

Mecanismos da terapia com luz de baixa intensidade.

Michael R Hamblin^{a,b,c,d} e Tatiana N Demidova

Centro Wellman de Fotomedicina, Hospital Geral de Massachusetts,

Departamento de Dermatologia, Harvard e Programa

Escola de Medicina, c Divisão de Ciências e Tecnologia da Saúde Harvard-MIT,

de Pós-Graduação em Biologia Celular

Biologia Molecular e do Desenvolvimento, Escola Sackler de Ciências Biomédicas de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina da Universidade Tufts

RESUMO

O uso de baixos níveis de luz visível ou infravermelha próxima para reduzir a dor, a inflamação e o edema, promover a cicatrização de feridas, tecidos profundos e nervos, e prevenir danos teciduais é conhecido há quase quarenta anos, desde a invenção dos lasers. Originalmente considerada uma propriedade peculiar da luz laser (lasers suaves ou frios), a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) agora abrange a fotobiomodulação e a fotobioestimulação com luz não coerente. Apesar de muitos relatos de resultados positivos em experimentos *in vitro*, em modelos animais e em ensaios clínicos randomizados e controlados, a LLLT permanece controversa. Isso provavelmente se deve a dois motivos principais: primeiro, os mecanismos bioquímicos subjacentes aos efeitos positivos não são completamente compreendidos; segundo, a complexidade de escolher racionalmente entre um grande número de parâmetros de iluminação, como comprimento de onda, fluência, densidade de potência, estrutura do pulso e tempo de tratamento, levou à publicação de diversos estudos com resultados negativos, bem como muitos com resultados positivos. Em particular, uma resposta bifásica à dose tem sido frequentemente observada, na qual baixos níveis de luz apresentam um efeito muito melhor do que níveis mais altos. Esta revisão introdutória abordará alguns dos cromóforos celulares propostos como responsáveis pelo efeito da luz visível em células de mamíferos, incluindo a citocromo c oxidase (com picos de absorção no infravermelho próximo) e as porfirinas fotoativas. Acredita-se que as mitocôndrias sejam um local provável para os efeitos iniciais da luz, levando ao aumento da produção de ATP, à modulação de espécies reativas de oxigênio e à indução de fatores de transcrição. Esses efeitos, por sua vez, levam ao aumento da proliferação e migração celular (particularmente por fibroblastos), à modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, e ao aumento da oxigenação tecidual. Os resultados dessas alterações bioquímicas e celulares em animais e pacientes incluem benefícios como cicatrização acelerada de feridas crônicas, melhora em lesões esportivas e síndrome do túnel do carpo, redução da dor em artrites e neuropatias, e atenuação de danos após ataques cardíacos, acidente vascular cerebral, lesões nervosas e toxicidade retiniana.

Palavras-chave: bioestimulação, terapia com laser de baixa intensidade, cicatrização de feridas, biomodulação, laser frio, espectros de ação

1. HISTÓRIA Em 1967,

alguns anos após a invenção do primeiro laser funcional, Endre Mester, da Universidade Semmelweis, em Budapeste, Hungria, quis testar se a radiação laser poderia causar câncer em ratos [1]. Ele raspou os pelos dorsais, dividiu os ratos em dois grupos e aplicou um tratamento a laser com um laser de rubi de baixa potência (694 nm) em um dos grupos. Os ratos não desenvolveram câncer e, para sua surpresa, os pelos do grupo tratado cresceram mais rapidamente do que os do grupo não tratado. Essa foi a primeira demonstração de "bioestimulação a laser". Desde então, o tratamento médico com fontes de luz coerente (lasers) ou luz não coerente (diodos emissores de luz, LEDs) passou por sua infância e adolescência. Atualmente, a terapia com laser (ou luz) de baixa intensidade (LLLT), também conhecida como "laser frio", "laser suave", "bioestimulação" ou "fotobiomodulação", é praticada como parte da fisioterapia em muitas partes do mundo. Na verdade, a terapia com luz é um dos métodos terapêuticos mais antigos utilizados pela humanidade (historicamente como terapia solar pelos egípcios, posteriormente como terapia UV, pela qual Nils Finsen ganhou o Prêmio Nobel em 1904 [2]). O uso de lasers e LEDs como fontes de luz foi o próximo passo no desenvolvimento tecnológico da terapia com luz, que agora é aplicada a milhares de pessoas em todo o mundo diariamente. Na LLLT, a questão não é mais se a luz tem efeitos biológicos, mas sim como a energia dos lasers e LEDs terapêuticos atua nos níveis celular e do organismo e quais são os parâmetros de luz ideais para diferentes usos dessas fontes de luz.

Um ponto importante que foi demonstrado por múltiplos estudos em cultura de células [3], modelos animais [4] e em estudos clínicos é o conceito de uma resposta bifásica à dose quando o resultado é comparado com a densidade total de energia luminosa fornecida (fluência). A razão pela qual a técnica é denominada de BAIXO nível é que existe uma dose ótima de luz para qualquer aplicação específica, e doses inferiores a esse valor ótimo, ou mais significativamente, **superiores** ao valor ótimo, terão um resultado terapêutico diminuído, ou, no caso de altas doses de luz, um resultado negativo pode até ocorrer.

Existem talvez três áreas principais da medicina e da prática veterinária em que a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) desempenha um papel fundamental (Figura 1). São elas: (i) cicatrização de feridas, reparação tecidual e prevenção da necrose tecidual; (ii) alívio da inflamação em doenças crônicas e lesões, com a dor e o edema associados; (iii) alívio da dor neuropática e de alguns problemas neurológicos. Idealmente, as vias propostas para explicar os mecanismos da LLLT deveriam ser aplicáveis a todas essas condições.

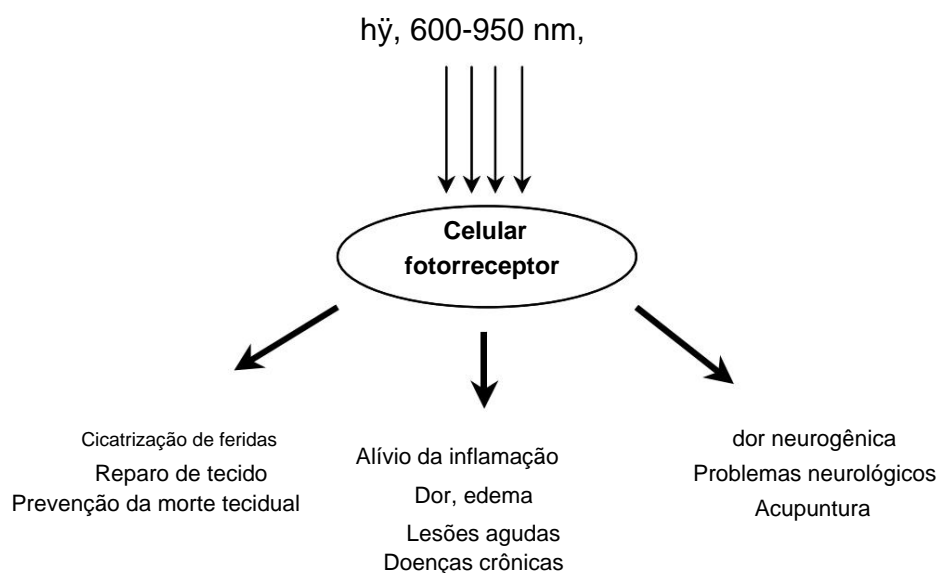


Figura 1. Representação esquemática das principais áreas de aplicação da LLLT (Terapia a Laser de Baixa Intensidade)

2. MECANISMOS BIOQUÍMICOS

2.1. Fotobiologia tecidual A

primeira lei da fotobiologia afirma que, para que a luz visível de baixa potência tenha algum efeito sobre um sistema biológico vivo, os fótons devem ser absorvidos por bandas de absorção eletrônica pertencentes a algum cromóforo molecular ou fotoaceitador [5]. Uma abordagem para identificar esse cromóforo é realizar espectros de ação. Trata-se de um gráfico que representa a fotoresposta biológica em função do comprimento de onda, número de onda, frequência ou energia do fóton e deve assemelhar-se ao espectro de absorção da molécula fotoaceitadora. O fato de ser possível construir um espectro de ação estruturado corrobora a hipótese da existência de fotoaceitadores celulares e vias de sinalização estimuladas pela luz.

A segunda consideração importante envolve as propriedades ópticas do tecido. Tanto a absorção quanto a dispersão da luz no tecido dependem do comprimento de onda (ambas muito maiores na região azul do espectro do que na vermelha), e o principal cromóforo do tecido (hemoglobina) apresenta altas bandas de absorção em comprimentos de onda menores que 600-nm. Por essas razões, existe a chamada "janela óptica". A segunda consideração importante envolve as propriedades ópticas do tecido. Tanto a absorção quanto a dispersão da luz no tecido dependem do comprimento de onda (ambas muito maiores na região azul do espectro do que na vermelha) e os principais cromóforos do tecido (hemoglobina e

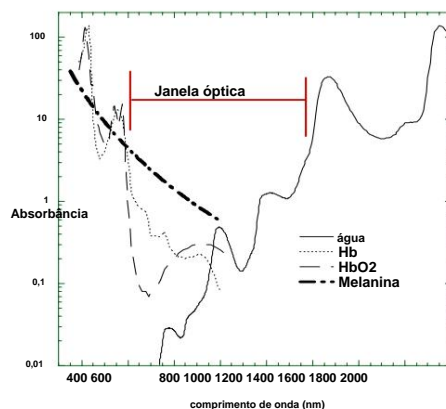


Figura 2. Janela óptica no tecido devido à absorção reduzida de comprimentos de onda vermelhos e infravermelhos próximos (600-1200 nm) pelos cromóforos do tecido.

A melanina apresenta bandas de alta absorção em comprimentos de onda inferiores a 600 nm. A água começa a absorver significativamente em comprimentos de onda superiores a 1150 nm. Por essas razões, existe uma chamada "janela óptica" no tecido que abrange os comprimentos de onda do vermelho e do infravermelho próximo, onde a penetração efetiva da luz no tecido é maximizada (Figura 2). Portanto, embora a luz azul, verde e amarela possam ter efeitos significativos em células cultivadas em meio opticamente transparente, o uso da terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) em animais e pacientes envolve quase exclusivamente luz vermelha e infravermelha próxima (600-950-nm).

2.2 Espectros de ação

Foi sugerido em 1989 que o mecanismo da LLLT em nível celular era baseado na absorção de radiação monocromática visível e NIR por componentes da cadeia respiratória celular [6]. A membrana mitocondrial interna contém 5 complexos de proteínas integrais de membrana: NADH desidrogenase (Complexo I), succinato desidrogenase (Complexo II), citocromo c redutase (Complexo III), citocromo c oxidase (Complexo IV), ATP sintase (Complexo V) e duas moléculas livremente difusíveis, ubiquinona e citocromo c, que transportam elétrons

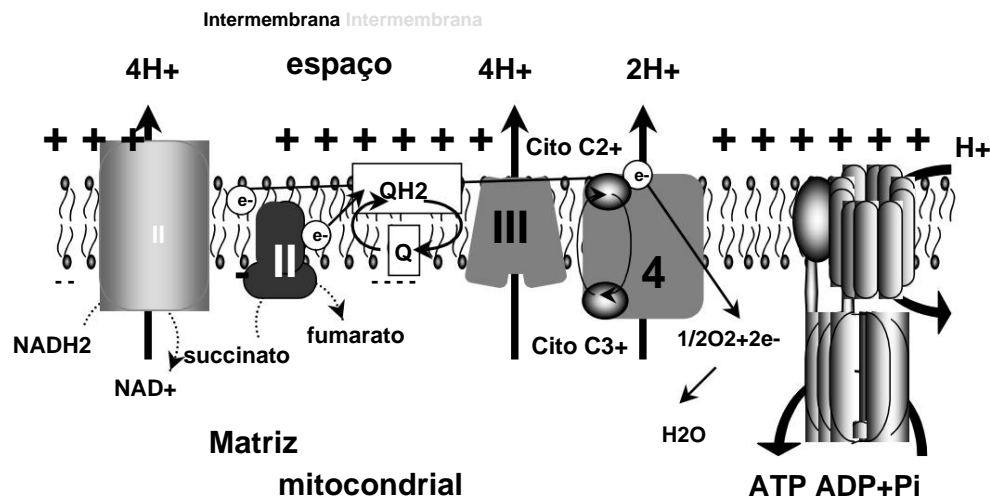


Figura 3. Estrutura da cadeia respiratória mitocondrial

de um complexo para o próximo (Figura 3). A cadeia respiratória realiza a transferência gradual de elétrons do NADH e do FADH₂ (produzidos no ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs) para moléculas de oxigênio para formar (com o auxílio de

As moléculas de água (prótons) aproveitam a energia liberada por essa transferência para bombear prótons (H^+) da matriz para o espaço intermembranar. O gradiente de prótons formado através da membrana interna por esse processo de transporte ativo constitui uma bateria em miniatura. Os prótons podem fluir de volta a favor desse gradiente, reentrando na matriz, somente através de outro complexo de proteínas integrais na membrana interna, o complexo da ATP sintase.

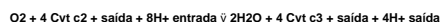
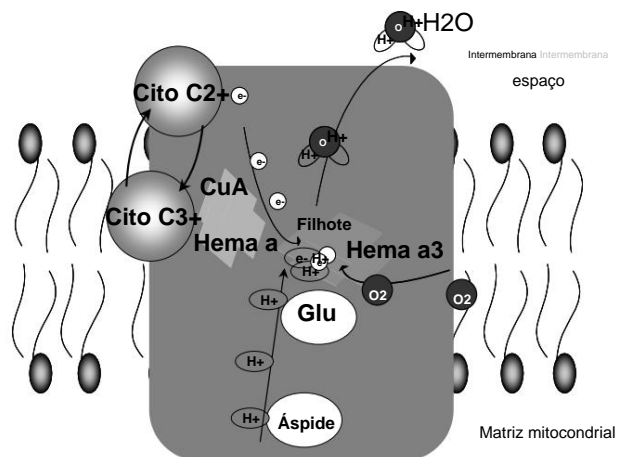


Figura 4. Estrutura e modo de ação da citocromo c oxidase

Os espectros de absorção obtidos para a citocromo c oxidase em diferentes estados de oxidação foram registrados e considerados muito semelhantes aos espectros de ação para respostas biológicas à luz. Portanto, foi proposto que a citocromo c oxidase é o principal fotoaceitador para a faixa vermelho-NIR em células de mamíferos [7] (Figura 4). A citocromo c oxidase contém dois centros de ferro, heme a e heme a3 (também denominados citocromos a e a3), e dois centros de cobre, CuA e CuB [8]. A citocromo c oxidase totalmente oxidada apresenta ambos os átomos de ferro no estado de oxidação Fe(III) e ambos os átomos de cobre no estado de oxidação Cu(II), enquanto a citocromo c oxidase totalmente reduzida apresenta o ferro no estado de oxidação Fe(II) e o cobre no estado de oxidação Cu(I). Existem muitas formas intermediárias de valência mista da enzima e outros ligantes coordenados, como CO, CN e formiato, podem estar envolvidos. Todos os muitos estados de oxidação individuais da enzima têm espectros de absorção diferentes [9], o que provavelmente explica as pequenas diferenças nos espectros de ação da LLLT que foram relatadas. Um artigo recente do grupo de Karu [10] apresentou as seguintes faixas de comprimento de onda para quatro picos no espectro de ação da LLLT: 1) 613,5 - 623,5 nm, 2) 667,5 - 683,7 nm, 3) 750,7 - 772,3 nm, 4) 812,5 - 846,0 nm.

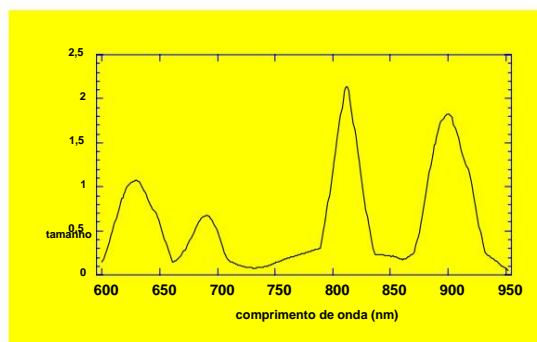


Figura 5. Espectro de ação generalizado dos efeitos da LLLT em células, animais e pacientes. Os dados apresentados são uma combinação de diversos relatos da literatura de vários laboratórios.

Um estudo de Pastore et al [11] examinou o efeito da iluminação com laser He-Ne na enzima citocromo c oxidase purificada e encontrou aumento na oxidação do citocromo c e aumento na transferência de elétrons. Artyukhov e colegas encontraram [12] aumento na atividade enzimática da catalase após a iluminação com He-Ne.

A absorção de fótons por moléculas leva a estados eletronicamente excitados e, conseqüentemente, pode levar à aceleração de reações de transferência de elétrons [13]. Um maior transporte de elétrons leva necessariamente a um aumento na produção de ATP [14]. O aumento da síntese de ATP induzido pela luz e o aumento do gradiente de prótons levam a um aumento da atividade dos antiportadores Na^+/H^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e de todos os transportadores de íons dependentes de ATP, como a Na^+/K^+ ATPase e o Ca^{2+} bombas. O ATP é o substrato da adenilciclase e, portanto, o nível de ATP controla o nível de cAMP. Tanto o Ca^{2+} O AMPc e o cálcio são segundos mensageiros muito importantes. O cálcio, em especial, regula quase todos os processos do corpo humano (contração muscular, coagulação sanguínea, transmissão de sinais nos nervos, expressão gênica, etc.).

Além do aumento na produção de ATP mediado pela citocromo c oxidase, outros mecanismos podem estar operando na LLLT. O primeiro deles que consideraremos é a "hipótese do oxigênio singlete". Certas moléculas com bandas de absorção visíveis, como porfirinas sem centros de coordenação de metais de transição [15] e algumas flavoproteínas [16], podem ser convertidas em um estado triplete de longa duração após a absorção de fótons. Esse estado triplete pode interagir com o oxigênio no estado fundamental com transferência de energia, levando à produção de uma espécie reativa, o oxigênio singlete. Essa é a mesma molécula utilizada na terapia fotodinâmica (PDT) para matar células cancerígenas, destruir vasos sanguíneos e eliminar micróbios.

Os investigadores em PDT sabem há muito tempo que doses muito baixas de PDT podem causar proliferação celular e estimulação do tecido em vez da morte observada em doses elevadas [17].

O próximo mecanismo proposto foi a "hipótese da alteração das propriedades redox" [18]. A alteração do metabolismo mitocondrial e a ativação da cadeia respiratória pela iluminação também aumentariam a produção de ânions superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$. Foi demonstrado que a produção celular total de $\text{O}_2^{\bullet-}$ depende principalmente de estado metabólico das mitocôndrias. Outras cadeias redox nas células também podem ser ativadas pela LLLT. A NADPH-oxidase é uma enzima encontrada em neutrófilos ativados e é capaz de induzir uma explosão respiratória não mitocondrial e a produção de grandes quantidades de ROS. [19]. Esses efeitos dependem do estado fisiológico do organismo hospedeiro, bem como dos parâmetros de radiação.

A atividade da citocromo c oxidase é inibida pelo óxido nítrico (NO). Essa inibição da respiração mitocondrial pelo NO pode ser explicada por uma competição direta entre NO e O_2 pelo centro binuclear reduzido CuB/a3 da citocromo c oxidase e é reversível [20]. Foi proposto que a irradiação a laser poderia reverter a inibição da citocromo c oxidase pelo NO e, assim, aumentar a taxa de respiração ("hipótese do NO") [21]. Dados publicados recentemente por Karu et al. [21] apoiam indiretamente essa hipótese. Outra evidência do envolvimento do NO nas respostas à LLLT é o aumento na produção de óxido nítrico sintase induzível após a exposição à luz (635 nm) [22]. Embora ambas as observações apoiem a hipótese de respostas dependentes de NO à LLLT, as respostas a diferentes comprimentos de onda de luz em diferentes modelos podem ser regidas por mecanismos distintos.

2.3 Sinalização celular

A combinação dos produtos do potencial de redução e da capacidade redutora dos pares redox presentes nas células e nos tecidos representa o ambiente redox (estado redox) da célula. Os pares redox presentes na célula incluem: nicotinamida adenina dinucleotídeo (formas oxidada/reduzida) NAD/NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato NADP/NADPH, glutatona/glutatona dissulfeto (GSH/GSSG) e tiorredoxina/tiorredoxina dissulfeto ($\text{Trx}(\text{SH})_2/\text{TrxSS}$) [23]. Diversas vias de regulação importantes são mediadas pelo estado redox celular. Alterações no estado redox induzem a ativação de inúmeras vias de sinalização intracelular, regulam a síntese de ácidos nucleicos, a síntese de proteínas, a ativação de enzimas e a progressão do ciclo celular [24]. Essas respostas citosólicas, por sua vez, induzem alterações transcricionais. Vários fatores de transcrição são regulados por alterações no estado redox celular. Entre eles, o fator redox-1 (Ref-1) dependente de proteína ativadora-1 (AP-1) (Fos e Jun), o fator nuclear γB (NF- γB), p53, o fator de transcrição ativador/proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (ATF/CREB), o fator induzível por hipóxia (HIF)-1 γ e o fator semelhante ao HIF. Em geral, a forma oxidada dos fatores de transcrição dependentes de redox apresenta baixa atividade de ligação ao DNA. O Ref-1 é um fator importante para a redução específica desses fatores de transcrição.

Entretanto, também foi demonstrado que baixos níveis de oxidantes parecem estimular a proliferação e diferenciação de alguns tipos de células [25-27]

Propõe-se que a terapia com laser de baixa intensidade (LLLT) produza uma mudança no potencial redox geral da célula na direção de uma maior oxidação. [28]. Diferentes células em uma variedade de condições de crescimento apresentam estados redox distintos. Portanto, os efeitos da LLLT podem

variam consideravelmente. Células que inicialmente se encontram em um estado mais reduzido (pH intracelular baixo) têm alto potencial de resposta à LLLT, enquanto células em estado redox ideal respondem fracamente ou não respondem ao tratamento com luz.

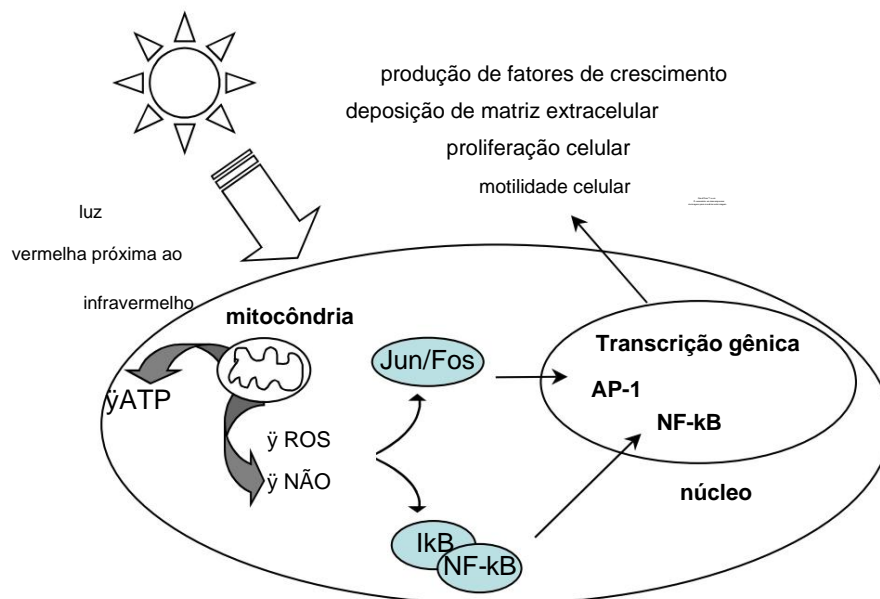


Figura 6. Vias de sinalização celular induzidas por LLLT.

3. RESULTADOS IN VITRO

3.1 Tipos de

células Há evidências de que múltiplos tipos de células de mamíferos e microbianas podem responder à LLLT. Grande parte do trabalho de Karu utilizou *Escherichia coli* (uma bactéria aeróbica Gram-negativa) [29] e células HeLa [30], uma linhagem celular de carcinoma cervical humano. No entanto, para que as aplicações clínicas da LLLT sejam validadas, é muito mais importante estudar os efeitos da LLLT em tipos de células não malignas que provavelmente serão estimuladas de forma útil para remediar alguma doença ou lesão. Para estudos de cicatrização de feridas, essas células provavelmente serão células endoteliais [31], fibroblastos [32], queratinócitos [33] e possivelmente algumas classes de leucócitos, como macrófagos [34] e neutrófilos [35]. Para estudos de alívio da dor e regeneração nervosa, essas células serão neurônios [36-38] e células da glia [39]. Para aplicações anti-inflamatórias e antiedema, os tipos de células serão macrófagos [34], mastócitos [40], neutrófilos [41], linfócitos [42] etc. Há evidências na literatura de efeitos in vitro da LLLT para a maioria desses tipos de células.

3.2. Mitocôndrias isoladas

Como a cadeia respiratória e a citocromo c oxidase estão localizadas nas mitocôndrias, diversos grupos testaram o efeito da LLLT em preparações de mitocôndrias isoladas. O sistema mais popular para estudo é o efeito da iluminação com laser HeNe em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Observou-se aumento do potencial eletroquímico de prótons e da síntese de ATP [43]. O aumento da síntese de RNA e proteínas foi demonstrado após 5 J/cm² [44]. Pastore et al. [45] encontraram aumento da atividade da citocromo c oxidase e aumento na captação de oxigênio medida polarograficamente após 2 J/cm² de HeNe. Uma estimulação significativa na atividade de bombeamento de prótons, com aumento de cerca de 55% na razão $-H^+/e^-$, foi encontrada em mitocôndrias iluminadas. Yu et al [13] utilizaram laser de 660 nm com densidade de potência de 10 mW/cm² e demonstraram aumento no consumo de oxigênio (0,6 J/cm² e 1,2 J/cm²), aumento no potencial de fosfato e na carga energética (1,8 J/cm² e 2,4 J/cm²), além de aumento nas atividades de NADH: ubiquinona oxidoreductase, ubiquinol: ferricitocromo C oxidoreductase e ferrocitocromo C: oxigênio oxidoreductase (0,6 J/cm²

3.3 Resposta celular à LLLT As

respostas celulares observadas *in vitro* após a LLLT podem ser amplamente classificadas em aumentos no metabolismo, migração, proliferação e aumentos na síntese e secreção de várias proteínas. Muitos estudos relatam efeitos em mais de um desses parâmetros. Yu et al. relataram [33] sobre queratinócitos e fibroblastos cultivados que foram irradiados com laser HeNe de 0,5 a 1,5 J/cm². Eles encontraram um aumento significativo na liberação do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) tanto por queratinócitos quanto por fibroblastos e um aumento significativo na liberação do fator de crescimento nervoso (NGF) por queratinócitos. O meio de cultura de queratinócitos irradiados com laser HeNe estimulou a captação de [3H]timidina e a proliferação de melanócitos cultivados. Além disso, a migração de melanócitos foi aumentada diretamente pelo laser HeNe ou indiretamente pelo meio derivado de queratinócitos tratados com laser HeNe.

A presença de respostas celulares à LLLT em nível molecular também foi demonstrada [46]. Fibroblastos humanos normais foram expostos por 3 dias a 0,88 J/cm² de luz de 628 nm proveniente de um diodo emissor de luz. Os perfis de expressão gênica após a irradiação foram examinados utilizando um microarray de cDNA contendo 9982 genes humanos. Constatou-se que 111 genes foram afetados pela luz. Todos os genes da categoria relacionada a antioxidantes e os genes relacionados ao metabolismo energético e à cadeia respiratória apresentaram regulação positiva. A maioria dos genes relacionados à proliferação celular também apresentou regulação positiva. Entre os genes relacionados à apoptose e à resposta ao estresse, alguns genes, como a proteína de ligação JAK, apresentaram regulação positiva, enquanto outros, como HSP701A, caspase 6 e fosfoproteína induzida por estresse, apresentaram regulação negativa. Sugere-se que a LLLT estimula o crescimento celular diretamente, regulando a expressão de genes específicos, bem como indiretamente, regulando a expressão de genes relacionados à síntese e reparo do DNA e ao metabolismo celular.

4. MODELOS ANIMAIS Um

grande número de modelos animais tem sido utilizado para demonstrar os efeitos da LLLT em diversas doenças, lesões e condições crônicas e agudas. Nesta revisão, discutiremos apenas três aplicações específicas para as quais existem bons relatos de eficácia na literatura.

4.1 Cicatrização de feridas A

literatura sobre a aplicação da LLLT na estimulação da cicatrização de feridas em diversos modelos animais apresenta estudos tanto positivos quanto negativos. As razões para os relatos conflitantes, por vezes em modelos de feridas muito semelhantes, são provavelmente diversas. É provável que as aplicações da LLLT em modelos animais sejam mais eficazes se realizadas em modelos que apresentem algum estado patológico intrínseco. Embora existam vários relatos de que processos como a cicatrização de feridas são acelerados pela LLLT em roedores normais [3, 34], uma abordagem alternativa consiste em inibir a cicatrização induzindo algum estado patológico específico. Isso foi feito no caso do diabetes, uma doença conhecida por deprimir significativamente a cicatrização de feridas em pacientes. A LLLT melhora significativamente a cicatrização de feridas tanto em ratos diabéticos [35, 36] quanto em camundongos diabéticos [37, 38]. A LLLT também foi eficaz na cicatrização de feridas prejudicada por radiação X em camundongos [39]. Um estudo [47] em camundongos sem pelos encontrou melhora na resistência à tração de feridas irradiadas com laser HeNe em 1 e 2 semanas. Além disso, o conteúdo total de colágeno aumentou significativamente em 2 meses, quando comparado com as feridas do grupo controle. O efeito benéfico da LLLT na cicatrização de feridas pode ser explicado considerando-se diversos mecanismos biológicos básicos, incluindo a indução da expressão de citocinas e fatores de crescimento conhecidos por serem responsáveis pelas várias fases da cicatrização. Primeiramente, há um relato [48] de que o laser HeNe aumentou os níveis de proteína e mRNA de IL-1 γ e IL-8 em queratinócitos. Essas são citocinas responsáveis pela fase inflamatória inicial da cicatrização. Em segundo lugar, há relatos [49] de que a LLLT pode regular positivamente citocinas responsáveis pela proliferação e migração de fibroblastos, como bFGF, HGF e SCF. Em terceiro lugar, foi relatado [50] que a LLLT pode aumentar fatores de crescimento como o VEGF, responsável pela neovascularização necessária para a cicatrização. Em quarto lugar, o TGF- β é um fator de crescimento responsável por induzir a síntese de colágeno a partir de fibroblastos e foi relatado que sua expressão é regulada positivamente pela LLLT [51]. Em quinto lugar, existem relatos [52, 53] de que a LLLT pode induzir os fibroblastos a sofrerem a transformação em miofibroblastos, um tipo de célula que expressa γ -actina de músculo liso e desmina e tem o fenótipo de células contráteis que aceleram a contração da ferida.

4.2 Estudos sobre toxicidade

neuronal do grupo de Whelan exploraram o uso de LEDs de 670 nm no combate aos danos neuronais causados por neurotoxinas. A intoxicação por metanol é causada pela conversão metabólica em ácido fórmico, que produz lesões na retina e no nervo óptico, resultando em cegueira. Utilizando um modelo em ratos e o eletrorretinograma como indicador sensível de

Em relação à função retiniana, demonstraram que três breves tratamentos com LED de 670 nm (4 J/cm^2), administrados 5, 25 e 50 horas após a intoxicação por metanol, atenuaram os efeitos retinotóxicos do formato derivado do metanol. Houve uma recuperação significativa da função mediada por bastonetes e cones em ratos intoxicados por metanol tratados com LED, além de evidências histopatológicas de proteção retiniana [54]. Um estudo subsequente [55] explorou os efeitos de um inibidor irreversível da citocromo c oxidase, o cianeto de potássio, em neurônios cultivados primários. O tratamento com LED restaurou parcialmente a atividade enzimática bloqueada por 10-100 μM de KCN. Reduziu significativamente a morte celular neuronal induzida por 300 μM de KCN de 83,6% para 43,5%.

A terapia com LED restaurou significativamente o conteúdo de ATP neuronal apenas na concentração de 10 μM de KCN, mas não nas concentrações mais elevadas testadas. Em contraste, a terapia com LED foi capaz de reverter completamente o efeito deletério da tetrodotoxina, que apenas reduziu indiretamente os níveis da enzima. Dentre os comprimentos de onda testados (670, 728, 770, 830 e 880 nm), os mais eficazes (830 nm e 670 nm) apresentaram espectro de absorção no infravermelho próximo (NIR) da citocromo c oxidase oxidada.

4.3 Regeneração nervosa

Modelos animais têm sido empregados para estudar os efeitos da LLLT no reparo nervoso [56, 57]. Byrnes et al usaram 1.600 J/cm^2 de laser de diodo de 810 nm para melhorar a cicatrização e a funcionalidade em uma hemisseção dorsal T9 da medula espinhal em ratos [39]. Anders et al [58] estudaram a LLLT para regenerar nervos faciais esmagados de ratos; comparando 361, 457, 514, 633, 720 e 1064 nm e encontraram a melhor resposta com $162,4 \text{ J/cm}^2$ de laser HeNe de 633 nm.

5. ESTUDOS CLÍNICOS A terapia a laser

de baixa potência é utilizada por fisioterapeutas para tratar uma ampla variedade de dores musculoesqueléticas agudas e crônicas, por dentistas para tratar inflamações nos tecidos orais e cicatrizar diversas ulcerações, por dermatologistas para tratar edemas, úlceras de difícil cicatrização, queimaduras e dermatites, por ortopedistas para aliviar a dor e tratar inflamações crônicas e doenças autoimunes, e por outros especialistas, bem como por clínicos gerais. A terapia a laser também é amplamente utilizada na medicina veterinária (especialmente em centros de treinamento de cavalos de corrida) e em clínicas de medicina esportiva e reabilitação (para reduzir inchaço e hematoma, aliviar a dor, melhorar a mobilidade e tratar lesões agudas de tecidos moles). Os lasers e LEDs são aplicados diretamente nas respectivas áreas (por exemplo, feridas, locais de lesões) ou em vários pontos do corpo (pontos de acupuntura, pontos-gatilho musculares). No entanto, uma das limitações mais importantes para o avanço dessa área na prática médica convencional é a falta de ensaios clínicos adequadamente controlados e cegos. Os ensaios devem ser prospectivos, controlados por placebo e duplo-cegos, e incluir um número suficiente de participantes para permitir que se chegue a conclusões estatisticamente válidas.

As aplicações clínicas da terapia a laser de baixa potência são diversas. O campo é caracterizado por uma variedade de metodologias e usos de diversas fontes de luz (lasers, LEDs) com diferentes parâmetros (comprimento de onda, potência de saída, modos de operação contínuo ou pulsado, parâmetros de pulso). Nos últimos anos, comprimentos de onda mais longos (de 800 a 900 nm) e potências de saída mais altas (até 100 mW) têm sido preferidos em dispositivos terapêuticos, especialmente para permitir uma penetração mais profunda nos tecidos. Em 2002, a MicroLight Corp recebeu a aprovação 510K da FDA para o laser de diodo ML de 830 nm para o tratamento da síndrome do túnel do carpo. Vários ensaios controlados relataram melhora significativa na dor e alguma melhora em medidas objetivas de resultado [59-61]. Desde então, diversas fontes de luz foram aprovadas como equivalentes a uma lâmpada de aquecimento infravermelho para o tratamento de uma ampla gama de distúrbios musculoesqueléticos, sem estudos clínicos de suporte.

6. QUESTÕES NÃO RESOLVIDAS 6.1

Comprimento de onda. Este é provavelmente o parâmetro em que existe maior consenso na comunidade de LLLT.

Comprimentos de onda na faixa de 600 a 700 nm são escolhidos para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto comprimentos de onda entre 780 e 950 nm são escolhidos para tecidos mais profundos devido às maiores distâncias de penetração óptica através do tecido.

Comprimentos de onda entre 700 e 770 nm não são considerados muito ativos.

6.2 Laser versus luz não coerente. Uma das questões mais atuais e amplamente discutidas na comunidade clínica de LLLT (Terapia a Laser de Baixa Intensidade) é se a coerência e a natureza monocromática da radiação laser oferecem benefícios adicionais em comparação com a luz de banda mais ampla proveniente de uma fonte de luz convencional ou LED com o mesmo comprimento de onda central e intensidade. Dois aspectos desse problema devem ser distinguidos: a coerência da própria luz e a coerência da interação da luz com a matéria (biomoléculas, tecidos).

6.3 Dose. Devido à possível existência de uma curva de resposta à dose bifásica, mencionada anteriormente, escolher a dosagem correta de luz (em termos de densidade de energia) para qualquer condição médica específica é difícil. Além disso, houve alguma confusão na literatura sobre a fluência fornecida quando o ponto de luz é pequeno. Se 5 J de luz forem

Ao incidir sobre uma área de 5 mm², a fluência é de 100 J/cm², que é nominalmente a mesma fluência que 100 J/cm² incidindo sobre uma área de 10 cm², mas a energia total fornecida neste último caso é 200 vezes maior.

6.3 Pulsado ou CW. Há alguns relatos de que a estrutura do pulso é um fator importante na LLLT; por exemplo, Ueda et al [62, 63] encontraram melhores efeitos usando pulsos de 1 ou 2 Hz do que laser de 8 Hz ou CW de 830 nm em células ósseas de ratos, mas o mecanismo subjacente para esse efeito não está claro.

6.4 Estado da polarização. Há algumas afirmações de que a luz polarizada tem melhores efeitos em aplicações de LLLT do que a luz não polarizada idêntica (ou mesmo a luz polarizada rotacionada em 90 graus) [64]. No entanto, sabe-se que a luz polarizada é rapidamente desordenada em meios altamente dispersivos, como o tecido (provavelmente nas primeiras centenas de µm), e, portanto, parece altamente improvável que a polarização possa desempenhar um papel, exceto em aplicações superficiais nas camadas superiores da pele.

6.5. Efeitos sistêmicos. Embora a LLLT seja aplicada principalmente a doenças localizadas e seu efeito seja frequentemente considerado restrito à área irradiada, existem relatos de efeitos sistêmicos da LLLT atuando em um local distante da iluminação [65, 66].

AGRADECIMENTOS O Sr. Hamblin

recebeu apoio dos Institutos Nacionais de Saúde dos EUA (R01CA/AI838801 e R01 AI050875). T. N. Demidova recebeu apoio de uma bolsa de estudos para estudantes de pós-graduação do Wellman Center. Agradecemos a R. Rox Anderson pelo apoio.

REFERÊNCIAS E.

- [1] Mester, B. Szende e P. Gartner, O efeito dos feixes de laser no crescimento do cabelo em camundongos, *Radiobiol Radiother (Berl)* 9 (1968) 621-6.
- [2] R. Roelandts, A história da fototerapia: algo novo sob o sol?, *J Am Acad Dermatol* 46 (2002) 926-30.
- [3] AN Pereira, P. Eduardo Cde, E. Matson e MM Marques, Efeito da irradiação de laser de baixa potência no crescimento celular e na síntese de pró-colágeno de fibroblastos cultivados, *Lasers Surg Med* 31 (2002) 263-7.
- [4] JS Kana, G. Hutschenreiter, D. Haina e W. Waidelich, Efeito da radiação laser de baixa densidade de potência na cicatrização de feridas abertas na pele de ratos, *Arch Surg* 116 (1981) 293-6.
- [5] JC Sutherland, Efeitos biológicos da luz policromática, *Photochem Photobiol* 76 (2002) 164-70.
- [6] T. Karu, Bioestimulação a laser: um fenômeno fotobiológico, *J Photochem Photobiol B* 3 (1989) 638-40.
- [7] TI Karu e NI Afanas'eva, Citocromo c oxidase como o principal fotoaceitador após exposição a laser de células cultivadas à luz visível e próxima ao infravermelho, *Dokl Akad Nauk* 342 (1995) 693-5.
- [8] RA Capaldi, F. Malatesta e VM Darley-USmar, Estrutura da citocromo c oxidase, *Biochim Biophys Acta* 726 (1983) 135-48.
- [9] I. Szundi, GL Liao e O. Einarsdottir, Estudos de absorção óptica resolvida no tempo no infravermelho próximo da reação da citocromo c oxidase totalmente reduzida com dioxigênio, *Bioquímica* 40 (2001) 2332-9.
- [10] TI Karu e SF Kolyakov, Espectros de ação exatos para respostas celulares relevantes para fototerapia, *Photomed Laser Surg* 23 (2005) 355-61.
- [11] D. Pastore, M. Greco e S. Passarella, Sensibilidade específica do laser de hélio-néon da citocromo c oxidase purificada, *Int J Radiat Biol* 76 (2000) 863-70.
- [12] VG Artyukhov, OV Basharina, AA Pantak e LS Sveklo, Efeito do laser de hélio-néon na atividade e propriedades ópticas da catalase, *Bull Exp Biol Med* 129 (2000) 537-40.
- [13] W. Yu, JO Naim, M. McGowan, K. Ippolito e RJ Lanzafame, Fotomodulação do metabolismo oxidativo e enzimas da cadeia de elétrons em mitocôndrias de fígado de rato, *Photochem Photobiol* 66 (1997) 866-71.
- [14] S. Passarella, Irradiação de laser He-Ne de mitocôndrias isoladas, *J Photochem Photobiol B* 3 (1989) 642-3.
- [15] H. Friedmann, R. Lubart, I. Laulich e S. Rochkind, Uma possível explicação da estimulação e dano induzidos por laser em culturas de células, *J Photochem Photobiol B* 11 (1991) 87-91.
- [16] M. Eichler, R. Lavi, A. Shainberg e R. Lubart, Flavinas são fonte de formação de radicais livres induzida por luz visível em células, *Lasers Surg Med* 37 (2005) 314-9.
- [17] K. Plaetzer, T. Kiesslich, B. Krammer e P. Hammerl, Caracterização dos modos de morte celular e das alterações associadas no fornecimento de energia celular em resposta à PDT com AIPcS4, *Photochem Photobiol Sci* 1 (2002) 172-7.

- [18] R. Lubart, M. Eichler, R. Lavi, H. Friedman e A. Shainberg, Irradiação a laser de baixa energia promove atividade redox celular, *Photomed Laser Surg* 23 (2005) 3-9.
- [19] R. Duan, TC Liu, Y. Li, H. Guo e LB Yao, Vias de transdução de sinal envolvidas na explosão respiratória induzida por laser He-Ne de baixa intensidade em neutrófilos bovinos: um mecanismo potencial de bioestimulação por laser de baixa intensidade, *Lasers Surg Med* 29 (2001) 174-8.
- [20] F. Antunes, A. Boveris e E. Cadenas, Sobre o mecanismo e a biologia da inibição da citocromo oxidase pelo óxido nítrico, *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 16774-9.
- [21] TI Karu, LV Pyatibrat e NI Afanasyeva, Efeitos celulares da terapia a laser de baixa potência podem ser mediados pelo óxido nítrico, *Lasers Surg Med* 36 (2005) 307-14.
- [22] Y. Moriyama, EH Moriyama, K. Blackmore, MK Akens e L. Lilge, Estudo in vivo dos efeitos moduladores inflamatórios da terapia a laser de baixa intensidade na expressão de iNOS usando imagens de bioluminescência, *Photochem Photobiol* 81 (2005) 1351-5.
- [23] FQ Schafer e GR Buettner, Ambiente redox da célula visto através do estado redox do par dissulfeto de glutationa/ glutationa, *Free Radic Biol Med* 30 (2001) 1191-212.
- [24] H. Liu, R. Colavitti, Rovira, II e T. Finkel, regulação transcricional dependente de Redox, *Circ Res* 97 (2005) 967-74.
- [25] M. Yang, NB Nazhat, X. Jiang, SM Kelsey, DR Blake, AC Newland e CJ Morris, A adriamicina estimula a proliferação de células leucêmicas linfoblásticas humanas por meio de um mecanismo de produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), *Br J Haematol* 95 (1996) 339-44.
- [26] WG Kirilin, J. Cai, SA Thompson, D. Diaz, TJ Kavanagh e DP Jones, Potencial redox da glutationa em resposta à diferenciação e indutores enzimáticos, *Free Radic Biol Med* 27 (1999) 1208-18.
- [27] S. Alaluf, H. Muir-Howie, HL Hu, A. Evans e MR Green, O oxigênio atmosférico acelera a indução de um fenótipo pós-mitótico em fibroblastos dérmicos humanos: o papel protetor chave da glutationa, *Differentiation* 66 (2000) 147-55.
- [28] T. Karu, Mecanismos primários e secundários de ação da radiação visível ao infravermelho próximo nas células, *J Photochem Photobiol B* 49 (1999) 1-17.
- [29] O. Tiphlova e T. Karu, Ação da radiação laser de baixa intensidade em *Escherichia coli*, *Crit Rev Biomed Eng* 18 (1991) 387-412.
- [30] TI Karu, LV Pyatibrat, GS Kalendo e RO Esenaliev, Efeitos da luz monocromática de baixa intensidade e da irradiação a laser na adesão de células HeLa in vitro, *Lasers Surg Med* 18 (1996) 171-7.
- [31] P. Moore, TD Ridgway, RG Higbee, EW Howard e MD Lucroy, Efeito do comprimento de onda na proliferação celular estimulada por irradiação a laser de baixa intensidade in vitro, *Lasers Surg Med* 36 (2005) 8-12.
- [32] D. Hawkins e H. Abrahamse, Efeitos biológicos da irradiação do laser de hélio-néon em fibroblastos da pele humana normal e lesionada, *Photomed Laser Surg* 23 (2005) 251-9.
- [33] HS Yu, CS Wu, CL Yu, YH Kao e MH Chiou, A irradiação com laser de hélio-néon estimula a migração e proliferação de melanócitos e induz a repigmentação no vitiligo do tipo segmentar, *J Invest Dermatol* 120 (2003) 56-64.
- [34] S. Young, P. Bolton, M. Dyson, W. Harvey e C. Diamantopoulos, Resposta dos macrófagos à terapia com luz, *Lasers Surg Med* 9 (1989) 497-505.
- [35] Y. Fujimaki, T. Shimoyama, Q. Liu, T. Umeda, S. Nakaji e K. Sugawara, A irradiação laser de baixo nível atenua a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos humanos, *J Clin Laser Med Surg* 21 (2003) 165-70.
- [36] YS Chen, SF Hsu, CW Chiu, JG Lin, CT Chen e CH Yao, Efeito do laser pulsado de baixa potência na regeneração do nervo periférico em ratos, *Microsurgery* 25 (2005) 83-9.
- [37] M. Miloro, LE Halkias, S. Mallery, S. Travers e RG Rashid, Efeito do laser de baixa intensidade na regeneração neural em tubos de Gore-Tex, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93 (2002) 27-34.
- [38] P. Balaban, R. Esenaliev, T. Karu, E. Kutomkina, V. Letokhov, A. Oraevsky e N. Ovcharenko, Irradiação com laser He-Ne de neurônios únicos identificados, *Lasers Surg Med* 12 (1992) 329-37.
- [39] KR Byrnes, RW Waynant, IK Ilev, X. Wu, L. Barna, K. Smith, R. Heckert, H. Gerst e JJ Anders, A luz promove a regeneração e a recuperação funcional e altera a resposta imune após lesão medular, *Lasers Surg Med* 36 (2005) 171-85.

- [40] SO el Sayed e M. Dyson, Efeito da taxa de repetição do pulso de laser e da duração do pulso no número de mastócitos e na degranulação, *Lasers Surg Med* 19 (1996) 433-7.
- [41] RA Lopes-Martins, R. Albertini, PS Martins, JM Bjordal e HC Faria Neto, Efeitos espontâneos da terapia a laser de baixa intensidade (650 nm) na pleurisia inflamatória aguda induzida por carragenina em camundongos, *Photomed Laser Surg* 23 (2005) 377-81.
- [42] AD Agaiby, LR Ghali, R. Wilson e M. Dyson, Modulação a laser da produção de fator angiogênico por linfócitos T, *Lasers Surg Med* 26 (2000) 357-63.
- [43] S. Passarella, E. Casamassima, S. Molinari, D. Pastore, E. Quagliariello, IM Catalano e A. Cingolani, Aumento do potencial eletroquímico de prótons e síntese de ATP em mitocôndrias de fígado de rato irradiadas in vitro por laser de hélio-neônio, *FEBS Lett* 175 (1984) 95-9.
- [44] M. Greco, G. Guida, E. Perlino, E. Marra e E. Quagliariello, Aumento na síntese de RNA e proteína por mitocôndrias irradiadas com laser de hélio-neônio, *Biochem Biophys Res Commun* 163 (1989) 1428-34.
- [45] D. Pastore, M. Greco, VA Petragallo e S. Passarella, Aumento na razão $\frac{H^+}{e^-}$ da reação da citocromo c oxidase em mitocôndrias irradiadas com laser de hélio-neônio, *Biochem Mol Biol Int* 34 (1994) 817-26.
- [46] Y. Zhang, S. Song, CC Fong, CH Tsang, Z. Yang e M. Yang, Análise de microarray de cDNA de perfis de expressão gênica em células de fibroblastos humanos irradiadas com luz vermelha, *J Invest Dermatol* 120 (2003) 849-57.
- [47] RF Lyons, RP Abergel, RA White, RM Dwyer, JC Castel e J. Uitto, Bioestimulação da cicatrização de feridas in vivo por um laser de hélio-néon, *Ann Plast Surg* 18 (1987) 47-50.
- [48] HS Yu, KL Chang, CL Yu, JW Chen e GS Chen, A irradiação com laser de hélio-néon de baixa energia estimula a liberação de interleucina-1 alfa e interleucina-8 de queratinócitos humanos cultivados, *J Invest Dermatol* 107 (1996) 593-6.
- [49] VK Poon, L. Huang e A. Burd, Bioestimulação de fibroblastos dérmicos por laser Nd:YAG Q-switched subletal de 532 nm: remodelação de colágeno e pigmentação, *J Photochem Photobiol B* 81 (2005) 1-8.
- [50] N. Kipshidze, V. Nikolajchik, MH Keelan, LR Shankar, A. Khanna, R. Kornowski, M. Leon e J. Moses, Irradiação de laser de hélio: néon de baixa potência aumenta a produção do fator de crescimento endotelial vascular e promove o crescimento de células endoteliais in vitro, *Lasers Surg Med* 28 (2001) 355-64.
- [51] A. Khanna, LR Shankar, MH Keelan, R. Kornowski, M. Leon, J. Moses e N. Kipshidze, Aumento da expressão de genes pró-angiogênicos em cardiomiócitos com irradiação a laser de baixa dose in vitro, *Cardiovasc Radiat Med* 1 (1999) 265-9.
- [52] AR Medrado, LS Pugliese, SR Reis e ZA Andrade, Influência da terapia a laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas e sua ação biológica sobre miofibroblastos, *Lasers Surg Med* 32 (2003) 239-44.
- [53] EJ Neiburger, Cicatrização rápida de incisões gengivais pelo laser de diodo hélio-néon, *J Mass Dent Soc* 48 (1999) 8-13, 40.
- [54] JT Eells, MM Henry, P. Summerfelt, MT Wong-Riley, EV Buchmann, M. Kane, NT Whelan e HT Whelan, Fotobiomodulação terapêutica para toxicidade retiniana induzida por metanol, *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 3439-44.
- [55] MT Wong-Riley, HL Liang, JT Eells, B. Chance, MM Henry, E. Buchmann, M. Kane e HT Whelan, Fotobiomodulação beneficia diretamente neurônios primários funcionalmente inativados por toxinas: papel da citocromo c oxidase, *J Biol Chem* 280 (2005) 4761-71.
- [56] D. Gigo-Benato, S. Geuna e S. Rochkind, Fototerapia para melhorar o reparo do nervo periférico: uma revisão da literatura, *Muscle Nerve* 31 (2005) 694-701.
- [57] JJ Anders, S. Geuna e S. Rochkind, A fototerapia promove a regeneração e a recuperação funcional do nervo periférico lesionado, *Neurol Res* 26 (2004) 233-9.
- [58] JJ Anders, RC Borke, SK Woolery e WP Van de Merwe, A irradiação a laser de baixa potência altera a taxa de regeneração do nervo facial do rato, *Lasers Surg Med* 13 (1993) 72-82.
- [59] K. Branco e MA Naeser, Síndrome do túnel do carpo: resultado clínico após acupuntura a laser de baixa intensidade, estimulação elétrica nervosa transcutânea de microampères e outras terapias alternativas - um estudo de protocolo aberto, *J Altern Complement Med* 5 (1999) 5-26.
- [60] J. Irvine, SL Chong, N. Amirjani e KM Chan, Ensaio controlado randomizado duplo-cego de terapia a laser de baixa intensidade na síndrome do túnel do carpo, *Muscle Nerve* 30 (2004) 182-7.
- [61] MI Weintraub, Neurolise a laser não invasiva na síndrome do túnel do carpo, *Muscle Nerve* 20 (1997) 1029-31.

- [62] Y. Ueda e N. Shimizu, Irradiação pulsada de laser de baixa potência estimula a formação de nódulos ósseos, *J Oral Sci* 43 (2001) 55-60.
- [63] Y. Ueda e N. Shimizu, Efeitos da frequência de pulso da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) na formação de nódulos ósseos em células calvariais de ratos, *J Clin Laser Med Surg* 21 (2003) 271-7.
- [64] MS Ribeiro, F. Da Silva Dde, CE De Araujo, SF De Oliveira, CM Pelegrini, TM Zorn e DM Zezell, Efeitos da radiação laser visível polarizada de baixa intensidade em queimaduras de pele: um estudo de microscopia de luz, *J Clin Laser Med Surg* 22 (2004) 59-66.
- [65] T. Moshkovska e J. Mayberry, É hora de testar a terapia a laser de baixa intensidade na Grã-Bretanha, *Postgrad Med J* 81 (2005) 436-41.
- [66] LA Santana-Blank, E. Rodriguez-Santana e KE Santana-Rodriguez, Biomodulação pulsada foto-infravermelha (PIPBM): um novo mecanismo para o aprimoramento de respostas reparadoras fisiológicas, *Photomed Laser Surg* 23 (2005) 416-24.