EFEITO DE DIFERENTES DOSIMETRIAS DA LUZ DE LASER EM 660NM SOBRE LINHAGENS DE FIBROBLASTOS 3T3

Maria Luiza Chemin (PROVIC), Eduardo Bauml Campagnoli (Orientador), e-mail: ebcampagnoli@yahoo.com.br, Mariane Sanson (Coorientadora), Maristela Hoffmann Giraldi (Coorientadora).

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Odontologia.

Ciências da Saúde (4.00.00.00-1); Odontologia (4.02.00.00-0).

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Laserterapia, Fibroblastos.

Resumo

A ação do laser de baixa potência vem sendo estudada desde a década de 1960 e hoje, sabe-se que o seu uso induz diferentes reações nos tecidos biológicos. Entre elas, encontram-se a ação anti-inflamatória, antiálgica, regenerativa e cicatrizante, entre outros múltiplos efeitos bioestimulantes. Essa pesquisa teve como objetivo determinar a ação *in vitro* da laserterapia em diferentes dosimetrias, (200J/cm^2, 100J/cm^2, 50J/cm^2, 25J/cm^2 e 12J/cm^2) sobre linhagens de fibroblastos (3T3). O comprimento de onda da luz do fotoativador foi de 660nm, o qual considera-se com boa transmissão para pele e mucosas. Foram utilizados os meios PBS (tampão fosfato-salino), DMEM como controle positivo e DMSO como controle negativo. A viabilidade celular foi analisada através do ensaio colorimétrico de atividade metabólica celular (MTT) em intervalos de 24 e 48 horas. Os resultados encontrados mostraram diferença significativa entre os meios de controle positivo, negativo e suas relações com a aplicação do laser, porém não há diferença significativa entre as diferentes dosimetrias da laserterapia.

Introdução

O laser de baixa potência tem sido testado desde 1960, tanto em tratamentos médicos quanto odontológicos, observando-se sua ação terapêutica sobre os diferentes tecidos biológicos. Sabe-se que seus efeitos terapêuticos são amplos e, entre eles, pode-se citar ações analgésicas, aumento na microcirculação local (MIRÓ et al., 1984; MAIER et al., 1990), no sistema linfático (LIEVENS, 1991), na proliferação epitelial (STEINLECHNER e DYSON, 1993) de fibroblastos (LUBART et al., 1995; WEBB et al., 1998; ALMEIDA-LOPES et al., 2003), assim como aumento da síntese de colágeno dos fibroblastos (ENWEMEKA et al., 1990; SKINNER et al., 1996) através da elevação dos níveis de ácido ascórbico nos fibroblastos e a formação da hidroxiprolina, responsável pela produção do colágeno.

Sobre o mecanismo de ação, entende-se que cada célula possui um limiar de sobrevivência, de acordo com o tecido onde ela está localizada e com o seu estado fisiológico, quando trabalha-se dentro desse limiar e lhe oferecendo uma baixa intensidade de energia, induz-se essa célula à bioestimulação, ou seja, ela

trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada através de um estímulo de sua membrana ou suas mitocôndrias, e isso denomina-se laserterapia.

De acordo com as pesquisas mais recentes, o uso do laser de baixa potência ainda não está inteiramente esclarecido, por enquanto, afirmam-se as capacidades bio e imunomodulatórias do mesmo, portanto, no presente projeto encontrou-se a necessidade de analisar, *in vitro,* a reação dos fibroblastos com aplicação direta e contínua de um laser diodo, com o objetivo de analisar a viabilidade celular fibroblástica usando diferentes meios para controle e diferentes dosimetrias de laserterapia.

Materiais e Métodos

Neste estudo, foi empregado o laser diodo (Whitening Lase II, DMC) com comprimento de onda de 660 nm e emissão contínua, com o modo de operação pontual e as dosimetrias aplicadas foram de 200J/cm^2, 100J/cm^2, 50J/cm^2, 25J/cm^2 e 12J/cm^2 em aplicação única, considerando-se a área do feixe de 0,028 cm^2. As linhagens celulares utilizadas foram 3T3 (fibroblastos), as quais foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

As células foram plaqueadas em concentração de 1x10^4/ml de DMEM/F-12 com 10% de SFB como controle positivo e também foi utilizado 150 μL do meio DMSO (dimetilsulfóxido) como controle negativo em cada poço de placas de cultura contendo 96 poços. A viabilidade celular foi analisada nos tempos de 24 e 48 horas e determinada por meio do teste conversão do MTT. As amostras foram divididas da seguinte forma:

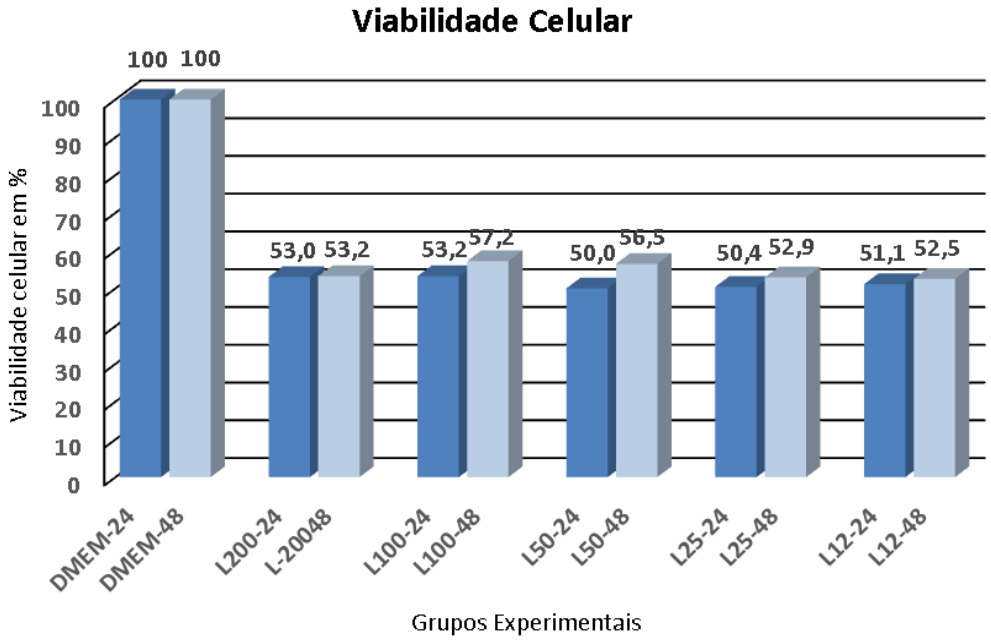
- Controle Positivo: as células foram expostas somente ao DMEM (100 μL).
- Controle Negativo: as células foram expostas somente ao DMSO (150 μL) por 15 minutos.
- Grupo 1: 3 poços de cultura contendo, cada poço, 100 μL da suspensão de células a serem testadas, com 100 μL de PBS e incubado por 15 minutos.
- Grupo 2: (3T3 + 200): idem ao grupo 1. Após o tempo de incubação, procede-se a irradiação com laser na dosimetria de 200J/cm^2.
- Grupo 3: (3T3 + 100): idem ao grupo 1. Após o tempo de incubação, procede-se a irradiação com laser na dosimetria de 100J/cm^2.
- Grupo 4: (3T3 + 50): idem ao grupo 1. Após o tempo de incubação, procede-se a irradiação com laser na dosimetria de 50J/cm^2.
- Grupo 5: (3T3 + 25): idem ao grupo 1. Após o tempo de incubação, procede-se a irradiação com laser na dosimetria de 25J/cm^2.
- Grupo 6: (3T3 + 12): idem ao grupo 1. Após o tempo de incubação, procede-se a irradiação com laser na dosimetria de 12J/cm^2.

A análise estatística foi feita através do programa estatístico BioEstat 5.0 (Brasil, 2007). Foi determinada a normalidade da amostra, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. E optou-se pelo uso de testes estatísticos paramétrico: análise da variância (ANOVA) um critério, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

Como pode-se observar no gráfico 01, quanto aos grupos de 24h houve diferença estatisticamente significante apenas entre o grupo DMEM-24 (controle positivo) e os as diferentes dosimetrias de laser aplicadas no período de 24 horas, (Teste de Tukey p<0,001), no entanto, não houve diferença estatisticamente significante quando se comparou somente as diferentes dosimetrias de laser aplicadas (ANOVA, p= 0,3890). Quanto aos grupos de 48h, houve diferença estatisticamente significante entre o grupo DMEM-48 (controle positivo) e as diferentes dosimetrias de laser que foram aplicadas, (Teste de Tukey p<0,001), no entanto, também não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando se comparou somente as diferentes dosimetrias de laser aplicadas (ANOVA, p= 0,7599).

GRÁFICO 01: Análise (%) da viabilidade celular dos fibroblastos (3T3) comparando-se os controles positivo e as diferentes dosimetrias.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Na tabela 01 observa-se que houve diferença estatisticamente significante ao comparar o DMSO (controle negativo) com as amostras tratadas somente com PBS e as que receberam irradiação ao laser tanto em 24 horas (ANOVA, p=0,0004) como em 48 horas (ANOVA, p<0,0001).

TABELA 01: Análise da viabilidade celular nas diferentes dosimetrias aplicadas quando comparado ao PBS (Tampão fosfato-salino) e DMSO (controle negativo).

Grupo	Viabilidade celular média (%) (desvio-padrão)	
	24 horas	48 horas
DMSO (controle negativo)	24,4% (DP = 1,45)^{B}	12,3% (DP = 1,57)^{B}
PBS (Tampão fosfato-salino)	55,6% (DP = 10,36)^{A}	54,5% (DP = 7,92) ^{A}
Laser 200	53,0% (DP =5,72) ^{A}	53,2% (DP = 5,11) ^{A}
Laser 100	53,2% (DP = 1,97) ^{A}	57,2% (DP = 6,47) ^{A}

Laser 50	50,0% (DP = 2,33) [A]	56,5% (DP = 9,63) [A]
Laser 25	50,4% (DP = 4,09) [A]	52,9% (DP = 1,94) [A]
Laser 12	51,1% (DP = 6,81) [A]	52,5% (DP = 6.69) [A]

Legenda: Letras iguais significam que não houve diferença estatisticamente significante. Letras diferentes mostras diferenças estatisticamente significantes.
Fonte: Dados da Pesquisa.

Conclusões

A partir desse estudo pode-se concluir que os procedimentos utilizados para a aplicação da luz do laser, quando utilizou-se somente o PBS reduziram a viabilidade celular ao se comparar com as células que foram tratadas somente com DMEM. Além disso, as diferentes dosagem de laser utilizadas, no comprimento de onda de 660nm, não influenciaram positivamente na viabilidade celular.

Referências

01. DOUGHERTY, T.J. et al. Photodynamic therapy. J. Natl. Cancer Inst., Cary, v. 90,n. 12, p. 889- 905, June 1998.
02. CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Phothodiag. Photodyn. Ther., Yorkshire, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.
03. ZANCANELA, DC. Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos. Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis. Ribeirão Preto: USP, 2009; 73p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP, 2009.
04. SAINI, R.; LEE, N.V.; LIU, K.Y.P.; POH, C. Prospects in the apllication of photodynamic therapy in oral câncer and premalignant lesions. Cancers, v. 8, n.
05. ALMEIDA, L.L. Análise *in vitro* da Proliferação Celular de Fibroblastos de Gengiva Humana Tratados com Laser de Baixa Potência. Dissertação do programa de Teses de Doutorado de São Carlos, Universidade de São Paulo, Novembro, 2003.
13. INOE, A.P.; ZAFANELLI, C.C.G.; ROSSATO, R.M.; LEME, M.C.; SANCHES, A.; ARAÚJO, C.V.; et al. Avaliação morfológica do efeito do laser de baixa potência He-Ne em feridas cutâneas de coelhos. Unipar, p. 27-30, 2008.
14. SILVA, D.F.; CLARK, R.; FERREIRA, M.L.; Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. Rev. Col. Bras. Cir.; p. 129-133, 2014.
15. UCHÔA, R.A; et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. Scielo – revista de dermatologia; 2010.