

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO LASER DE BAIXA POTÊNCIA
SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS HUMANOS TRATADOS COM
CISPLATINA**

Renata Lazari Sandoval

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Concentração Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Tosta

Brasília

2007

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus pacientes, que compartilham comigo suas dores, seus medos, sua vontade de viver...e que sem saberem preenchem os meus dias com o verdadeiro sentido da vida.

"O precipício só amedronta aqueles que não tem asas".

CET

Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Clovis e Izilda, pela educação proporcionada, imenso amor dedicado e eterno apoio.

Ao meu marido, Leonardo, pelo apoio, paciência, orientação, compreensão e enorme companheirismo.

Ao meu orientador, professor e amigo, Carlos Eduardo Tosta, pela amizade, dedicação, orientação, paciência e apoio incondicional, tanto profissional como espiritual.

Ao amigo e professor, Luciano Lauria Dib, que me acompanhou desde a graduação, despertou o meu interesse pela pesquisa e contribuiu para a construção de grande parte dos meus alicerces profissionais.

Ao Nelson e ao Felício, pelos inúmeros ensinamentos técnico-laboratoriais, pela paciência, amizade e apoio constante.

À Cláudia e à Ana, por estarem sempre prontas a me ajudar.

Aos amigos, colegas e voluntários que de algum modo se dispuseram a participar deste trabalho.

A Deus, por ser tão generoso comigo, iluminando o meu caminho com tantas pessoas especiais.

Prefácio

Eu, Renata Lazari Sandoval, sou dentista, estomatologista e trabalho com pacientes com câncer. A grande motivação do presente estudo foi a busca de ferramentas terapêuticas que pudessem amenizar o sofrimento dos pacientes que já fragilizados pela própria doença ainda manifestam efeitos colaterais extremamente debilitantes, decorrentes do tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, como é o caso da mucosite oral.

Em 2003, durante meu segundo ano de residência no Hospital do Câncer de São Paulo, tive o meu primeiro contato com a laserterapia de baixa potência para o tratamento da mucosite oral. A grande aceitação pelos pacientes, tanto adultos como crianças, principalmente devido à melhora da dor, fez com que logo fossem instituídos protocolos de irradiação com o laser na instituição. A escassa literatura científica disponível sobre o assunto na época incentivou a realização de um projeto de pesquisa que resultou em um período de aprendizado no Centro Antoine-Lacassagne (Nice, França), onde pude aprofundar meus conhecimentos sobre o laser com o querido Dr. Gaston Ciais.

Atualmente, a laserterapia faz parte da minha rotina profissional diária, porém ainda existe uma série de lacunas a serem preenchidas no que diz respeito ao embasamento científico do método. Tendo isso em vista, este trabalho reflete uma fagulha rumo à incessante busca de conhecimento, visando a melhora da prática clínica através da pesquisa científica.

Lista de siglas e abreviações

ATP	Adenosina trifosfato
Células HeLa	Linhagem de células imortalizadas de adenocarcinoma proveniente de uma paciente chamada Henrietta Lacks.
CMN	Células mononucleares
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i> que significa ácido etilenodiamino tetra-acético.
IC ₅₀	Concentração de cisplatina necessária para induzir redução de 50% na proliferação linfocitária após 72 horas de incubação.
LBP	Laserterapia de baixa potência
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> , que significa amplificação da luz por emissão estimulada de radiação.
STF	Solução de salina tamponada com fosfato.

Lista de unidades

Gy	Gray é a unidade que representa a quantidade de energia de radiação ionizante absorvida por unidade de massa, onde: $1 \text{ Gy} \equiv 1 \text{ m}^2 \text{ s}^{-2} \equiv 1 \text{ J kg}^{-1}$.
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado. O joule (J) é a unidade de energia e trabalho, e é definida como: $1 \text{ kg} \times \text{m}^2 \times \text{s}^{-2} = 1 \text{ N} \times \text{m} = 1 \text{ W} \times \text{s}$.
μM	Micromolar
nm	Nanometros
W	Watt é a unidade para potência. É equivalente a um joule por segundo (1 J/s).

Lista de figuras

Fig. 1. Espectro das radiações eletromagnéticas, em relação à frequência (f) e ao comprimento de onda (λ).....	16
Fig. 2. Propriedade de monocromaticidade da radiação laser.....	17
Fig. 3. Fenômeno de emissão espontânea de radiação.....	18
Fig. 4. Fenômeno de emissão estimulada de radiação.....	18
Fig. 5. Propriedade de colimação da radiação laser.....	18
Fig. 6. Ondas coerentes (A) e não-coerentes (B).....	18
Fig. 7. Proliferação de linfócitos de indivíduos sadios, após 96h de incubação com fito-hemaglutinina.....	33
Fig. 8. Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação linfocitária.....	33
Fig. 9. Efeito de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação linfocitária.....	34
Fig. 10. Interferência de diferentes concentrações de cisplatina, incubada por 72 horas, sobre a proliferação de linfócitos estimulados por PHA.....	35
Fig. 11. Correlação negativa entre a concentração de cisplatina e o percentual de redução da proliferação linfocitária.....	36
Fig. 12. Redução da proliferação linfocitária induzida por diferentes concentrações de cisplatina.....	36
Fig. 13. Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com as concentrações de cisplatina $1/8 IC_{50}$, $1/4 IC_{50}$ e $1 IC_{50}$	38
Fig. 14. Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração $1/8 IC_{50}$ de cisplatina.....	40
Fig. 15. Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração $1/4 IC_{50}$ de cisplatina.....	42
Fig. 16. Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração $1 IC_{50}$ de cisplatina.....	44

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos doadores e dados hematológicos.....	25
Tabela 2. Proliferação linfocitária com diferentes doses de radiação laser.....	32
Tabela 3. Proliferação linfocitária com a presença de 1/8 IC ₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser.....	39
Tabela 4. Proliferação linfocitária com a presença de 1/4 IC ₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser.....	41
Tabela 5. Proliferação linfocitária com a presença de 1 IC ₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser.....	43

Sumário

Lista de siglas e abreviações.....	5
Lista de unidades.....	6
Lista de figuras.....	7
Lista de tabelas.....	8
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	24
3. Materiais e Métodos	
3.1. Características do grupo de estudo.....	25
3.2. Considerações éticas.....	25
3.3. Protocolo geral.....	26
3.4. Coleta de sangue.....	27
3.5. Separação das células mononucleares.....	27
3.6. Avaliação da proliferação linfocitária.....	28
3.7. Interferência da cisplatina sobre a proliferação linfocitária.....	28
3.8. Irradiação com laser de baixa potência.....	29
3.9. Parâmetros utilizados para análise dos dados.....	30
3.10. Análise estatística.....	30
4. Resultados	
4.1. Validação da técnica de proliferação linfocitária por fito-hemaglutinina.....	31
4.2. Efeito da radiação laser de baixa potência sobre a proliferação linfocitária.....	32
4.3. Efeito da cisplatina sobre a proliferação linfocitária.....	35

4.4. Influência da radiação laser de baixa potência sobre o efeito citotóxico da cisplatina.....	37
4.5. Influência da radiação laser de baixa potência em relação às diferentes concentrações de cisplatina	
4.5.1. Concentração de cisplatina 1/8 IC ₅₀	39
4.5.2. Concentração de cisplatina 1/4 IC ₅₀	41
4.5.3. Concentração de cisplatina 1 IC ₅₀	43
5. Discussão.....	45
6. Conclusão.....	54
7. Referências bibliográficas.....	55
Anexos	
Anexo 1 – Glossário de conceitos físicos.....	66
Anexo 2 – Termo de consentimento.....	68
Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CONEP).....	69
Anexo 4 – Desenhos das placas de cultivo empregadas nos experimentos.....	70
Anexo 5 - Valores absolutos dos resultados obtidos nos experimentos.....	72

Resumo

A radiação laser de baixa potência tem sido utilizada com sucesso na prevenção e no tratamento de ulcerações orais causadas por terapias citotóxicas (radioterapia e quimioterapia), empregadas no tratamento oncológico. Sabe-se que o efeito curativo da radiação laser decorre, principalmente, da indução da proliferação de células que participam do processo de cicatrização tecidual. No entanto, ainda pouco se sabe sobre o seu efeito preventivo, devido às limitações investigacionais inerentes aos estudos clínicos envolvendo pacientes em tratamento oncológico. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de um modelo de estudo *in vitro* que possibilite investigações mais aprofundadas sem que haja o comprometimento do bem estar dos pacientes.

Tendo isso em vista, o objetivo da presente investigação foi desenvolver um modelo de estudo *in vitro* capaz de reproduzir fenômenos observados na prática clínica, tais como indução de citotoxicidade associada ao uso de quimioterapia, neste caso a cisplatina, observação de variações de resposta entre diferentes indivíduos, estimulação da proliferação celular e indução de citoproteção a partir da irradiação com laser de baixa potência.

O modelo desenvolvido teve como indicador dos fenômenos investigados a proliferação linfocitária, e mostrou-se adequado para o cumprimento de todos os objetivos apresentados. A radiação laser induziu aumento da proliferação linfocitária e reduziu a citotoxicidade causada pela cisplatina. Não foi possível observar relação de dose-resposta, pois houve grande variabilidade de resposta entre os indivíduos investigados. Essa variação de resposta interindividual ocorreu também em relação à ação tóxica da cisplatina. Esses dados corroboram uma nova tendência da área médica: a necessidade de individualização dos tratamentos com o auxílio de técnicas laboratoriais que possam prever padrões de resposta, orientando assim ajustes de doses e conseqüente otimização dos esquemas terapêuticos. O presente modelo de estudo pode ser utilizado em pesquisas futuras com esse propósito.

Palavras-chave: laser de baixa potência, mucosite oral, proliferação celular, citoproteção.

Abstract

Low energy laser radiation has been successfully used for the prevention and treatment of oral ulcerations induced by cytotoxic therapies (radiotherapy and chemotherapy), during oncologic treatment. The healing effect of laser radiation is a consequence of its potential to induce cell proliferation, including the cells that participate in tissue repair. In spite of its wide use, its role in the prevention of oral ulcerations is not completely understood, owing to investigational limitations. These limitations exist due to special aspects associated to the oncologic patient, including myelosuppression and higher risk of infection.

The development of an in vitro model that is capable of reproducing in vivo situations is mandatory to evaluate the effects caused by laser irradiation and to elucidate its mechanisms of action. With this purpose, we developed a model that was able to reproduce cytotoxicity caused by chemotherapeutic agents, cisplatin in this case, as well as interindividual response variations, stimulatory effect on cell proliferation and cytoprotection induced by low energy laser radiation.

In the present model, lymphocyte proliferation was the biological marker used to study the aforementioned circumstances. Laser radiation increased the lymphocyte proliferative response and promoted cytoprotection when the cells were exposed to cisplatin. It was not possible to show any relation between energy density of laser radiation and the obtained proliferative responses because of interindividual variations. These variations were also noted in the cytotoxicity assay induced by cisplatin. Esses dados corroboram uma nova tendência da área médica: a necessidade de individualização dos tratamentos com o auxílio de técnicas laboratoriais que possam prever padrões de resposta, orientando assim ajustes de doses e conseqüente otimização dos esquemas terapêuticos. O presente modelo de estudo pode ser utilizado em pesquisas futuras com esse propósito.

Palavras-chave: laser de baixa potência, mucosite oral, proliferação celular, citoproteção.

1. Introdução

A cada ano, mais de 10 milhões de pessoas são submetidas a terapias citotóxicas (quimioterapia e/ou radioterapia) para tratamento de câncer (BLIJLEVENS 2005). No Brasil, esse número se aproxima a 500.000 pessoas ao ano (estimativa do INCA para o ano de 2006). Infelizmente, as terapias citotóxicas não atingiram ainda um nível máximo de especificidade para células tumorais, o que resulta em toxicidade também para células normais que possuem alta taxa de proliferação, tais como células do sangue e da mucosa oral (KEEFE e GIBSON 2006). A toxicidade provocada nas células do sangue se manifesta clinicamente como citopenia, enquanto que na mucosa oral ocorrem ulcerações extremamente dolorosas, que interferem com a qualidade de vida do paciente durante o tratamento e aumentam o risco de infecções (ÖHRN e cols. 2001). O aparecimento de ulcerações orais além de aumentar o uso de opióides para controle da dor, determina a necessidade de nutrição parenteral e de dias adicionais de internação hospitalar. Em muitos casos, pode acarretar na interrupção do tratamento devido à gravidade das lesões (VERA-LLONCH e cols. 2006). Em pacientes imunocomprometidos, como é o caso daqueles submetidos à quimioterapia de altas doses no preparo para transplante de medula óssea, essas lesões estão associadas ao aumento do risco de mortalidade (RAPOPORT e cols. 1999, SONIS e cols. 2001, GABRIEL e cols. 2003).

Apesar das importantes implicações decorrentes do aparecimento dessas ulcerações orais, são poucos os recursos terapêuticos eficazes na prevenção e no tratamento delas (WORTHINGTON e cols. 2006). O tratamento é basicamente paliativo, consistindo em cuidados locais e medicação sintomática. Em relação à prevenção, algumas substâncias têm sido investigadas, tais como a amifostina (BUENTZEL e cols. 2006) e certos fatores de crescimento celular (MCDONNELL e LENZ 2007). Uma alternativa que tem sido empregada com sucesso tanto no tratamento como na prevenção dessas lesões é a laserterapia de baixa potência (LBP) (BENSADOUN e cols 1999, BENSADOUN 2002, GENOT e KLASTERSKY 2005, BENSADOUN e cols 2006). O nível de evidência científica em relação à

essa terapia pode ser considerado nível I, pois existem estudos publicados recentemente; aleatorizados, duplo cegos e controlados com placebo, que demonstraram a efetividade da laserterapia de baixa potência (LBP) (BENSADOUN e cols. 1999, ANTUNES e cols. 2007, SCHUBERT e cols. 2007).

A LBP é conhecida principalmente pela sua capacidade de estimular o processo de cicatrização tecidual (WOODRUFF e cols. 2004, HAWKINS e cols. 2005, BAYAT e cols. 2006, GAL e cols. 2006), pois promove aumento da proliferação de fibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER e cols. 1989, POURZARANDIAN e cols. 2005) e de ceratinócitos (YU e cols. 1997, GROSSMAN e cols. 1998), além de aumentar a produção de colágeno (YAMAMOTO e cols. 1996, PUGLIESE e cols. 2003). Com base nesses achados, Pourreau-Schneider e cols. (1992) foram os primeiros a utilizarem a LBP no tratamento e na prevenção das ulcerações orais decorrentes de quimioterapia. Foi observada redução do tempo na resolução das lesões de 19 para 8 dias. O efeito preventivo foi constatado através da diminuição da frequência das lesões de 43 para 7%.

A capacidade de estimulação da cicatrização tecidual vem sendo amplamente investigada em modelos *in vitro* e *in vivo* há mais de 40 anos (KLEIN e cols. 1965, RICEVUTI e cols. 1989). Por esse motivo, é um fenômeno mais compreendido, com aplicações clínicas consolidadas principalmente na área da dermatologia. Por outro lado, a proteção induzida pela radiação laser é um achado ainda pouco difundido. Os primeiros estudos *in vitro* realizados neste sentido tinham como objetivo a investigação da influência da radiação laser sobre o efeito citotóxico causado pela radiação ionizante (KARU e cols. 1994) e pela radiação ultravioleta (DUBE e cols. 2001). Recentemente, foram conduzidos estudos com outros agentes promotores de citotoxicidade, tais como o metanol (EELLS e cols. 2003) e o cianeto de potássio (WONG-RILEY e cols. 2005, LIANG e cols. 2006). Em todos eles foi possível observar aumento da sobrevivência celular (efeito citoprotetor) a partir da pré-irradiação com radiação laser. Ao contrário do que acontece no processo de estimulação cicatricial, no qual já existe uma injúria tecidual, e desta forma, pode-se observar de forma objetiva a melhora dos

parâmetros cicatriciais, os mecanismos envolvidos na citoproteção são mais difíceis de serem observados, pois neste caso, as alterações causadas pela radiação laser são menos evidentes, já que ocorrem antes da injúria. Por exemplo, no caso de uma ulceração oral tratada com radiação laser de baixa potência, é possível, através da análise histopatológica do tecido, investigar a reorganização da arquitetura tecidual. Por outro lado, no caso da irradiação de uma mucosa íntegra, a arquitetura tecidual estará inalterada, mas isso não quer dizer que a radiação laser não produziu efeito, e sim que, talvez, este efeito possa ser observado apenas no plano molecular. Portanto, embora alguns autores tenham realizado investigações *in vivo* em relação ao efeito preventivo da LBP sobre ulcerações orais causadas por terapias citotóxicas, essas investigações são limitadas a observações clínicas relacionadas ao aparecimento das lesões e ao tempo de resolução das mesmas, pois não é admissível a realização de biópsias, variações do esquema de aplicação da radiação laser ou variações das terapias citotóxicas, já que essas abordagens podem causar danos aos pacientes. Sendo assim, ainda pouco se sabe sobre padrões de resposta, adequação e otimização de protocolos de irradiação, mecanismos de ação envolvidos, dentre outros aspectos importantes no embasamento científico de uma intervenção terapêutica.

Antes do início da descrição dos possíveis mecanismos gerais envolvidos na ação da LBP, é importante o esclarecimento de alguns conceitos físicos sobre a radiação laser, pois eles serão facilitadores do entendimento da diferença entre esta e outras fontes de luz, de suas propriedades físicas e da sua interação com células ou tecidos.

Tanto a radiação laser como a luz emitida pelo sol ou por uma lâmpada elétrica são tipos de radiações eletromagnéticas que consistem em ondas eletromagnéticas criadas por partículas carregadas em movimento. Do ponto de vista da física, a luz pode comportar-se ou ter propriedades tanto de partículas como de ondas. Durante a sua propagação comporta-se como onda, e durante a interação com a matéria comporta-se como partícula (RATZ 1995). A propagação é caracterizada por uma grandeza física denominada frequência que corresponde ao número de oscilações da onda realizadas em um segundo (Anexo 1). A

freqüência é inversamente proporcional ao comprimento de onda, ou seja, quanto menor a freqüência maior é o comprimento de onda (Figura 1). Por sua vez, o comprimento de onda está relacionado à energia contida na partícula de luz, que é denominada fóton. A luz branca convencional é composta por fótons de diferentes comprimentos de onda que constituem uma faixa do espectro eletromagnético conhecida como luz visível. Se a luz branca convencional for decomposta com o auxílio de um prisma será possível observar as cores: vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e violeta; que correspondem aos fótons de diferentes comprimentos de onda que a compõem (Figura 2). No caso da radiação laser, ela é composta por fótons de um único comprimento de onda, e por isso, é monocromática (Figura 2). Essa diferença entre a luz branca convencional e a radiação laser está relacionada ao processo envolvido na emissão de fótons durante a produção de cada uma.

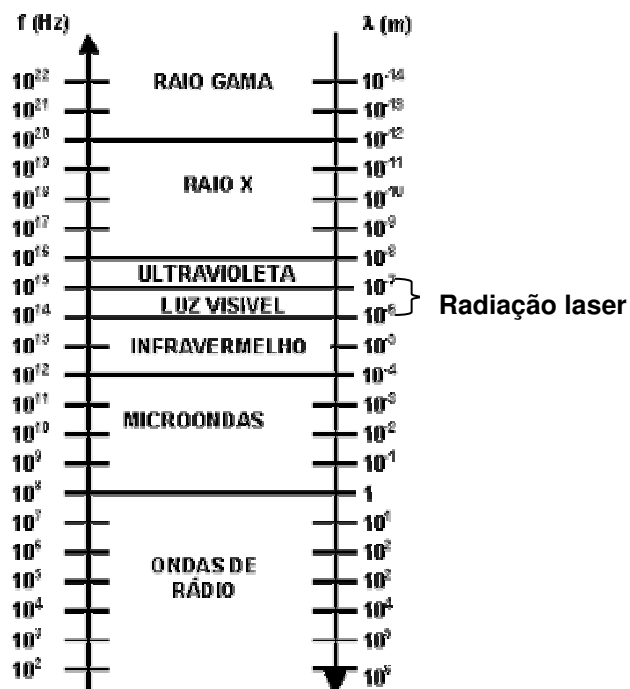


Figura 1. Espectro das radiações eletromagnéticas, em relação à freqüência (f) e ao comprimento de onda (λ). (http://www.fisica.net/einsteinjr/9/ondas_eletrmagneticas.html, acesso em 15/01/2007)

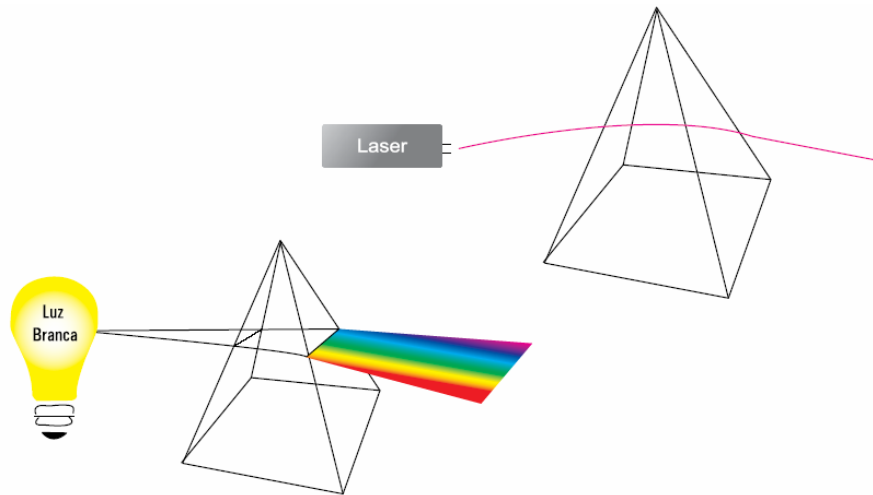


Figura 2. Propriedade de monocromaticidade da radiação laser. (Neves e cols. 2005)

Na natureza, quando átomos são excitados através da absorção de energia, elétrons passam de uma órbita para outra mais afastada do núcleo, e em frações de segundos, eles retornam espontaneamente à sua órbita de origem, podendo haver emissão de fótons. Esse fenômeno é conhecido como emissão espontânea de radiação (Figura 3) e dá origem a fótons com diferentes frequências, emitidos em diversas direções (ANDERSEN 2003). Processo similar ocorre em lâmpadas elétricas. Por outro lado, o fenômeno envolvido na produção de radiação laser é a emissão estimulada de radiação (Figura 4), que ocorre quando os elétrons de um átomo já excitado, ao absorver energia decaem para um nível menos energético, e neste processo emitem o dobro de fótons daqueles emitidos na emissão espontânea. Neste caso, são emitidos fótons de mesma energia, frequência, comprimento de onda, e ainda, com a mesma direção de propagação. Por esse motivo, além da propriedade de monocromaticidade, a radiação laser possui colimação (as ondas eletromagnéticas propagam-se de forma paralela, como um feixe) (Figura 5) e coerência (propagação dos fótons na mesma direção e com mesma frequência) (Figura 6). (RATZ 1995)

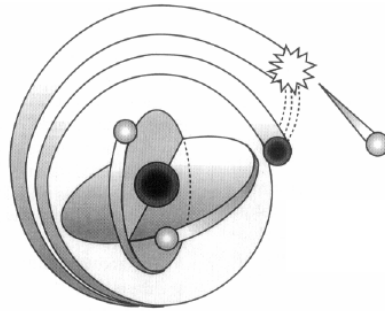


Figura 3. Fenômeno de emissão espontânea de radiação. (Ratz 1995).

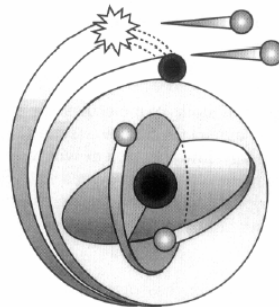


Figura 4. Fenômeno de emissão estimulada de radiação. (Ratz 1995).

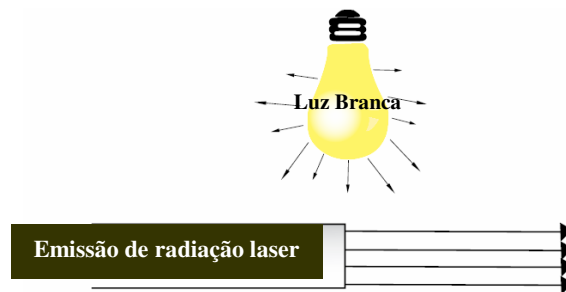


Figura 5. Propriedade de colimação da radiação laser. (Neves e cols. 2005)

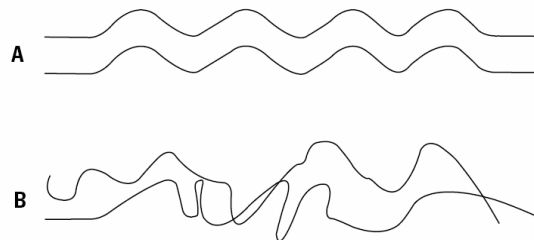


Figura 6. Ondas coerentes (A) e não-coerentes (B). (Neves e cols. 2005)

O comprimento de onda da radiação laser varia de acordo com a natureza química do meio utilizado como emissor de radiação. Existem meios gasosos (hélio-neônio 632,8nm, gás carbônico 10.600nm), sólidos (rubi 694nm) e líquidos (corantes orgânicos dissolvidos em solventes) (CARROLL e HUMPHREYS 2006). Dentre o grupo dos meios sólidos existem os semicondutores, onde os lasers diodo estão incluídos: arseneto de gálio (904nm), arseneto de gálio-alumínio (660, 820, 870, 880nm), alumínio-gálio-índio-fósforo (660, 780nm) (BABAPOUR e cols.1995). Dependendo do comprimento de onda da radiação, os lasers são classificados em baixa e alta potência. Comprimentos de onda contidos no espectro eletromagnético entre 488 e 904nm, isto é, entre a faixa de luz visível e próximo ao infravermelho, caracterizam os lasers de baixa potência (BABAPOUR e cols.1995). Acima dessa faixa, estão os lasers de alta potência. Essa característica física irá influenciar o efeito biológico produzido por cada radiação (RATZ 1995, WALSH 1997).

O efeito biológico depende, sobretudo, da capacidade de absorção da radiação laser pelo tecido ou célula. Essa absorção ocorre de maneira seletiva apenas por certas moléculas que são sensíveis a determinados comprimentos de onda (WELCH e cols. 1989, CARROLL e HUMPHREYS 2006). Essas moléculas são denominadas cromóforos. Para comprimentos de onda do espectro da LBP, os cromóforos são tipicamente metais ou moléculas que contém átomos metálicos em sua estrutura, como por exemplo, o grupo heme das globinas (hemoglobina, mioglobina) e dos citocromos (KARU 1999). No espectro dos lasers de alta potência, a radiação é absorvida principalmente pelas moléculas de água do tecido. O fato da radiação laser de alta potência ser absorvida por moléculas de água, aliado à alta concentração de energia emitida, há conversão da energia em calor, o que confere a esse tipo de laser aplicações na área cirúrgica para o corte e a coagulação de tecidos. No caso da radiação laser de baixa potência, a energia emitida é tão baixa que não há evento térmico, as elevações de temperatura do tecido não ultrapassam 0,5°C (BABAPOUR e cols. 1995). Portanto pode-se dizer que os efeitos biológicos dos lasers de alta potência dependem de reações

fototérmicas, enquanto que para os lasers de baixa potência ocorrem reações fotoquímicas, como será discutido adiante (BABAPOUR e cols.1995).

A partir da absorção de radiação laser de baixa potência por cromóforos celulares ocorre fotobiomodulação, isto é, a modulação de certas funções celulares através da indução de reações fotoquímicas (BABAPOUR e cols.1995). Embora os mecanismos envolvidos não estejam completamente elucidados, há indícios de que o principal mecanismo seja o aumento do metabolismo oxidativo através da foto-oxidação do citocromo c, uma proteína da membrana mitocondrial de mamíferos que participa do transporte de elétrons durante a síntese de ATP (KARU e cols. 2004, EELLS e cols. 2004, KARU e cols. 2005, WINTERLE e EINARSDÓTTIR 2006). Tanto que Pastore e cols. (2000) observaram aumento do transporte de elétrons e Karu e cols. (1995) observaram aumento da síntese de ATP, em decorrência da irradiação com laser de baixa potência.

O citocromo c possui centros redox (grupos que sofrem oxidação-redução) constituídos por dois grupos heme (ferro), átomos de cobre, zinco e magnésio. Durante o transporte de elétrons os grupos heme se alternam em estados de oxidação Fe^{2+} e de redução Fe^{3+} devido perda ou ganho de elétrons (VOET e cols. 2002). O aumento do metabolismo oxidativo tem como consequência o aumento da produção de radicais livres (oxigênio nascente, íon superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico), que são produtos da redução parcial do oxigênio molecular. Lavi e cols (2003) demonstraram aumento da produção de peróxido de hidrogênio em células cardíacas irradiadas com comprimentos de onda na faixa da LBP. A quantidade de radicais livres produzidos pode influenciar o comportamento celular. Altas concentrações podem levar à morte celular (FRAIKIN e cols. 1996), enquanto que baixas concentrações podem estimular a proliferação (VLADIMIROV e cols. 2004). De fato, Wiese e cols. (1995) mostraram que concentrações extremamente baixas de peróxido de hidrogênio (de 3 a $15\mu M$) promovem aumento de 25 a 45% da proliferação celular, concentrações médias (de 250 a $400\mu M$) causam perda permanente do potencial de replicação celular, enquanto que altas concentrações (≥ 1 mM) causam morte celular por necrose.

O efeito citotóxico dos radicais livres advém da produção de lesões oxidativas em sítios celulares vitais, por exemplo, a oxidação lipídica causa rompimento de membranas biológicas (GIROTTI 2001) e as lesões oxidativas no DNA podem promover mutações pontuais (POULSEN 2005). Todavia, o efeito proliferativo ou citotóxico não depende apenas da intensidade do estresse oxidativo, mas também da eficácia de mecanismos citoprotetores endógenos, tais como mecanismos antioxidantes e de reparo de DNA (FRAIKIN e cols. 2000).

Sugere-se que a LBP induza estresse oxidativo de baixa intensidade, e assim ative os mecanismos citoprotetores, auxiliando a célula a responder mais prontamente e de maneira mais eficaz a um dano seqüencial causado por agentes citotóxicos (KOHLI e GUPTA 2003). De fato, Karu e cols (1994) demonstraram que a pré-irradiação com laser de baixa potência aumenta em 30 a 40% a viabilidade de células HeLa submetidas à radiação gama. De acordo com Joyce e cols. (1999), isso decorre da redução da freqüência de aberrações cromossômicas, provavelmente, devido à ativação dos mecanismos citoprotetores pela LBP. Uma via possível de ativação desses mecanismos seria através da produção de radicais livres. Foi demonstrado por Wiese e cols. (1995) que o pré-tratamento de células com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio (120 a 150 μM), seguido de altas concentrações, promove aumento da sobrevivência celular de 1,9% para 76,5%.

Além das evidências do envolvimento da foto-oxidação do citocromo c, da indução de estresse oxidativo de baixa intensidade, da ativação de mecanismos antioxidantes e de reparo de DNA, é possível que várias outras vias também estejam envolvidas nas alterações provocadas pela radiação laser. Como mostrado por Eells e cols. (2004), uma série de genes sofre regulação pela ação da LBP, incluindo genes que codificam proteínas envolvidas no reparo de DNA, enzimas antioxidantes, moléculas transportadoras, genes da família oxidase do citocromo c e genes envolvidos no crescimento e manutenção celular. Isso explica a diversidade de achados relatados na literatura científica, dentre eles, redução do tecido cicatricial após infarto do miocárdio (GATSURA e cols. 2004), diminuição da toxicidade induzida por metanol em células da retina (EELLS e cols. 2003),

aumento da capacidade de fertilização de espermatozóides (CORRAL-BAQUES e cols. 2005) e regeneração de tecidos com baixo potencial cicatricial (CARVALHO e cols. 2006).

Tendo em vista o impacto negativo dos efeitos colaterais causados por terapias citotóxicas no tratamento do câncer e a evidência de citoproteção induzida pela LBP, é imprescindível a elaboração de estudos que investiguem de forma mais aprofundada a interferência da LBP sobre a ação de agentes citotóxicos. Para que isso ocorra é indispensável o desenvolvimento de um modelo de estudo *in vitro* capaz de reproduzir o fenômeno de proliferação celular, citotoxicidade, citoproteção, relações de dose-resposta, variações interindividuais, dentre outros fenômenos observados *in vivo*. Uma vez que não é possível, do ponto de vista ético, realizar investigações que coloquem em risco o bem-estar dos pacientes já fragilizados pela doença, e pelo tratamento oncológico (radioterapia e/ou quimioterapia).

Sendo assim, a presente investigação teve como objetivo desenvolver um modelo *in vitro* capaz de reproduzir esses fenômenos biológicos observados na prática clínica, e com isso possibilitar a investigação dos mecanismos de ação da LBP, das variações de dose-resposta, permitindo o delineamento, o aprimoramento e a otimização de protocolos de aplicação da radiação laser. Foi utilizado como marcador biológico dos fenômenos investigados a proliferação linfocitária devido ao fato dos linfócitos participarem do processo de reparação tecidual e de serem sensíveis à radiação laser de baixa potência (FUNK e cols. 1993, AGAIBY e cols. 2000, NOVOSELOVA e cols. 2006). Funk e cols. (1993) observaram aumento da produção de interleucinas 1 e 2, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama em culturas de células mononucleares irradiadas com laser de baixa potência. Agaiby e cols. (2000) também observaram aumento da produção de fatores angiogênicos por linfócitos T após irradiação.

No modelo desenvolvido para indução de citotoxicidade, optou-se pelo uso da cisplatina, um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer (ovário, testículo, cabeça e pescoço, pulmão), e que apresenta importantes efeitos colaterais, tais como nefrotoxicidade, neurotoxicidade,

ototoxicidade, toxicidade oral e mielossupressão (BOULIKAS e VOUGIOUKA 2003, WANG e LIPPARD 2005). Tais efeitos advêm do fato da cisplatina inibir a síntese de DNA pela produção de ligações cruzadas inter e intrafitas no DNA. As sínteses de proteínas e RNA também são inibidas, porém em menor extensão. Os dados farmacológicos da droga serão citados mais adiante.

2. Objetivos

2.1. Geral

Desenvolver um modelo *in vitro* para avaliar o efeito protetor da radiação laser de baixa potência sobre a citotoxicidade induzida por agentes quimioterápicos.

2.2. Específicos

Avaliar o efeito da radiação laser de baixa potência sobre a proliferação linfocitária.

Avaliar a atividade citotóxica da cisplatina sobre a proliferação linfocitária.

Avaliar a interferência da radiação laser de baixa potência sobre a atividade citotóxica da cisplatina.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização do grupo de estudo

Esta investigação foi conduzida no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O grupo de estudo constou de seis indivíduos saudáveis, tendo sido adotados como critérios de inclusão: pessoas de ambos os sexos, de 21 a 50 anos de idade, que não estivessem fazendo uso de qualquer medicação e que não tivessem estado doentes nos últimos 30 dias. As características dos componentes do grupo de estudo e os resultados de seus leucogramas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos doadores e dados hematológicos

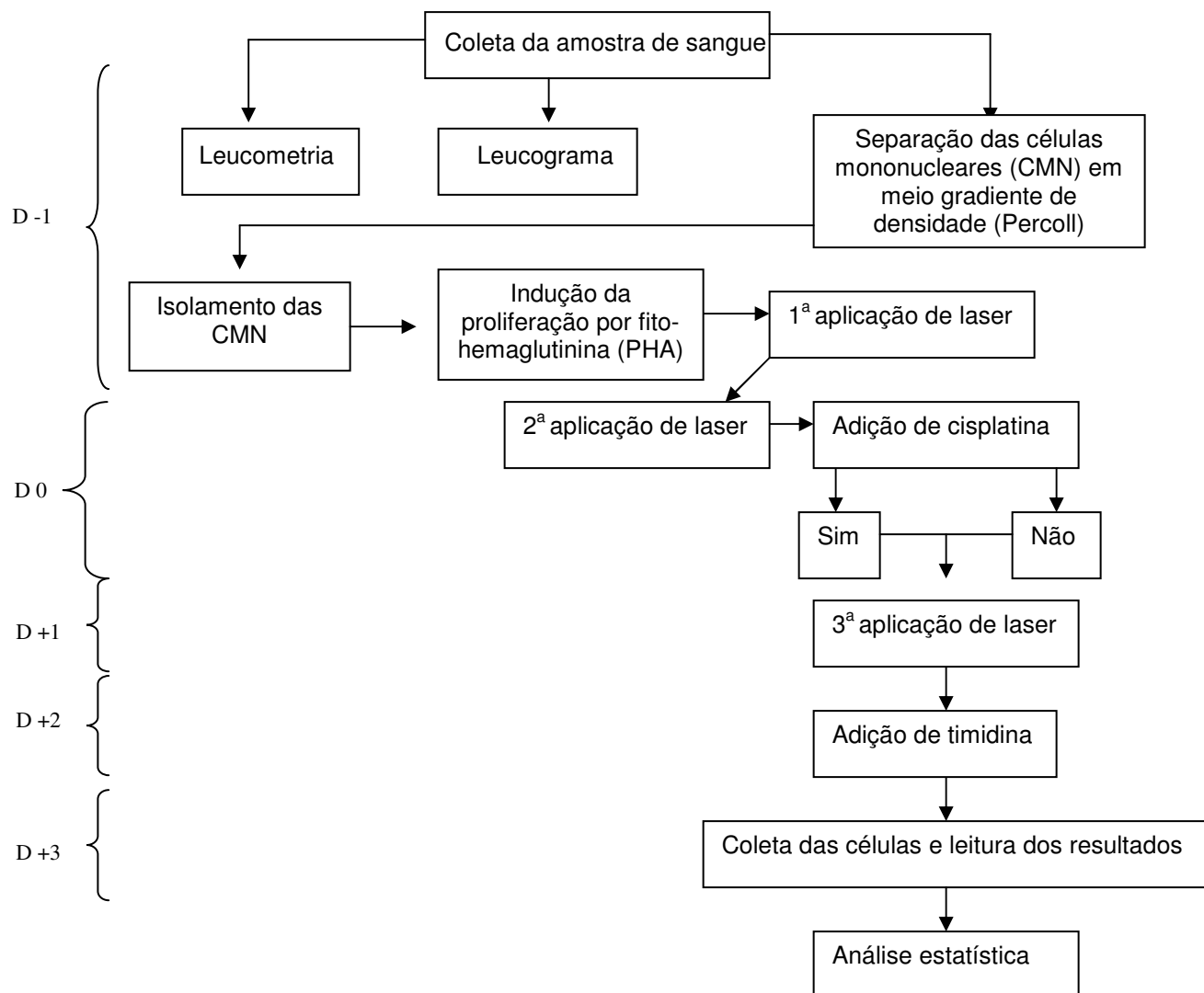
Doador	Sexo	Idade	Leucometria total /mm ³	Linfócitos %	Monócitos %	Bastonetes %	Segmentados %	Eosinófilos %	Basófilos %
1	M	42	4125	25	10	0	62	2	1
2	F	27	7100	35	8	0	56	1	0
3	F	27	11000	44	10	0	44	1	1
4	M	28	6100	55	8	0	36	1	0
5	F	36	7900	31	9	0	56	4	0
6	M	45	6000	49	8	0	40	2	1

3.2. Considerações éticas

Todos os indivíduos que participaram da pesquisa foram voluntários e consentiram com a coleta de sangue para o estudo desenvolvido após leitura e assinatura do termo de consentimento (Anexo 2).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Anexo 3).

3.3. Fluxograma



D -1	Obtenção de células mononucleares e 1ª Aplicação de laser
D 0	2ª Aplicação de laser (intervalo de 24 horas entre as aplicações) e adição de cisplatina
D +1	3ª Aplicação de laser
D +2	Adição de timidina triciada
D +3	Coleta das células 18 horas após a colocação de timidina e leitura da radioatividade em cintilador beta

3.4. Coleta de sangue

Foi coletada amostra de 10 mL de sangue venoso de cada doador. Para a coleta, foram utilizados tubos estéreis Vacutainer (BD, Juiz de Fora, MG), contendo EDTA, 0,05 mL de solução a 15%. Após a coleta, o volume de sangue total era duplicado com solução gelada de salina tamponada com fosfato (STF) 0,15M e pH 7,2 em tubo estéril de 50 mL.

3.5. Separação das células mononucleares

As células mononucleares do sangue periférico (monócitos e linfócitos) foram separadas do sangue total por centrifugação em suspensão de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suécia), densidade 1,077 g/mL, segundo a técnica de Ulmer e Flad (1979). A primeira centrifugação era realizada a 750xG, por 15 minutos a 4°C, em centrífuga com caçamba móvel. As células mononucleares (CMN) eram coletadas da interface, ressuspensas em STF gelado 0,15M e pH 7,2, e centrifugadas uma segunda vez a 400xG por 10 minutos a 4°C para remoção do Percoll. Após a segunda centrifugação, as CMN eram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, EUA) completo, ou seja, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP), previamente inativado a 56°C por 1 hora, mais 20 mM HEPES, 2 mM glutamina, 2 mM Na₂HCO₃ e 40 mg/mL de gentamicina. Uma terceira centrifugação era então realizada com o intuito de reduzir a contaminação com plaquetas (200xG, por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante era desprezado e as CMN ressuspensas em meio RPMI 1640 completo gelado. As CMN separadas eram imediatamente quantificadas em hematocítmetro. A viabilidade celular era determinada pela exclusão de nigrosina a 0,5% em STF pH 7,2 (diluição 1:5), sendo sempre superior a 95%. Para determinar o grau de contaminação da suspensão de CMN com outras células do sangue periférico eram realizadas distensões após a separação, coradas por solução de Giemsa a 10%, sendo a contaminação sempre inferior a 5%. A recuperação das CMN após a separação era sempre maior que 70%.

3.6. Avaliação da proliferação linfocitária

Amostras de 10^5 CMN, em meio RPMI 1640 completo, eram distribuídas em triplicatas, em placas de microcultivo de 96 escavações, fundo chato (Costar, modelo 3596, New York, EUA) e incubadas em câmara úmida, com atmosfera de 5% de CO_2 em ar, a 37°C , por 96 horas, na presença de $1\mu\text{g}$ de fito-hemaglutinina por escavação (PHA-P, Sigma, St Louis, EUA). A solução estoque de fito-hemaglutinina (PHA) foi preparada a partir de 3mg diluídos em 15 mL de meio RPMI 1640 completo e filtrada em membrana de acetato de celulose de $0,2\mu\text{m}$ de porosidade.

Dezoito horas antes do término do cultivo, era adicionada $0,5\mu\text{Ci}$ de timidina triciada (Amersham Biosciences, Inglaterra, atividade específica de $16\text{Ci}/\text{mmol}$) por escavação. A proliferação dos linfócitos era avaliada através da quantificação da radioatividade por cintilografia (Beckman Coulter Inc., EUA) e os resultados expressos em contagens por minuto (cpm).

3.7. Interferência da cisplatina sobre a proliferação linfocitária

Com o objetivo de induzir ação tóxica sobre os linfócitos e a conseqüente redução na proliferação linfocitária, utilizamos a cisplatina. A cisplatina utilizada foi fabricada pela Mayne Pharma, Mulgrave, Austrália, nome comercial Fauldcispla, solução injetável $50\text{mg}/50\text{mL}$, peso molecular 300,05. Após infusão intravenosa, a meia vida plasmática da cisplatina é de aproximadamente 30 minutos. A cisplatina não se liga instantaneamente de forma reversível às proteínas plasmáticas. Todavia, a platina presente na composição da cisplatina mantém-se ligada às proteínas plasmáticas. Estes complexos são lentamente eliminados, com uma meia-vida de 5 dias ou mais. Com doses de 20 a $120\text{mg}/\text{m}^2$ de cisplatina, as concentrações de platina são mais altas no fígado, próstata, rins, um pouco mais baixas na bexiga, músculos, testículos, pâncreas e baço. A platina permanece nos tecidos por até 180 dias da última administração. A excreção da droga é predominantemente renal.

A concentração de cisplatina usada no presente estudo foi definida com base nos dados de Kosmider e cols. (2004). Foram utilizadas concentrações

determinadas a partir de curvas de toxicidade representadas por frações de IC₅₀ (1/8, 1/4 e 1), sendo considerado 1 IC₅₀ a concentração de cisplatina que induz 50% de inibição da proliferação linfocitária após 72 horas de exposição à droga. As frações de IC₅₀ corresponderam a 6,1µM (1 IC₅₀), 1,525µM (1/4 IC₅₀) e 0,7625µM (1/8 IC₅₀). Antes dos experimentos, a cisplatina era diluída em STF (diluição 1:20). O desenho contendo a disposição das triplicatas de cada concentração de cisplatina utilizadas nas placas de cultivo dos experimentos realizados está ilustrado no Anexo 4. A cisplatina era adicionada uma hora após o término da segunda irradiação com laser.

3.8. Irradiação com laser de baixa potência

As irradiações foram realizadas com o equipamento Twin Laser da MM Optics (São Carlos, SP), comprimento de onda 660nm, potência 40mW, meio ativo semiconductor AlGaInP (mistura de alumínio, gálio, índio e fósforo). A fórmula empregada para o cálculo da energia liberada (Joules/cm²) foi:

$$\text{Dose de radiação laser} = \frac{P \times T}{A}$$

Sendo P a potência do aparelho expressa em Watts, T o tempo de irradiação expresso em segundos e A a área da ponta da caneta de aplicação expressa em centímetros quadrados (0,04 cm²). Considerando a potência 40mW (0,04 W), tivemos os seguintes tempos de aplicação por escavação:

Dose de radiação laser (J/ cm ²)	Tempo de aplicação por escavação (s)
5	5
10	10
20	20
40	40
80	80

Era realizada uma irradiação diária em cada placa, durante três dias consecutivos (D-1, D 0 e D+1), com intervalo de 24 horas. Para cada doador foram utilizadas duas placas de cultivo. O esquema de dose de radiação, combinado ou não à adição de cisplatina, encontra-se ilustrado no Anexo 3.

3.9. Parâmetros utilizados para a análise dos dados

Para comparação da proliferação linfocitária entre os doadores utilizamos como parâmetro o índice de estimulação (IE), calculado segundo a equação:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

3.10. Análise estatística

Primeiramente, cada variável do estudo foi analisada quanto ao seu padrão de distribuição amostral, visando a caracterização da normalidade ou não da mesma, com base no teste de Kolmogorov-Smirnov e outros parâmetros descritivos (igualdade de variância e coeficientes de *skewness* e *kurtosis*), empregando-se o programa SigmaStat 3.1 (Jandel Scientific, San Rafael, EUA, 2004).

Como as variáveis apresentaram distribuição normal foram utilizados os seguintes testes paramétricos: análise de variância para comparação entre várias amostras com relação a uma variável, análise de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls, análise de regressão linear e correlação de Pearson para verificar a existência ou não de relação entre as variáveis.

A representação gráfica dos resultados foi elaborada a partir do programa SigmaPlot 3.1 (Jandel Scientific, San Rafael, EUA, 2004).

Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças entre variáveis quando $p < 0,05$. As correlações efetuadas também foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Validação da técnica de proliferação linfocitária por fito-hemaglutinina (PHA)

Como mostrado na Figura 7, foi obtida intensa proliferação linfocitária em todos os experimentos, com baixa variabilidade entre as réplicas, o que indica que os mesmos foram realizados em condições ótimas. Obtivemos uma grande variabilidade dos níveis de proliferação linfocitária entre os indivíduos analisados, variando de 32.107 a 103.028 cpm, com uma média de 69.450.

Validação da técnica de linfoproliferação

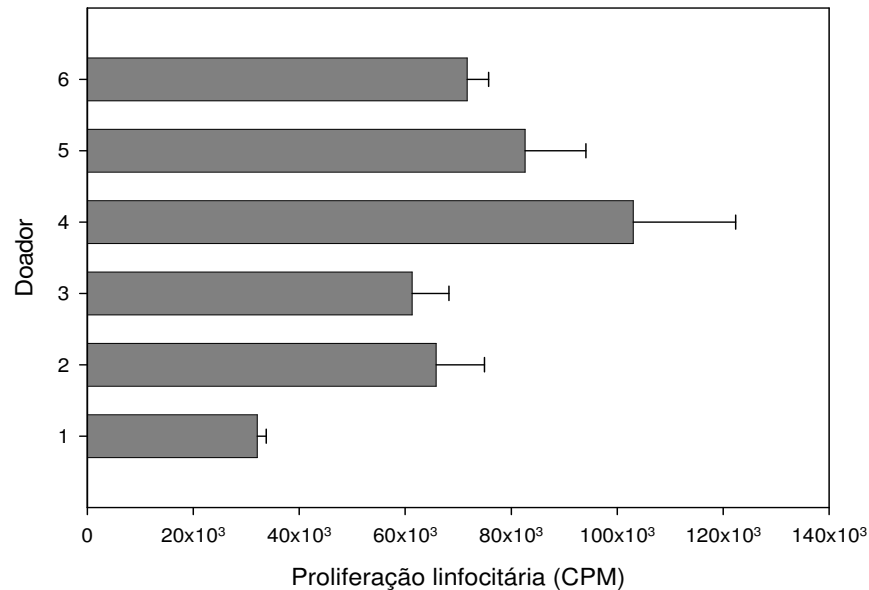


Figura 7 – Proliferação de linfócitos de indivíduos sadios, após 96 horas de incubação com 5 µg/mL de PHA, avaliada pela incorporação de timidina triçada (0,5µCi/ 10⁵ CMN) e representada por contagens por minuto (cpm). Cada coluna representa a média de cpm e respectivo desvio-padrão de três réplicas de cada doador.

4.2. Efeito da radiação laser de baixa potência sobre a proliferação linfocitária

A radiação laser aumentou a proliferação linfocitária em alguns indivíduos, mas em outros não (Tabela 2). No doador 1 houve aumento estatisticamente significativo da proliferação de linfócitos com as doses de 5 ($p=0,012$) e 20 J/cm^2 ($p < 0,001$). No doador 2, houve aumento com a dose de 40 J/cm^2 ($p=0,020$), enquanto que no doador 3 houve aumento com a dose de 10 J/cm^2 ($p=0,032$) e redução de 30% com as doses de 40 e 80 J/cm^2 (não houve significância estatística). Não houve alteração significativa da proliferação nos doadores 4, 5 e 6.

Tabela 2 – Proliferação linfocitária com diferentes doses de radiação laser

Doadores	Dose de radiação (Joules/cm ²)				
	5	10	20	40	80
1	*1,31	1,06	*1,63	1,15	1,20
2	1,15	1,05	1,13	*1,25	1,13
3	1,06	*1,32	0,83	0,70	0,69
4	1,03	1,03	0,96	0,99	0,99
5	1,02	0,92	1,21	1,17	1,12
6	1,02	1,04	1,01	0,97	0,91

A proliferação linfocitária foi representada pelo índice de estimulação (IE), sendo:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

* $p < 0,05$, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

Como pôde ser observado, houve grande variabilidade do efeito da radiação laser (Figura 8). Nota-se que não houve aumento da proliferação apenas com a dose de 80 J/cm^2 (Figura 9).

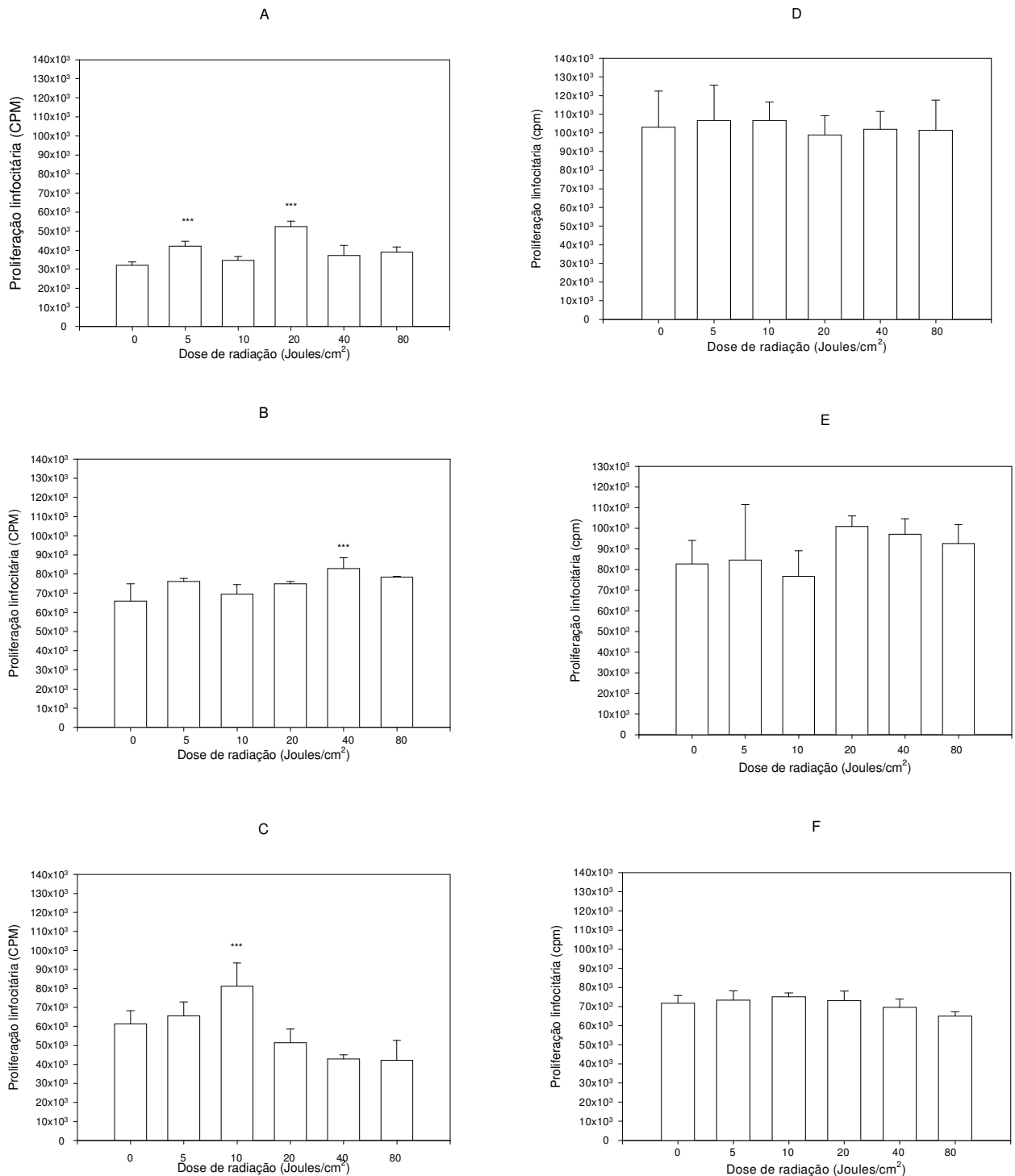


Figura 8 – Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação linfocitária. A proliferação linfocitária está expressa em cpm. Os resultados representam as médias e desvios-padrão obtidos conforme a variação da dose de laser. Cada gráfico de barras representa os resultados de um doador, sendo A (doador 1), B (doador 2), C (doador 3), D (doador 4), E (doador 5) e F (doador 6).

***p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

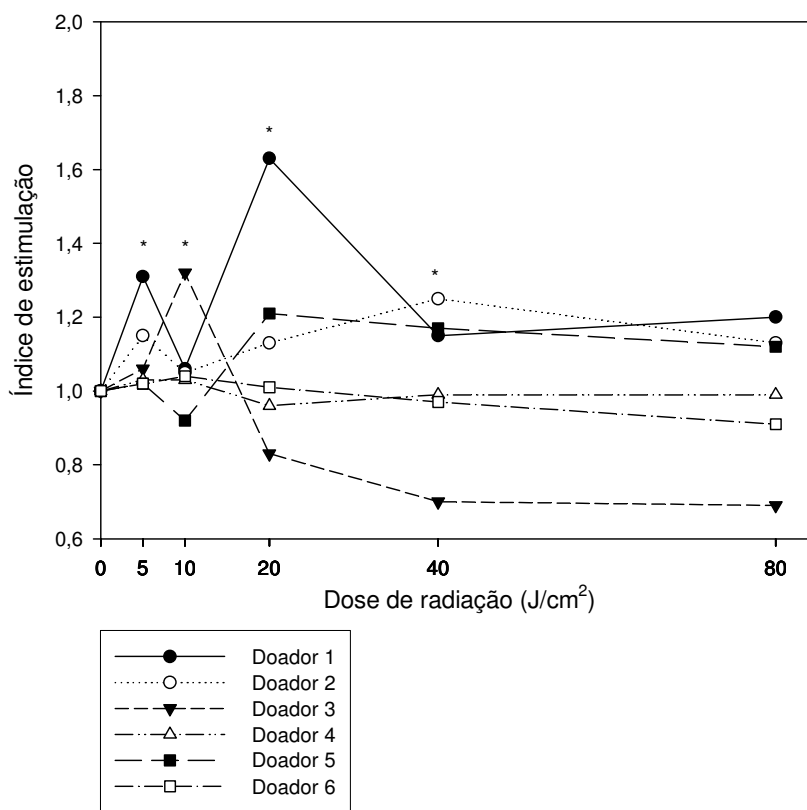


Figura 9 – Efeito de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação linfocitária. A proliferação linfocitária está representada pelo índice de estimulação (IE), sendo:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

*p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

4.3. Efeito da cisplatina sobre a proliferação linfocitária

A cisplatina promoveu diminuição da proliferação linfocitária de maneira dose-dependente (Figura 10), ou seja, quanto maior a concentração de cisplatina utilizada menor a proliferação linfocitária obtida (Figura 11). Foi observada grande variabilidade de resposta à cisplatina entre os indivíduos investigados (Figura 12). A menor variabilidade ocorreu com a maior concentração de cisplatina (1 IC₅₀).

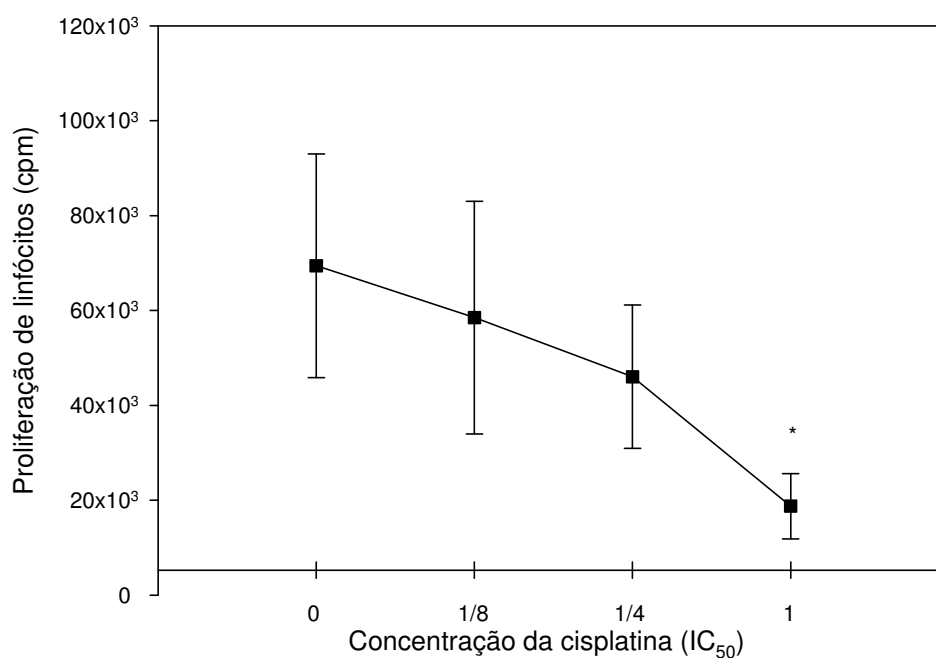


Figura 10 – Interferência de diferentes concentrações de cisplatina, incubada por 72 horas, sobre a proliferação de linfócitos estimulados por PHA. Os resultados são representados em contagens por minuto (cpm), após incorporação de timidina triçada, e expressos em média e desvio-padrão. Cada ponto representa a média dos seis indivíduos analisados.

*p <0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

Regressão linear: efeito citotóxico dose-dependente da cisplatina

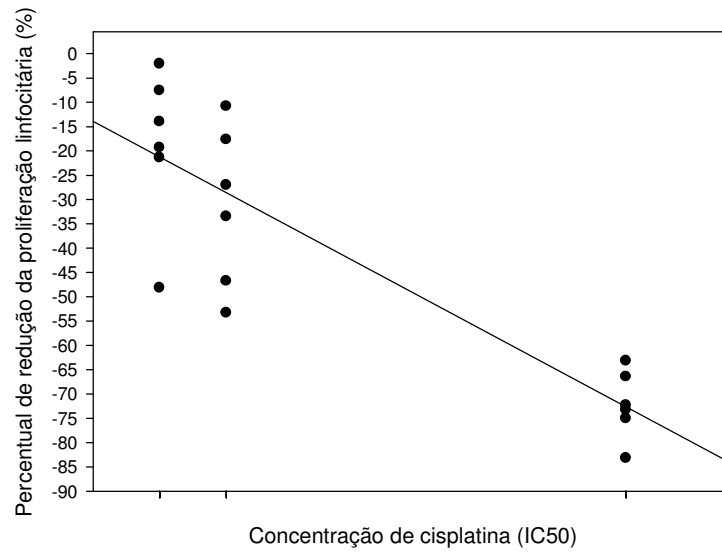


Figura 11 – Correlação negativa entre a concentração de cisplatina e o percentual de redução da proliferação linfocitária ($p < 0,001$, $R = -0,904$, correlação de Pearson). Cada ponto representa um indivíduo.

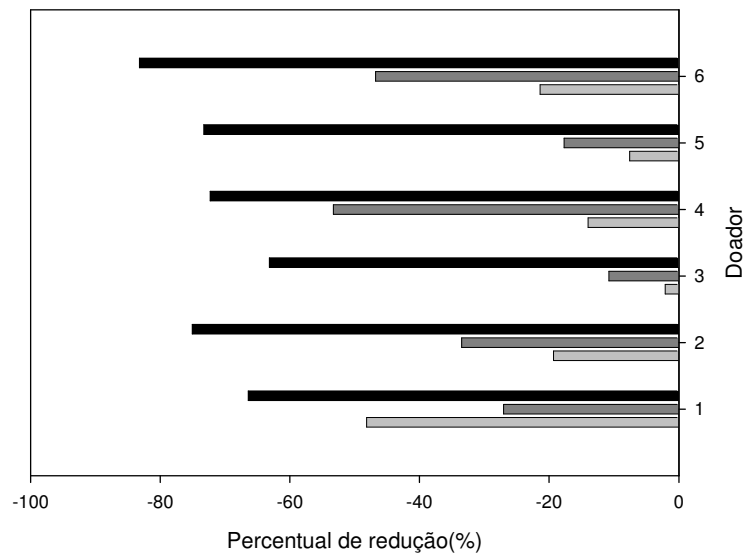


Figura 12 – Redução da proliferação linfocitária induzida por diferentes concentrações de cisplatina, $1/8 IC_{50}$ (□), $1/4 IC_{50}$ (▒), $1 IC_{50}$ (■). A proliferação linfocitária está representada como percentual de redução.

4.4. Influência da radiação laser de baixa potência sobre o efeito citotóxico da cisplatina

A radiação laser promoveu ação citoprotetora nos linfócitos tratados com cisplatina em 25,5% das observações realizadas. Esse fenômeno de citoproteção foi representado pelo aumento da proliferação linfocitária mesmo sob efeito da cisplatina. A frequência e a intensidade do fenômeno variaram bastante entre os indivíduos avaliados (Figura 13). O aumento da proliferação induzido pela radiação laser oscilou entre 19,1 e 120,6%, dependendo da dose de energia utilizada durante a irradiação.

Foi observada citoproteção com maior frequência utilizando-se 20 J/cm² (26% das observações), sendo que o aumento da proliferação variou entre 29,5 e 120,6%. Com 40 J/cm², observou-se aumento da proliferação de 21,1 a 54,5%, em 21,7% das observações. As doses 5, 10 e 80 J/cm² promoveram aumento de 19,1 a 72,5%. Cada uma dessas doses promoveu citoproteção em 17,3% das observações. Devido à diversidade de doses de radiação laser capazes de promover citoproteção, não foi possível delinear um padrão de resposta dose-dependente.

O fenômeno de citoproteção induzido pela radiação laser foi mais evidente nos cultivos de linfócitos incubados com as concentrações mais elevadas de cisplatina, sendo 47,8% das observações de citoproteção associadas à 1 IC₅₀, 34,7% associadas à 1/4 IC₅₀ e 17,3% associadas à 1/8 IC₅₀.

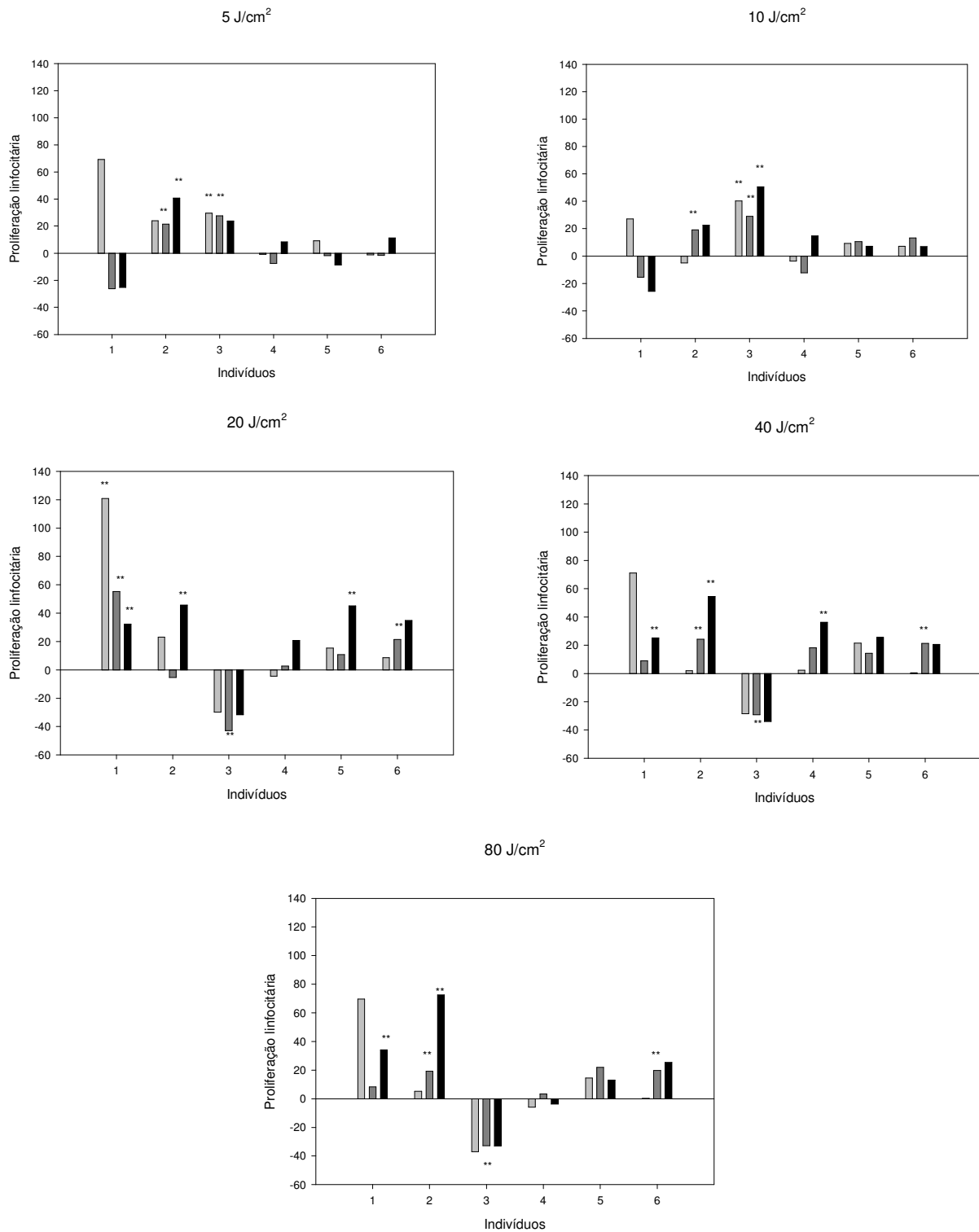


Figura 13 - Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com as seguintes concentrações de cisplatina:

1/8 IC₅₀ (), 1/4 IC₅₀ (), 1 IC₅₀ (). A proliferação linfocitária está expressa como porcentagem de variação da proliferação, sendo que o aumento da proliferação está representado pelos valores positivos e a diminuição pelos valores negativos. Cada três barras representam os resultados de um doador.

**p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com o laser.

4.5. Influência da radiação laser de baixa potência em relação às diferentes concentrações de cisplatina

4.5.1. Concentração de cisplatina 1/8 IC₅₀

No doador 1, foi observado aumento da proliferação linfocitária com todas as doses de radiação empregadas, sendo o maior incremento com 20 J/cm² (p=0,013), tendo sido obtida proliferação duas vezes maior que o controle. Nos doadores 2, 4, 5 e 6, não foi observada alteração significativa da proliferação com nenhuma das doses de radiação laser. No doador 3, houve aumento da proliferação com 5 (p=0,022) e 10 J/cm² (p=0,010), e diminuição com 20, 40 e 80 J/cm² (p=0,028) (Tabela 3).

Tabela 3 – Proliferação linfocitária com a presença de 1/8 IC₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser

Doadores	Dose de radiação (Joules/cm ²)				
	5	10	20	40	80
1	1,69	1,27	*2,20	1,71	1,69
2	1,23	0,96	1,23	1,01	1,05
3	*1,29	*1,40	0,71	0,72	*0,63
4	0,99	0,97	0,96	1,02	0,95
5	1,09	1,09	1,15	1,21	1,14
6	0,99	1,07	1,08	1,00	1,00

A proliferação linfocitária está representada pelo índice de estimulação (IE), sendo:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

*p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

Como pode ser observado na Figura 14, houve grande variabilidade de respostas interindivíduos frente à radiação laser. Entre os seis indivíduos analisados, em apenas dois houve aumento significativo da proliferação.

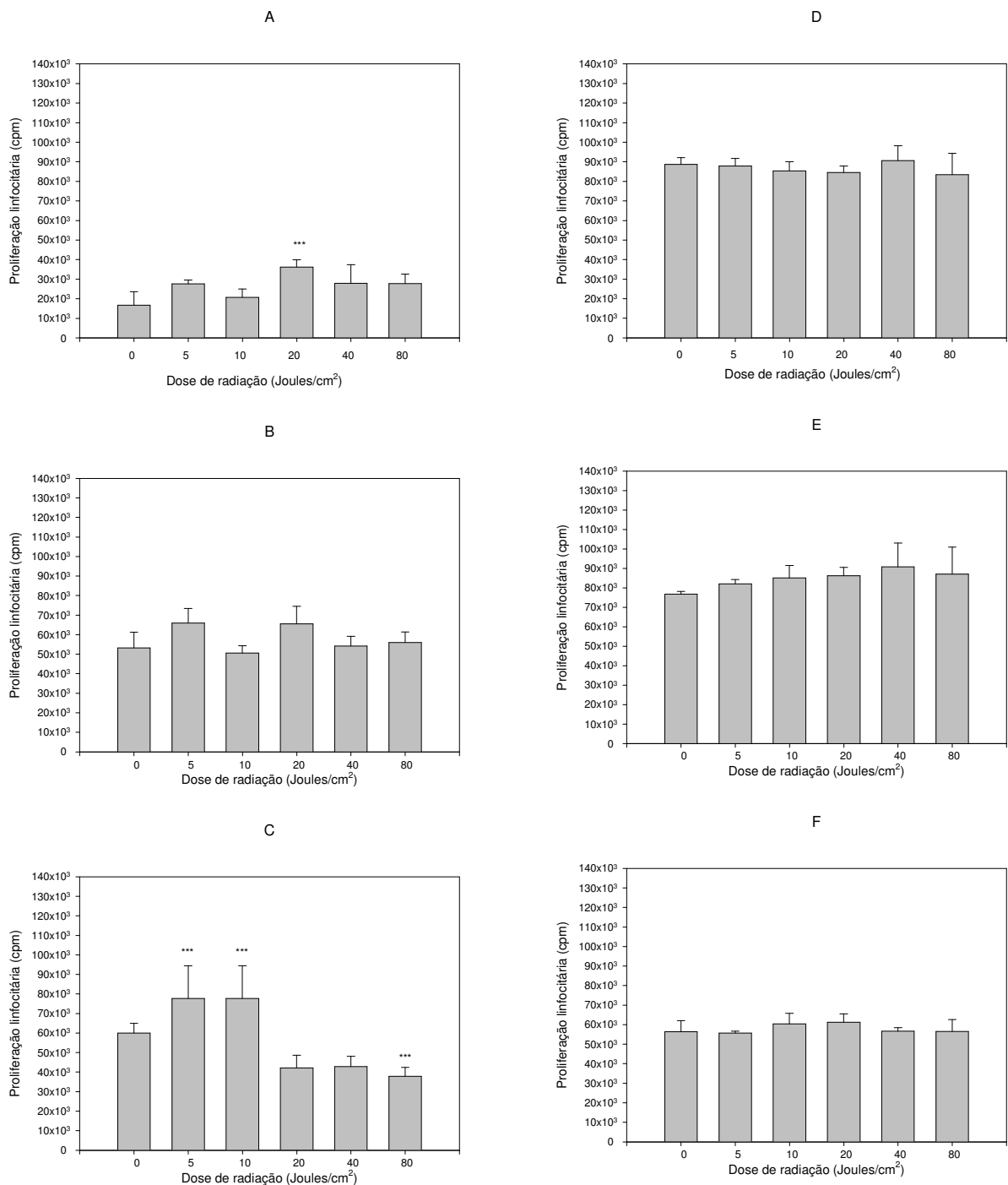


Figura 14 - Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração 1/8 IC₅₀ de cisplatina. A proliferação linfocitária está expressa em cpm. Os resultados representam as médias e desvios-padrão obtidos conforme a variação da dose de radiação. Cada gráfico de barras representa os resultados de um doador, sendo A (doador 1), B (doador 2), C (doador 3), D (doador 4), E (doador 5) e F (doador 6).

***p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

4.5.2. Concentração de cisplatina 1/4 IC₅₀

Houve aumento significativo da proliferação linfocitária no doador 1 com a dose 20 J/cm² (p=0,001). No doador 2, o aumento ocorreu com as doses 5 (p=0,035), 10 (p=0,015), 40 (p=0,021) e 80 J/cm² (p=0,036). No doador 3, houve aumento da proliferação com 5 (p=0,001) e 10 J/cm² (p=0,003), e diminuição com 20, 40 e 80 J/cm² (p< 0,001). Nos doadores 4 e 5, não foi observada alteração significativa da proliferação com nenhuma das doses de laser. No doador 6, o incremento da proliferação ocorreu com 20 (p=0,013), 40 (p=0,012) e 80 J/cm² (p=0,011) (Tabela 4).

Tabela 4 – Proliferação linfocitária com a presença de 1/4 IC₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser

Doadores	Dose de radiação (Joules/cm ²)				
	5	10	20	40	80
1	0,74	0,85	*1,55	1,09	1,08
2	*1,21	*1,19	0,95	*1,24	*1,19
3	*1,27	*1,29	*0,58	*0,71	*0,68
4	0,93	0,88	1,02	1,18	1,03
5	0,99	1,10	1,10	1,14	1,21
6	0,99	1,13	*1,21	*1,21	*1,19

A proliferação linfocitária está representada pelo índice de estimulação (IE), sendo:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

*p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

Como pode ser observado na Figura 15, houve grande variabilidade de resposta interindivíduos frente à radiação laser. Entre os seis indivíduos analisados, em quatro houve aumento significativo da proliferação.

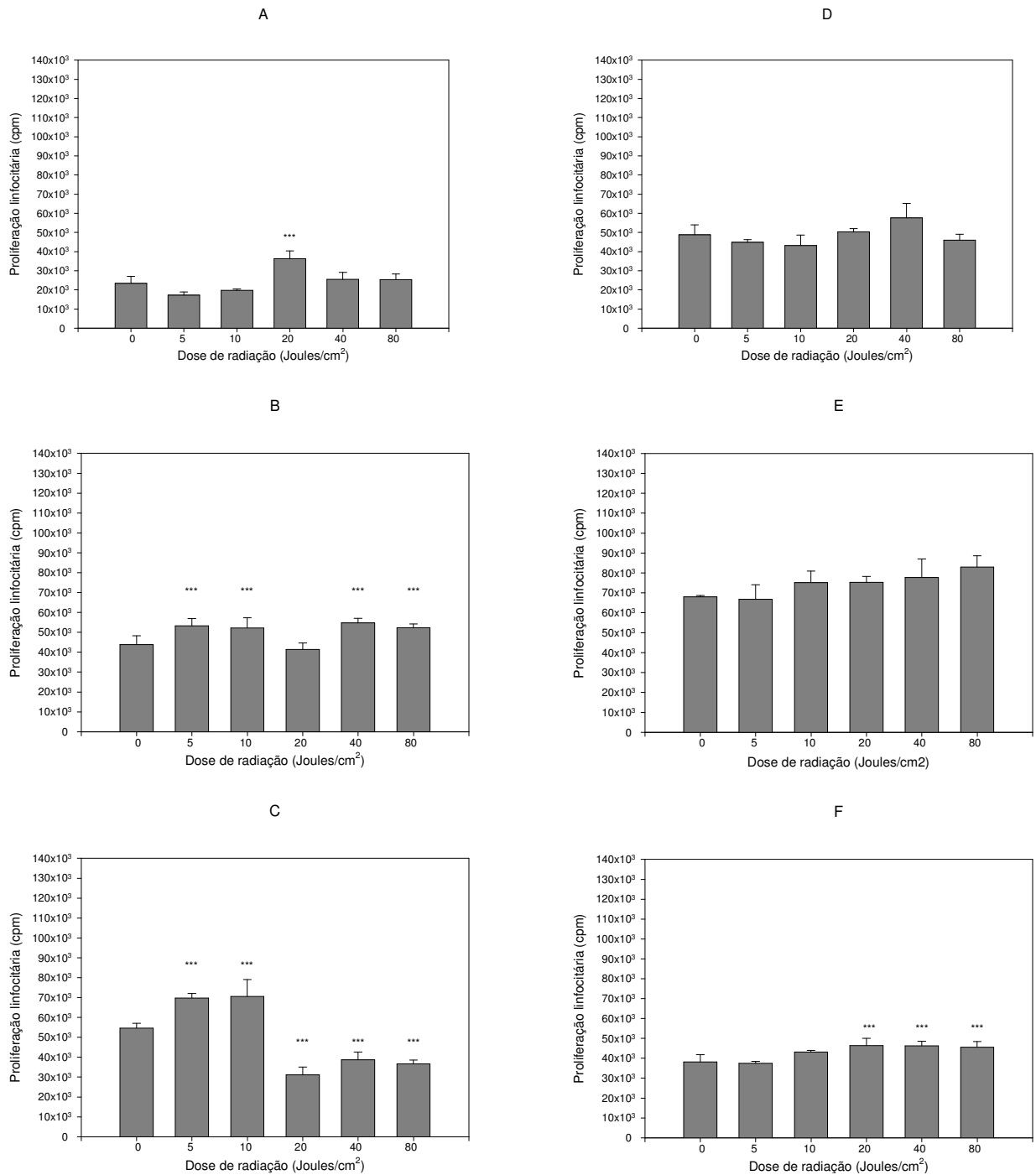


Figura 15 - Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração 1/4 IC₅₀ de cisplatina. A proliferação linfocitária está expressa em cpm. Os resultados representam as médias e desvios-padrão obtidos conforme a variação da dose de radiação. Cada gráfico de barras representa os resultados de um doador, sendo A (doador 1), B (doador 2), C (doador 3), D (doador 4), E (doador 5) e F (doador 6).

***p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados.

4.5.3. Concentração de cisplatina 1 IC₅₀

Houve aumento significativo da proliferação linfocitária no doador 1 com as doses 20 ($p=0,036$), 40 ($p=0,046$) e 80 J/cm² ($p=0,045$). No doador 2, o aumento ocorreu com as doses 5 ($p=0,004$), 20 ($p=0,003$), 40 ($p=0,001$) e 80 J/cm² ($p<0,001$). No doador 3, houve aumento da proliferação com 10 J/cm² ($p=0,009$), e diminuição de 50% com 20, 40 e 80 J/cm² (não houve significância estatística). Nos doadores 4 e 6, não foi observada alteração significativa da proliferação com nenhuma das doses. No doador 5, o incremento da proliferação ocorreu com 20 ($p<0,001$) e 40 J/cm² ($p=0,035$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Proliferação linfocitária com a presença de 1 IC₅₀ de cisplatina associada às diferentes doses de radiação laser

Doadores	Dose de radiação (Joules/cm ²)				
	5	10	20	40	80
1	0,75	0,75	*1,32	*1,25	*1,34
2	*1,40	1,22	*1,45	*1,54	*1,72
3	1,23	*1,50	0,69	0,66	0,67
4	1,08	1,14	1,20	1,36	0,97
5	0,92	1,07	*1,45	*1,25	1,12
6	1,11	1,07	1,34	1,20	1,25

A proliferação linfocitária está representada pelo índice de estimulação (IE), sendo:

$$IE = \frac{\text{valor em cpm da proliferação após a intervenção (laser e/ou cisplatina)}}{\text{valor em cpm da proliferação sem intervenção}}$$

* $p < 0,05$, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

Como pode ser observado na Figura 16, houve grande variabilidade de resposta interindivíduos frente à radiação laser. Entre os seis indivíduos analisados, em quatro houve aumento significativo da proliferação.

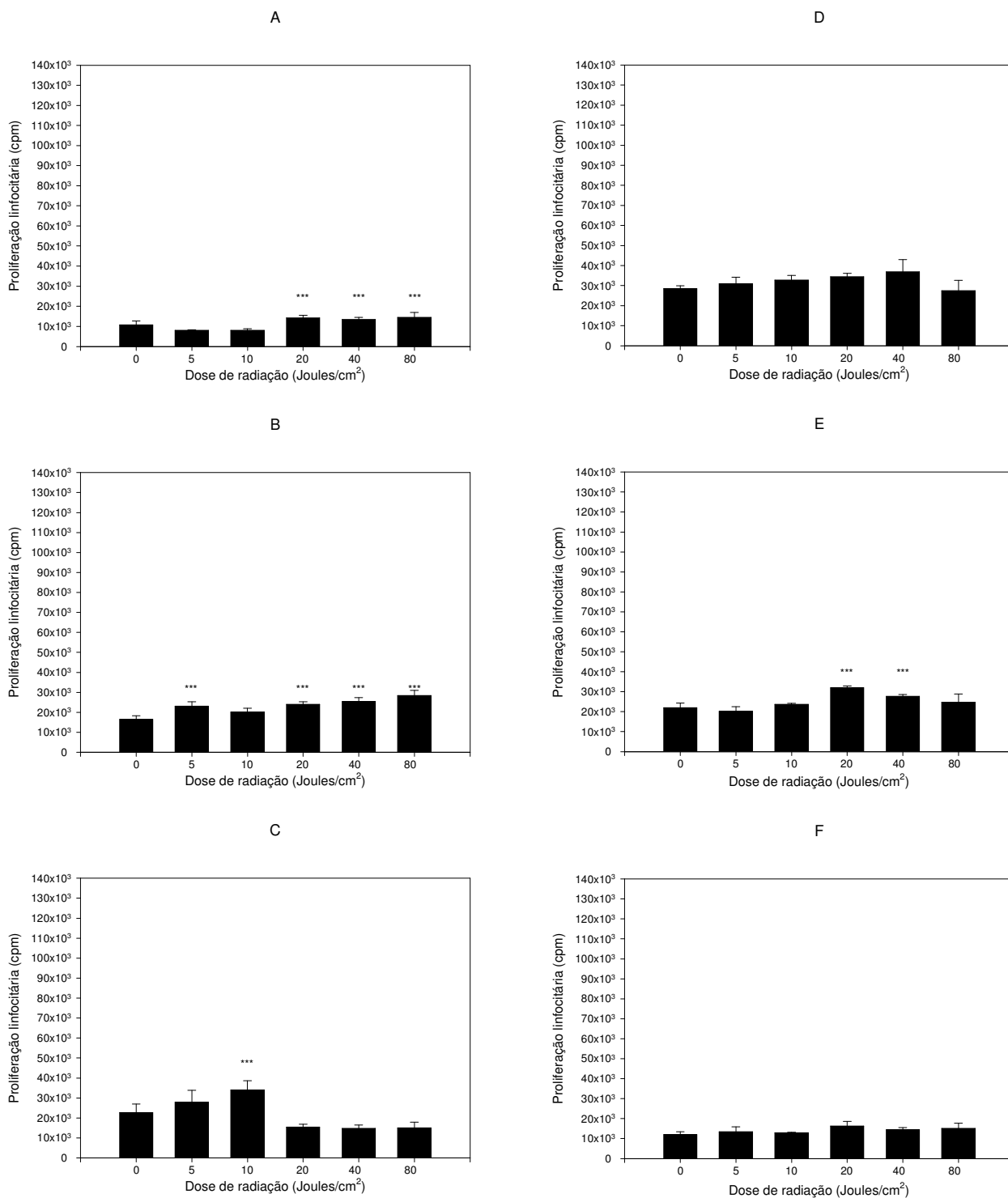


Figura 16 - Influência de diferentes doses de radiação laser sobre a proliferação de linfócitos tratados com a concentração 1 IC₅₀ de cisplatina. A proliferação linfocitária está expressa em cpm. Os resultados representam as médias e desvios-padrão obtidos conforme a variação da dose de radiação. Cada gráfico de barras representa os resultados de um doador, sendo A (doador 1), B (doador 2), C (doador 3), D (doador 4), E (doador 5) e F (doador 6).

***p < 0,05, análise de variância com comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls entre a proliferação de linfócitos irradiados e não irradiados com laser.

5. Discussão

A ocorrência e a gravidade das ulcerações orais causadas por terapias citotóxicas utilizadas no tratamento oncológico apresentam ampla variação. De modo geral, dependem do tipo histopatológico, localização e estadiamento do tumor, terapia instituída, esquema terapêutico, idade e estado geral do paciente, dentre outros fatores (ÖHRN e cols. 2001, BLIJLEVENS 2005). No entanto, existem terapias que conferem risco de quase 100% para o desenvolvimento dessas lesões, como é o caso do uso de quimioterapia em altas doses no preparo para transplante de medula óssea (MCGUIRE e cols. 1993, WOO e cols. 1993, VERA-LLONCH e cols. 2006), de radioterapia com doses acima de 60 Gy (VERA-LLONCH e cols. 2006) e de radioterapia associada à quimioterapia para tratamento de tumores de cabeça e pescoço (NUMICO e cols. 2006). Nesses casos, a ocorrência de ulcerações orais gera um grande impacto em termos de piora na qualidade de vida do paciente, aumento do risco de infecções, aumento de custos (internações adicionais, uso de opióides, instalação de sondas nasogástricas), necessidade de redução da dose terapêutica ou até interrupção do tratamento (ROSE-PED e cols. 2002, NAIDU e cols. 2004, PETERSON e CARIELLO 2004, SONIS e cols. 2004, BLIJLEVENS 2005). Com o auxílio de algumas medidas curativas é possível amenizar a sintomatologia dolorosa e diminuir o tempo de resolução dessas lesões (WORTHINGTON e cols. 2004), porém, medidas preventivas eficazes proporcionariam maiores benefícios.

Alguns ensaios clínicos mostraram que a laserterapia de baixa potência (LBP) pode ser utilizada com sucesso tanto no tratamento como na prevenção das ulcerações orais (PORREAU-SCHNEIDER e cols. 1992, BARASCH e cols. 1995, BENSADOUN e cols. 1999, ANTUNES e cols. 2007). Entretanto, faltam modelos experimentais que permitam estudos mais aprofundados, haja vista as limitações éticas das investigações *in vivo*. Em virtude disso, foi proposto no presente trabalho um modelo de estudo *in vitro* para melhor investigação dos efeitos que permeiam a LBP.

O modelo proposto foi capaz de reproduzir situações da prática clínica, tais como proliferação celular induzida pela radiação laser, toxicidade causada pela cisplatina, variação de resposta interindivíduos em ambas as situações, além de demonstrar o fenômeno de citoproteção. O indicador dos fenômenos biológicos investigados foi a proliferação linfocitária, tendo em vista a utilização deste como marcador biológico da eficácia da quimioterapia (POIKONEN e cols. 1999) e como fator prognóstico (WILTSCHKE e cols. 1995, COSISKI MARANA e cols. 2000).

Estudos com enfoque no efeito da LBP sobre a proliferação linfocitária, além de escassos, apresentam protocolos de irradiação distintos e resultados, muitas vezes, divergentes em relação à dose-resposta (STADLER e cols. 2000, EL BATANOUNY e cols. 2002, GULSOY e cols. 2006). Estudos envolvendo outros tipos de células, tais como fibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER e cols. 1989, POURZARANDIAN e cols. 2005) e células epiteliais (YU e cols. 1997, GROSSMAN e cols. 1998), apesar de serem mais freqüentes, também compartilham essas características. Muitos desses trabalhos mencionam a relação entre doses baixas e a estimulação da proliferação, assim como, entre doses elevadas e a inibição da proliferação, porém essa conceituação é pouco esclarecedora já que o referencial de dose baixa ou elevada varia de acordo com o autor. Por esses motivos, utilizamos ampla variação de dose de radiação laser (5, 10, 20, 40 e 80 J/cm²), incluindo a maioria das doses referidas na literatura científica.

Em relação ao protocolo de irradiação, seguimos o esquema empregado em ensaios clínicos sobre a prevenção de ulcerações orais induzidas por quimioterapia de altas doses para transplante de medula óssea (BARASCH e cols. 1995, COWEN e cols. 1997). Por esse motivo, a irradiação teve início um dia antes da adição de cisplatina e término um dia depois, tendo sido realizadas ao todo três irradiações com intervalos de 24 horas. O segundo dia de irradiação coincidiu com a adição de cisplatina, sendo definido, com base em outros estudos, intervalo de 60 minutos entre os procedimentos (KARU e cols 1994; KHOLI e cols. 2003; DUBE e cols 2001).

A avaliação da proliferação linfocitária foi realizada através da incorporação de timidina triciada. Essa técnica permite a quantificação de timidina radioativa incorporada ao DNA das células que proliferaram durante o período de incubação. Na etapa de padronização dos experimentos, foi realizada investigação inicial do efeito da LBP sobre a proliferação linfocitária sem a adição de mitógeno (resultados não apresentados), no entanto a proliferação alcançada foi extremamente baixa, tanto no grupo controle como também nos grupos submetidos às diferentes doses de radiação laser. Esses dados estão em concordância com aqueles encontrados por Gulsoy e cols. (2006). Por esse motivo, nos demais experimentos utilizou-se fito-hemaglutinina (PHA), uma lectina com atividade mitogênica. A PHA liga-se a glicoproteínas presentes na superfície da membrana celular de linfócitos, causando a transdução de sinais que culminam em ativação e indução de proliferação (ASHRAF e KHAN 2003). Dessa forma, foi possível uniformizar o ciclo celular dos linfócitos, aumentando assim a sensibilidade do nosso modelo de estudo tanto para a ação da radiação laser, como também para a cisplatina.

Outro aspecto considerado no delineamento do modelo foi a existência de variação de resposta interindivíduos. Esse fato é observado tanto em estudos sobre a incidência de ulcerações orais causadas por terapias citotóxicas (ÖHRN e cols. 2001, SONIS e cols. 2004), como também em estudos que investigam a ação da LBP (POURREAU-SCHNEIDER e cols. 1992, BENSADOUN e cols. 1999) ou da cisplatina (NADIN e cols 2006). Na verdade, pode-se afirmar que, de modo geral, essa variação de resposta é observada em todos os estudos que investigam fenômenos biológicos. Em vista disso, utilizamos amostras de sangue de seis indivíduos diferentes.

Tendo sido discutidas as particularidades inerentes ao modelo de estudo utilizado, iniciaremos a discussão de cada aspecto envolvido na interpretação dos resultados. Primeiramente, em relação à técnica de proliferação linfocitária por PHA, foi obtida intensa proliferação, com baixa variabilidade entre as réplicas de cada experimento. Entretanto, houve variação da proliferação (32.107 a 103.028 cpm) entre as amostras dos indivíduos investigados. Isso está em concordância

com achados de outros estudos (WILSON e cols. 1978, RAPPOCCIOLO e cols. 1992, PINZÓN-CHARRY e cols. 2003). Pinzón-Charry e cols. (2003) relatam que além da heterogeneidade de resposta entre diferentes indivíduos, há também diferença entre amostras de um mesmo indivíduo obtidas em momentos diferentes. Essas variações podem estar relacionadas ao nível de ativação celular. Duas situações podem contribuir para a ativação dos linfócitos. A primeira pode ocorrer antes da coleta de sangue, e estar associada ao contato dos linfócitos com antígenos ou outros fatores capazes de ativá-los. Uma outra possibilidade pode ser a ativação decorrente da manipulação das células durante o experimento. Além disso, após a adição do mitógeno, a intensidade da proliferação pode variar de acordo com a quantidade de receptores da superfície celular com afinidade pela PHA, que influenciará a magnitude do sinal transduzido para o núcleo (ASHRAF e KHAN 2003).

A radiação laser promoveu aumento da proliferação induzida por PHA em alguns indivíduos, enquanto que em outros não foi observada alteração significativa. Nos casos em que houve aumento, não foi possível definir uma relação de dose-resposta, pois cada indivíduo respondeu a uma dose diferente. Dentre as doses que influenciaram positivamente a proliferação tivemos: 5, 10, 20 e 40 J/cm². Para alguns autores (OHTA e cols 1987, BATANOUNY e cols. 2002, GULSOY e cols. 2006) doses de 1 a 10 J/cm² causaram efeito inibitório ou não causaram qualquer efeito. Por outro lado, em estudos com fibroblastos e ceratinócitos, foi observado efeito proliferativo com doses de 1 a 5 J/cm² (POURREAU-SCHNEIDER e cols. 1989, GROSSMAN e cols. 1998, POURZARANDIAN e cols. 2005, HAWKINS e ABRAHAMSE 2006) e efeito inibitório com doses acima de 16 J/cm² (HAWKINS e ABRAHAMSE 2006). Essa variedade de dose-resposta pode ser decorrente, principalmente, de variações metodológicas. Como deve ser também considerada a limitação de muitas investigações que são baseadas na utilização de células provenientes de um único doador.

Outro aspecto a ser considerado seria a existência de uma relação entre o efeito da radiação laser e o estado funcional das células. Tanto que, segundo Karu

(1999), a resposta à LBP é determinada principalmente pelo potencial de oxidação-redução (redox) da célula no momento da irradiação. Células com pH abaixo do normal apresentam maior potencial de redução, ou seja, maior tendência a aceitar elétrons, com isso, seriam mais sensíveis à ação da radiação laser (KARU 1999). Outro fato a ser considerado é que, mesmo havendo sensibilização celular, a resposta proliferativa dependerá também da disponibilidade de substratos, produtos e enzimas envolvidas no processo (AMAT e cols. 2006).

No presente modelo de estudo, a cisplatina foi utilizada como agente promotor de citotoxicidade. As concentrações de cisplatina empregadas foram definidas com base nos dados de Kosmider e cols. (2004), sendo 1 IC₅₀ correspondente à 6,1µM que é a concentração necessária para redução de 50% da proliferação linfocitária após 72 horas de incubação. Foram ainda testadas concentrações correspondentes à 1/4 e 1/8 de IC₅₀. Como esperado, foi observada redução da proliferação linfocitária de maneira dose-dependente. Segundo Lieberthal e cols. (1996), essas concentrações provocam morte celular por apoptose. A indução de apoptose ocorre provavelmente a partir de lesões oxidativas na membrana mitocondrial, responsáveis pela liberação de citocromo c no citosol e conseqüente ativação das caspases. Concentrações em torno de 800µM causam morte celular por necrose devido a lesões oxidativas na membrana plasmática (LIEBERTHAL e cols. 1996).

Demonstramos variação de resposta à cisplatina entre os indivíduos investigados, o que está de acordo com dados da literatura científica. Houve menor variabilidade com a maior concentração de cisplatina (1 IC₅₀). Para Nadin e cols. (2006), a variação de resposta à cisplatina é, de modo geral, decorrente do polimorfismo genético que delimita a capacidade de reparo do DNA de cada indivíduo. Além disso, o envolvimento de mecanismos de reparo do DNA pode explicar a menor variabilidade de resposta observada com a maior concentração de cisplatina, ou seja, os danos causados por concentrações mais baixas poderiam ser revertidos, permitindo maior sobrevivência celular, enquanto que os

danos causados por concentrações mais elevadas seriam, de qualquer forma, letais para a maioria das células.

A radiação laser foi capaz de reduzir a citotoxicidade produzida pela cisplatina. Isso foi representado pelo aumento da proliferação linfocitária mesmo sob a influência negativa da cisplatina, o que configurou o fenômeno de citoproteção. Sendo assim, foi constatada citoproteção em 25,5% das observações. O aumento da proliferação variou de 19,1 a 120,6%. Como no caso do aumento da proliferação pela radiação laser na ausência de cisplatina, houve variabilidade interindividual em relação à ocorrência do fenômeno e à dose de radiação promotora de resposta.

O fenômeno de citoproteção ocorreu com maior frequência com as concentrações mais elevadas de cisplatina, sendo que 34,7% das observações de citoproteção ocorreram com $1/4$ IC_{50} e 47,8% com 1 IC_{50} . Tanto Karu e cols. (1994) como Liang e cols. (2006) observaram citoproteção de forma mais evidente com concentrações mais elevadas do agente citotóxico. Uma explicação para esse fato seria que a proteção causada pela LBP teria maior impacto em situações de alto risco de mortalidade celular, já que no caso de baixo risco os próprios mecanismos protetores endógenos seriam suficientes para promover sobrevivência celular.

Embora não seja objetivo da presente investigação elucidar os mecanismos envolvidos na ação da LBP, é importante especular sobre possíveis vias comuns de ação da radiação laser e da cisplatina. Tendo isso em vista, teoricamente, a radiação laser pode interferir sobre a ação da cisplatina de várias maneiras. Uma dessas maneiras seria através da estimulação da oxidase do citocromo c. A inibição dessa enzima por agentes citotóxicos resulta em alteração da homeostasia iônica mitocondrial levando à ruptura de sua membrana e conseqüente indução de apoptose devido a liberação de citocromo c no citosol (LIM e cols. 2002). De forma similar, a indução de apoptose pela cisplatina depende da liberação de citocromo c pela mitocôndria (WANG e LIPPARD 2005). De acordo com Eells e cols. (2003), a pré-irradiação de células da retina com radiação laser de baixa potência reduz as alterações provocadas pela ação tóxica

do ácido fórmico, um inibidor da oxidase do citocromo c. Wong-Riley e cols. (2005) observaram redução da morte de neurônios causada por cianeto de potássio, outro inibidor da oxidase do citocromo c. Portanto, em nosso estudo, a radiação laser pode ter interferido com o processo apoptótico induzido pela cisplatina impedindo a liberação de citocromo c a partir da estimulação da enzima oxidase deste citocromo.

Outro possível mecanismo capaz de impedir a liberação de citocromo c seria através da estimulação da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como por exemplo, a Bcl-2. De fato, Liang e cols. (2006) observaram aumento da expressão de Bcl-2 pela radiação laser. Essa proteína está presente na membrana mitocondrial e o aumento de sua expressão confere proteção celular contra a apoptose (LIM e cols. 2002). Parte dessa atividade anti-apoptótica ocorre a partir da interação direta com proteínas pró-apoptóticas, inativando-as (YANG e cols. 1997).

As enzimas antioxidantes (dismutase do íon superóxido, catalase, peroxidase) também devem ser consideradas como participantes do fenômeno de citoproteção, já que são peças fundamentais da defesa celular frente a agentes citotóxicos. Dentro desta perspectiva, Wangila e cols. (2006) demonstraram inibição da indução de apoptose pela cisplatina em células epiteliais de rim pré-tratadas com uma substância mimética à dismutase do íon superóxido. É de se salientar que Klebanov e cols. (2005) observaram aumento da atividade da dismutase do íon superóxido após irradiação com laser de baixa potência. Esse achado pode acontecer como mera consequência do aumento do metabolismo oxidativo causado pela radiação laser, ou talvez, pela atuação direta da radiação sobre a enzima, já que ela contém íons metálicos em sua estrutura.

Em relação à ativação dos mecanismos de reparo do DNA, Koberle e cols. (1999) constataram a existência de relação entre defeitos nesses mecanismos e maior sensibilidade à cisplatina. Portanto, o inverso também pode ocorrer, ou seja, mecanismos de reparo eficientes poderiam conferir resistência à droga. Neste contexto, vale mencionar que existem enzimas de reparo de DNA ativadas pela luz, como por exemplo, as fotoliasas presentes em *E. coli* (ESSEN e KLAR 2006).

Embora não tenham sido ainda identificadas em células de mamíferos, sabe-se que elas são capazes de reconhecer e reverter lesões induzidas por radiação ultravioleta (ESSEN e KLAR 2006). Enfim, há indícios que, de alguma forma, a LBP interfira com os mecanismos de reparo de DNA, pois Joyce e cols. (1999) observaram redução da frequência das aberrações cromossômicas induzidas por radiação ionizante a partir da pré-irradiação com laser de baixa potência. Conseqüentemente, é plausível pensar que possa existir em mamíferos uma enzima de reparo com propriedades semelhantes as das fotoliasas.

Outro dado interessante vem da descoberta da utilização de transportadores de cobre como via comum de entrada e saída na célula, tanto para os íons cobre como também para a cisplatina (WANG e LIPPARD 2005), pois, até pouco tempo atrás, acreditava-se que a entrada de cisplatina na célula era decorrente, principalmente, de difusão passiva (WANG e LIPPARD 2005). No entanto, estudos recentes têm demonstrado uma relação direta entre moléculas transportadoras de cobre e a concentração intracelular de cisplatina (SAFAEI 2006, ZISOWSKY e cols. 2007). Por exemplo, foi demonstrada proteção de linhagens tumorais contra o efeito citotóxico da cisplatina através do pré-tratamento com sais de cobre (ZELAZOWSKI e cols. 1984; BONGERS e cols. 1988; BOOGAARD e cols. 1991). Deste modo, a radiação laser poderia, de alguma forma, aumentar o transporte de cobre que, por sua vez, competiria com a cisplatina diminuindo sua entrada na célula, e com isso, contribuiria para a diminuição de sua toxicidade.

Existe ainda uma outra via comum de ação que merece ser mencionada. Tanto a LBP como a cisplatina causam estresse oxidativo devido à produção de radicais livres, porém com intensidades diferentes. A LBP causa estresse oxidativo de baixa intensidade (LAVI e cols. 2003, LUBART e cols. 2005), enquanto que no caso da cisplatina o estresse oxidativo é de alta intensidade (KAWAI e cols. 2006, SIOMEK e cols. 2006). O estresse de baixa intensidade pode desencadear respostas celulares adaptativas, o que resulta em maior resistência celular aos agentes estressantes (WIESE e cols. 1995, ROTHFUSS e cols. 2001, CHIUEH e cols. 2005, KOYELI e cols. 2005, TAPIA 2006). Como mostrado por Wiese e cols.

(1995), o pré-tratamento de células com baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, seguido de altas concentrações, aumenta a viabilidade das células de 1,9% para 76,5%.

Pesquisas futuras devem ser direcionadas para a investigação de cada uma dessas possíveis vias comuns à ação da LBP e da cisplatina. Outro dado que merece ser investigado de forma mais aprofundada é a aparente independência entre os fenômenos de estimulação da proliferação e indução de citoproteção pela ação da LBP, pois, no presente trabalho, foi possível observar efeito citoprotetor apesar da ausência de efeito proliferativo inicial nas amostras de um mesmo indivíduo. Porém, o inverso não foi observado, isto é, não foram observados casos de presença de efeito proliferativo na ausência de efeito citoprotetor.

Finalmente, tendo em vista as variações de resposta entre diferentes indivíduos, é indispensável o desenvolvimento de ferramentas capazes de prever comportamentos biológicos para que, com isso, seja possível propor tratamentos de maneira individualizada. A farmacogenômica é um exemplo de ferramenta moderna capaz de identificar as diferenças genéticas entre indivíduos que condicionam diferentes padrões de resposta aos medicamentos (MOREIRA-FILHO e OKAMOTO 2004). A tendência é que este tipo de análise molecular venha a ser incorporada aos procedimentos rotineiros para a escolha de abordagens terapêuticas mais adequadas a cada caso, aumentando assim a eficácia dos tratamentos (MOREIRA-FILHO e OKAMOTO 2004). O modelo utilizado na presente investigação pode ser aplicado em estudos futuros com o objetivo de prever a sensibilidade do paciente à cisplatina, e assim, orientar ajustes de dose. Além disso, pode-se investigar a correlação entre a sensibilidade *in vitro*, a incidência e a intensidade dos efeitos colaterais provocados pela cisplatina *in vivo*. Através deste modelo, também é possível identificar de maneira individualizada a melhor dose de radiação laser necessária para a indução de proliferação celular ou citoproteção, e com isso, verificar a aplicação desta individualização de dose no tratamento e na prevenção de ulcerações orais induzidas por radioterapia e/ou quimioterapia em pacientes com câncer.

6. Conclusões

1. O modelo de estudo desenvolvido foi capaz de reproduzir situações observadas *in vivo*, tais como indução de aumento da proliferação celular e indução de citoproteção decorrente da irradiação com laser de baixa potência, promoção de citotoxicidade devido ao uso de cisplatina, e variabilidade de resposta interindividual em todos estes casos.
2. A radiação laser induziu aumento da proliferação linfocitária, porém não foi observada relação de dose-resposta.
3. A cisplatina promoveu redução da proliferação linfocitária de maneira dose-dependente.
4. A radiação laser reduziu a citotoxicidade causada pela cisplatina, caracterizando o fenômeno de citoproteção, o qual foi representado pelo aumento da proliferação linfocitária mesmo sob a influência negativa da cisplatina.

7. Referências bibliográficas

AGAIBY AD, GHALI LR, WILSON R, DYSON M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, 26: 357-63, 2000.

AMAT A, RIGAU J, WAYNANT RW, ILEY IK, ANDRES JJ. The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: a hypothesis of mechanism. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 82: 152-60, 2006.

ANDERSEN K. Laser technology--a surgical tool of the past, present, and future. **AORN Journal**, 78: 794-807, 2003.

ANTUNES HS, DE AZEVEDO AM, BOUZAS LF, ADAO CA, PINHEIRO CT, MAYHE R, PINHEIRO LH, AZEVEDO R, MATOS VD, RODRIGUES PC, SMALL IA, ZANGARO RA, FERREIRA CG. Low power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood**, 109: 2250-5, 2007.

ASHRAF MT & KHAN RH. Mitogenic lectins. **Medical Science Monitor**, 9: 265-9, 2003.

BABAPOUR R, GLASSBERG E, LASK GP. Low-energy laser systems. **Clinics in Dermatology**, 13: 87-90, 1995.

BARASCH A, PETERSON DE, TANZER JM, D'AMBROSIO JA, NUKI K, SCHUBERT MM, FRANQUIN JC, CLIVE J, TUTSCHKA P. Helium-neon laser effects on conditioning-induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **Cancer**, 76: 2550-6, 1995.

BAYAT M, VASHEGHANI MM, RAZAVI N. Effect of low-level helium-neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 83: 87-93, 2006.

BENSADOUN RJ, FRANQUIN JC, CIAIS G, DARCOURT V, SCHUBERT MM, VIOT M, DEJOU J, TARDIEU C, BENEZERY K, NGUYEN TD, LAYDOYER Y, DASSONVILLE O, POISSONNET G, VALLICIONI J, THYSS A, HAMDY M, CHAUVEL P, DEMARD F. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis: a multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. **Supportive Care in Cancer**, 7: 244-52, 1999.

BENSADOUN RJ. Low level laser therapy: a real hope in the management of chemo-induced and radiation-induced mucositis? **Cancer Journal**, 8: 236-8, 2002.

BENSADOUN RJ, LE PAGE F, DARCOURT V, BENSADOUN F, CIAIS G, ROSTOM YA, POISSONNET G, DASSONVILLE O, DEMARD F. [Radiation-

induced mucositis of the aerodigestive tract: prevention and treatment. MASCC/ISOO mucositis group's recommendations] **Bulletin du Cancer**, 93: 201-11, 2006.

BLIJLEVENS NM. Implications of treatment-induced mucosal barrier injury. **Current Opinion in Oncology**, 17: 605-10, 2005.

BONGERS J, BELL JU, RICHARDSON DE. Platinum(II) binding to metallothioneins. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 34: 55-62, 1988.

BOOGAARD PJ, SLIKERVEER A, NAGELKERKE JF, MULDER GJ. The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bi³⁺(+)-pretreatment in the rat in vivo and in vitro: are antioxidant properties of metallothionein more relevant than platinum binding? **Biochemical Pharmacology**, 41: 369-75, 1991.

BOULIKAS T & VOUGIOUKA M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncology Reports**, 10: 1663-82, 2003.

BUENTZEL J, MICKE O, ADAMIETZ IA, MONNIER A, GLATZEL M, DE VRIES A. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo-controlled phase III study. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, 64: 684-91, 2006.

CARROLL L & HUMPHREYS TR. Laser-tissue interactions. **Clinics in Dermatology**, 24: 2-7, 2006.

CARVALHO PDE T, MAZZER N, DOS REIS FA, BELCHIOR AC, SILVA IS. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 21: 177-83, 2006.

CORRAL-BAQUES MI, RIGAU T, RIVERA M, RODRIGUEZ JE, RIGAU J. Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility. **Lasers in Medical Sciences**, 20: 28-34, 2005.

CHIUEH CC, ANDOH T, CHOCK PB. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1042: 403-18, 2005.

COSISKI MARANA HR, SANTANA DA SILVA J, MOREIRA DE ANDRADE J. NK cell activity in the presence of IL-12 is a prognostic assay to neoadjuvant chemotherapy in cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, 78: 318-23, 2000.

COWEN D, TARDIEU C, SCHUBERT M, PETERSON D, RESBEUT M, FAUCHER C, FRANQUIN JC. Low energy Helium-Neon laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind

randomized trial. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, 38: 697-703, 1997.

DUBE A, BOCK C, BAUER E, KOHLI R, GUPTA PK, GREULICH KO. He-Ne laser irradiation protects B-lymphoblasts from UVA-induced DNA damage. **Radiation and Environmental Biophysics**, 40: 77-82, 2001.

EELLS JT, HENRY MM, SUMMERFELT P, WONG-RILEY MT, BUCHMANN EV, KANE M, WHELAN NT, WHELAN HT. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100: 3439-44, 2003.

EELLS JT, WONG-RILEY MT, VERHOEVE J, HENRY M, BUCHMAN EV, KANE MP, GOULD LJ, DAS R, JETT M, HODGSON BD, MARGOLIS D, WHELAN HT. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. **Mitochondrion**, 4: 559-67, 2004.

EL BATANOUNY M, KORRAA S, FEKRY O. Mitogenic potential inducible by He:Ne laser in human lymphocytes in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 68:1-7, 2002.

ESSEN LO & KLAR T. Light-driven DNA repair by photolyases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 63: 1266-77, 2006.

FRAIKIN GYA, STRAKHOVSKAYA MG, RUBIN AB. The role of membrane-bound porphyrin-type compound as endogenous sensitizer in photodynamic damage to yeast plasma membranes. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 34: 129-35, 1996.

FRAIKIN GYA, STRAKHOVSKAYA MG, RUBIN AB. Light-induced processes of cell protection against photodamage. **Biochemistry (Moscow)**, 65: 737-46, 2000.

FUNK JO, KRUSE A, NEUSTOCK P, KIRCHNER H. Helium-neon laser irradiation induces effects on cytokine production at the protein and the mRNA level. **Experimental Dermatology**, 2: 75-83, 1993.

GABRIEL DA, SHEA T, OLAJIDA O, SERODY JS, COMEAU T. The effect of oral mucositis on morbidity and mortality in bone marrow transplant. **Seminars in Oncology**, 30: 76-83, 2003.

GAL P, VIDINSKY B, TOPORCER T, MOKRY M, MOZES S, LONGAUER F, SABO J. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, 24: 480-8, 2006.

GATSURA SV, GLADKIKH SP, TITOV MN. Effect of low-energy laser irradiation on the area of experimental myocardial infarction, lipid peroxidation, and hemoglobin affinity for oxygen. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, 137: 355-7, 2004.

GENOT MT & KLASTERSKY J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. **Current Opinion in Oncology**, 17: 236-40, 2005.

GIROTTI AW. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 63: 103-13, 2001.

GROSSMAN N, SCHNEID N, REUVENI H, HALEVY S, LUBART R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, 22: 212-8, 1998.

GULSOY M, OZER GH, BOZKULAK O, TABAKOGLU HO, AKTAS E, DENIZ G, ERTAN C. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 82: 199-202, 2006.

HAWKINS D, HOURELD N, ABRAHAMSE H. Low level laser therapy (LLLT) as an effective therapeutic modality for delayed wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1056: 486-93, 2005.

HAWKINS D & ABRAHAMSE H. The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**, 38: 74-83, 2006.

JOYCE KM, DOWNES CS, HANNIGAN BM. Radioadaptation in Indian muntjac fibroblast cells induced by low intensity laser irradiation. **Mutation Research**, 435: 35-42, 1999.

KARU T, PYATIBRAT L, KALENDU G. Irradiation with He-Ne laser can influence the cytotoxic response of HeLa cells to ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, 65: 691-7, 1994.

KARU T, PYATIBRAT L, KALENDU G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 27: 219-23, 1995.

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

KARU TI, PYATIBRAT LV, AFANASYEVA NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. **Photochemistry and photobiology**, 80: 366-72, 2004.

KARU TI, PYATIBRAT LV, KOLYAKOV SF, AFANASYEVA NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 81: 98-106, 2005.

KAWAI Y, NAKAO T, KUNIMURA N, KOHDA Y, GEMBA M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. **Journal of Pharmacological Sciences**, 100: 65-72, 2006.

KEEFE DM & GIBSON RJ. Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**, online edition DOI 10.1007/s00520-006-0181-z, 2006.

KLEIN E, FINE S, AMBRUS J, COHEN E, NETER E, AMBRUS C, BARDOS T, LYMAN R. Interaction of laser radiation with biologic systems 3: studies on biologic systems in vitro. **Federation Proceedings**, 24: 104, 1965.

KOHLI R & GUPTA PK. Irradiance dependence of the He-Ne laser-induced protection against UVC radiation in E. coli strains. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 69: 161-7, 2003.

KOSMIDER B, ZYNER E, OSIECKA R, OCHOCKI J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, 563: 61-70, 2004.

LAVI R, SHAINBERG A, FRIEDMANN H, SHNEYVAYS V, RICKOVER O, EICHLER M, KAPLAN D, LUBART R. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. **The Journal of Biological Chemistry**, 278: 40917-22, 2003.

LIANG HL, WHELAN HT, EELLS JT, MENG H, BUCHMANN E, LERCH-GAGGL A, WONG-RILEY M. Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis. **Neuroscience**, 139: 639-49, 2006.

LIEBERTHAL W, TRIACA V, LEVINE J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. **American Journal of Physiology**, 270: F700-8, 1996.

LIM ML, LUM MG, HANSEN TM, ROUCOU X, NAGLEY P. On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. **Journal of Biomedical Science**, 9: 488-506, 2002.

LUBART R, EICHLER M, LAVI R, FRIEDMANN H, SHAINBERG A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. **Photomedicine and Laser Surgery**, 23: 3-9, 2005.

LUBART R, LAVI R, FRIEDMANN H, ROCHKIND S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. **Photomedicine and Laser Surgery**, 24: 179-85, 2006.

MCDONNELL AM & LENZ KL. Palifermin: role in the prevention of chemotherapy- and radiation-induced mucositis. **The Annals of Pharmacotherapy**, 41: 86-94, 2007.

MCGUIRE DB, ALTOMONTE V, PETERSON DE, WINGARD JR, JONES RJ, GROCHOW LB. Patterns of mucositis and pain in patients receiving preparative chemotherapy and bone marrow transplantation. **Oncology Nursing Forum**, 20: 1493-502, 1993.

MOREIRA-FILHO CA, OKAMOTO OK. Medicina genômica na prática clínica. **Einstein**, 2: 235-236, 2004.

NADIN SB, VARGAS-ROIG LM, DRAGO G, IBARRA J, CIOCCA DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Letters**, 239: 84-97, 2006.

NAIDU MU, RAMANA GV, RANI PU, MOHAN IK, SUMAN A, ROY P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia**, 6: 423-31, 2004.

NEVES LS, SOUZA E SILVA CM, HENRIQUES JFC, CANÇADO RH, HENRIQUES RP, JANSON G. A utilização do laser em Ortodontia. **Revista DentalPress de Ortodontia e Ortopedia Facial**, 10: 149-156, 2005.

NOVOSELOVA EG, GLUSHKOVA OV, CHERENKOV DA, CHUDNOVSKY VM, FESENKO EE. Effects on low power laser radiation on mice immunity. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, 22: 33-8, 2006.

NUMICO G, RUSSI EG, VITIELLO R, SORRENTINO R, COLANTONIO I, CIPOLAT M, TAGLIANTI RV, PELISSERO A, FEA E, GRANETTO C, DI COSTANZO G, GASCO M, GARRONE O, OCCELLI M, MERLANO M. Gemcitabine and cisplatin in a concomitant alternating chemoradiotherapy program for locally advanced head-and-neck cancer: a pharmacology-guided schedule. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, 66: 731-7, 2006.

ÖHRN KE, WAHLIN YB, SJODEN PO. Oral status during radiotherapy and chemotherapy: a descriptive study of patient experiences and the occurrence of oral complications. **Supportive Care in Cancer**, 9: 247-57, 2001.

OHTA A, ABERGEL RP, UITTO J. Laser modulation of human immune system: inhibition of lymphocyte proliferation by a gallium-arsenide laser at low energy. **Lasers in Surgery and Medicine**, 7: 199-201, 1987.

PASTORE D, GRECO M, PASSARELLA S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. **International Journal of Radiation Biology**, 76: 863-70, 2000.

PETERSON DE & CARIELLO A. Mucosal damage: a major risk factor for severe complications after cytotoxic therapy. **Seminars in Oncology**, 31: 35-44, 2004.

PINZÓN-CHARRY A, VERNOT JP, RODRIGUES R, PATARROYO ME. Proliferative response of peripheral blood lymphocytes to mitogens in the owl monkey *Aotus nancymae*. **Journal of Medical Primatology**, 32: 31-8, 2003.

POIKONEN P, SAARTO T, LUNDIN J, JOENSUU H, BLOMQVIST C. Leucocyte nadir as a marker for chemotherapy efficacy in node-positive breast cancer treated with adjuvant CMF. **British Journal of Cancer**, 80: 1763-6, 1999.

POULSEN HE. Oxidative DNA modifications. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 57: 161-9, 2005.

POURREAU-SCHNEIDER N, SOUDRY M, REMUSAT M, FRANQUIN JC, MARTIN PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence International**, 20: 887-93, 1989.

POURREAU-SCHNEIDER N, SOUDRY M, FRANQUIN JC, ZATTARA H, MARTIN PM, CIAIS G, NAMER M, SCHNEIDER M, CHAUVEL P, DEMARD F. Soft-laser therapy for iatrogenic mucositis in cancer patients receiving high-dose fluorouracil: a preliminary report. **Journal of the National Cancer Institute**, 84: 358-9, 1992.

POURZARANDIAN A, WATANABE H, RUWANPURA SM, AOKI A, ISHIKAWA I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontology**, 76: 187-93, 2005.

PUGLIESE LS, MEDRADO AP, REIS SR, ANDRADE ZDE A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, 17: 307-13, 2003.

RAPOPORT AP, MILLER WATELET LF, LINDER T, EBERLY S, RAUBERTAS RF, LIPP J, DUERST R, ABOUD CN, CONSTINE L, ANDREWS J, ETTER MA, SPEAR L, POWLEY E, PACKMAN CH, ROWE JM, SCHWERTSCHLAG U, BEDROSIAN C, LIESVELD JL. Analysis of factors that correlate with mucositis in recipients of autologous and allogeneic stem-cell transplants. **Journal of Clinical Oncology**, 17: 2446-53, 1999.

RAPPOCCIOLO G, ALLAN JS, EICHBERG JW, CHANH TC. A comparative study of natural killer cell activity, lymphoproliferation, and cell phenotypes in nonhuman primates. **Veterinary Pathology**, 29: 53-9, 1992.

RATZ JL. Laser physics. **Clinics in Dermatology**, 13: 11-20, 1995.

RICEVUTI G, MAZZONE A, MONAIA C, FRATINO P, DEGIULIO R, DELL'ACQUA R, LEONARDI G, JUCCI A, SACCHI S. In vivo and in vitro HeNe laser effects on phagocyte functions. **Inflammation**, 13: 507-27, 1989.

ROELANDTS R. The history of phototherapy: something new under the sun? **Journal of the American Academy of Dermatology**, 46: 926-30, 2002.

ROSE-PED AM, BELLM LA, EPSTEIN JB, TROTTI A, GWEDE C, FUCHS HJ. Complications of radiation therapy for head and neck cancers. The patient's perspective. **Cancer Nursing**, 25: 461-7, 2002.

SAFAEI R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. **Cancer Letters**, 234: 34-9, 2006.

SCHUBERT MM, EDUARDO FP, GUTHRIE KA, FRANQUIN JC, BENSADOUN RJ, MIGLIORATI CA, LLOYD CM, EDUARDO CP, WALTER NF, MARQUES MM, HAMDY M. A phase III randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to determine the efficacy of low level laser therapy for the prevention of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic cell transplantation. **Supportive Care in Cancer**, publicado online em 29 de março de 2007.

SIOMEK A, TUJAKOWSKI J, GACKOWSKI D, ROZALSKI R, FOKSINSKI M, DZIAMAN T, ROSZKOWSKI K, OLINSKI R. Severe oxidatively damaged DNA after cisplatin treatment of cancer patients. **International Journal of Cancer**, 119: 2228-30, 2006.

SONIS ST, OSTER G, FUCHS H, BELLM L, BRADFORD WZ, EDELSBERG J, HAYDEN V, EILERS J, EPSTEIN JB, LEVEQUE FG, MILLER C, PETERSON DE, SCHUBERT MM, SPIJKERVETFK, HOROWITZ M. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, 19: 2201-5, 2001.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M, BEKELE BN, RABER DURLACHER J, DONNELLY JP, RUBENSTEIN EB. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 100: 1995-2025, 2004.

STADLER I, EVANS R, KOLB B, NAIM JO, NARAYAN V, BUEHNER N, LANZAFAME RJ. In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on

peripheral blood lymphocytes. **Lasers in Surgery and Medicine**, 27: 255-61, 2000.

TAPIA PC. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "mitohormesis" for health and vitality. **Medical Hypotheses**, 66: 832-43, 2006.

ULMER AJ & FLAD HD. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll as gradient medium. **Journal of Immunological Methods**. 30: 1-10, 1979.

VERA-LLONCH M, OSTER G, FORD CM, LU J, SONIS S. Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. **Supportive Care in Cancer**, online edition DOI 10.1007/s00520-006-0176-9, 2006.

VERA-LLONCH M, OSTER G, HAGIWARA M, SONIS S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. **Cancer**, 106: 329-36, 2006.

VLADIMIROV YA, OSIPOV AN, KLEBANOV GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. **Biochemistry (Moscow)**, 69: 81-90, 2004.

VOET D, VOET JG, PRATT CW. Fundamentos de Bioquímica. 1ª Reimpressão, Editora Artmed, 2002.

WALSH LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1: Soft tissue applications. **Australian Dental Journal**, 42: 247-54, 1997.

WANG D & LIPPARD SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, 4: 307-20, 2005.

WANGILA GW, NAGOTHU KK, STEWARD R 3rd, BHATT R, LYERE PA, WILLINGHAN WM, SORENSON JR, SHAH SV, PORTILLA D. Prevention of cisplatin-induced kidney epithelial cell apoptosis with a Cu superoxide dismutase-mimetic [copper2II(3,5-ditertiarybutylsalicylate)4(ethanol)4]. **Toxicology In Vitro**, 20: 1300-12, 2006.

WELCH AJ, TORRES JH, CHEONG WF. Laser physics and laser-tissue interaction. **Texas Heart Institute Journal**, 16: 141-9, 1989.

WIESE AG, PACIFICI RE, DAVIES KJ. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 318: 231-40, 1995.

WILSON FD, SHIFRINE M, GERSHWIN ME, SPANGLER W, DYCK J. Growth of canine T-lymphocyte colonies in vitro. **Experimental Hematology**, 6: 539-48, 1978.

WILTSCHKE C, KRAINER M, BUDINSKY AC, BERGER A, MULLER C, ZEILLINGER R, SPEISER P, KUBISTA E, EIBL M, ZIELINSKY CC. Reduced mitogenic stimulation of peripheral blood mononuclear cells as a prognostic parameter for the course of breast cancer: a prospective longitudinal study. **British Journal of Cancer**. 71: 1292-6, 1995.

WINTERLE JS & EINARSDOTTIR O. Photoreactions of cytochrome C oxidase. **Photochemistry and Photobiology**, 82: 711-9, 2006.

WONG-RILEY MT, LIANG HL, EELLS JT, CHANCE B, HENRY MM, BUCHMANN E, KANE M, WHELAN HT. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, 280: 4761-71, 2005.

WOO SB, SONIS ST, MONOPOLI MM, SONIS AL. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. **Cancer**, 72: 1612-7, 1993.

WOODRUFF LD, BOUNKEO JM, BRANNON WM, DAWES KS, BARHAM CD, WADDELL DL, ENWEMEKA CS. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomedicine and Laser Surgery**, 22: 241-7, 2004.

WORTHINGTON HV, CLARKSON JE, EDEN OB. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2: CD001973, 2004.

WORTHINGTON HV, CLARKSON JE, EDEN OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2: CD000978, 2006.

YAMAMOTO Y, KONO T, KOTANI H, KASAI S, MITO M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, 14: 129-32, 1996.

YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, 275: 1129-32, 1997.

YU W, NAIM JO, LANZAFAME RJ. Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. **Lasers in Surgery and Medicine**, 20: 56-63, 1997.

YU W, NAIM JO, MCGOWAN M, IPPOLITO K, LANZAFAME RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. **Photochemistry and Photobiology**, 66: 866-71, 1997.

ZELAZOWSKI AJ, GARVEY JS, HOESCHELER JD. In vivo and in vitro binding of platinum to metallothionein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 229: 246-52, 1984.

ZISOWSKY J, KOEGEL S, LEYERS S, DEVARAKONDA K, KASSACK MU, OSMAK M, JAEHDE U. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, 73: 298-307, 2007.

Anexo 1- Glossário de conceitos físicos

Amplitude é uma medida escalar da magnitude de oscilação de uma onda. A unidade de medida da amplitude depende do tipo da onda. Por exemplo, a amplitude de ondas de som e sinais de áudio costumam ser expressas em decibéis (dB).

Coerência refere-se a ondas eletromagnéticas com mesma frequência e mesmo comprimento de onda.

Colimação é o nome que se dá para o processo de tornar paralelas, com a maior precisão possível, as trajetórias de determinadas partículas de determinados feixes, estes podem ser eletrônicos, luminosos, linhas de fluxo eletromagnético, etc. Na óptica a colimação é necessária para tornar paralelos os raios de um feixe luminoso.

Campo elétrico é o campo de força provocado por cargas elétricas (elétrons, prótons ou íons) ou por um sistema de cargas.

Campo magnético é o campo produzido por um ímã ou por cargas elétricas em movimento.

Comprimento de onda é a distância entre valores repetidos num padrão de onda. É usualmente representado pela letra grega *lambda* (λ). O comprimento de onda tem uma relação inversa com a frequência.

Frequência é o número de oscilações de uma onda em um segundo. A unidade de medida da frequência é o hertz (Hz).

Espectro eletromagnético é a distribuição da intensidade da radiação eletromagnética com relação ao seu comprimento de onda ou frequência. Contém

desde as ondas de rádio, o infravermelho, a luz visível, os raios ultravioletas, o raio X, até a radiação gama.

Fóton é a partícula elementar mediadora da força eletromagnética. O fóton também é o quantum da radiação eletromagnética (incluindo a luz). Em alguns aspectos um fóton atua como uma partícula, por exemplo, quando registrado por um mecanismo sensível a luz, como no caso de um filme fotográfico. Em outras ocasiões, um fóton se comporta como uma onda, tal quando passa através de uma lente ótica. De acordo com a conhecida dualidade partícula onda da mecânica quântica, é natural para um fóton apresentar ambos aspectos na sua natureza, de acordo com as circunstâncias em que se encontra.

Monocromaticidade é a propriedade da radiação laser que está relacionada à emissão de fótons de um único comprimento de onda, isto é representado pela emissão de luz composta por apenas uma cor do espectro visível.

Onda é uma perturbação oscilante, de alguma grandeza física no espaço e periódica no tempo. A oscilação espacial é caracterizada pelo comprimento de onda e a periodicidade no tempo é medida pela frequência da onda.

Partículas elementares da matéria também chamadas de partículas subatômicas são as menores porções de matéria-energia conhecidas. Partícula subatômica é a designação genérica daquelas cujas dimensões são muito menores que as de um átomo.

Radiação eletromagnética é uma combinação de um campo elétrico e de um campo magnético que se propagam através do espaço transportando energia. A luz visível é uma radiação eletromagnética. Dependendo das circunstâncias, esta radiação pode comportar-se como uma onda ou como uma partícula.

Anexo 2- Termo de consentimento

Eu, abaixo assinado, autorizo a coleta de sangue para uso em pesquisa sobre o efeito do laser de baixa potência sobre células do sangue. O procedimento planejado foi a mim explicado.

Os possíveis riscos associados a este procedimento foram-me esclarecidos e são os seguintes:

1. Aparecimento de hematoma na região de coleta.
2. Presença de desconforto local.

Certifico que este formulário me foi explicado e que o li ou que o mesmo foi lido para mim e que entendi o seu conteúdo.

Data __/__/__ Hora: __:__

Assinatura do
doador: _____

Nome: _____ R.G.: _____

Testemunha: _____ R.G.: _____

Qualquer dúvida entrar em contato com o Dr. Carlos Eduardo Tosta ou com a Dra. Renata Lazari Sandoval no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, ou pelos telefones 9963-7780 e 8172-9089.

Anexo 3- Parecer CONEP



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 063/2006

Título: Avaliação do efeito do laser de baixa potência sobre a proliferação de linfócitos humanos tratados com cisplatina

Pesquisador responsável: Renata Lazari Sandoval

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 13/10/2006

Proposição do(a) relator(a)

(x) Aprovação

() Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 20/11/2006

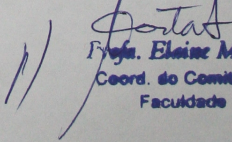
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 18/01/2007

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 22 de Janeiro de 2007.


Profa. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisas
Faculdade de Medicina - UnB

Anexo 4 - Desenho das placas de cultivo empregadas nos experimentos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 J/cm ² 0 IC ₅₀	0 J/cm ² 0 IC ₅₀	0 J/cm ² 0 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	0 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	0 J/cm ² 1 IC ₅₀	0 J/cm ² 1 IC ₅₀	0 J/cm ² 1 IC ₅₀
B	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
C	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
D	5 J/cm ² 0 Qt	5 J/cm ² 0 Qt	5 J/cm ² 0 Qt	5 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	5 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	5 J/cm ² 1/8 IC ₅₀	5 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	5 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	5 J/cm ² 1/4 IC ₅₀	5 J/cm ² 1 IC ₅₀	5 J/cm ² 1 IC ₅₀	5 J/cm ² 1 IC ₅₀
E	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
F	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
G	10J/cm ² 0 IC ₅₀	10J/cm ² 0 IC ₅₀	10J/cm ² 0 IC ₅₀	10J/cm ² 1/8 IC ₅₀	10J/cm ² 1/8 IC ₅₀	10J/cm ² 1/8 IC ₅₀	10J/cm ² 1/4 IC ₅₀	10J/cm ² 1/4 IC ₅₀	10J/cm ² 1/4 IC ₅₀	10J/cm ² 1 IC ₅₀	10J/cm ² 1 IC ₅₀	10J/cm ² 1 IC ₅₀
H	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	20J/cm ² 0 IC ₅₀	20J/cm ² 0 IC ₅₀	20J/cm ² 0 IC ₅₀	20J/cm ² 1/8 IC ₅₀	20J/cm ² 1/8 IC ₅₀	20J/cm ² 1/8 IC ₅₀	20J/cm ² 1/4 IC ₅₀	20J/cm ² 1/4 IC ₅₀	20J/cm ² 1/4 IC ₅₀	20J/cm ² 1 IC ₅₀	20J/cm ² 1 IC ₅₀	20J/cm ² 1 IC ₅₀
B	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
C	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
D	40J/cm ² 0 IC ₅₀	40J/cm ² 0 IC ₅₀	40J/cm ² 0 IC ₅₀	40J/cm ² 1/8 IC ₅₀	40J/cm ² 1/8 IC ₅₀	40J/cm ² 1/8 IC ₅₀	40J/cm ² 1/4 IC ₅₀	40J/cm ² 1/4 IC ₅₀	40J/cm ² 1/4 IC ₅₀	40J/cm ² 1 IC ₅₀	40J/cm ² 1 IC ₅₀	40J/cm ² 1 IC ₅₀
E	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
F	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF
G	80J/cm ² 0 IC ₅₀	80J/cm ² 0 IC ₅₀	80J/cm ² 0 IC ₅₀	80J/cm ² 1/8 IC ₅₀	80J/cm ² 1/8 IC ₅₀	80J/cm ² 1/8 IC ₅₀	80J/cm ² 1/4 IC ₅₀	80J/cm ² 1/4 IC ₅₀	80J/cm ² 1/4 IC ₅₀	80J/cm ² 1 IC ₅₀	80J/cm ² 1 IC ₅₀	80J/cm ² 1 IC ₅₀
H	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF	STF

Placa 2

Anexo 5 - Valores absolutos dos resultados obtidos em cada experimento, expressos em contagens por minuto (cpm).

Doador 1	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	33300	32843	30179	12419	12797	24699	22118	20574	27601	10083	9337	12897
5J/cm ²	43403	43889	39208	26817	29751	26318	16114	16539	19247	8122	7762	8230
10J/cm ²	33336	33583	36937	16144	21787	24396	19712	20492	19211	8854	7462	7707
20J/cm ²	49431	52828	55110	38149	31877	38268	33766	41089	34227	15082	14911	12744
40J/cm ²	31233	39686	40796	27497	37631	18698	29267	25336	22037	12284	14050	14103
80J/cm ²	37636	37114	42058	26491	33132	23494	23024	24388	28733	11759	14842	16769

Doador 2	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	69481	55467	72615	47006	62218	50263	46310	38728	46468	16764	14529	18035
5J/cm ²	74794	77958	75537	58020	73190	66428	55088	55611	49046	25265	23199	20972
10J/cm ²	73625	64124	70938	52032	53315	46207	46793	57026	52899	20863	17907	21647
20J/cm ²	76259	74119	74313	55027	70885	70515	40990	44889	38475	23489	22895	25495
40J/cm ²	76729	87677	84373	48889	55055	58662	52351	55049	56839	27336	23362	25521
80J/cm ²	78362	68795	77997	61816	51065	54925	50125	53915	52857	25490	29175	30456

Doador 3	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	53956	62148	67782	54361	63534	62136	52900	57459	53637	27721	20207	20207
5J/cm ²	74005	60692	61949	58363	86927	87751	68899	68220	72260	21667	28431	33617
10J/cm ²	72373	95125	75909	82581	82219	87615	60638	75406	75522	28909	38078	34957
20J/cm ²	54916	56193	43120	36884	49396	40057	29644	35584	28357	16748	15598	13896
40J/cm ²	40889	45171	42674	40648	48915	39086	34646	38953	42438	15535	16105	12931
80J/cm ²	51551	44086	31095	32823	41942	38627	38110	37498	34489	16593	16935	11813

Doador 4	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	82717	121256	105111	85953	92575	87255	54284	48110	43903	28610	29937	27041
5J/cm ²	87197	125008	107755	84246	91942	87348	44437	46478	43677	34417	27947	30451
10J/cm ²	95206	112647	112146	80220	89383	86609	48975	42256	38125	35401	32160	30724
20J/cm ²	93512	92352	110886	86272	80743	86627	52305	49392	49338	34748	32514	35988
40J/cm ²	91164	106415	108494	89677	98594	83684	65584	56856	50563	43471	35577	31603
80J/cm ²	83069	106595	114351	70905	89529	89868	42811	46797	48587	33396	24452	24535

Doador 5	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	69876	92131	85890	75796	78314	76292	67639	67639	68783	21318	24637	20210
5J/cm ²	115468	71550	66871	79627	83425	83277	61458	63959	75053	17908	19672	22774
10J/cm ²	62801	80100	87058	83354	79744	92285	70091	81486	73955	23914	22967	24072
20J/cm ²	103359	94848	104126	81423	89278	88102	73746	78727	73575	32293	31002	32708
40J/cm ²	105732	92008	93624	77917	102129	92648	88147	70400	74700	26635	28504	27900
80J/cm ²	89793	102808	85224	72914	87287	100850	78282	81180	89386	28349	25638	20780

Doador 6	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	0 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/8 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1/4 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀	1 IC ₅₀
0J/cm ²	67760	75777	71636	49948	60666	58519	38482	41579	34438	13550	10699	11868
5J/cm ²	78617	72320	69055	56080	54682	56405	36620	37742	38357	12415	16212	11565
10J/cm ²	75364	77012	73076	56512	66490	58075	43102	42427	44092	12900	12591	13169
20J/cm ²	71308	69373	78735	59193	66096	58463	42208	49228	47717	15821	14322	18582
40J/cm ²	68031	65991	74513	58383	56813	54810	48536	46166	44052	14294	13609	15608
80J/cm ²	62724	64968	67331	51409	55045	63289	46000	42773	48256	14318	12862	18079