecer o número de células existentes em cada tubo para poder fazer-se a semeadura nas placas de experimento

com números exatos de células nas placas, padronizando dessa forma os experimentos, da maneira mais precisa possível.

Para a determinação do número de células existentes nos frascos originais (contagem celular), as células foram lavadas duas vezes com PBSA e levantadas de seu substrato utilizando solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA. O conteúdo de cada frasco foi removido, colocado em tubo de ensaio e centrifugado. O sobrenadante dos tubos foi descartado e os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de PBSA e 0,1 ml dessa suspensão celular foi dispensada em um tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8 ml de PBSA e 0,1 ml de Azul de Trypanil a 0,4%. Fora do fluxo laminar, uma gota dessa mistura foi colocada em cada lado da Câmara de Neubauer, que foi levada ao microscópio invertido de fase para realização da contagem do número de células. As células coradas em azul representam as células mortas, enquanto que as células que não estiverem coradas representam as células viáveis. Foram contados 25 quadrados na parte superior e 25 na parte inferior, perfazendo um total de 50 quadrados contados. O cálculo de contagem foi obtido pela fórmula onde o número total de células contadas (mortas e viáveis) será multiplicado pela diluição (nesse caso de 10, já que usaremos 100 µl de uma suspensão celular de 1000 µl) e multiplicado por 10^4 (pelo volume contado que é 0,1 mm² ou 10⁴ml). Esse valor será dividido pelo número de quadrados contados (50). A partir dessa fórmula então obteremos a quantidade de células presentes em cada frasco.

O número total de células presentes no frasco foi obtido através da equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados usados para contagem}}$$

A suspensão restante (0,9 ml) foi centrifugada, o sobrenadante aspirado, e o precipitado adicionado em 1ml de meio DME fresco. De acordo com a quantidade de células existentes, foi adicionado meio DME suficiente a essa suspensão para obter-se $1,8 \times 10^4$ células em cada 100 μ l. Essa nova suspensão de células foi novamente subcultivada em placas de 35 x 10 mm, onde as células aderiram e cresceram. Para a manutenção da viabilidade das células a troca dos meios de cultivo das placas foi feita a cada dois ou três dias. Aguardaremos 48 horas após o plaqueamento para começarmos o experimento.

5.2 Laser utilizado

Foi utilizado um equipamento de laser de diodo de alta potência, com comprimento de onda de 808 nm, emitindo em modo contínuo, da marca comercial LASERING (Figura 4) A potência máxima do equipamento é de 15 W, apresenta fibras de 200, 300 e 600 μ m. A fibra a ser utilizada foi de 300 μ m, NA de 0,37.

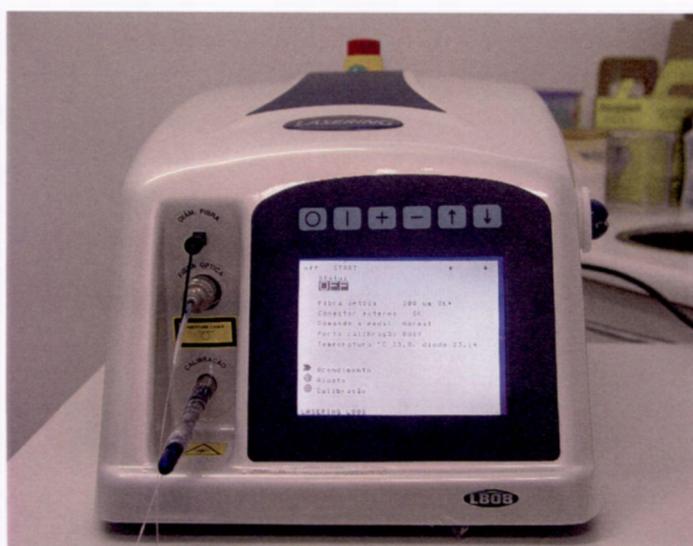


Figura 4: Laser de diodo de 808 nm, marca comercial Lasering

Foi utilizado o Power Meter (PM 600, Laser Fiber Power Meter), da Moletron Detector Incorporated. O laser foi sendo calibrado a cada grupo irradiado.

5.3 Grupos experimentais

Para todos os experimentos foi utilizada a linhagem LMF. Todos os procedimentos experimentais foram realizados sob capela de fluxo laminar, e as células foram incubadas em estufa de cultivo a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (Figura 5).



Figura 5: Estufa (meio de cultura)

O meio de cultivo utilizado foi o meio DME, porém a quantidade de soro fetal bovino varia. Para lavagem das células foi usada a solução tampão de PBSA, pH 7,2 e para seu levantamento solução de tripsina a 0,25% em PBSA e 1% de EDTA.

Para o experimento foi montado um sistema de irradiação onde a peça de mão do laser e a placa fiquem fixos, controlando desta maneira a distância do equipamento que será colocada junto à placa que receberá a irradiação de baixo para cima, a distância de 1 cm, num ponto único pré estabelecido quando da fixação da ponteira no sistema. Dessa forma, as

aplicações foram feitas do lado de fora da placa, sem necessidade de abrir as tampas das mesmas para receberem a irradiação, diminuindo assim os riscos de contaminação das células (Figura 6 e Figura 7).

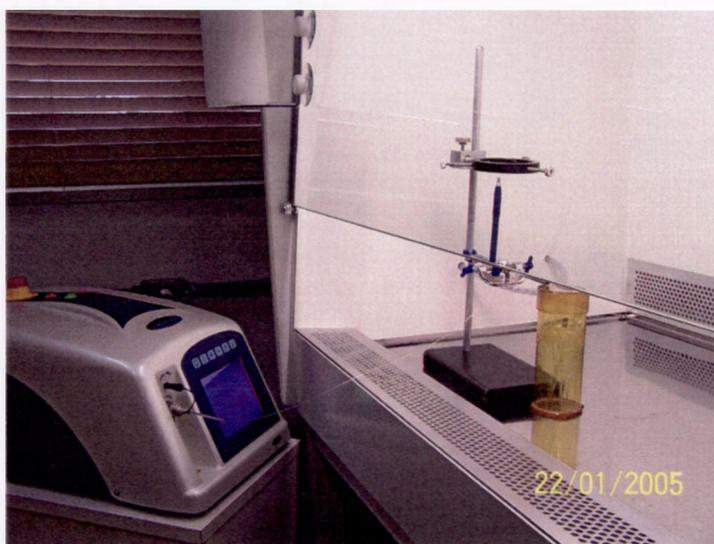


Figura 6. Posicionamento da fibra do Lasering para irradiação

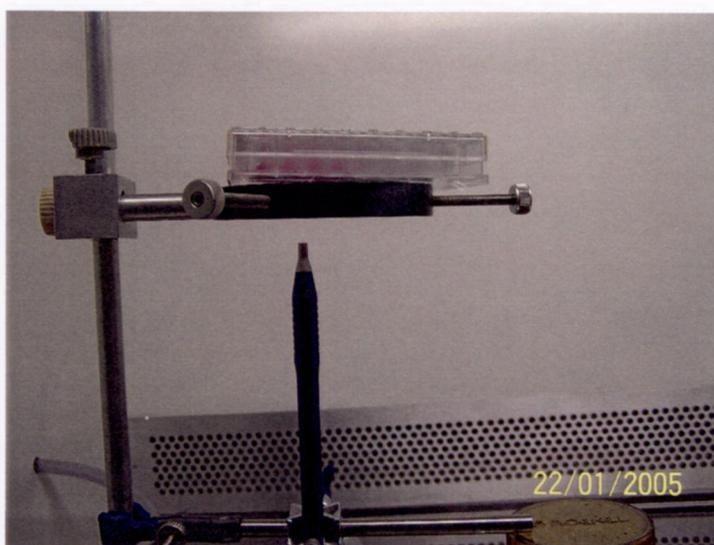


Figura 7: Placa de meio de cultura em posição de irradiação

O aparelho laser foi colocado fora do fluxo laminar, e suas ponteiros foram colocadas dentro do fluxo laminar, previamente esterilizadas em autoclave. Todas as placas foram

colocadas dentro do fluxo laminar ao mesmo tempo, inclusive as placas controle, e assim permaneceu até que a última placa do último grupo foi irradiada. Assim sendo, todas as placas foram submetidas às mesmas condições de stress. Quando chegar o momento da irradiação, as placas foram colocadas uma a uma no sistema e receberam a irradiação correspondente.

As irradiações foram feitas sempre da mesma forma, variando apenas o tempo de aplicação, em função da intensidade, segundo o experimento.

GRUPO 1: grupo controle

GRUPO 2: densidade de potência de 250 ± 20 mW/cm² ; P= 0,1 W

GRUPO 3: densidade de potência de 500 ± 40 mW/cm² ; P= 0,2 W

GRUPO 4: densidade de potência de 1000 ± 80 mW/cm² ; P= 0,4 W

GRUPO 5: densidade de potência de 1500 ± 120 mW/cm² ; P= 0,6 W

A densidade de energia dos grupos 2 a 5 foi 2 J/cm². A aplicação foi realizada a distância, desfocado e englobando toda a placa. A área da placa é de 0,385 cm² e a área irradiada é de $0,4 \pm 0,03$ cm².

Para os grupos controle, seguiram os mesmos processos de manipulação, simulando-se receber aplicação de laser, permanecendo fora da estufa de cultivo, com conseqüente variação de temperatura, sempre nas mesmas condições que os grupos irradiados.

5.3.1 EXPERIMENTOS

As células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em meio DME sem soro e semeadas em placas (plaqueamento), com poços de 7 mm de diâmetro. A concentração celular para o seguinte plaqueamento foi de $1,7 \times 10^4$ células/placa.

Foram utilizadas um total de 03 placas divididas aleatoriamente em cinco grupos. Foram realizadas duas irradiações, e realizadas em triplicata para cada grupo, a saber. A distribuição dos poços está exemplificada na figura 8. As placas foram mantidas em estufa a 37° C, com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As culturas foram plaqueadas, e após 6 horas realizado o plaqueamento, foi realizado a primeira aplicação com o laser, com uma distância de 1 cm da placa, desfocado, sendo cada poço irradiado com seus devidos tempos calculados. O intervalo para a segunda irradiação foi de 6 horas, sendo a primeira contagem 12 horas após a segunda irradiação. Após a irradiação, as placas foram colocadas na estufa novamente. A segunda irradiação aconteceu 6 horas após a primeira irradiação, exatamente nos mesmos tempos dos primeiros.

GRUPO 1: grupo controle

GRUPO 2: $De = 1,7 \pm 0,13 \text{ J/cm}^2$ $t = 6,66 \text{ s}$

GRUPO 3: $De = 2 \pm 0,15 \text{ J/cm}^2$ $t = 4 \text{ s}$

GRUPO 4: $De = 2 \pm 0,15 \text{ J/cm}^2$ $t = 2 \text{ s}$

GRUPO 5: $De = 2 \pm 0,15 \text{ J/cm}^2$ $t = 1,33 \text{ s}$

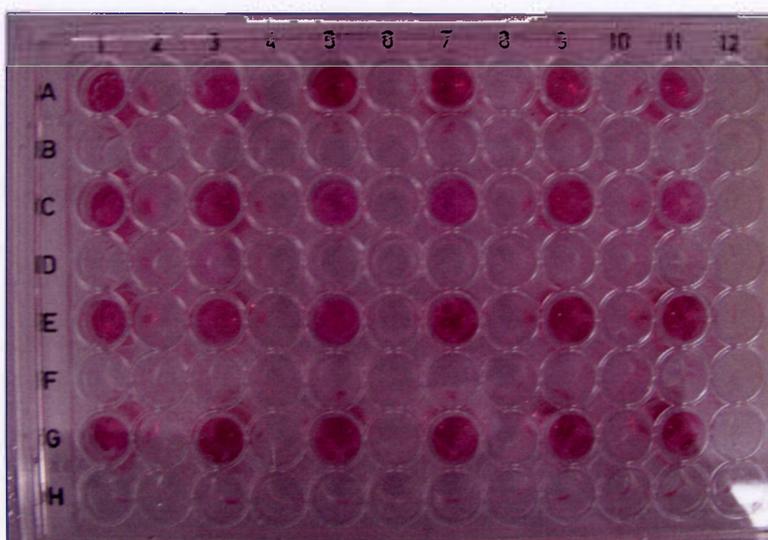


Figura 8: Distribuição das células nos poços das placas

A contagem celular começou a ser realizada 12 horas após o plaqueamento, quando houve confluência de 50% na maioria das placas. A segunda contagem foi em 16 hrs.

5.3.2 CURVAS DE CRESCIMENTO E DE VIABILIDADE CELULAR

A contagem celular é realizada para a obtenção de curvas de crescimento e de viabilidade celular, com finalidade de análise do efeito do laser sobre os fibroblastos.

Para fazer a primeira contagem, foi feita a primeira incubação. Removeu-se o meio de cultura e colocou-se 100 μ l de meio novo em cada well. Preparou-se o componente A (1 ml de PPS no frasco). Colocou-se 10 μ l do componente A em cada well. Deixou em período de incubação na estufa a 37° C por um período de 4 horas (Figura 9). Preparou-se o componente B (10 ml de solução de HCL no frasco).

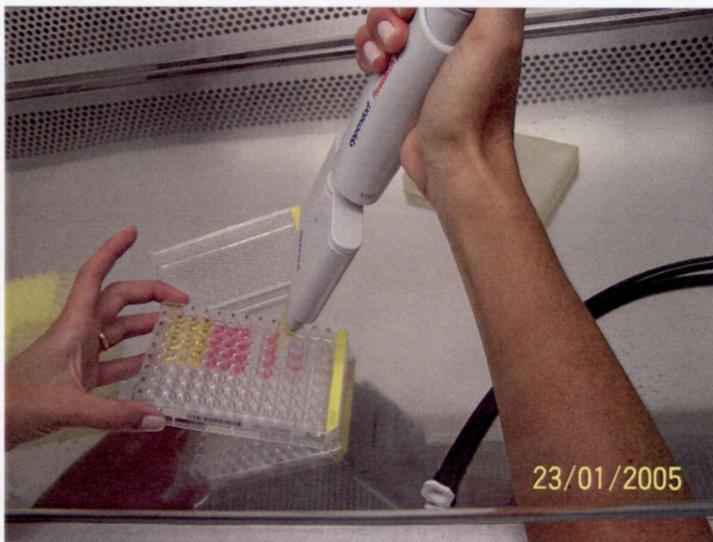


Figura 9: Colocação do componente A, antes da incubação para fazer a leitura.

Após este período, retirou-se a placa da estufa. Colocou-se 100 μ l do componente B em cada well. Misturou-se bem com a pipeta, sem fazer bolhas. Colocou-se 50 μ l de DMSO em cada well. Foi realizada a incubação durante 10 minutos e fez-se a leitura.

A primeira leitura foi realizada após 12 horas do preparo. A segunda, 16 horas após. Para a leitura foi utilizada a Leitora Elisa (contagem de células), marca Biotrak II, do laboratório da Dentística, da FOU SP.

O número total de células foi registrado segundo a equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas} \times \text{diluição} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados usados para contagem}}$$

As suspensões celulares restantes (0,9 ml de cada placa contada) não utilizadas na contagem foram descartadas com jato de líquido de Dakin.

5.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os pontos das curvas de crescimento e de viabilidade celular representam a média +/- o erro da média da contagem de três placas para cada período experimental. Os dados obtidos foram comparados por teste estatístico de análise de variância. da presença.

Foi aplicado o teste de KRUSKAL-WALLIS (GOMES, 1990) quando da presença de uma curva não normal, utilizando-se programa de informática. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p \leq 0,05$).

6 RESULTADOS

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação ao grupo controle, conforme pode-se observar nos resultados em anexo. Todavia, observa-se uma tendência de melhor atuação no grupo 4, irradiado com uma potência de 1500 mW/cm^2 , conforme mostra a Figura 10.

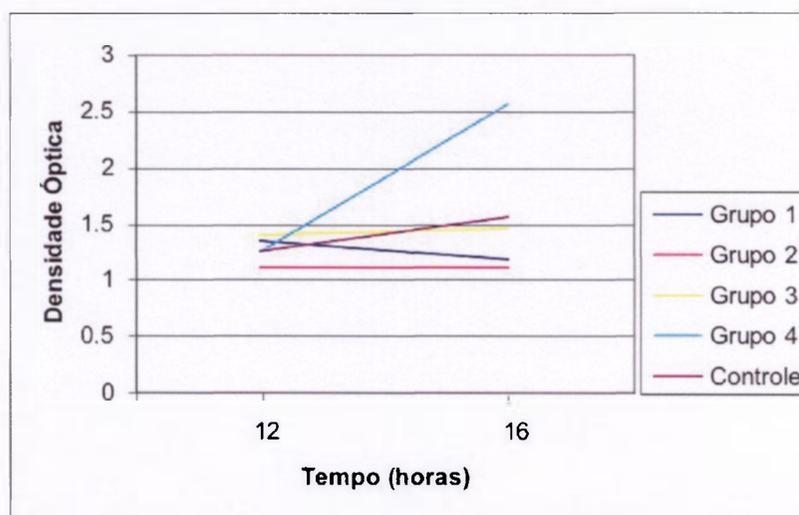


Figura 10: Gráfico mostrando o crescimento das células de cultura LMF, com o laser de Diodo de alta potência desfocado, irradiado com $D_e = 2 \text{ J/cm}^2$.

Foram realizadas contagem em 12 e 16 horas, para se observarem as curvas de crescimento, sendo que o número de células do grupo controle aumentou até 16 horas..

As células do grupo I, irradiadas com uma $D_p = 250 \text{ mW/cm}^2$ tiveram um decréscimo a partir das 12 horas após a irradiação. Já as células do grupo II, irradiadas com $D_p = 500 \text{ mW/cm}^2$, permaneceram estáveis durante o período analisado.

As células do grupo III, por sua vez, com $D_p = 1000 \text{ mW/cm}^2$, apresentaram um leve crescimento após 12 horas.

Somente as células do grupo IV, irradiadas com $D_p = 1500 \text{ mW/cm}^2$, apresentaram crescimento significativo até 16 horas.

A contagem também foi realizada 30 horas após a irradiação, mas foi possível se observar um decréscimo acentuado do número de células em todos os parâmetros de aplicação, indicando a morte das células, ficando, assim, as mesmas inutilizáveis para o trabalho.

O fator tempo foi imprescindível para o crescimento das culturas, de acordo com a área específica de irradiação.

7 DISCUSSÃO

A absorção molecular da luz laser é um pré-requisito para qualquer efeito celular, e a teoria de que o efeito do laser nas células depende da densidade de energia e do comprimento de onda é em geral aceita.

O laser de 809 nm LLLT tem considerável efeito estimulatório na proliferação de fibroblastos gengivais humanos.

Katada et al. (1992), analisaram o crescimento e a maturação de células osteoblásticas da calvária de ratos, estimuladas por laser de baixa potência, observando que para fibroblastos, a irradiação por Nd:YAG não gerou proliferação celular.

O aumento da proliferação dos fibroblastos pode estar associada com a produção dos fatores de crescimento.

Estudos anteriores indicam que a irradiação pelo laser com densidades acima de 4 J/cm² pode ter efeitos estimulatórios. Porém, em locais com altas doses podem ocorrer características inibitórias (ALMEIDA-LOPES, 2001).

A irradiação com o laser de diodo 808 nm, desfocado, em comparação com outros estudos, inibe as prostaglandinas E₂, assim como a produção de IL-1 β e genes que expressam quais os benefícios terapêuticos contra o agravante da gengivite e da periodontite que acompanham as infecções bactericidas.

No crescimento das células, a irradiação com 2 J/cm² aumenta o número de células em 3 ou 6 vezes quando comparadas ao grupo controle, mas não tem nenhum efeito na síntese do procolágeno. Os resultados mostram que um laser específico pode estimular a proliferação dos fibroblastos, sem interferir na síntese de procolágeno.

Porfirinas endógenas e citocromas, assim como vasos biopolímeros, são descritos como chaves para a absorção celular. Takema (1998), citou o laser 830 nm semiconductor como inibidor do plasminogênio, ativador do sistema proteolítico plasmático.

A impossibilidade do preparo de soluções de células com idênticas concentrações celulares pode resultar na razão para as diferenças entre os respectivos grupos selecionados, no primeiro, segundo e terceiro dia, nas diferentes concentrações de radiação.

Culturas de células irradiadas em uma condição deficitária de suplemento médio de 5 % de FBS, cujo crescimento permite um aumento na proliferação da célula podem ser observada, o que traduz um índice significativo menor que as células crescidas em condições normais.

Kreisler et al (2002), concluiu que as reações bioquímicas não são totalmente compreendidas, sendo necessárias mais pesquisas sobre a biologia do laser nas reações histológicas das células. A estimulação de fibroblastos gengivais pode ser benéfica na aceleração do processo de reparação.

O laser de baixa intensidade de potência tem suas melhores aplicações em tecidos sob estresse (5 % SFB)

O uso de 5% FBS mostra ser o modelo ideal para a análise dos efeitos do laser terapêutico, pois o crescimento celular decresce proporcionalmente para as FBS proporções.

A fluência de 2 J/cm² administrada estimula o fibroblasto gengival quando ele está em déficit nutricional (condição de estresse).

O aumento do índice de proliferação ocorre com o efeito do LLLT dos fibroblastos, quando usada a fluência de 2 J/cm². O crescimento dos fibroblastos crescendo abaixo das condições ideais (10 % FBS) tem pouco ou nenhum significado.

O laser vermelho, por apresentar particularidade de menor penetração, induz significativamente o crescimento das células em amostras submetidas a um déficit nutricional

(condição de estresse) do que os lasers infravermelhos. Os melhores resultados são encontrados com um pequeno tempo de aplicação.

A combinação do comprimento de onda, da intensidade e do tempo utilizados na irradiação de cada grupo, determina o melhor parâmetro para a análise do crescimento das culturas. Tentando determinar este parâmetro, estudou-se, na presente pesquisa, o efeito das densidades de potência e suas variações.

Apesar de muitas investigações descreverem o efeito da ação do laser com seus diferentes comprimentos de onda em crescimento de células e suas interações, os exatos mecanismos não foram elucidados ainda. Entretanto, existe uma “janela específica “ de certas dosagens e comprimentos de onda que vem sendo postulados (KARU, 1989; ALMEIDA-LOPES, 2001). Assim, conclui-se que a fluência ideal para se obter resultados favoráveis usando-se fibroblastos *in vitro* é de aproximadamente de 2 J/cm^2 (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Há muitos estudos tentando explicar o porquê de algumas pesquisas com laser de baixa potência apresentarem resultados negativos.

Na presente pesquisa, foram usados parâmetros diferentes daqueles encontrados na literatura, assim como equipamento e forma de irradiação (desfocado).

O resultado não foi o esperado. O grupo irradiado com uma intensidade maior teve em média um crescimento superior em comparação com o grupo controle.

Comparando-se aos trabalhos descritos na literatura, que tiveram seus resultados mais favoráveis com densidades de energia menores, como por exemplo, o trabalho de Kert e Rose, em 1989, no qual o limite para o tratamento seria de 500 mW/cm^2 , não obtivemos resultados semelhantes. Segundo o autor, acima deste valor as células sofreriam danos.

8 CONCLUSÃO

A irradiação das células com 1500 mW/cm^2 (grupo 4), resultou no favorecimento ao crescimento das células. Não houve diferença estatística entre os grupos.

O crescimento das células com 1500 mW/cm^2 vai ao encontro do resultado de outros pesquisadores. Como não houve diferença significativa com o grupo controle há a necessidade de confirmar este resultado com mais pesquisas.

Como conclusão, mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar os efeitos das diferentes densidades de potência no crescimento das culturas de fibroblastos humanos.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York: Plenum, 1989.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. São José dos Campos, 1999. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Paraíba, S.P, 1999.

ALMEIDA-LOPES, L. et al. Comparison of the low level therapy effects on human gingival fibroblasts proliferation using different in irradiance and same fluence. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 29, n. 2, p. 179-84, Feb. 2001.

BACH, G., NECKEL, C., MALL, C., et al. Conventional versus laser- assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 9, n. 3, p. 247-251, 2000.

BALBONI, G. C.; et al. Effects of laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts *in vitro*. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY, 5., 1985, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Monduzzi, 1985. p. 101-103.

BASERGA, R. **Cell grow and division: a practical approach**. Philadelphia: IRL, 1990.

BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and praactice**. London: Churchill Livingstone, 1994.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenase activity of human fibroblasts *in vitro*. **Laser Therapy**, [S.l.], v. 7, p. 55-60, 1995.

DORTBUDAK, O. et al. Photodynamic therapy for bacterial reduction of periodontal microorganisms. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 12, n. 2, p. 104-108, Apr. 2001

FRESHNEY, R. I. **Biology of the culture cell: a manual of basic technique**. 2. ed. New York: Wisley-Liss, 1990.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I. A possible explanation of laser induced stimulation and damage of cell cultures. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, Lausanne, Suíça, v. 11, n. 1, p. 87-91, Oct. 1991.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1990.

HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing: an experimental study in rats. **Swedish Dentistry Journal**, Jönköping, v. 18, n. 1-2, p. 29-34, 1994.

HARRIS, A. K.; WILD, P.; STOPPAK, D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. **Science**, [Washington], v. 208, n. 4440, p.177-179, Apr. 1980.

JGM ASSOCIATES. **Dental applicatios of advanced lasers**. Burlington, USA, 1992.

KARU, T. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **Ieee Journal of Quantum Electronics**, New york, QE 23, n. 10, p. 1703-1717, Oct. 1987.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, Hagerstown, v. 56, p. 691-704, 1989.

KARU, T. et al. Biostimulation of HeLa cells by low: intensity visible light II. Stimulation of DNA and RNA synthesis in a wide spectral range. **Nuevo Cimento**, [S.l.], 3d, p. 309-318, 1984.

KATADA, H. et al. A study on the effects of He-Ne laser irradiation on cultured cells. Part 2: the effects on gingival fibroblasts. **Aichi-Gakuin of Dental Science**, Nagoya, Japão, v. 5, p. 85-90, 1992.

KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA, J. R. M. Biological testing of dental materials by mean of tissue culture. **International Dental Journal**, London, v. 18, n. 2, p. 443-467, June 1968.

KERT, J.; ROSE, L. Clinical laser therapy – low level therapy. **Scandinavian Medical Laser Thecnology**, Copenhagen, Denmark, p.13,1989.

KLIMA, H. Erfarungsheilkunde Teil I. **Elektromagnetische Bioinformatizion**, [S.l.], v. 9, p. 553-560, 1998a.

KLIMA, H. Erfahrungsheilkunde Teil II. **Elektromagnetische Bioinfomazion**, [S.l.], v. 10, p. 623-632, 1998b.

KREISLER, M. et al. Effect of diode laser irradiation on the attachment rate of periodontal ligament cells: an in vitro study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 72, f. 10, p. 1312-1317, 2001.

KREISLER, M. et al. Low level 809 nm Diode laser- induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 30, p. 365-369, 2002.

KREISLER, M. et al. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, f. 4, p. 353-358, 2003.

LOEVSCHELL, H; ARENHALT-BINDSTEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblast in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 14, n. 4, p. 347-354, 1994.

LONGO, L.; MESTER, A. Present and future of laser cicatrization. **Proc. Laser therapy**, Kansas City, p. 10-11, 1998.

LOWE, A. S. et al. Effects of low intensity monochromatic light tferapy (890nm) on a radiation: impaired, wound healing model in murine skin skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 23, n. 5, p. 291-298, 1998.

MAIORANA, C.; SALINA, S.; SANTORO, F. Treatment of periimplantitis with diode Laser: a clinical report. **Journal Oral Laser Applications**, Berlin, v. 2, n. 2, p. 172-183, 2002.

MARQUES, M. M. et al., C. P. Effect of Low-Power Laser Irradiation on Protein Synthesis and Ultrastructure of Human Gingival Fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 34, p. 260-265, 2004.

MARSHAL, S. L. **Laser: tecnologia y aplicaciones**. Barcelona: Reverte, 1972.

MESAWA, S. et al. The possible effect of soft-laser irradiation on heat nociceptors in the cat tongue. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 20-24, 1988.

MESTER, E. experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing.

Experimentation Cirurgical, New York, v. 2, p. 94, 1969.

MESTER, E. et al. Effect of laser on wound healing. **American Journal of Surgery**, New York, v. 122, p. 532-535, 1971.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application . **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 5, p. 31-39, 1985.

MORITZ, A. et al. Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 15, n. 1, p. 33-37, Feb. 1997.

NEIBURGER, E. J. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: a preliminary study. **General Dentistry**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 166-170, Mar./Apr. 1997.

NOBLE, B. P. et al. Locomotory characteristics of fibroblasts within a three-dimensional collagen lattice: modulation by a Helium/Neon soft laser. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 12, n. 6, p. 669-674, 1992.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of interleukin-1B production and gene expression in gingival fibroblasts by low energy laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, London, v. 16, p. 218-223, 2001.

OHSHIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. Laser therapy- a decade further on. **Laser Therapy**, [S.l.], v. 10, p. 5-6, 1998.

OLIVEIRA JR., M. V., et al. Morphological and thermal analysis of resolidified dental enamel surface after dye-assisted irradiation with a 960-nm diode laser. **Journal Oral Laser Applications**, Berlin, v. 1. n. 3, 2001.

PEREIRA, A. N. et al. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 31, p. 263-267, 2002.

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

PONTINEN, P. J. **Low level laser therapy as a medical treatment modality**. Tampere: Art Urpo, 1992.

PORREAU-SCHNEIDER, N. et al. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblast. **Quintessence International**, Berlin, v. 20, n. 12, p. 887-893, Dec. 1989.

ROCKIND, S. et al. Systemic effects of low- power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York,, v. 9, n. 2, p. 174-182, 1998.

ROMANOS, G. E, KARMAN, M. A., NENTWIG, G. H. **Clinical experince with a diode laser in oral surgical procedures**. Frankfut: Dental School Frankfurt, 1998.

ROMANOS, G., NENTWIG, G. H. Diode laser (980 nm) in oral and maxillofacial surgical procedures: clinical observations based on clinical applications. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 17, n. 5, p. 193-197, 1999.

SAKURAI, Y.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 and production cyclooxygenase – 2 in human gingival fibroblast. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 108, n. 1, p. 29-34, Feb. 2000.

SCHENEIDER, N. P. et al. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 13, p. 171-178, 1990.

SCHMALZ, G. Use so cells cultures for toxicity testing os dental materials: advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, Bristol, v. 22, n. 2, p. S6-S11, Aug. 1994.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Iowa State: University, 1967.

THEODORO, L. H. et al. Effect of Er:YAG and diode laser irradiation on the root surface : morphological and thermal analysis. **Journal Periodontology**, Chicago, v. 74, n. 6, p. 838-843, June 2003.

TAM, G. Low power laser therapy and analgesic action. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 17, n. 1, p. 29-33, 1999.

TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on rat submandibular salivary gland. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 91-94, Feb. 1998.

THWE, T. T. et al. Pulp reaction after pulpotomy after he-ne laser irradiation . In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASERS IN DENTISTRY, 4., Singapore, 1994. **Proceedings...**Singapore: [s.n.], 1994. p. 108.

TUNÉR, J.; HODE, L. It's all in the parameters. a critical analysis of some wellknown negative studies on low-level laser therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 16, n. 5, p. 245-248, 1998.

VÉLEZ-GONZÁLEZ, M. et al. Treatment of relapse in herpes simplex on labial & facial areas and of primary herpes simplex genital areas and "area pudenda" with low power laser (He-Ne) or acyclovir administered orally. **Spie Journal**, Redondo Beach, Calif., 2630/43, 1994.

YLMAZ, S. et al. Effect of Galium Arsenide Diode Laser on human periodontal disease: a microbiological and clinucal study. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 30, n. 1, p. 60-66, Jan. 2002.

ANEXOS

Plate ID: 1

Biotrak II Reader

Measurement

Measurement Date : 29.03.05 16:17
Measurement Filter : 562 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.133	0.081	0.108	0.081	0.108	0.109	0.114	0.083	0.109	0.083	0.087	0.082
B	0.081	0.081	0.085	0.081	0.080	0.084	0.085	0.089	0.083	0.083	0.082	0.080
C	0.122	0.079	0.117	0.080	0.123	0.082	0.143	0.083	0.137	0.083	0.276	0.080
D	0.082	0.079	0.080	0.077	0.081	0.080	0.106	0.082	0.082	0.082	0.084	0.082
E	0.151	0.079	0.134	0.082	0.191	0.082	0.115	0.082	0.129	0.086	0.096	0.083
F	0.081	0.079	0.080	0.078	0.081	0.082	0.083	0.081	0.083	0.083	0.083	0.081
G	0.084	0.083	0.080	0.087	0.084	0.083	0.083	0.085	0.083	0.083	0.080	0.080
H	0.083	0.085	0.084	0.082	0.080	0.083	0.081	0.082	0.080	0.082	0.079	0.081

Plate ID: 2

Biotrak II Reader

Measurement

Measurement Date : 29.03.05 19:31
Measurement Filter : 562 nm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.128	0.091	0.110	0.083	0.103	0.085	0.114	0.080	0.157	0.083	0.099	0.082
B	0.099	0.099	0.105	0.091	0.096	0.099	0.103	0.083	0.085	0.084	0.085	0.083
C	0.125	0.106	0.127	0.094	0.167	0.106	0.328	0.088	0.167	0.089	0.132	0.082
D	0.086	0.089	0.096	0.090	0.097	0.099	0.105	0.136	0.096	0.089	0.089	0.086
E	0.102	0.082	0.098	0.082	0.165	0.086	1.216	0.116	0.144	0.103	1.730	0.082
F	0.083	0.083	0.083	0.085	0.084	0.082	0.086	0.079	0.085	0.089	0.087	0.080
G	0.099	0.089	0.141	0.114	0.080	0.080	0.084	0.087	0.089	0.084	0.086	0.086
H	0.094	0.084	0.082	0.080	0.080	0.082	0.082	0.080	0.085	0.082	0.083	0.083

Method : NEW MTT LMF
 Measurement Date : 30.03.05 14:32
 Measurement Filter : 562 nm

Legend: Layout / Absorbance / Average

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC 0.046 0.080	BK 0.000	PC 0.110	BK -0.007	PC 0.090	BK -0.005	PC 0.076	BK -0.005	NC 0.160 0.103	BK -0.003	BK 0.029	BK -0.004
B	BK -0.005	BK 0.041	BK -0.002	BK -0.004	BK -0.003	BK 0.004	BK 0.004	BK 0.001	BK 0.000	BK 0.004	BK -0.002	BK -0.002
C	PC 0.102	BK 0.000	PC 0.123	BK -0.002	PC 0.071	BK -0.004	PC 0.097	BK -0.002	NC 0.076	BK 0.001	BK 0.017	BK 0.002
D	BK -0.005	BK 0.000	BK 0.001	BK 0.000	BK -0.003	BK -0.006	BK -0.002	BK 0.003	BK 0.000	BK 0.003	BK -0.002	BK 0.003
E	PC 0.060	BK -0.004	PC 0.065	BK -0.006	PC 0.038	BK -0.004	PC 0.082	BK 0.004	NC 0.072	BK -0.002	BK 0.030	BK 0.001
F	BK 0.001	BK 0.001	BK -0.003	BK -0.005	BK -0.002	BK -0.005	BK -0.003	BK -0.001	BK 0.000	BK 0.002	BK 0.002	BK -0.001
G	BK -0.006	BK 0.000	BK 0.002	BK -0.002	BK -0.003	BK -0.003	BK 0.002	BK -0.001	BK -0.003	BK -0.005	BK 0.001	BK 0.000
H	BK -0.002	BK -0.003	BK -0.003	BK -0.002	BK -0.002	BK -0.002	BK -0.001	BK -0.002	BK -0.003	BK -0.002	BK -0.004	BK -0.003

Teste de Kruskal-Wallis

Postos médios	54.3333	3.6023	3.126	< 0.05
Postos médios 1 e 13				
Postos médios 1 e 14	31.3333	2.0774	3.126	ns
Postos médios 1 e 15	34.6667	2.2984	3.126	ns
Postos médios 2 e 3	9.3333	0.6188	3.126	ns
Postos médios 2 e 4	4.6667	0.3094	3.126	ns
Postos médios 2 e 5	7.3333	0.4862	3.126	ns
Postos médios 2 e 6	1.6667	0.1105	3.126	ns
Postos médios 2 e 7	9.0000	0.5967	3.126	ns
Postos médios 2 e 8	16.0000	1.0608	3.126	ns
Postos médios 2 e 9	25.3333	1.6796	3.126	ns
Postos médios 2 e 10	30.6667	2.0332	3.126	ns
Postos médios 2 e 11	26.0000	1.7238	3.126	ns
Postos médios 2 e 12	21.3333	1.4144	3.126	ns
Postos médios 2 e 13	39.3333	2.6078	3.126	ns
Postos médios 2 e 14	16.3333	1.0829	3.126	ns
Postos médios 2 e 15	19.6667	1.3039	3.126	ns
Postos médios 3 e 4	4.6667	0.3094	3.126	ns
Postos médios 3 e 5	2.0000	0.1326	3.126	ns
Postos médios 3 e 6	11.0000	0.7293	3.126	ns
Postos médios 3 e 7	18.3333	1.2155	3.126	ns
Postos médios 3 e 8	6.6667	0.4420	3.126	ns
Postos médios 3 e 9	16.0000	1.0608	3.126	ns
Postos médios 3 e 10	21.3333	1.4144	3.126	ns
Postos médios 3 e 11	35.3333	2.3426	3.126	ns
Postos médios 3 e 12	30.6667	2.0332	3.126	ns
Postos médios 3 e 13	48.6667	3.2266	3.126	< 0.05
Postos médios 3 e 14	25.6667	1.7017	3.126	ns
Postos médios 3 e 15	29.0000	1.9227	3.126	ns
Postos médios 4 e 5	2.6667	0.1768	3.126	ns
Postos médios 4 e 6	6.3333	0.4199	3.126	ns
Postos médios 4 e 7	13.6667	0.9061	3.126	ns
Postos médios 4 e 8	11.3333	0.7514	3.126	ns
Postos médios 4 e 9	20.6667	1.3702	3.126	ns
Postos médios 4 e 10	26.0000	1.7238	3.126	ns
Postos médios 4 e 11	30.6667	2.0332	3.126	ns
Postos médios 4 e 12	26.0000	1.7238	3.126	ns
Postos médios 4 e 13	44.0000	2.9172	3.126	ns
Postos médios 4 e 14	21.0000	1.3923	3.126	ns
Postos médios 4 e 15	24.3333	1.6133	3.126	ns
Postos médios 5 e 6	9.0000	0.5967	3.126	ns
Postos médios 5 e 7	16.3333	1.0829	3.126	ns
Postos médios 5 e 8	8.6667	0.5746	3.126	ns
Postos médios 5 e 9	18.0000	1.1934	3.126	ns
Postos médios 5 e 10	23.3333	1.5470	3.126	ns
Postos médios 5 e 11	33.3333	2.2100	3.126	ns
Postos médios 5 e 12	28.6667	1.9006	3.126	ns
Postos médios 5 e 13	46.6667	3.0940	3.126	ns

Teste de Kruskal-Wallis

Postos médios 5 e 14	23.6667	1.5691	3.126	ns
Postos médios 5 e 15	27.0000	1.7901	3.126	ns
Postos médios 6 e 7	7.3333	0.4862	3.126	ns
Postos médios 6 e 8	17.6667	1.1713	3.126	ns
Postos médios 6 e 9	27.0000	1.7901	3.126	ns
Postos médios 6 e 10	32.3333	2.1437	3.126	ns
Postos médios 6 e 11	24.3333	1.6133	3.126	ns
Postos médios 6 e 12	19.6667	1.3039	3.126	ns
Postos médios 6 e 13	37.6667	2.4973	3.126	ns
Postos médios 6 e 14	14.6667	0.9724	3.126	ns
Postos médios 6 e 15	18.0000	1.1934	3.126	ns
Postos médios 7 e 8	25.0000	1.6575	3.126	ns
Postos médios 7 e 9	34.3333	2.2763	3.126	ns
Postos médios 7 e 10	39.6667	2.6299	3.126	ns
Postos médios 7 e 11	17.0000	1.1271	3.126	ns
Postos médios 7 e 12	12.3333	0.8177	3.126	ns
Postos médios 7 e 13	30.3333	2.0111	3.126	ns
Postos médios 7 e 14	7.3333	0.4862	3.126	ns
Postos médios 7 e 15	10.6667	0.7072	3.126	ns
Postos médios 8 e 9	9.3333	0.6188	3.126	ns
Postos médios 8 e 10	14.6667	0.9724	3.126	ns
Postos médios 8 e 11	42.0000	2.7846	3.126	ns
Postos médios 8 e 12	37.3333	2.4752	3.126	ns
Postos médios 8 e 13	55.3333	3.6686	3.126	< 0.05
Postos médios 8 e 14	32.3333	2.1437	3.126	ns
Postos médios 8 e 15	35.6667	2.3647	3.126	ns
Postos médios 9 e 10	5.3333	0.3536	3.126	ns
Postos médios 9 e 11	51.3333	3.4034	3.126	< 0.05
Postos médios 9 e 12	46.6667	3.0940	3.126	ns
Postos médios 9 e 13	64.6667	4.2874	3.126	< 0.05
Postos médios 9 e 14	41.6667	2.7625	3.126	ns
Postos médios 9 e 15	45.0000	2.9835	3.126	ns
Postos médios 10 e 11	56.6667	3.7570	3.126	< 0.05
Postos médios 10 e 12	52.0000	3.4476	3.126	< 0.05
Postos médios 10 e 13	70.0000	4.6410	3.126	< 0.05
Postos médios 10 e 14	47.0000	3.1161	3.126	ns
Postos médios 10 e 15	50.3333	3.3371	3.126	< 0.05
Postos médios 11 e 12	4.6667	0.3094	3.126	ns
Postos médios 11 e 13	13.3333	0.8840	3.126	ns
Postos médios 11 e 14	9.6667	0.6409	3.126	ns
Postos médios 11 e 15	6.3333	0.4199	3.126	ns
Postos médios 12 e 13	18.0000	1.1934	3.126	ns
Postos médios 12 e 14	5.0000	0.3315	3.126	ns
Postos médios 12 e 15	1.6667	0.1105	3.126	ns
Postos médios 13 e 14	23.0000	1.5249	3.126	ns
Postos médios 13 e 15	19.6667	1.3039	3.126	ns
Postos médios 14 e 15	3.3333	0.2210	3.126	ns

Teste de Kruskal-Wallis ↵

	Resultados			
H =	49.2698			
Graus de liberdade =	14			
(p) Kruskal-Wallis =	0.0000			
R 1 =	373.0000			
R 2 =	283.0000			
R 3 =	339.0000			
R 4 =	311.0000			
R 5 =	327.0000			
R 6 =	273.0000			
R 7 =	229.0000			
R 8 =	379.0000			
R 9 =	435.0000			
R 10 =	467.0000			
R 11 =	127.0000			
R 12 =	155.0000			
R 13 =	47.0000			
R 14 =	185.0000			
R 15 =	165.0000			
R 1 (posto médio) =	62.1667			
R 2 (posto médio) =	47.1667			
R 3 (posto médio) =	56.5000			
R 4 (posto médio) =	51.8333			
R 5 (posto médio) =	54.5000			
R 6 (posto médio) =	45.5000			
R 7 (posto médio) =	38.1667			
R 8 (posto médio) =	63.1667			
R 9 (posto médio) =	72.5000			
R 10 (posto médio) =	77.8333			
R 11 (posto médio) =	21.1667			
R 12 (posto médio) =	25.8333			
R 13 (posto médio) =	7.8333			
R 14 (posto médio) =	30.8333			
R 15 (posto médio) =	27.5000			
Comparações (método de Dunn)	Dif. Postos	z calculado	z crítico	p
Postos médios 1 e 2	15.0000	0.9945	3.126	ns
Postos médios 1 e 3	5.6667	0.3757	3.126	ns
Postos médios 1 e 4	10.3333	0.6851	3.126	ns
Postos médios 1 e 5	7.6667	0.5083	3.126	ns
Postos médios 1 e 6	16.6667	1.1050	3.126	ns
Postos médios 1 e 7	24.0000	1.5912	3.126	ns
Postos médios 1 e 8	1.0000	0.0663	3.126	ns
Postos médios 1 e 9	10.3333	0.6851	3.126	ns
Postos médios 1 e 10	15.6667	1.0387	3.126	ns
Postos médios 1 e 11	41.0000	2.7183	3.126	ns
Postos médios 1 e 12	36.3333	2.4089	3.126	ns