



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Efeitos do laser em baixa intensidade em *Candida albicans*. Estudo *in vitro* de parâmetros da luz**

**Fabiano de Lima**

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

**Orientadora:**

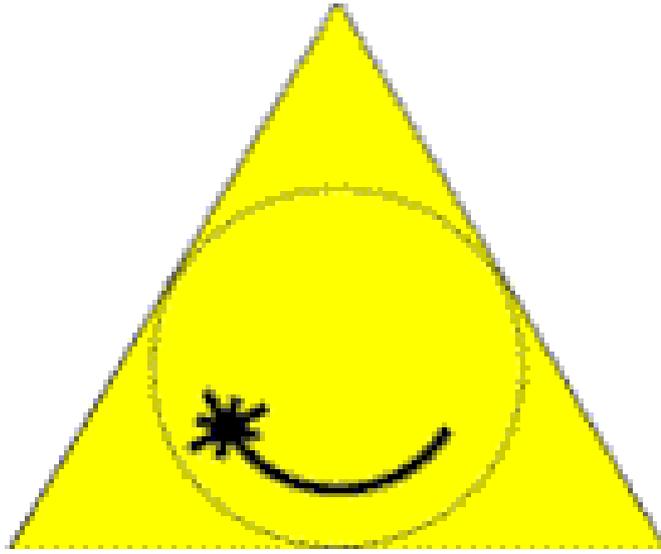
**Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**Co-orientadora:**

**Prof. Dra. Fernanda de Paula Eduardo**

**São Paulo**

**2012**



**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE LASERS EM  
ODONTOLOGIA**

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

**Efeitos do laser em baixa intensidade em *Candida albicans*. Estudo *in vitro* de parâmetros da luz**

**Fabiano de Lima**

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

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**Co-orientadora:**

**Prof. Dra. Fernanda de Paula Eduardo**

**São Paulo**

**2012**

*“Existe uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”*

*Albert Einstein*

## *Dedicatória*

*A minha esposa Carla,  
mulher guerreira e incentivadora,  
obrigado por entender  
as minhas ausências para que  
mais uma etapa em minha vida se cumprisse.*

*Aos meus filhos Davi e Daniel,  
motivo do meu orgulho e  
fonte da minha coragem  
e perseverança.*

*Aos meus pais, Dermeval e Maria Inês  
Pela educação, carinho, amor e  
por acreditarem e investirem na  
realização dos meus sonhos.*

*Aos meus irmãos,  
Maurício e Dermari,  
pelo carinho, apoio e incentivo.*

## *Agradecimentos*

*À Deus,  
pela Vida e  
pelas oportunidades  
concedidas no meu  
caminho.*

*Agradecimento especial,*

*À minha orientadora Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, por ter aberto as portas para mim e ter me conduzido até aqui, agradeço pela sua paciência e compreensão na orientação deste trabalho.*

A todos os professores e funcionários do mestrado profissionalizante pela paciência e dedicação, muito obrigado.

A todos os colegas do mestrado, pelos momentos de descontração, alegria e pela amizade.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para que eu concluísse este trabalho, meu sincero agradecimento.

**EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE EM *Candida albicans*.  
ESTUDO *IN VITRO* DE PARÂMETROS DA LUZ**

**Fabiano de Lima**

**RESUMO**

A utilização da terapia laser em baixa intensidade (LILT, do inglês “*Low-Intensity Laser Therapy*”) como agente bioestimulador da proliferação celular vem sendo uma das propostas de uso dessa técnica nas áreas da saúde humana. O presente estudo examinou o efeito da irradiação de um laser de diodo de GaAlAs emitindo em dois comprimentos de onda em cultura celulares de *Candida albicans in vitro*, utilizando parâmetros de uso comum em intervenções da LILT em odontologia. O objetivo dessa investigação foi avaliar se esses parâmetros estimulariam a proliferação de um fungo, com potencial patogênico, comum na cavidade oral. Para isso dois experimentos foram realizados em duplicata. No primeiro, utilizou-se o comprimento de onda 660nm e no segundo 780nm, do intervalo visível e infravermelho próximo, respectivamente, do espectro eletromagnético. Em ambos os experimentos foram utilizadas potências de 10mW e 40mW e densidades de energia de 1J/cm<sup>2</sup> e 4J/cm<sup>2</sup>. Cada experimento foi constituído por cinco grupos de estudo ressuspendidos numa placa de microtitulação, onde, cada grupo era composto por 4 porções de uma mesma amostra. Dos 5 grupos, 4 receberam irradiação e um não (controle). O crescimento populacional dos grupos foi aferido por um espectofotômetro a cada 30 minutos por 20 horas. Os resultados demonstraram que, para os parâmetros da LILT investigados, não houve estimulação da proliferação de *C. albicans*, sugerindo que a utilização da LILT para fins odontológicos não favorece a proliferação desse fungo.

# **EFFECTS OF LOW-INTENSITY LASER THERAPY ON *Candida albicans*. AN IN VITRO STUDY OF LIGHT PARAMETERS**

**Fabiano de Lima**

## ***ABSTRACT***

The use of the Low-Intensity Laser Therapy (LILT) as a biostimulator agent on cell proliferation has been one of the usage proposals of this technique in the human health field. The present study examined the effect of a GaAlAs diode laser on *Candida albicans* cell cultures *in vitro*, using common parameters in LILT interventions in dentistry. The objective of this investigation was to evaluate whether these parameters would stimulate the proliferation of a fungus, with pathogenic potential, common in the oral cavity. For this purpose two experiments were performed in duplicate. In the first, a 660nm wavelength was used and 780nm in the second, of the visible range and near infrared, respectively, of the electromagnetic spectrum. In both experiments strength of 10mW and 40mW and energy densities of 1J/cm<sup>2</sup> and 4 J/cm<sup>2</sup> were used. Each experiment was made up of five study groups, where each group consisted of 4 parts of the same sample resuspended in a microtiter plate. Of the five groups, four received irradiation and one did not (control). The population growth of the groups was measured by a spectrophotometer every 30 minutes for 20 hours. The results demonstrated that, for the LILT parameters investigated, there was no stimulating proliferation of *Candida albicans*, suggesting that the use of LILT for dental purposes does not favor the proliferation of this fungus.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Espectrofotômetro utilizado para a padronização do inóculo .....	17
FIGURA 2 – Espectrofotômetro utilizado para a mensuração da proliferação celular dos grupos de estudo.....	18
FIGURA 3 – Ilustração da divisão seqüencial dos grupos na placa de microtitulação com 96 poços .....	20
FIGURA 4 – Ilustração da posição de irradiação dos grupos.....	21
FIGURA 5 – Curva de proliferação celular do grupo irradiado com $\lambda = 660\text{nm}$ .....	23
FIGURA 6 – Tabela do desvio padrão dos grupos 660nm (em porcentagem) referentes a cinco instantes do Intervalo de horário mensurado.....	24
FIGURA 7 – Curva de crescimento celular do grupo irradiado com $\lambda = 780\text{nm}$ .....	25
FIGURA 8 – Tabela do desvio padrão dos grupos 780nm (em porcentagem) referentes a cinco instantes do Intervalo de horário mensurado.....	26
FIGURA 9 - Gráfico de parâmetros derivados dos grupos $\lambda = 660\text{nm}$ e $\lambda = 780\text{nm}$ .....	27

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

GaAIs	Arseneto de Gálio Alumínio
J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
LILT	Low intensity laser therapy
C. albicans	Candida albicans
W	watt
nm	nanômetro
µL	microlitro
mW	miliwatt
pH	potencial de Hidrogênio iônico
s	segundo
M	concentração molar
mm	milímetro
J	joule
ua	unidade arbitrária
°C	grau Celsius
T	transmitância
cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
PBS	<i>sodium phosphate buffer</i> (tampão fosfato de sódio)
λ	comprimento de onda (em nm)
h	hora
DE	densidade de energia
%	porcentagem
rpm	rotações por minuto

## 1. INTRODUÇÃO

A terapia laser em baixa intensidade (LILT – low intensity laser therapy) vem sendo utilizada na Odontologia mostrando bons resultados clínicos. A crescente utilização desse recurso não invasivo é inerente aos seus efeitos fotobiomoduladores curativos, os quais ainda não estão bem esclarecidos, porém, sua eficácia clínica, pode ser comprovada na literatura científica. Trabalhos mostram bons resultados desta técnica reportando efeitos antiinflamatório, analgésico e reparador. (1-4)

Há algum tempo o cirurgião dentista e os pacientes vêm se beneficiando desta tecnologia em várias patologias, como no tratamento de lesões de mucosa (5-6), no pós - operatório (4, 7), e nas disfunções têmporo-mandibulares. (8-12)

Um critério para a seleção de casos adequados para a LILT pode ser a presença ou ausência de infecções. Tratamentos a laser que se destinam a estimular a síntese protéica em feridas também podem estimular o crescimento de microrganismos, o que interferiria na cicatrização, a falta de estudos randomizados nessa situação pode ser a responsável por esse impasse (13-15).

Na literatura científica são encontrados alguns estudos avaliando os efeitos da LILT sobre bactérias (14-15), porém, é escassa a descrição de trabalhos sobre seu efeito na proliferação de fungos.

Durante a utilização da LILT em intervenções de afecções na cavidade oral é bem provável que microrganismos patogênicos comuns nesse meio, como *Candida albicans*, sejam irradiados sem intenção.

*C. albicans* é encontrada frequentemente na cavidade oral de indivíduos saudáveis na forma comensal (16) podendo, em situações oportunas, (imunodepressão) transformar-se em patógeno. Essa espécie possui a capacidade de invadir tecidos de indivíduos imunocomprometidos (17) causando doença como a candidíase orofaríngea (18-21), muito frequente em mucosite oral tipo 4 (pacientes oncológicos) (22) e em estomatite protética (trauma por

próteses) (23-24).

Como qualquer tratamento medicamentoso, a LILT tem “seu princípio ativo”, os parâmetros de irradiação. Parâmetros da luz como comprimento de onda, potência, energia e tempo de exposição são importantes para se conseguir o efeito fotobiológico desejável (25). A densidade de energia é considerada o fator mais relevante relacionado ao estímulo da proliferação celular (26), que é a potência multiplicada pelo tempo de exposição em razão da área irradiada.

A escassez de estudos científicos aliada a possibilidade da LILT estimular a proliferação de um fungo potencialmente patogênico, comum na cavidade oral, levou esse trabalho a investigar os efeitos de parâmetros clínicos odontológicos da LILT quando aplicados em cultura celular de *C. albicans in vitro*. O fungo *C. albicans* foi o objeto de estudo deste trabalho por apresentar as características propostas anteriormente e por ser um modelo indicado pela literatura (27).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de parâmetros da terapia laser em baixa intensidade (comprimentos de onda em 660nm e 780nm, potências de 10mW e 40mW e densidades de energia de 1J/cm<sup>2</sup> e 4J/cm<sup>2</sup>), frequentemente utilizados em odontologia, sobre cultura celular de *C. albicans*, fungo que apresenta potencial de virulência e é comum no meio bucal.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

O LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) é uma fonte luminosa de radiação eletromagnética não ionizante, monocromática e com coerência espacial e temporal. A LILT é uma modalidade terapêutica caracterizada pela interação da radiação laser em baixa intensidade com os tecidos biológicos.

Na LILT, a energia dos fótons absorvidos pelos fotorreceptores celulares desencadeia efeitos fotoquímicos, fotofísicos e ou fotobiológicos, a nível celular nos tecidos, agindo de forma biomoduladora (27-29) induzindo a célula a trabalhar para normalizar a região afetada. (30) Desde meados da década de 1960, Mester observou os efeitos do laser em baixa intensidade como bioestimulante acelerando a cicatrização de feridas na pele. (29)

Investigações clínicas e laboratoriais mostraram que essa técnica pode acelerar como inibir processos de cicatrização de acordo com os parâmetros da luz utilizada. (14)

Em 1988, Karu (31) propôs um mecanismo de ação para os lasers emitindo radiação no visível e no infravermelho próximo: para o visível ele atua em nível celular sobre citocromos e mitocôndrias, podendo induzir reações fotoquímicas e ativar a indução de enzimas intracelulares; no infravermelho as alterações se dariam sobre a membrana celular induzindo efeitos fotofísicos e fotoelétricos. Estes estímulos promovem o aumento da síntese de ATP, provocando alterações no metabolismo celular que resultam em bioestimulação. Smith (32) sugeriu, como complemento ao modelo de Karu, que a radiação infravermelha seria a responsável pelo início da cascata de eventos metabólicos conduzindo à mesma resposta final.

Uma variedade de comprimentos de onda do laser (633, 660, 820, 880,904 e 950nm) tem sido usada para o tratamento de lesões de pele e mucosa em humanos, bem como densidades de energia de 1J/cm<sup>2</sup> a 4J/cm<sup>2</sup>. (33-38)

A infecção bacteriana é um problema comum em feridas crônicas. A antibioticoterapia, como procedimento tópico usual para tratamento dessas condições, pode muitas vezes dar origem a efeitos colaterais indesejáveis como a resistência bacteriana. A utilização da LILT, como método para tratamento dessas condições adversas, está sendo muito investigada e tem despertado a atenção de pesquisadores com relação ao seu efeito coincidente sobre microrganismos, com potencial patogênico, presentes em ferimentos infectados (14).

Com o objetivo de avaliar os efeitos da LILT em bactérias, vários parâmetros de irradiação laser têm sido estudados em cultura celular *in vitro*. Irradiação usando laser pulsado de comprimento de onda 904nm com 27W de potência pico estimulou o crescimento de *Streptococcus mutans* (0,17-05J/cm<sup>2</sup>) (39) e *Staphylococcus aureus* (0,03J/cm<sup>2</sup>; 6KHz). (40) Karu *et al* demonstraram que a irradiação em 950nm, usando diodos super luminosos com 5KHz, estimulou o crescimento de *Escherichia coli* de forma dose-dependente com densidade de energia entre 1J/cm<sup>2</sup> e 12J/cm<sup>2</sup> e inibiu o crescimento, também de forma dose-dependente, com densidade de energia entre 30J/cm<sup>2</sup> e 60J/cm<sup>2</sup>. (41) O achado importante desse estudo foi que a inibição foi significativamente maior com 5KHz do que com 26Hz. O aumento do crescimento de *Escherichia coli* também tem sido observado após a irradiação com He-Ne (0,4J/cm<sup>2</sup> e 4,0J/cm<sup>2</sup>). (42) Um outro estudo observou que o crescimento da *Escherichia coli* manteve-se inalterado, quando as colônias foram contadas após 12h da irradiação com He-Ne ( $\lambda = 632,8\text{nm}$ ). (43)

Em um trabalho para avaliar a proliferação de bactérias, em lesão na pele de ratos, infectada com *Streptococcus aureus* (44), sob irradiação laser emitindo em 904nm com densidade de energia de 0,0764J/cm<sup>2</sup>, e num outro semelhante, envolvendo *Streptococcus mutans* (39), foi observado a aceleração da cicatrização. Os autores foram incapazes de explicar o benefício desses estudos, pois, não conseguiram concluir se o estímulo do laser sobre o tecido do hospedeiro predominou sobre o estímulo do crescimento bacteriano na ferida ou ainda se o laser conteve o processo inflamatório, o que contribuiu para abreviar o tempo de reparo tecidual.

Apesar de diversos trabalhos para avaliar os efeitos da LILT em bactérias (13, 14, 15, 42 e 43), são poucos os trabalhos realizados para investigar o efeito direto da LILT em fungos.

Estudos com várias espécies de *Candida* estão relatadas na literatura demonstrando a importância médica dada a esse microrganismo com potencial patogênico para várias doenças infecciosas. (45-47) As espécies de maior potencial patogênico em humanos, dentre as 200 espécies do gênero *Candida*, são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dublinensis*. (48-49) Dentre essas espécies, *C. albicans* faz parte da microbiota normal do Homem e pode ser encontrada na cavidade oral numa forma de relação comensal. (50)

Esse fungo é responsável por infecções oportunistas na pele e mucosas podendo até evoluir para disseminações sistêmicas graves e invasivas, ele está presente na maioria das infecções bucais, muito comum em pacientes imunossuprimidos. (51-55) A ampla utilização de antifúngicos para o tratamento desses pacientes resultou no aumento da resistência desses microrganismos (53), onde um efeito estimulante da LILT sobre esses microrganismos seria negativo e um efeito inibitório seria positivo.

Ao longo da pesquisa por trabalhos relacionados com o efeito da LILT em fungos, não foram encontrados artigos relacionados com o tema específico deste estudo, ou seja, avaliação dos parâmetros da irradiação laser de baixa intensidade quando empregada diretamente sobre fungos, dissociada de fotossensibilizadores. Neste sentido, o presente estudo realiza uma importante contribuição científica ao uso do laser como técnica de biomodulação.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os grupos de estudo desse experimento foram preparados a partir da cepa padrão de *Candida albicans* ATCC90028 fornecida pelo Laboratório de Leveduras Patogênicas do IBC-USP.

Para a irradiação dos grupos foi utilizado um equipamento laser de GaAlAs, Twin Laser da MMOptics, São Carlos, Brasil. Esse equipamento opera com dois comprimentos de onda (660nm e 780nm) e possui uma área de secção transversal da ponteira igual a 0,04 cm<sup>2</sup>.

Para a padronização do inóculo, foi utilizado o espectrofotômetro SP-220 da Biospectrocome com o software Winspec 2.3.1, do laboratório de Fotoprocessos não térmicos em Biociências do Centro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP (FIG. 1).



FIGURA 1 - Espectrofotômetro utilizado para a padronização do inóculo

Para a leitura do crescimento da população dos grupos de estudo, foi utilizado o espectrofotômetro Spectra Max – M4, calibrado em 540nm, com o software Soft Max Pro do mesmo laboratório citado acima (FIG. 2).



FIGURA 2 - Espectrofotômetro utilizado para a mensuração da proliferação celular dos grupos de estudo.

### **Padronização do inóculo**

O inóculo foi padronizado através de uma adaptação atribuída à metodologia sugerida por Nussbaum (14). Uma suspensão de *C. albicans* contendo  $10^6$  células/ml. Para a obtenção dessa suspensão, foram removidos os microrganismos do tubo de armazenagem e inseridos em um tubo falcon contendo 5mL de caldo *Sabouraud*. Essa suspensão foi incubada a 37°C em uma estufa bacteriológica, por 24h sob atmosfera ambiente.

Após o crescimento do fungo na estufa, o tubo falcon com os microrganismos foi centrifugado por 10 minutos a 3000rpm para promover a sedimentação das células.

No interior da câmara de fluxo laminar, devidamente preparada e desinfetada, foi removida a porção sobrenadante dessa suspensão deixando somente o *pellet* no tubo.

Para a obtenção de um número conhecido de microrganismos, foi preparado um tubo de ensaio estéril com 3ml de PBS (*phosphate buffer solution* – solução salina tamponada), 0,15M e pH 7,0, mais 30 $\mu$ L do *pellet*. Essa amostra foi homogeneizada no vórtex por 20s e o tubo de ensaio foi limpo com algodão antes de iniciar as leituras no espectrofotômetro, o qual foi programado para operar no comprimento de onda de 540nm. A concentração de células foi ajustada até chegar na quantidade de células desejada, ou seja, 70% de transmitância ( $T = 0,70$ ).

### **Padronização dos grupos de estudo**

Para o estudo dos parâmetros da LILT foram montados 5 grupos para cada comprimento de onda. Foi utilizada uma placa de microtitulação de 96 poços, com fundo chato, para a ressuspensão dos grupos de cada comprimento de onda. Cada grupo foi composto pela sequência de 4 poços na vertical, contendo em cada poço 30 $\mu$ L da mesma amostra irradiada, diluída em 270 $\mu$ L de caldo.

Os poços que não foram selecionados para a ressuspensão dos grupos foram preenchidos com 270 $\mu$ L de PBS.

A amostra de cada grupo foi preparada coletando 200 $\mu$ L do inóculo, com uma micropipeta, e ressuspensa numa placa de microtitulação, à parte, onde foi irradiada.

A sequência de poços selecionados na placa para a ressuspensão dos grupos de estudo foram:

- na série vertical os correspondentes às letras: C, D, E e F (FIG 3)
- na série horizontal os correspondentes aos números: 4, 5, 6, 7 e 8 (FIG. 3).

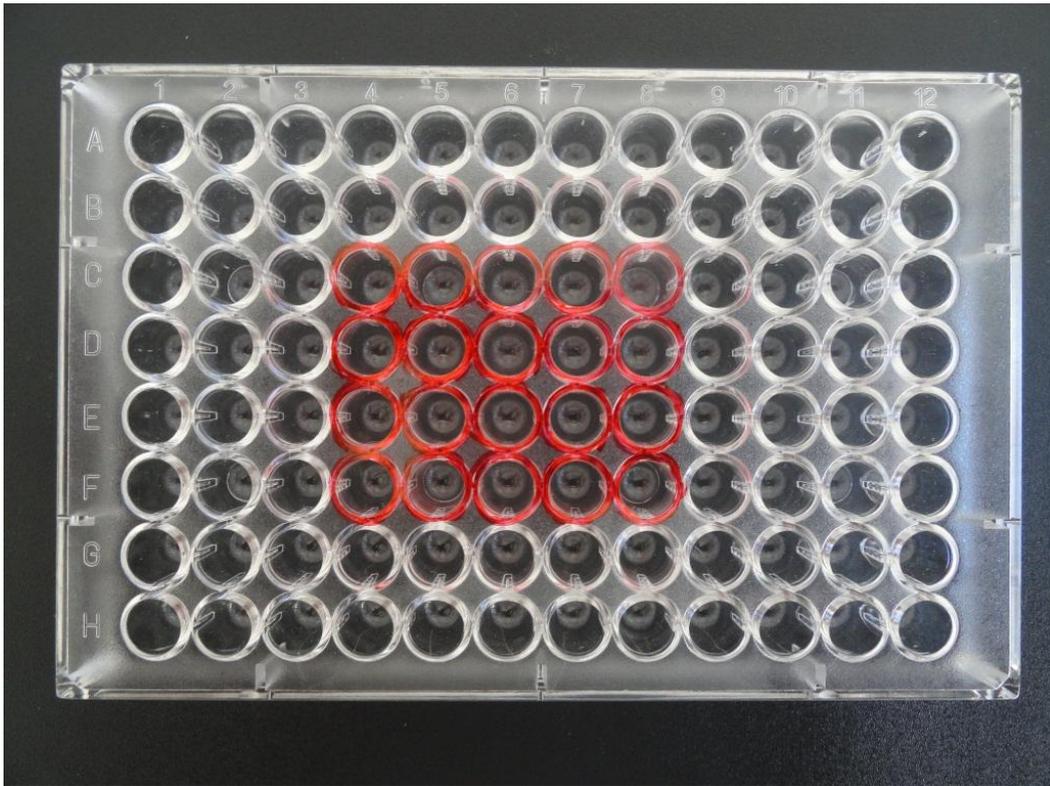


FIGURA 3 - Ilustração da divisão sequencial dos grupos na placa de microtulação, com 96 poços

Segue abaixo a tabela dos parâmetros da irradiação dos grupos e a disposição dos mesmos na placa de microtitulação:

660nm-10mW- 1J/cm <sup>2</sup>	660nm-10mW- 4J/cm <sup>2</sup>	660nm-40mW- 1J/cm <sup>2</sup>	660nm-40mW- 4J/cm <sup>2</sup>	Controle
C4	C5	C6	C7	C8
D4	D5	D6	D7	D8
E4	E5	E6	E7	E8
F4	F5	F6	F7	F8

780nm-10mW-1J/cm <sup>2</sup>	780nm-10mW-4J/cm <sup>2</sup>	780nm-40mW-1J/cm <sup>2</sup>	780nm-40mW-4J/cm <sup>2</sup>	Controle
C4	C5	C6	C7	C8
D4	D5	D6	D7	D8
E4	E5	E6	E7	E8
F4	F5	F6	F7	F8

### Padronização da irradiação

A ponteira do laser foi posicionada perpendicular e mantida a uma distância de 10mm da suspensão em todos os grupos irradiados (FIG. 4).

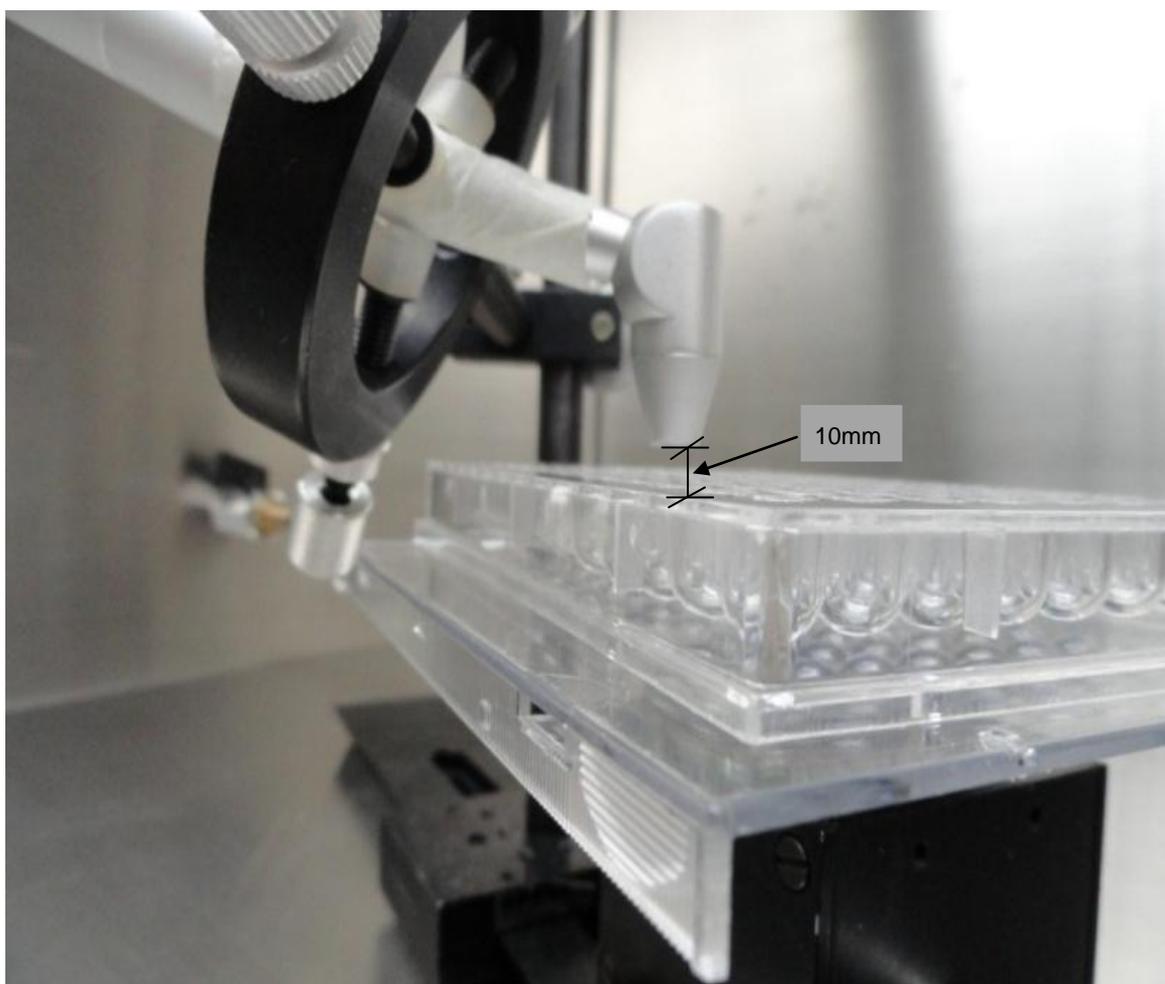


FIGURA 4 – Ilustração da posição de irradiação dos grupos

Após a irradiação e distribuição dos grupos foram iniciadas as leituras no espectrofotômetro Spectra Max M-4 para aferir o crescimento populacional dos mesmos. Realizou-se dois experimentos em duplicata, um para cada comprimento de onda e as leituras foram registradas a cada 30 minutos durante 20h, totalizando 41 leituras.

## 5. RESULTADOS

Para plotagem dos gráficos, foi feita a média das oito leituras obtidas para cada condição. Os gráficos da FIG. 5 mostram que houve inibição do crescimento celular em todos os grupos irradiados com 660nm, sendo menos evidente, quando foi utilizado a maior densidade de energia ( $4\text{J}/\text{cm}^2$ ) com a maior potência (40mW). Nota-se também que o perfil de crescimento celular é semelhante para todos os grupos.

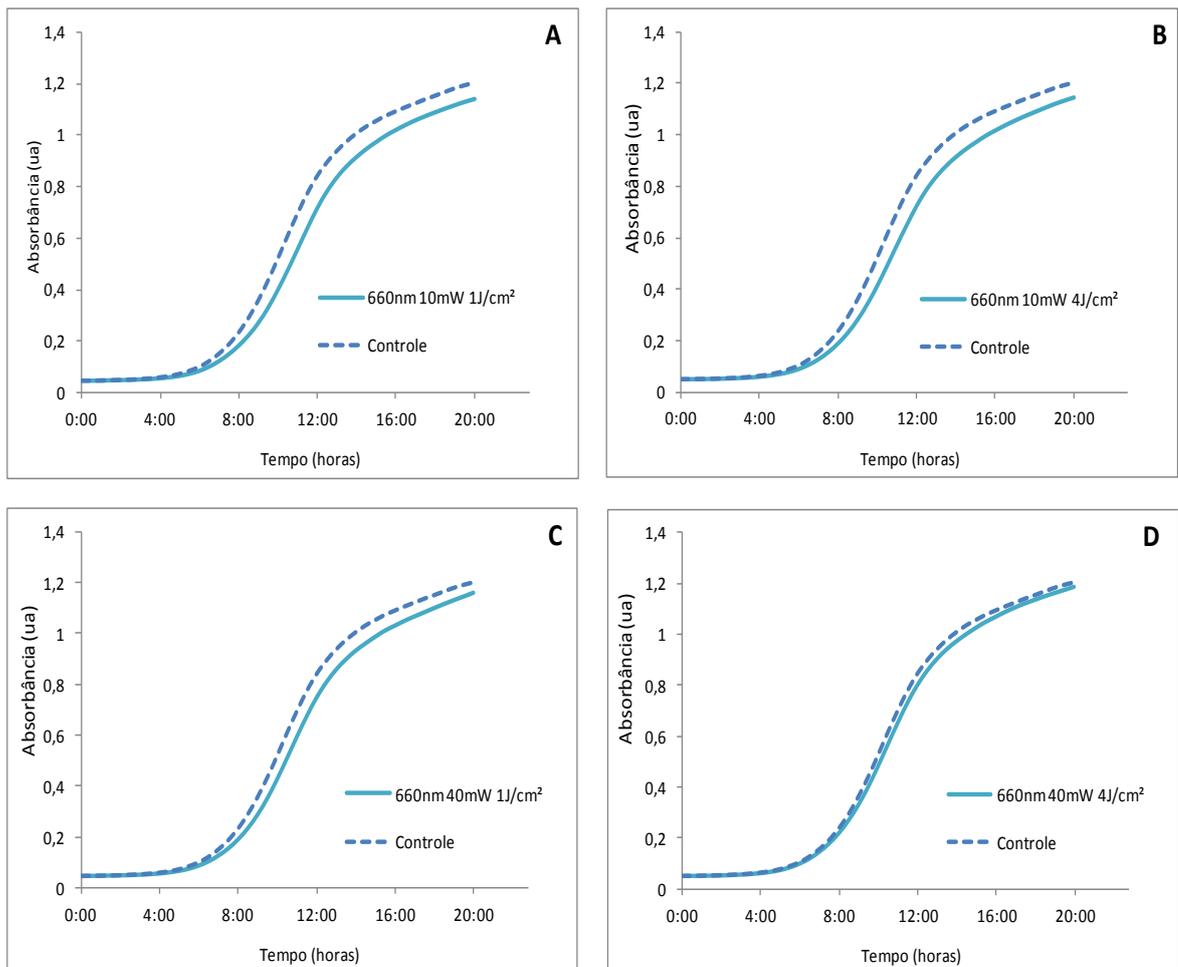


FIGURA 5 – Curva de proliferação celular dos grupos irradiados com  $\lambda = 660\text{nm}$ .

Os dados relatam que até o momento 7h houve crescimento celular lento e constante para todos os grupos, a partir daí ele aumentou abruptamente até o momento 12h, onde voltou a ser lento e constante até as 20h.

Desvio padrão dos grupos 660nm				
Instante	660nm 10mW 1J/cm <sup>2</sup>	660nm 10mW 4J/cm <sup>2</sup>	660nm 40mW 1J/cm <sup>2</sup>	660nm 40mW 4J/cm <sup>2</sup>
0h	0,60%	0,70%	1,20%	0,50%
5h	10,60%	9,70%	9,30%	5,10%
10h	23,20%	21,00%	17,60%	8,40%
15h	7,60%	7,80%	6,10%	2,90%
20h	5,10%	4,50%	3,20%	1,5

FIGURA 6 - Tabela do desvio padrão dos grupos 660nm (em porcentagem) referentes a cinco instantes do intervalo de horário mensurado

De acordo com a FIG. 6 os grupos 660nm-10mW-1J/cm<sup>2</sup>, 660nm-10mW-4J/cm<sup>2</sup> e 660nm-40mW-1J/cm<sup>2</sup> apresentaram uma maior inibição da proliferação celular demonstrada no instante de maior resposta celular dos grupos (10h). Esses resultados também indicam que a irradiação laser emitindo em 660nm associada a densidade de energia de 1J/cm<sup>2</sup>, independente da potência utilizada (10mW ou 40mW), apresentou um efeito inibitório evidente sobre o crescimento de *C. albicans*.

Quando a densidade de energia 4J foi utilizada, associada a menor potência (10mW), a inibição foi evidente, porém, quando essa mesma densidade de energia foi associada a maior potência (40mW) a inibição foi insignificante.

A FIG. 7 mostra o comportamento da proliferação celular para todos os grupos irradiados com  $\lambda = 780\text{nm}$  durante o período de leitura de 20h.

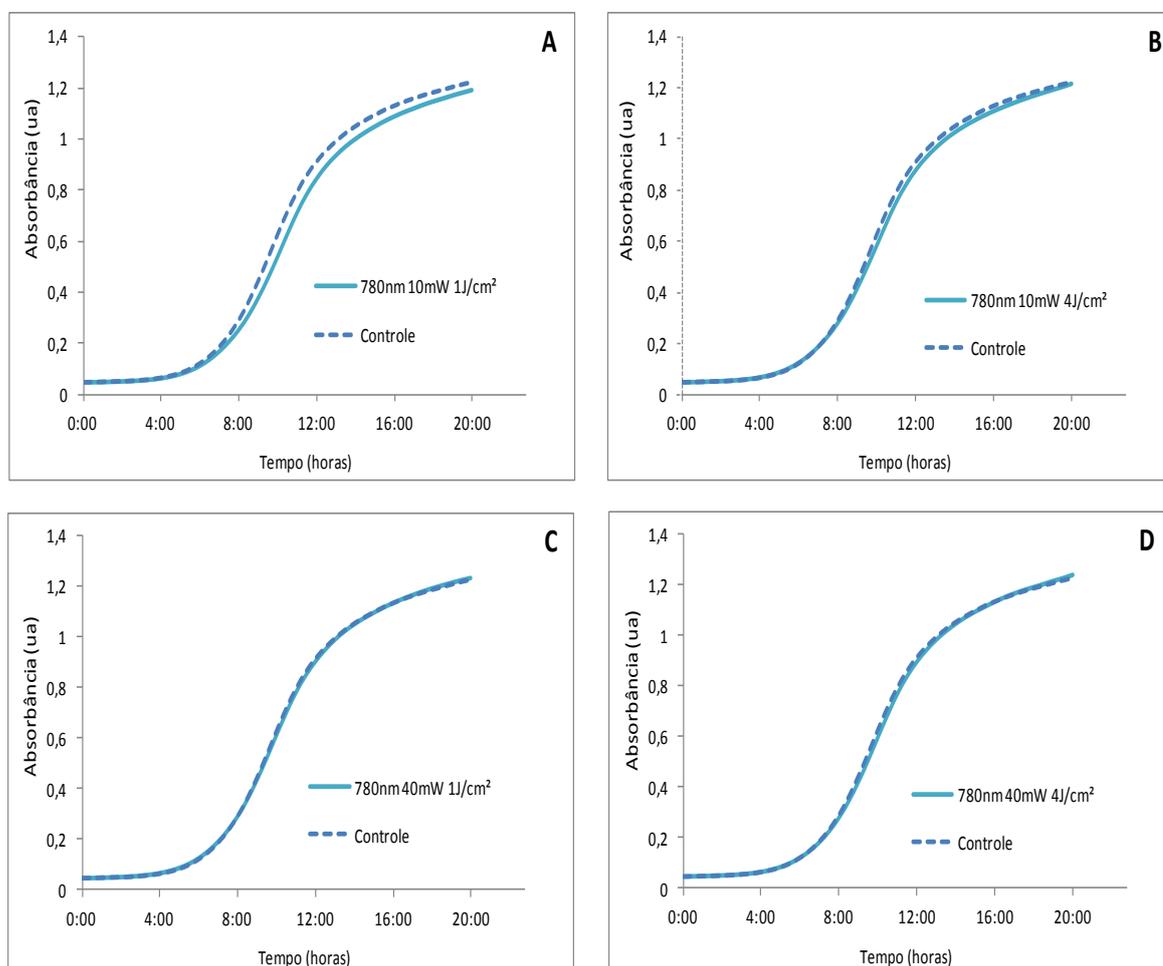


FIGURA 7 - Curva de crescimento celular dos grupos irradiado com  $\lambda = 780\text{nm}$

O gráfico indica que até o momento 7h houve aumento do crescimento celular lento e constante para todos os grupos, a partir daí, um crescimento abrupto até o momento 12h e deste ponto em diante continuou aumentando de forma lenta e constante até 20h. É possível observar na figura 7, onde o comprimento de onda utilizado foi no infravermelho próximo, que o perfil de crescimento celular dos grupos irradiados foi bem semelhante ao do controle e que quando ele foi associado à menor densidade de energia (1J/cm<sup>2</sup>) com a menor potência (10mW), apresentou um efeito inibitório evidente, enquanto que nos demais grupos o efeito apresentado foi insignificante.

A tabela da figura 8 mostra, no instante de pico (10h) da resposta celular do grupo 780nm, que somente o grupo irradiado com a menor potência (10mW) e menor densidade de energia (1J/cm<sup>2</sup>) evidenciou uma ligeira inibição da proliferação celular.

Os resultados do desvio padrão apresentados para os demais grupos na figura 8 mostram que a inibição para esses grupos foi insignificante.

Desvio padrão dos grupos 780nm				
Instante	780nm 10mW 1J/cm <sup>2</sup>	780nm 10mW 4J/cm <sup>2</sup>	780nm 40mW 1J/cm <sup>2</sup>	780nm 40mW 4J/cm <sup>2</sup>
0h	4,20%	1,40%	1,80%	0,70%
5h	2,50%	3,50%	4,90%	0,80%
10h	13,70%	6,90%	2,50%	4,70%
15h	4,10%	2,00%	0,10%	0,20%
20h	2,50%	0,60%	0,50%	1,00%

FIGURA 8 – Tabela do desvio padrão dos grupos 780nm (em porcentagem) referentes a cinco instantes do intervalo de horário mensurado

A FIG. 9 compara o efeito de dois comprimentos de onda distintos, utilizados com a mesma potência e densidade de energia, subtraído da amostra controle, em relação ao tempo.

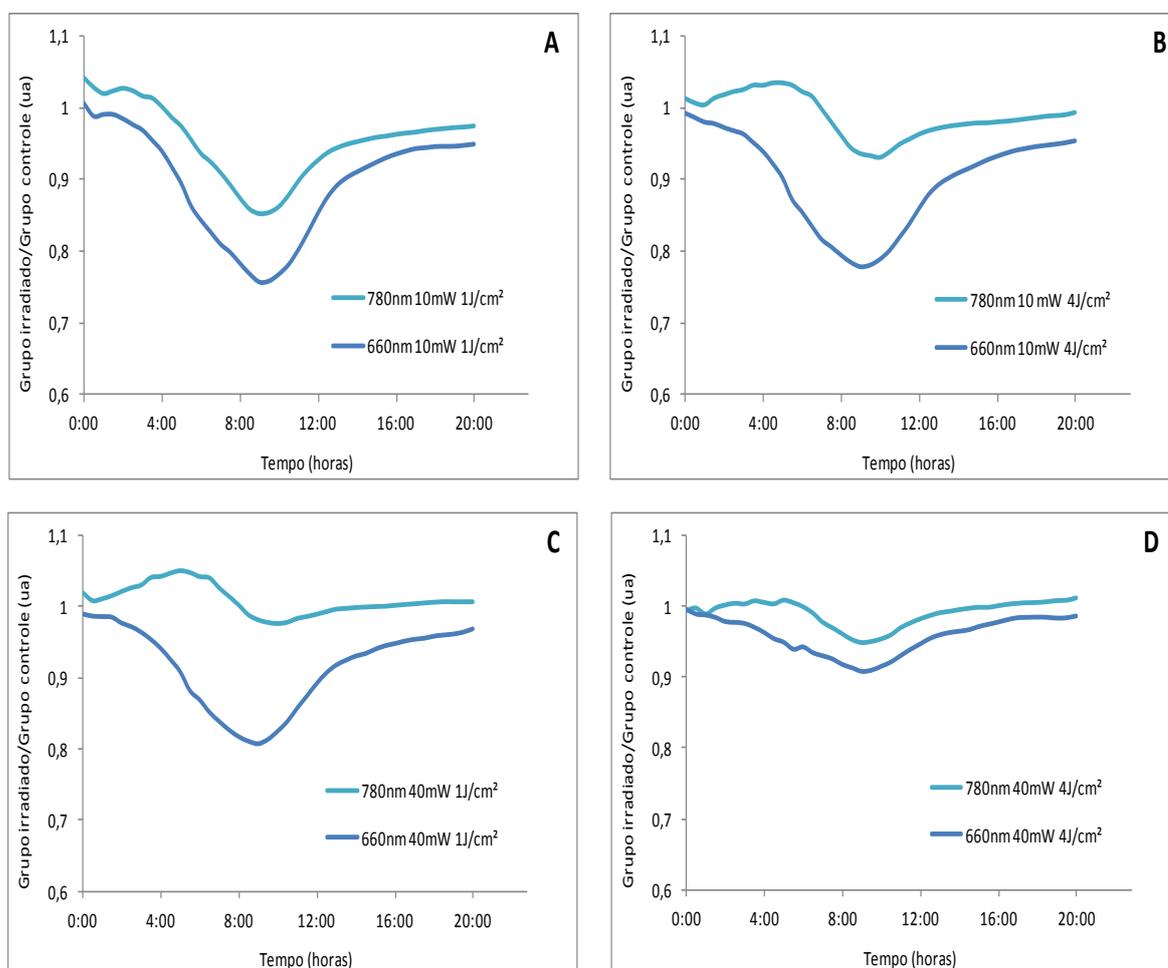


FIGURA 9 – Gráfico de parâmetros derivados dos grupos  $\lambda = 660\text{nm}$  e  $780\text{nm}$

O objetivo desta análise foi realçar os efeitos de estímulo e/ou inibição do crescimento celular. Para tanto, foi calculado a média de cada grupo e subtraído à respectiva média da amostra controle. Valores acima de 1 indicam estímulo da proliferação celular, enquanto que valores abaixo de 1 indicam inibição.

Todos os gráficos da FIG. 9 demonstram que houve inibição da proliferação celular para o comprimento de onda 660nm, independente da potência ou densidade de energia utilizada.

Para ambos os comprimentos de onda, o intervalo entre 8h e 12h descreve uma forte inibição no crescimento celular, algo que foge ao padrão em relação aos períodos anteriores e posteriores.

Quando ambos os comprimentos de onda foram associados à potência e densidade de energia mais altas (40mW e 4J/cm<sup>2</sup>), o efeito inibitório foi muito discreto (FIG. 9D).

Uma tendência discreta de estímulo pode ser observado no período de 1h a 5h nos grupos 780nm-10mW-4J/cm<sup>2</sup> e 780nm-40mW-1J/cm<sup>2</sup> nos gráficos B e C (FIG. 9).

O instante pico da resposta celular pode ser observado entre o instante 9h e 10h em todos os grupos nos gráficos A, B, C e D (FIG. 9).

## 6. DISCUSSÃO

O microrganismo *C. albicans* está presente na microbiota oral humana numa relação comensal, mas com potencial patogênico. A proliferação descontrolada desse fungo pode ser responsável por infecções locais e sistêmicas.

Durante a utilização da LILT na cavidade oral com o objetivo de estimular a reparação tecidual, reduzir edema e dor, há uma alta probabilidade de irradiar esse fungo sem intenção.

Este estudo teve o objetivo de verificar os efeitos biomoduladores de parâmetros odontológicos da LILT sobre esse microrganismo. As doses de energia aplicadas nesse trabalho,  $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$ ; foram embasadas em trabalhos científicos. (56) Essas doses foram condicionadas a 2 comprimentos de onda distintos (660nm e 780nm) e 2 potências distintas (10mW e 40mW).

Os resultados obtidos mostraram que o perfil de crescimento celular dos grupos (660nm e 780nm) foi igual ao do respectivo grupo controle, todos proliferaram.

O comprimento de onda 660nm revelou um efeito inibitório na proliferação celular quando foi condicionado à todas as potências (10mW e 40mW) e densidades de energia estudadas ( $1\text{J}/\text{cm}^2$  e  $4\text{J}/\text{cm}^2$ ), o efeito foi mais evidente nos grupos submetidos a densidade de energia mais baixa ( $1\text{J}/\text{cm}^2$ ).

Nussbaun *et al* (14) também observou esse efeito inibitório na proliferação celular de bactérias ao utilizar o comprimento de onda no visível (630nm e 660nm) condicionado à densidade de energia de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , muito semelhante a esse estudo.

Nesse trabalho o comprimento de onda 780nm apresentou uma tendência ao estímulo da proliferação celular nas primeiras horas após a irradiação, quando associado a potência e ou energia mais alta.

A menor potência e a menor densidade de energia associada ao comprimento de onda 780nm, apresentaram um discreto efeito inibitório,

essencialmente entre 8h e 12h. Em contra partida a maior potência e a maior densidade de energia indicaram resultados inibitórios pouco relevantes.

O experimento de Nussbaun *et al* (14), com os comprimentos de onda no infra vermelho próximo, 810nm e 905nm, mostrou um estímulo na proliferação celular de bactérias quando esses foram condicionados à densidade de energia de 1J/cm<sup>2</sup>. O efeito foi menos evidente para o comprimento de onda 905nm do que para o 810nm.

Os resultados de Nussbaun *et al* (14) e os obtidos nesse experimento, demonstram que o comprimento de onda no visível foi mais eficaz para o efeito de inibição da proliferação celular de bactérias, e que o comprimento de onda no infra vermelho próximo não mostrou efeitos significantes na proliferação celular. Mostraram também que os efeitos mais evidentes ocorreram quando os comprimentos de onda no visível e no infra vermelho próximo foram condicionados a densidade de energia de 1J/cm<sup>2</sup> e potências mais baixas.

## CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do crescimento celular dos grupos estudados, podemos sugerir que os parâmetros frequentemente usados para intervenções na cavidade oral não estimulam a proliferação de *Candida albicans*.

Além disso, os resultados obtidos indicam que a radiação laser emitida em 660nm está diretamente relacionada com a inibição de *C. albicans* e que seu efeito inibitório é mais evidente quando associada a potência mais baixa (10mW) e densidade de energia mais baixa (1J/cm<sup>2</sup>), enquanto que, a irradiação laser com o comprimento de onda infra vermelho próximo (780nm) não demonstrou efeitos relevantes com as doses estudadas nesse trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 HENRIQUES, A.C.G.; MAIA, A.M.A.; CIMÕES, R.; CASTRO, J.F.L. de. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 7, n. 3, p. 197-200, jul./set. 2008.
- 2 LOPES, A.L. Laser in dentistry: reality and myths. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, p. 64, 2004.
- 3 PESEVSKA,S.; NAKOVA, M.; PEJCIC, A.; IVANOVSKI, K.; ANGELOV, N.; MINDOVA, S. Biostimulative laser therapy: base for favorized and accented results in dentistry. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, v. 23, n. 1, p. 75-78, 2006.
- 4 BORGIO, M. **Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico**. 2010. 183 p. Dissertação (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2010.
- 5 CARVALHO, P.A.; JAGUAR, G.C.; PELLIZZON, A.C.; PRADO, J.D.; LOPES, R.N.; ALVES, F.A. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. **Oral Oncology**, Oxford, 2011 Sep 10. In press.
- 6 SAWASAKI, I.; GERALDO-MARTINS, V.R.; RIBEIRO, M.S.; MARQUES, M.M. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. **Lasers in Medical Science**, London, v. 24, n. 1, p. 113-6, 2009.
- 7 SOUZA, A.M.A. de. **O uso do laser de baixa potência na recuperação neurossensorial de pacientes submetidos à cirurgia de lateralização do nervo alveolar inferior**. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado Profissionalizante de Laser em Odontologia) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2009. Disponível em: <https://www.ipen.br/conteudo/upload/201003031354000.MPLO%20Dissertacao%202009%20Ana%20Maria%20Aparecida%20de%20Souza.pdf>.
- 8 KULEKCIOGLU, S.; SIVRIOGLU, K.; OZCAN, O.; PARLAK, M. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular disorder. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, Stockholm, v. 32, p. 114-8, 2003.

9 ARNAUD, F.A. de A. **Avaliação do efeito imediato da terapia laser com emissão no infravermelho nas desordens têmporo-mandibulares por intermédio da eletromiografia.** 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado Profissionalizante de Lasers em Odontologia) – IPEN, São Paulo, 2007. Disponível em: <https://www.ipen.br/conteudo/upload/200805081700470.MPLO%202007%20Dissertacao%20Fernando%20Arnaud.pdf>.

10 NÚÑEZ, S.C.; GARCEZ, A.S.; SUZUKI, S.S.; RIBEIRO, M.S. Management of mouth opening in patients with temporomandibular disorders through low-level laser therapy and transcutaneous electrical neural stimulation. **Photomedicine and Laser Surgery**, Larchmont, v. 24, n. 1, p. 45-9, feb. 2006.

11 VENANCIO, R. de A.; CAMPARIS, C.M.; LIZARELLI, R. de F.Z. Laser no tratamento de desordens temporomandibulares/Laser in the treatment of temporomandibular disorders. **JBA: Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM & Dor orofacial**, Curitiba, v. 2, n. 7, p. 229-34, jul./set. 2002.

12 WANG, X.; YANG, Z.; ZHANG, W.; YI, X.; LIANG, C.; LI, X. Efficacy evaluation of low-level laser therapy on temporomandibular disorder. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 29, n. 4, p. 393-5, 399, aug. 2011.

13 NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 810 nm laser irradiation on in vitro growth of bactéria: comparison of continuous wave and frequency modulated light. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 31, n. 5, p. 343-51, 2002.

14 NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of 630-, 660-, 810-, and 905-nm laser irradiation delivering radiant exposure of 1-50 J/cm<sup>2</sup> on three species of bactéria in vitro. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 20, n. 6, p. 325-33, dec. 2002.

15 NUSSBAUM, E.L.; LILGE, L.; MAZZULLI, T. Effects of low-level laser therapy (LLLT) of 810 nm upon *in Vitro* Growth of bacteria: relevance of irradiance and radiant exposure. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 21, n. 5, p. 283-90, 2003.

16 MARSH, P.; MARTIN, M.V. Infecções orais fúngicas. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia oral**. 4. ed. São Paulo: Editora Santos, 2005. p. 153-62.

17 KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 11, p. 1546-54, nov. 2005.

18 COLLINS, C.D.; COOKINHAM, S., SMITH, J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety, and patient acceptability. **Patient Preference and Adherence**, v. 5, p. 369-374, 2011.

19 FARAH, C.S.; ASHMAN, R.B.; CHALLACOMBE, S.J. Oral Candidosis. **Clinics in Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 553-62, sept./oct., 2000.

20 JORGE, A.O.C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-85, out./dez. 1997.

21 SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. **Oral Candidosis**. London: Wright, 1990. 265p.

22 GOMES, D.Q. de C.; ARAÚJO, A.M.M. de; PAIVA, D.E.B.; COSTA, L.J. da. Mucosite oral radioinduzida: etiologia, características clínico-histopatológicas, complicações e tratamento/Oral mucositis induced by radiotherapy: etiology, clinical and histological characteristics, complications and treatment. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 8, n. 3, p. 203-207, jul./ set., 2009.

23 THIELE, M.C. de M. **Estomatite protética: estudo dos fatores predisponentes, graus de colonização por *Candida* spp e fatores de virulência fúngica**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado na área de Estomatologia) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2005.

24 FALCÃO, A.F.P.; SANTOS, L. de B.; SAMPAIO, N. de M. Candidíase associada a próteses dentárias. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 30, p. 135-46, jan./jun. 2004.

25 KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, New York, v. QE-23, n. 10, p. 1703-717, oct. 1987.

26 KARU, T.I. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 49, p. 1-17, 1999.

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

28 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. **II Nuovo Cimento D**, Bologna, v. 3, n.2, p. 309-318, 1984.

29 MESTER, E.; MESTER, A.F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

30 OSHIRO, T.; CALDERHEAD, R.G. **Low level laser therapy**. Chichester: John Wiley & Sons, 1988.

31 KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. **Lasers in the Life Sciences**, Lausanne, v. 2, n. 1, p. 53-74, 1988.

32 SMITH, K.C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy. **Laser Therapy**, v. 3, p. 19-24, 1991.

33 SMITH, A.J.; DANIELS, T.; BOHNEN, J.M.A. Soft tissue infections and the diabetic foot. **American Journal of Surgery**, New York, v. 172, p. S7-12, 1996.

34 NUSSBAUM, E.L.; BIEMANN, I.; MUSTARD, B. Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. **Physical Therapy**, Alexandria, v. 74, p. 812-23, 1994.

35 SCHINDL, L.; KAINZ, A.; KERN, H. Effect of low-level laser irradiation on indolent ulcers caused by Buerger's disease; literature review and preliminary report. **Laser Therapy**, v. 4, p. 25-29, 1992.

36 LAGAN, K.; BAXTER, G.D.; ASHFORD, R. Combined phototherapy/low-intensity laser therapy in the management of diabetic ischemia and neuropathic ulceration: a single case series investigation. **Laser Therapy**, v. 10, p. 103-110, 1998.

37 MALM, M.; LUNDEBERG, T. Effect of low-power gallium arsenide laser on healing of venous ulcers. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery**, Stockholm, v. 25, p. 249-51, 1991.

38 LUCAS, C.; STANBOROUGH, R.; FREEMAN, C. et al. Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. **Lasers Med. Sci.**, v. 15, p. 84-93, 2000.

39 KIM, K.; LEE, C.W.; KIM, S.K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on the proliferation of *Streptococcus mutans*. **Laser Therapy**, v. 4, p. 81-85, 1992.

40 KIM, K.; LEE, P.; LEE, J. et al. Effects of low-level laser irradiation (LLLI) with 904-nm pulsed diode laser on *Staphylococcus aureus*. **Laser Therapy**, v. 9, p. 121-30, 1997.

41 KARU, T.; TIPHLOVA, O.; SAMOKHINA, M. et al. Effects of near-infrared laser and superluminescent diode irradiation on *Escherichia coli* division rate. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, New York, v. 26, p. 2162-165, 1990.

42 BERTOLONI, G.; SACCHETTO, R.; BARO, E. et al. Biochemical and morphological changes in *E. coli* irradiated by coherent and noncoherent 632.8-nm light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 18, p. 191-196, 1993.

43 DANIELS, L.; QUICKENDEN, T. Does low-intensity He-Ne laser radiation produce a photobiological growth response in *Escherichia coli*? **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 60, p. 481-85, 1994.

44 LEE, P.; KIM, K.; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wounds in rats. **Laser Therapy**, v. 5, p. 59-64, 1993.

45 ZÖLLNER, M.S.A.C.; JORGE, A.O.C. *Candida spp.* Occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mothers' mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 151-5, 2003.

46 VAZQUEZ, J.A. Invasive oesophageal candidiasis: current and developing treatment options. **Drugs**, Auckland, v. 63, n. 10, p. 971-89, 2003.

47 REGO, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida spp.* in children. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 332-6, 2003.

48 CANNON, R.D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization or candidiasis? **Journal of Dental Research**, Washington, v. 74, n. 5, p. 1152-61, maio 1995.

49 SAMARANAYAKE, Y.U.; SAMARANAYAKE, L.P. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 398-429, apr. 2001.

50 STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 48, n. 1, p. 3-10, feb. 1990.

51 HOFLING, J.F.; BARROS, L.M.; ALVES, A.C.B.A.; MARIANO, P.L.S.; GONÇALVES, R.B. Colonização bucal de espécies de *Candida*: prevalência e colonização. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 16-21, 2004.

52 PAULA, C.R. Candidíases. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A.S. et al. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 99-107.

53 TEICHERT, M.C.; JONES, J.W.; USACHEVA, M.N.; BIEL, M.A. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology and endodontics**, Saint Louis, v. 93, n. 2, p. 155-60, feb. 2002.

54 SOBEL, J.D.; VASQUEZ, J. Candidiasis in the Intensive Care Unit. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, New York, v. 24, n. 1, p. 99-112, 2003.

55 WILSON, M.; MIA, N. Sensitization of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. **Journal of oral pathology and medicine**, Copenhagen, v. 22, p. 354-7, may 1993.

56 ALMEIDA-LOPES, L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa intensidade utilizando diferentes parâmetros de irradiação. 2003. 189 p. **Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)** – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.