

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**

GILMAR POLI DE ARRUDA

**EFEITO BIOESTIMULANTE DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE MOLUSCO *BIOMPHALARIA*
*GLABRATA***

RECIFE – 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**

GILMAR POLI DE ARRUDA

**EFEITO BIOESTIMULANTE DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE MOLUSCO *BIOMPHALARIA*
*GLABRATA***

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso de Mestrado em Biofísica, do Departamento de Biofísica e Radiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADOR: FRANCISCO FERNANDES AMÂNCIO

RECIFE – 2003

Arruda, Gilmar Poli de.

A773e Efeito bioestimulante do laser de baixa intensidade em
células embrionárias de molusco *Biomphalaria glabrata*/
Gilmar Poli de Arruda. – Recife, 2003

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2003

“Orientação: Prof. Francisco Fernandes Amâncio,
Departamento de Biofísica e Radiologia”

1. Biofísica I. Título

CDD 574.876041

**EFEITO BIOESTIMULANTE DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE EM
CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DE MOLUSCO *BIOMPHALARIA*
*GLABRATA***

GILMAR POLI DE ARRUDA

APROVADA EM 18/12/2003

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Fernandes Amâncio - (Orientador)

Prof. Dr. Mauricy Alves da Motta

prof^a. Dra. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Mello

Prof^a. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai Geraldo "in memoriam", exemplo de hombridade, receba a profunda admiração do filho que o amou em vida e que agora o venera em pensamento.

À minha mãe Maria, que juntamente com meu pai conduziu-me pelos caminhos da decência e da dignidade.

Aos meus filhos, Camila e Pedro, por quem me agarro e mantenho os meus sonhos.

À minha esposa Maria, que me completa, viabiliza e sonha os meus sonhos comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo e companheiro prof. Carlos Rolim Martiniano "in memoriam" o grande artífice desta etapa da minha vida: o mestrado.

Ao fraterno amigo prof. Walter João Genovese a quem devo o despertar da minha curiosidade científica para os estudos do Laser.

À prof.^a Teresa Jasen, sempre com uma palavra animadora a encorajar-me.

À prof.^a Ana Maria Mendonça pela inestimável orientação e pelo companheirismo.

Ao prof. Amâncio meu orientador, que embora o tenha conhecido a tão pouco tempo, saiba professor que já o tenho na pleiade dos melhores amigos da minha vivência, obrigado por tudo.

Ao acad. Diego de Oliveira Gomes que laboriosamente participou das pesquisas que produziram os resultados que se seguem.

A todos os professores e funcionários que participaram direta ou indiretamente desta empreitada.

RESUMO

O laser de baixa intensidade encontra larga aplicabilidade clínica em medicina. Os efeitos terapêuticos esperados e referidos na literatura especializada abrangem eliminação de processos dolorosos, estimulação de crescimento celular dentre outros. Muitos e novos tipos de equipamentos são disponibilizados no comércio com diferentes potências e densidades energéticas. Neste trabalho nos propusemos a avaliar o efeito do L B I sobre embriões de moluscos *Biomphalaria glabrata* considerando as variáveis físicas de intensidade e densidade energética. O uso do Laser de arseniato de alumínio e gálio com comprimento de onda de 684nm nas potenciais 15, 30 e 50 mW e densidades energéticas de 3 e 6 Joules, permitiu observar experimentalmente resultados sugestivos da existência de forte correlação entre potência densidade energética e bioestimulação.

ABSTRAT

The laser of low intensity (L.B.I.) finds wide clinical applicability in medicine. The therapeutical effects and forenamed in specialized literature includes elimination of painful processes, stimulation of cellular growth among other effects. Many and new types of equipments are commercially available with different powers and energy densities. In this work we intended to evaluate the effect of L.B.I. on embryos of clams *Biomphalaria glabrata*, being considered the physical variable of intensity and energy density. The use of arsenate Laser of aluminum and gallium with wave length of 684nm and powerot 15, 30 and 50 mW, and energy densities of 3 and 6 joules, allowed to observe experimentally suggestive results of the existence of strong correlation between power, energy density and biostimulation.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA	X
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Mecanismo de Ação do Laser de Baixa Intensidade (L.B.I).....	14
1.2 Efeitos Biológicos com L.B.I.....	17
1.3 Efeitos Biológicos do L.B.I. Relatos de Pesquisas	18
1.3.1 Na Odontologia	18
1.3.2 Na Inflamação e Dor	21
1.3.3 Na Vascularização	22
1.3.4 Na Reparação Tissular	23
1.3.5 Na Dermatologia	24
1.3.6 Na Biologia Geral.....	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos.....	27
3 METODOLOGIA	28
3.1 Criação dos Moluscos.....	28
3.2 Coleta das Desovas	29
3.3 Condições de Irradiação	30
3.4 Análise da Radiosensibilidade de Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> ao L.B.I.....	32
4 RESULTADOS	34

5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES:.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURA

L.B.I. = Laser de baixa intensidade

Nd: YAG = Neodime – yttrium – alumínio – alumínio garnet

A.T.P. = Adenosina trifosfato

DNA = Ácido desoxi-ribonucléico

RNA = Ácido ribo-Nucléico

D.E = Densidade energética

PGE₂ = Prostaglandina E₂

HeNe = Hélio Néon

AsGa =Arseniato de Gálio

COX₁ = Ciclo Oxigenase 1

COX₂ = Ciclo Oxigenase 2

PGG₂ = Prostaglandina G₂

PGH₂ = Prostaglandina H₂

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Condição dos embriões segundo o número de dias analisados	34
TABELA 2 - Condição dos embriões segundo o estágio embrionário após 6 e 8 dias de avaliação.....	36
TABELA 3 – Condição dos embriões segundo a densidade do aparelho após 6 e 8 dias de avaliação.....	37
TABELA 4 – Condição dos embriões segundo a potência de exposição ao L.B.I. para 6 e 8 dias de avaliação	39
TABELA 5 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário e a densidade energética utilizada.....	40
TABELA 6 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário e a densidade utilizada.....	43
TABELA 7 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário e a exposição utilizada.....	44
TABELA 8 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário e a exposição utilizada.....	45
TABELA 9 – Condição dos embriões com 6 dias segundo a densidade (J/cm ²) e a potência da exposição (mW) utilizada.	46
TABELA 10 – Condição dos embriões com 8 dias segundo a densidade (J/cm ²) e a exposição (mW) utilizada.....	48
TABELA 11 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário, a densidade e a exposição utilizada.....	49
TABELA 12 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário, a densidade e a exposição utilizada.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cubas criatórias dos moluscos <i>B. glabrata</i>	28
Figura 2 - Molusco <i>Biomphalaria glabrata</i>	29
Figura 3 - Estádios embrionários em clivagem segundo Kawano, 1992.....	29
Figura 4 - Estádios embrionários de blástula (21 e 22,23), gástrula (24A e 24B) e trocófora jovem (25) segundo Kawano, 1992.	30
Figura 5 - Laser de baixa intensidade (LBI)	31
Figura 6 – Microscópio estereoscópico	31
Figura 7 - Embriões de <i>B. glabrata</i> mortos	32
Figura 8 - Embriões malformados	33
Figura 9 - Estádio embrionário do <i>B. glabrata</i> durante 8 dias de observação.....	35

1 INTRODUÇÃO

As teorias envolvendo Laser datam do início do século XX e foram desenvolvidas por Planck e Einstein. Neste período discutiam-se os conceitos de Maxwell considerando a radiação eletromagnética como onda. Max Plank propôs a teoria quântica dando a idéia que a radiação pode ser considerada como discreta “quanta” de energia. Baseando-se nos conceitos de Plank, Einstein publicou um trabalho intitulado: “Zur Quantas Theorider Stralung” onde estão contidas as principais chaves para o entendimento dos princípios da emissão estimulada de fótons (BAXTER et al, 1997).

No início dos anos 50 começou a materializar-se o sonho do uso de aparelhos que pudessem produzir estas radiações. Tal fato se deu inicialmente com um grupo da Universidade de Columbia liderado por Charles Townes, que, trabalhando com microondas, desenvolveu um aparelho de microondas amplificadas por emissão estimulada de radiação (MASER). Mas, somente no início dos anos 60 é que Teodor Maimam, trabalhando no Hughes Laboratories, em Malibu, publicou os primeiros relatos da produção de radiação por um cristal de rubi, de forma pulsátil de radiação visível com aparência de vermelho e de comprimento de onda fixa de 694 mm. A partir de então, as tecnologias envolvendo as descobertas de novos materiais emissores Laser, cresceram rapidamente assim como o seu uso na medicina, a exemplo dos estudos da Bell Telephone Laboratories, que associaram os gases Hélio e Néon, produzindo um aparelho emissor de Laser (He-Ne), o desenvolvimento do Laser de Co_2 e também aqueles produzidos a partir da associação de Neodymium-Ytrium – Aluminium Garnet (Nd: YAG), (BAXTER et al, 1997).

O interesse pelos aparelhos de Laser era centrado somente para atividades cirúrgicas e para ensaios experimentais, até que, em 1967 Endre Mester publicou os primeiros trabalhos científicos sobre os efeitos não térmicos do Laser, abrindo, com isto, o caminho para uma das formas mais usadas do Laser em medicina: estimulação do tecido vivo através da ação da energia do Laser. Trabalhos como os de Friedrich Plog no Canadá, utilizando o Laser na analgesia; os de Burgdejeva et al (1995) nos processos de cicatrização de feridas e os de Dotsenko et al (1985), em cicatrização de úlceras estomacais, foram fundamentais para o desenvolvimento da teoria da bioestimulação (TUNER & HODE, 1999).

1.1 Mecanismo de Ação do Laser de Baixa Intensidade (L.B.I.)

A célula eucariótica é composta por um grande conjunto de estruturas subcelulares, cada qual responsável por funções específicas, porém funcionalmente interligados. Destas subestruturas uma nos interessa diretamente: a mitocôndria.

Segundo Alberts et al (1997), a mitocôndria é uma organela presente em quase todas as células eucarióticas e tem a finalidade de converter as mais variadas formas de energia em formas utilizáveis para o “bom comportamento” celular. Ocupa uma porção substancial do volume citoplasmático, é altamente plástica, podendo inclusive fundir-se entre si, seu número varia de acordo com a necessidade energética de cada grupamento celular. Ainda de acordo com o referido autor, sua morfologia é composta da seguinte maneira:

- ▶ □ Membrana externa: altamente constituída por uma proteína transmembranosa chamada de porina, que permite a passagem de moléculas até 5.000 daltons.
- ▶ □ Membrana interna; dobrada em cristas aumentando enormemente sua área total. Contém proteínas com três tipos de funções; (1) conduzir as reações oxidativas da cadeia respiratória, (2) produzir ATP através de um complexo enzimático, (3) direcionar os catabólitos através de proteínas transportadas.
- ▶ □ Matriz: contém uma mistura altamente concentrada de centenas de enzimas necessárias ao processo oxidativo, a matriz contém também várias cópias idênticas do DNA genômico mitocondrial, ribossomos mitocondriais especiais, RNAs e várias enzimas requeridas para a expressão dos genes mitocondriais.
- ▶ □ Espaço intermembrana: contém várias enzimas que utilizam o ATP proveniente da matriz para fosforilar outros nucleotídeos.

A principal função mitocondrial é retirar através de reações enzimáticas específicas a energia eletroquímica existente nas ligações atômicas das moléculas de glicogênio e ácidos gordurosos, utilizá-la para produzir H₂O e CO₂, armazenar o excedente na forma de ATP e gerar calor. O caminho desta transferência energética se faz principalmente às custas de uma cascata formada por elementos chamados de citocromos e na forma de elétrons altamente energizados, que vão transferindo esta energia à medida que a cascata avança.

Revisando a literatura, percebe-se que os relatos são quase na totalidade sobre os efeitos biológicos e não sobre os mecanismos de ação do L.B.I. O modelo mais apropriado é encontrado nos relatos de Karu (1984) *apud* Baxter (1997), em que a pesquisadora sugere que a irradiação a laser induz trocas na homeostase celular que envolve uma cascata de reações e propõe que um número de componentes na cadeia respiratória (citocromos, citocromo-oxidase e flavina-desidrogenase) são os fotoreceptores primários cromóforos e são capazes de absorver a luz do comprimento de onda apropriado. Isto causa a ativação da cadeia respiratória, a ativação das cadeias de elétrons e resulta no aumento da síntese de ATP. Com o aumento de atividade na membrana interna da mitocôndria, ocorre um aumento do nível de hidrogênio na célula e, com o aumento do ATP, aumenta também as atividades de todas as membranas; este parâmetro é necessário para o controle da atividade proliferativa da célula. As trocas de concentração de íons afetam o metabolismo celular desenvolvendo os níveis de nucleotídeos cíclicos e estes componentes estariam envolvidos na iniciação da síntese do DNA. A pesquisadora acredita que a ação da luz visível sobre a célula pode ser mediada pela regulação do próprio metabolismo celular. Ela conclui que mais dados experimentais precisam ser explorados para explicar como um estímulo luminoso possa ser convertido em sinais elétricos e depois químicos, e como eles podem ser entendidos pela célula, podendo ser detectado e transmitido para componentes subcelulares.

1.2 Efeitos Biológicos com L.B.I.

De acordo com Baxter et al (1997), numerosos estudos para esclarecerem os efeitos biológicos da ação do L.B.I. tem sido propostos, porém, quase todos podem ser interpretados “a luz da teoria” proposta por Karu, ainda que existam muitas dificuldades quando comparamos os resultados destes estudos, como explicar o sucesso ou a falência. Isto reforça o ceticismo nesta área, razão pela qual mais estudos precisam ser desenvolvidos para esclarecerem pontos hoje sem respostas. Uma das mais notáveis aplicações do L.B.I. é aquela que objetiva a bioestimulação, principalmente para restauração de feridas, a participação de fibroblastos, linfócitos, monócitos, macrófagos, bem como de células epiteliais e endoteliais, que são alvos de estudo. Os fibroblastos, quando irradiados, promovem um aumento considerável na quantidade e qualidade de fibras colagenosas por ele produzidas. Sobre os linfócitos e os macrófagos aumentam a produção de fatores de crescimento.

As células acima descritas participam da fase de granulação da ferida e de outras células, por exemplo: endotelial, que irá responder aos fatores angiogênicos de crescimento e epitelial, que ao recompor tecido de proteção (pele ou mucosa), irá aparecer mais tardiamente. O L.B.I., interagindo com todas isoladamente, promove a aceleração de todo o conjunto (bioestimulação) (BAXTER et al,1997).

1.3 Efeitos Biológicos do L.B.I. Relatos de Pesquisas

1.3.1 Na Odontologia

Niccolli Filho (1991) verificou os efeitos bioestimulantes do L.B.I. de 632nm e potência de 0,75 mW com D.E. de 1 Joule. Seus resultados estão de acordo com os de Endré Mester, em que ambos verificaram nítida bioestimulação.

Silva (1992), analisando os efeitos biológicos do L.B.I. em 65 casos de pacientes envolvidos com hipersensibilidade dentinária, lesões periodontais e preparo cavitário obteve resultados favoráveis em 59 casos.

Silveira & Silveira (1992) apresentaram um interessante trabalho sobre o aumento da quantidade de fluido sulcular na gengiva de humanos e descreveram sua importância nos aspectos de defesa e nutrição.

Silveira (1993) relatou um interessante caso clínico de gengivite descamativa crônica, em que a patologia era resistente, inclusive, a tratamento quimioterápico. Passados dois anos, a paciente permaneceu assintomática.

Garcia et al (1996), aplicando L.B.I. em alvéolos dentários frescos de ratos, observaram que a reparação tecidual foi fortemente influenciada quando comparada ao controle, creditaram tal fato à presença de ligamentos periodontais e de células ricas em grânulos, fato este que favoreceria a absorção do Laser.

Pinheiro et al (1997) observaram o resultado terapêutico do L.B.I. em 165 pacientes portadores de patologias oro-faciais, usando dois comprimentos diferentes de onda. Segundo os seus achados, 120 pacientes tornaram-se assintomáticos, 25 melhoraram sensivelmente e 20 continuaram sintomáticos.

Ciconelli et al (1997) estudaram a aplicação do L.B.I. como agente produtor de analgesia em cirurgias para colocação de implantes dentários, concluíram que houve uma excelente resposta terapêutica e atribuíram-na a uma possível síntese de Beta – Endorfina.

Walsh (1977a) revistou na literatura patologias que acometem a boca e que respondem ao tratamento com L.B. I: (1) hipersensibilidade dentinária: após a aplicação do L.B.I., o autor acredita que ocorra forte inibição dos sinais nervosos ao nível dos nociceptores dentinários e bloqueio das fibras nervosas do tipo “C” aferentes da polpa dental, (2) dor Periodontal associada com a movimentação ortodôntica. O autor ao discutir a biomecânica do movimento descreveu que as células do ligamento periodontal, quando injuriadas, ativam a produção de prostaglandina E_2 e esta, por sua vez, é altamente algógena. Como o L.B.I. exerce inibição sobre a síntese de prostaglandina, estaria neste fato o efeito biológico do L.B.I. para esta situação. Descreveu, ainda, os efeitos do L.B.I. sobre a atividade bacteriana na boca, porém, relatou que o L.B.I. não consegue efeito direto sobre as bactérias, precisando do uso de corantes antes da aplicação do L.B.I. num tratamento semelhante aos aplicados na terapia fotodinâmica.

Pinheiro (1998) publicou os relatos de uma pesquisa do uso do L.B.I. em pacientes portadores de patologias buço-maxilar facial num total de 241 pacientes; após o tratamento, 224 pacientes tornaram-se assintomáticos, 50 apresentaram melhora acentuada e 37 pacientes permaneceram sintomáticos. O autor associou sintomas a possíveis transtornos emocionantes.

Ciconelli (1999) relatou um caso clínico de cirurgia para colocação de implante dentário, cujo local recebeu irradiação por 30 dias com aplicações em dias

alternados. Comparando os achados radiográficos ao redor do implante no 30º dia, sua densidade radiográfica era compatível com as achadas no 90º dia de implantes dentários que não foram irradiados. A autora concluiu que o L.B.I. acelera a osteointegração.

Genovese (2000) observou uma ampla quantidade de cirurgias para colocação de implantes dentários, em que foram aplicados L.B.I.. Entre outros parâmetros, uma que chamou sua atenção foi o comportamento reparacional dos tecidos moles, que ocorreu com uma qualidade superior aos não irradiados.

Miloro & Repasky (2000), tratando um grupo de seis pacientes com terapêutica cirúrgica ortognática, constataram que todos apresentaram seqüelas pós-operatórias, que iam desde dificuldade na abertura da boca até as parestesias. Instituíram, então o tratamento com L.B. I. e os resultados foram assim descritos: (1) A abertura da boca teve 100% de cura em dois meses; (2) Parestesias, 90% de Cura em dois meses. Discutindo os resultados, os autores propuseram as seguintes possibilidades: (1) que o L.B.I. teve penetração através dos tecidos até o axônio do neurônio e células de SCHWANN; (2) que na interação com o L.B.I. pode ocorrer ao nível de enzimas (rodopsina quinase) no axônio lesado; (3) que da interação com o L.B.I. são produzidas fatores de crescimento (neurotróficos) produzidos, principalmente, pelas células de SCHWANN e esta seria a chave para a regeneração neuronal.

1.3.2 Na Inflamação e Dor

Walker (1983) *apud* Cernavin et al (1994) pesquisou a atividade do L.B.I. de He – Ne em dor crônica num estudo duplo cego. Encontrou um aumento significativo de 5-hidroxiindolacético ácido (5-HIAA), produto de degradação da serotonina, descreveu o autor que a serotonina estaria diretamente envolvida com o mecanismo da dor e mais que massagens profundas e analgésicos não produziam 5-HIAA. Concluiu que a atividade analgésica instalada, após o uso do L.B.I., só pode ter sido produto da diminuição dos níveis de serotina.

Barberis et al (1996) aplicaram L.B.I. em portadores de artrite reumatóide em joelhos, encontrando sensível melhora clínica dos pacientes. Usaram como método de avaliação a análise da quantidade de PGE₂ obtida pela biópsia do material sinovial.

Campana et al (1998) estudaram o comportamento do processo inflamatório usando L.B.I. e diclofenaco de sódio. Como parâmetro de medição, usou-se o fibrinogênio plasmático. Entre as várias combinações, o experimento que produziu a mais forte inibição na formação do fibrinogênio plasmático foi quando se associou L.B.I. e diclofenaco de sódio. Partindo da observação de que o fibrinogênio plasmático está fortemente envolvido no processo inflamatório, conseqüentemente sua inibição sinaliza para a diminuição do processo inflamatório.

Walsh (1999), num extenso levantamento das atividades biológicas do L.B.I., destacou seus efeitos bioestimulantes tanto como acelerador da reparação tecidual como produtor de analgesia e antiinflamatório.

Tam (1999) estudou diversas patologias dolorosas com o uso do L.B.I. e sugeriu uma teoria para explicar seu efeito biológico analgésico: (1) normalização da velocidade de transmissão nervosa, que estaria prejudicada nas patologias dolorosas ligadas a inflamação; (2) sugeriu também uma alteração das PGG_2 e PGH_2 (que são altamente algógenas). Em PGI_2 (também chamada de prostaciclina ou epoprostenol) teria uma acentuada atividade sobre as células endoteliais e sobre as células musculares lisas dos vasos sanguíneos, produzindo a diminuição da inflamação e vasodilatação melhorando a nutrição geral principalmente de oxigênio.

Barattol et al (2000) trataram pacientes com osteoartrite na espinha cervical e escápula. A principal diferenciação entre o estado patológico e o não patológico era a alteração do tecido subcutâneo do músculo trapézio que os tornavam assimétrico quando comparados entre si. Instituíram a terapia com L.B.I. e observaram que houve a diminuição do volume muscular (patológico) retornando-os a simetria volumétrica.

Brasseau et al (2000), estudando pacientes com artrite reumatóide e osteoartrite, relataram que o L.B.I., nestes pacientes aumentou a síntese de proteoglicanos, colágeno, proteínas não colagenosas e DNA, melhorando a regulação das cartilagens.

1.3.3 Na Vascularização

Silveira & Lopes (1995) estudaram a atividade vasodilatadora do L.B.I. usando como parâmetro interpretativo à ocorrência da presença de mastócitos. Verificaram que os espécimes histológicos irradiados com L.B.I. possuem quase 4

vezes mais células mastocitárias. Como os mastócitos são ricos em histamina e esta por sua vez com grande atividade vascular (vasodilatadora), concluíram ser esta resposta para os seus estudos.

Agaiby et al (2000) estudaram os resultados da aplicação do L.B.I. na angiogênese. Para tanto, irradiaram culturas de linfócitos, pois partiram da premissa que linfócitos produzem fatores de crescimento que ao atuarem nas células endoteliais promovem o processo angiogênico. Concluíram que a angiogênese produzida por este método é dependente da dosimetria do L.B.I.. O processo é otimizado até determinada dose a partir da qual torna-se depressora do processo.

1.3.4 Na Reparação Tissular

Garcia et al (1995) estudaram comparativamente por meios biométricos o comportamento reparacional de feridas em ratos, submetidos à irradiação com L.B.I.. Como resultados as feridas irradiadas contraíram-se mais que as do controle, e atribuíram este fator ao Laser, que interagindo com os fibroblastos transformaram-se e miofibroblastos e estes, produziram fibras colagenosas com maior capacidade de contração.

Oliveira (1997) estudou a cronologia do processo de reparo tecidual em feridas cutâneas feitas em ratos através de análise comparativa (não irradiados e irradiados com L.B.I.). Concluindo que o melhor desempenho ocorreu no 6º dia no grupo irradiado, atribuindo este desempenho ao fato de que tecidos irradiados com L.B.I, aumentam sua síntese da ATP, sua angiogêneses e, finalmente, diminui os aspectos gerais da inflamação.

Segundo Walsh (1997b), o uso do L.B.I. não é novo e ele já vem sendo usado na Europa e no Japão há mais de 10 anos. Porém, mencionou ser o leste europeu seu maior usuário, especialmente a Rússia, onde a literatura já passa de trinta anos, mas que, infelizmente, não chegou ao mundo ocidental. Destacou os efeitos biológicos do L.B.I. para acelerar a cicatrização de feridas, acelerar a remodelação óssea e restaurar a função neural.

Parekh et al (1999) descreveram sua experiências em cicatrização de feridas cirúrgicas produzidas em ratos, em que usaram duas drogas diferentes que, quando aplicadas, dirigiam-se para as feridas e estas, ao serem irradiadas pelo Laser, produziam um efeito significativo na reparação tecidual.

Schindl et al (1999) descreveram um caso de úlcera no pé de um paciente diabético, em que a terapia convencional foi associada ao L.B.I.. Como resultado, em quatro semanas a úlcera cicatrizou totalmente. Os autores sugerem possíveis efeitos biológicos ligados ao aumento de ATPases e estímulo do influxo de cálcio celular, bem como a proliferação do tecido epitelial.

Stadler et al (2001), em seus experimentos, trabalharam com a resistência a tensões em feridas provocadas em ratos diabéticos (modificados geneticamente). O grupo irradiado apresentou melhor resistência à tração e os autores atribuíram isto a uma melhor e maior síntese do colágeno envolvido na reparação destas feridas.

1.3.5 Na Dermatologia

Mc Daniel et al (1996) trataram mulheres portadoras de estrias adquiridas por ocasião da gravidez com L.B.I.. Após observarem por métodos fotográficos,

concluíram que: (1) houve uma melhora acentuada na aparência das estrias, (2) que o aumento da elastina foi o principal responsável pela melhora da aparência.

1.3.6 Na Biologia Geral

Rochkin (1982) *apud* Cernavin et al (1994) descreve que, após uma única aplicação de He –Ne, nervos sadios aumentaram sua capacidade formadora de potencial de ação em cerca de 33%.

Garcia et al (1997) estudaram o efeito bactericida do L.B.I. em colônias de bactérias colhidas do trato respiratório de pacientes com necessidades especiais, irradiando-as com tempos diferentes. As colônias que sofreram atividade bactericida deram-se por alteração da membrana citoplasmática das bactérias.

Efeitos biológicos bem diferentes foram encontrados por Manteifel, Bakeeva & Karu (1997). Irradiando culturas de linfócitos com L.B.I. de He-Ne, observaram o decréscimo do número total de mitocôndrias (o normal varia de 40 a 45 mitocôndrias), porém, houve o aparecimento de duas a quatro mitocôndrias gigantes. A capacidade de fusão mitocondrial é observada por Alberts et al (1997).

Schindl & Newmam (1999) pesquisaram os efeitos biológicos do L.B.I. em herpes simplex recorrente. Para tanto, trabalharam num estudo duplo cego onde um grupo foi irradiado e outro não. A média de recorrência do grupo tratado foi de 37,5 semanas e do grupo não tratado foi de 35 semanas. Suas observações duraram 52 semanas.

Srokan et al (1999) realizaram um estudo sobre as mitoses celulares em células cancerosas e não cancerosas. Observaram que com densidades energéticas de 4 a 8 Joules/cm² o comportamento mitótico foi otimizado e, quando a densidade energética foi de 20 Joules/cm², houve uma depressão celular com acentuada diminuição das mitoses.

Dortbudak et al (2000) estudaram os efeitos da irradiação com L.B.I. em culturas de osteoblastos. Observaram que as culturas irradiadas produziram um depósito de osso significativamente maior do que as culturas não irradiadas.

Os estádios embrionários e larvais de peixes e moluscos têm sido referidos pela sua elevada radiosensibilidade (SHIMA & SHIMADA, 1991; FRANTSEVICH et al; OKAZAKI et al, 1996 *apud* MELO, 1998). Essa característica torna esses organismos potencialmente atraentes como modelos experimentais, em que exista o uso de elementos irradiadores.

Este trabalho propôs-se a avaliar os efeitos bioestimulantes obtidos por irradiação com Laser de baixa intensidade em larvas de *Biomphalaria glabrata*, por meio dos parâmetros mortalidade, malformados e eclosão. Analisaram-se também os parâmetros dosimetria e potência das fontes irradiantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos bioestimulantes da radiação Laser sobre embriões de *Biomphalaria glabrata*.

2.2 Específicos

- ▶ □ Analisar os parâmetros: potência e densidade energética dos aparelhos de L.B.I. envolvidos na pesquisa;
- ▶ □ Avaliar qual a melhor potência e densidade energética que propicia a antecipação da eclosão dos moluscos *Biomphalaria glabrata*;
- ▶ □ Detectar possíveis alterações no perfil dos embriões sob o ponto de vista de malformações e mortalidade;
- ▶ □ Interligar estes parâmetros sobre o ponto de vista de utilização do Laser como dispositivo bioestimulante.

3 METODOLOGIA

3.1 Criação dos Moluscos

Biomphalaria glabrata (SAY, 1818) foram mantidos em cubas de plástico de 25 cm x 55 cm x 17 cm, com água de clorada continuamente aerada (figura 1), alimentados com folhas de alface fresca (*lactuca sativa crispa*)(figura 2). Os moluscos foram mantidos a temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ com pH da água em torno de 7,0 seguindo a técnica de Andrade (1954), Brumpt (1941) e Rosemberg (1989) *apud* Melo (1998).

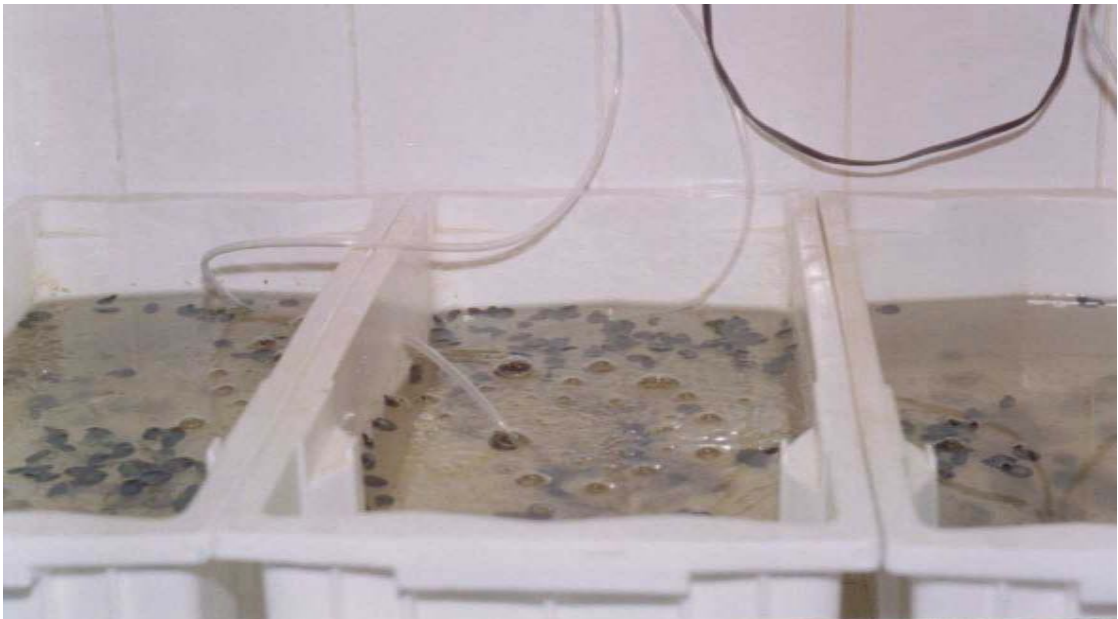


Figura 1- Cubas criatórias dos moluscos *B. glabrata*



Figura 2 - Molusco *Biomphalaria glabrata*

3.2 Coleta das Desovas

Foram colocadas tiras de plástico polietileno (21cm x 5 cm) na superfície da água do aquário onde os moluscos depositaram suas desovas. Para a identificação dos estádios embrionários foram utilizados os critérios adotados por Kawano et al (1992), nos quais as idades dos embriões em estágio de 1ª clivagem e blástula. Figura 3 e 4.

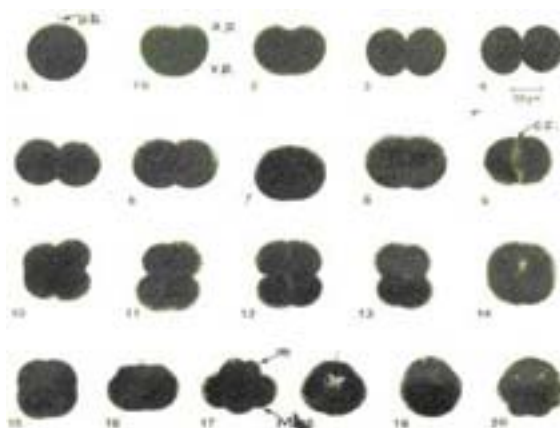


Figura 3 - Estádios embrionários em clivagem segundo Kawano, 1992.

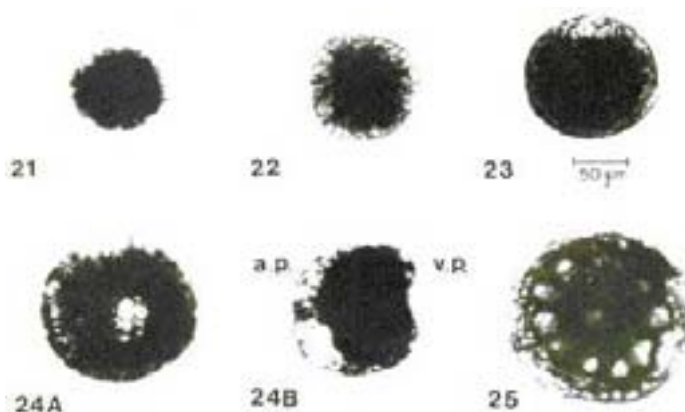


Figura 4 - Estádios embrionários de blástula (21 e 22,23), gástrula (24A e 24B) e trocófora jovem (25) segundo Kawano, 1992.

3.3 Condições de Irradiação

Os embriões em estádios de 1ª clivagem e blástula foram selecionados em dois grandes grupos: o grupo controle (sem exposição ao Laser) e o grupo a ser exposto ao Laser. Este último foi subdividido em três outros subgrupos, onde cada um foi exposto ao emissor de L.B.I. da marca Kroman (diodo) de Ga AIA (arseniato de alumínio e gálio), com as potências de 15mW, 30mW e 50mW, com o comprimento de onda de 684 nm. As densidades energéticas aplicadas foram de 3 e 6 Joules/cm², num total de 3550 embriões. Figura 5



Figura 5 - Laser de baixa intensidade (LBI)

A geometria da irradiação foi padronizada para os três aparelhos utilizados sendo estabelecida a distância de 11 cm entre a extremidade do aplicador e a superfície líquida envolvente dos embriões que ficaram contidos em placas de petri com 9 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura. O volume d'água foi o suficiente para evitar a desidratação dos embriões. Os embriões em estágio de 1ª clivagem receberam somente uma aplicação, já aqueles em estágio de blástula receberam 3 aplicações com intervalo de 24 horas. Todos os grupos (irradiados e não irradiados) foram observados por oito dias consecutivos. As observações foram feitas utilizando estereoscópio Will Heerburg. Figura 6.



Figura 6 – Microscópio estereoscópico

3.4 Análise da Radiosensibilidade de Embriões de *Biomphalaria glabrata* ao L.B.I.

Para a análise da rádio sensibilidade de embriões de *Biomphalaria glabrata* ao L.B.I. foram usados os seguintes critérios:

▶ □ Embriões mortos

Foram considerados mortos todos os embriões que apresentaram aspecto intumescido ou deformado (figura 7).



Figura 7 - Embriões de *B. glabrata* mortos

▶ □ Embriões Malformados

Foram assim considerados, todos os embriões que sobreviveram à irradiação e apresentaram malformações visível ao microscópio. Figura 8.

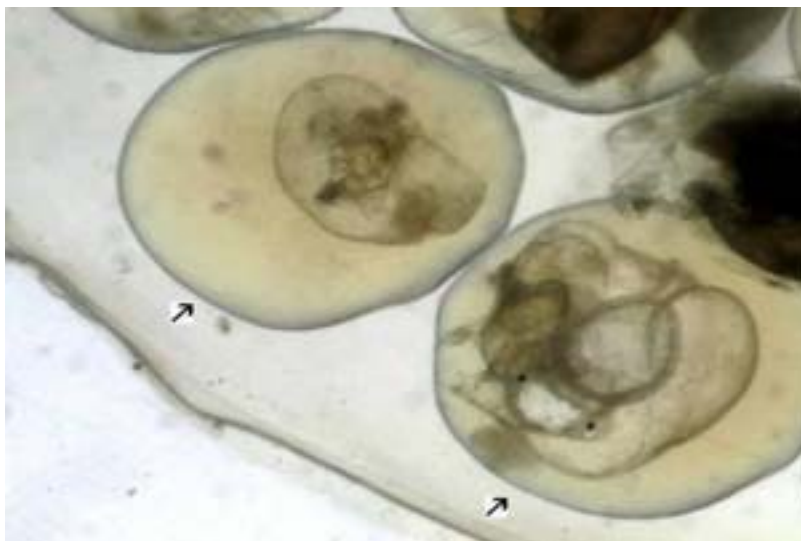


Figura 8 - Embriões malformados

Nesta categoria foram incluídos os embriões sobreviventes à irradiação, mesmo os de tamanho reduzido ou com atraso no desenvolvimento, mesmo que não apresentassem qualquer malformação visível ao microscópio estereoscópio.

▶ □ Embriões eclodidos

Os embriões que conseguiram sair da cápsula do ovo foram considerados embriões eclodidos. Em média, os embriões não irradiados de *Biomphalaria glabrata* eclodem entre o sétimo e o nono dia após a primeira clivagem, à temperatura de 25° Kawano et al (1992).

4 RESULTADOS

A evolução embrionária dos moluscos *Biomphalaria glabrata*, analisados por um período de oito dias, independente do estágio embrionário, densidade e potência da exposição ao L.B.I., pode ser observada na tabela 1 e figura 9.

No primeiro dia de avaliação todos os embriões estavam aparentemente normais. Os embriões iniciaram o processo de eclosão no sexto dia de observação, tendo sido observado 37,2% de eclosão. O percentual de eclosão aumentou para 85,5% no 7º dia e 94,6% no 8º dia.

A mortalidade de embriões foi registrada a partir do segundo dia, atingindo uma percentual máxima de 1,8% no 8º dia.

TABELA 1 – Condição dos embriões segundo o número de dias analisados

Dias de Observação	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos						Total	
			Malformados		Mortos		Aparentemente Normais			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1º	-	-	-	-	-	-	3550	100,0	3550	100,0
2º	-	-	15	0,4	2	0,1	3533	99,5	3550	100,0
3º	-	-	37	1,0	17	0,5	3496	98,5	3550	100,0
4º	-	-	51	1,4	21	0,6	3478	98,0	3550	100,0
5º	-	-	60	1,7	31	0,9	3459	97,4	3550	100,0
6º	1322	37,2	59	1,7	38	1,1	2131	60,0	3550	100,0
7º	3037	85,5	46	1,3	52	1,5	415	11,7	3550	100,0
8º	3360	94,6	34	1,0	64	1,8	92	2,6	3550	100,0

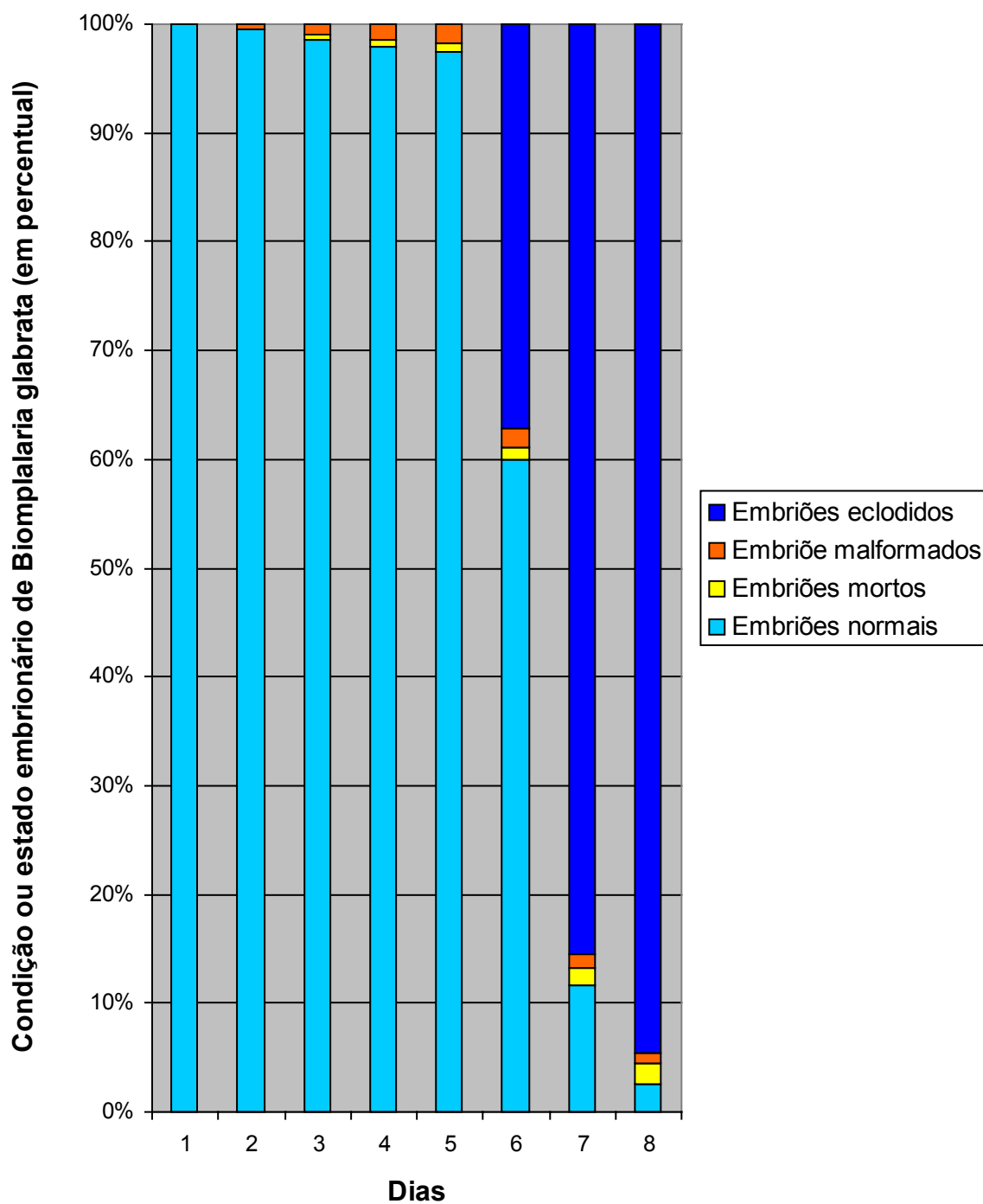


Figura 9 - Estádio embrionário do *B. glabrata* durante 8 dias de observação.

Considerando o estágio embrionário independente da densidade energética e da exposição utilizada, pode-se observar na tabela 2 e 4 os resultados que foram analisados para 6 e 8 dias de avaliação. A justificativa para escolha de seis dias foi devido a não ocorrência de eclosão de embriões até cinco dias. A escolha de oito dias tem como finalidade verificar a data mais tardia da eclosão.

TABELA 2 - Condição dos embriões segundo o estágio embrionário após 6 e 8 dias de avaliação

Dias de observação	Estádio embrionário	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos						Total		Valor P
				Malformados		Mortos		Aparentemente Normais				
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
6°	Clivagem	478	43,3	32	2,9	18	1,6	577	52,2	1105	100,0	P<0,001*
	Blástula	844	34,5	27	1,1	20	0,8	1554	63,6	2445	100,0	
8°	Clivagem	1048	94,8	18	1,6	32	2,9	7	0,6	1105	100,0	P<0,001*
	Blástula	2312	94,6	16	0,6	32	1,3	85	3,5	2445	100,0	

* - Associação significativa ao nível de 5%

- ▶ □ Com seis dias de avaliação o percentual de embriões que eclodiu foi mais elevado entre os embriões em estágio de clivagem do que aqueles em blástula (43,3% versus 34,5% respectivamente). Por outro lado, os percentuais de embriões malformados e mortos no estágio de clivagem foram maiores do que o estágio de Blástula (2,9% versus 1,1% de malformados, respectivamente, e 1,6% versus 0,8% mortos).

- □ Com oito dias de avaliação o percentual de embriões que eclodiu foi aproximadamente igual entre os dois estádios embrionários (94,8% versus 94,6%), enquanto que os percentuais dos mal formados ou mortos foram mais elevados entre os casos de clivagem do que os de Blástula (1,6% versus 0,6% de malformados e 2,9% versus 1,3% de mortos respectivamente).

Através do teste Qui-quadrado de independência, comprova-se associação fortemente significativa entre o estágio embrionário e a condição dos embriões irradiados e não irradiados, resultado este verificado tanto para 6 dias quanto para 8 dias de avaliação.

A análise de condição dos embriões segundo a densidade é mostrada na tabela 3.

TABELA 3 – Condição dos embriões segundo a densidade do aparelho após 6 e 8 dias de avaliação

Dias de observação	Densidade (J/cm ²)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos						Total		Valor P
				Malformados		Mortos		Aparentemente Normais				
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
6º	Controle	62	13,4	5	1,1	-	-	395	85,5	462	100,0	P<0,001*
	3	583	39,8	24	1,6	14	1,0	842	57,5	1463	100,0	
	6	677	41,7	30	1,8	24	1,5	894	55,0	1625	100,0	
8º	Controle	453	98,0	4	0,9	1	0,2	4	0,9	462	100,0	P<0,001*
	3	1363	93,2	17	1,2	22	1,5	61	4,2	1463	100,0	
	6	1544	95,0	13	0,8	41	2,5	27	1,7	1625	100,0	

* - Associação significativa ao nível de 5,0 %

Desta tabela é possível destacar:

- ▶ □ Com 6 dias, o percentual de embriões eclodidos foi bastante reduzido (13,4%) para os casos sem irradiação (controle) e é possível deduzir que foi 1,9% mais elevado entre os casos irradiados na densidade de 3 J/cm² do que entre os irradiados na densidade de 6 J/cm² (41,7% versus 39,8%). Entretanto, os percentuais de malformados e mortos foram, respectivamente, mais elevados em 6 J/cm² do que entre os 3 J/cm² (1,8% versus 1,6% para malformados e 1,5% versus 1,0% para mortos).

- ▶ □ Com 8 dias, os percentuais de embriões eclodidos variaram de 93,2%, para os irradiados com 3 J/cm² , até 98,0% entre os casos controle. Na irradiação, na densidade de 3 J/cm², o percentual de embriões aparentemente normais foi mais elevado do que entre os embriões não irradiados (controle) ou do que os irradiados com 6 J/cm².

Através do teste estatístico comprova-se associação fortemente significativa entre a densidade utilizada e a condição dos embriões, tanto para 6 quanto para 8 dias de avaliação.

A análise da condição dos embriões segundo a potência da exposição é mostrada na Tabela 4.

TABELA 4 – Condição dos embriões segundo a potência de exposição ao L.B.I. para 6 e 8 dias de avaliação

Dias de observação	Exposição (mW)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos						Total		Valor P
				Malformados		Mortos		Aparentemente Normais				
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
6	Controle	62	13,4	5	1,1	-	-	395	85,5	462	100,0	P<0,001*
	15	453	44,7	18	1,8	14	1,4	528	52,1	1013	100,0	
	30	396	38,8	19	1,9	13	1,3	593	55,0	1021	100,0	
	50	411	39,0	17	1,6	11	1,0	615	58,3	1054	100,0	
8	Controle	453	98,0	4	0,9	1	0,2	4	0,9	462	100,0	P<0,001*
	15	968	95,6	10	1,0	23	2,3	12	1,2	1013	100,0	
	30	953	93,3	9	0,9	24	2,3	35	3,4	1021	100,0	
	50	986	93,5	11	1,0	16	1,5	41	3,9	1054	100,0	

* - Associação significativa ao nível de 5,0%

Desta tabela é possível destacar:

- ▶ □ Para 6 dias de avaliação, o percentual de embriões eclodidos foi de 13,4% no grupo controle; 44,7% para 15 mW; 38,8 % 30 e 39,0% para 50 mW. Entre os embriões controle, não foi registrada a presença de mortos e o percentual de malformados foi de 1,1%. Para os irradiados, os menores percentuais de malformados e mortos ocorreram entre os embriões irradiados com 50 mW, com diferença de no máximo 0,3% em cada categoria.
- ▶ □ Para 8 dias de avaliação, o percentual de embriões eclodidos variou de 93,3% para os embriões irradiados com 30 mW a 98,0% entre os embriões controle. O percentual de embriões mal formados teve variação de no máximo 0,1%. O percentual de embriões mortos foi

menos elevado para os casos de controle e mais elevado para os irradiados com 15 e com 30 mW.

Nas tabelas de 5 a 10, os resultados são apresentados segundo a ocorrência de dois fatores e analisados separadamente para 6º e 8º dia de observação.

Na tabela 5, analisam-se os resultados segundo o estado embrionário e densidade para 6 dias.

TABELA 5 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário e a densidade energética utilizada.

Estádio Embrionário	Densidade (J/cm ²)	Embriões eclodidos		Malformados mortos		Aparentemente Normais		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Clivagem	Controle	41	33,1	2	1,6	81	65,3	124	100,0
	3	242	51,9	21	4,5	203	43,6	466	100,0*
	6	195	37,9	27	5,2	293	56,9	515	100,0
Blástula	Controle	21	6,2	3	0,9	314	92,9	338	100,0*
	3	341	34,2	17	1,7	639	64,1	997	100,0
	6	482	43,4	27	2,4	601	54,1	1110	100,0

* - Associação significativa ao nível de 5,0%

Desta tabela é possível destacar que:

- □ Para os embriões no estágio de clivagem, o maior percentual (51,9%) de eclosão ocorreu com densidade de 3 J/cm², o menor percentual (33,1%) entre os embriões não irradiados. Com densidade

de 6 J/cm² este percentual foi de 37,9%. A diferença percentual de malformados/mortos entre os irradiados foi de 0,7% mais elevada entre os irradiados com 6 J/cm² (5,2% versus 4,5%).

- ▶ □ Para os embriões no estágio de blástula, o maior percentual (43,4%) de eclosão ocorreu com densidade 6 J/cm² e o menor percentual (6,2%) entre os embriões não irradiados. Para os irradiados com 3 J/cm² este percentual foi de 34,2%. Os percentuais de embriões malformados/mortos variou de 0,9% entre os controles a 2,4% entre os irradiados com 6 J/cm².
- ▶ □ Os percentuais de embriões eclodidos foram correspondentemente mais elevados entre aqueles em estado de clivagem do que em blástula para os controle (33,1% versus e 6,2%), para os irradiados com densidade de 3 J/cm² (51,9% versus 34,2%), mas não para os irradiados com densidade de 6 J/cm² que teve percentual mais elevado entre os casos de Blástula (43,4% versus 37,9%).

Através da técnica de ajuste de modelos loglineares, determinou-se a rejeição de todos os 8 modelos ajustados ao nível de 5%, indicando a existência de associação entre os fatores densidade, condições dos embriões e o estágio embrionário.

Dentre esses modelos, o de maior interesse para este estudo é o que apresenta independência condicional de densidade em relação ao estágio embrionário ($P < 0,001$). A rejeição deste modelo significa que dado o estágio embrionário, existe associação fortemente significativa entre a densidade utilizada e a condição do embrião.

Mais precisamente, se o estágio embrionário considerado for clivagem, então as combinações dos níveis de 0 , 3 e 6 J/cm² com relação a eclosão, malformação, mortalidade e aparentemente normais produzem percentuais significativamente diferentes. Isto é, quando combinamos os níveis de densidade 0 , 3 e 6 J/cm² com “eclosão”, obtemos os percentuais de eclosão 33,1%, 51,9% e 37,9% respectivamente; quando combinamos os referidos níveis de densidade com “malformados/mortos”, obtemos os diferentes percentuais 1,6%, 4,5% e 5,2% respectivamente; quando combinamos os referidos níveis de densidade com “aparentemente normais” obtemos os diferentes percentuais 65,3%, 43,6% e 56,9 % respectivamente.

Analogamente, se o estágio embrionário é blástula: quando combinamos os níveis de densidade 0 J/cm² , 3 e 6 J/cm² com “eclosão”, obtemos os diferentes percentuais de eclosão 6,2%, 34,2% e 43,4% respectivamente; quando combinamos os referidos níveis de densidade com “malformados /mortos, obtemos os diferentes percentuais (de malformados/mortos): 0,9%, 1,7% e 2,4% respectivamente; quando combinamos os referidos níveis de densidade com “aparentemente normais”, obtemos os diferentes percentuais (de aparentemente normais): 92,9%, 64,1% e 54,1% respectivamente.

Na Tabela 6 a mesma análise mostrada na Tabela 5 é realizada para 8 dias. Esta tabela mostra que tanto para os embriões em estágio de clivagem como naqueles em Blástula, os maiores percentuais de eclosão ocorreram no grupo controle enquanto que o percentual de malformados/mortos foi menos elevado no grupo controle e o maior percentual entre os irradiados com 6 J/cm². Para os embriões em clivagem, a maior diferença percentual foi de 4,8% e em Blástula a maior diferença foi de 5,7%. Destaca-se que os percentuais de malformados/mortos

foram correspondentemente mais elevados entre os embriões no estágio de clivagem do que os embriões em Blástula.

TABELA 6 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário e a densidade utilizada

Estádio Embrionário	Densidade (J/cm ²)	Embriões eclodidos		Malformados mortos		Aparentemente Normais		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Clivagem	Controle	122	98,4	2	1,6	-	-	124	100,0
	3	444	95,3	21	4,5	1	0,2	466	100,0
	6	485	93,6	27	5,2	6	1,2	515	100,0
Blástula	Controle	331	97,9	3	0,9	4	1,2	338	100,0
	3	919	92,2	17	1,7	60	6,0	997	100,0
	6	1062	95,7	27	2,4	21	1,9	1110	100,0

Para os dados relativos a esta tabela, ao nível de significância considerado ($P = 0,0232$), todos os modelos foram rejeitados, indicando a existência de associação entre a densidade, condição dos embriões e o estágio embrionário.

A análise dos resultados segundo o estágio embrionário e a exposição é mostrada nas Tabelas 7 e 8.

TABELA 7 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário e a exposição utilizada.

Estádio Embrionário	Exposição (mW)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos				Total	
				Malformados mortos		Aparentemente Normais			
		N	%	N	%	N	%	N	%
Clivagem	Controle	41	33,1	2	1,6	81	65,3	124	100,0
	15	135	41,3	15	4,6	177	54,1	327	100,0
	30	127	38,5	16	4,8	187	56,7	330	100,0
	50	175	54,0	17	5,2	132	40,7	324	100,0
Blástula	Controle	21	6,2	3	0,9	314	92,9	338	100,0
	15	318	46,4	17	2,5	351	51,2	686	100,0
	30	269	38,9	16	2,3	406	58,8	691	100,0
	50	236	32,3	11	1,5	483	66,2	730	100,0

Da Tabela 7 para 6 dias destacam-se:

- ▶ □ Entre os embriões em clivagem o menor percentual (33,1%) de embriões eclodidos ocorreu entre os não irradiados. Entre os irradiados, o maior percentual (54,0%) de eclosão ocorreu para a exposição de 50 mW e o menor percentual (38,5%) ocorreu para 30 mW. O percentual de malformados/mortos foi de 1,6% no grupo controle e variou de 4,6% a 5,2% entre os irradiados.
- ▶ □ Entre os embriões em Blástula o menor percentual (6,2%) de embriões eclodidos ocorreu entre os não irradiados. Entre os irradiados, o maior percentual (46,4%) de eclosão ocorreu para a exposição de 15 mW e o menor percentual (32,3%) ocorreu para 50 mW. O percentual de malformados/mortos foi de 0,9% no grupo controle e variou de 1,5% a 2,5% entre os irradiados.

Para os dados relativos a esta tabela, ao nível de significância considerado, todos os modelos foram rejeitados, indicando a existência de associação entre a exposição, condição dos embriões e o estágio embrionário. O modelo de independência condicional da exposição e da condição do embrião, dado o estágio embrionário, é fortemente rejeitado ($P < 0,001$), o que indica que para cada nível fixado do estado embrionário existe associação significativa entre a exposição utilizada e a condição do embrião.

TABELA 8 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário e a exposição utilizada.

Estádio Embrionário	Exposição (mW)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos				Total	
				Malformados mortos		Aparentemente Normais			
		N	%	N	%	N	%	N	%
Clivagem	Controle	122	98,4	2	1,6	-	-	124	100,0
	15	312	95,4	15	4,6	-	-	327	100,0
	30	308	93,3	16	4,8	6	1,8	330	100,0
	50	306	94,4	17	5,2	1	0,3	324	100,0
Blástula	Controle	331	97,9	3	0,9	4	1,2	338	100,0
	15	656	95,6	17	2,5	12	1,7	686	100,0
	30	645	93,3	16	2,3	29	4,2	691	100,0
	50	680	93,1	11	1,5	40	5,5	730	100,0

Da tabela 8 para 8 dias destacam-se:

- ▶ □ Independente do estágio embrionário, o menor percentual de embriões eclodidos e o menor de malformados/mortos ocorreram entre os não irradiados. Entre os irradiados, o percentual de eclosão variou de 93,1% a 95,6%.

- ▢ Os percentuais de malformados/mortos, entre os embriões irradiados, foram correspondentemente mais elevados em clivagem do que em Blástula.

Ao nível de significância considerado, todos os modelos foram rejeitados, indicando a existência de associação entre a exposição, condição dos embriões e a densidade energética. O modelo de independência condicional da exposição e condição dos embriões, dado cada estágio embrionário, foi significativo ao nível de significância considerado, com valor $P = 0,0479$.

Nas Tabelas 9 e 10 as análises são segundo os efeitos das combinações dos fatores densidade e exposição.

TABELA 9 – Condição dos embriões com 6 dias segundo a densidade (J/cm^2) e a potência da exposição (mW) utilizada.

Densidade (J/cm^2)	Exposição (mW)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos				Total	
				Malformados/mortos		Aparentemente Normais			
		N	%	N	%	N	%	N	%
Controle	Controle	62	13,4	5	1,1	395	85,5	462	100,0
3	15	198	42,2	10	2,6	261	55,6	469	100,0
	30	169	35,1	9	1,9	304	63,1	482	100,0
	50	216	42,2	19	3,7	277	54,4	512	100,0
6	15	255	46,9	22	4,0	267	49,1	544	100,0
	30	227	42,1	23	4,3	289	53,6	539	100,0
	50	195	36,0	9	1,7	338	62,4	542	100,0

Da Tabela 9 destaca-se:

- ▶ □ Um percentual de eclosão bem mais reduzido para os embriões não irradiados (13,4%) do que para os irradiados. Uma variação percentual de embriões eclodidos oscilando de 35,1%, para os irradiados com 3 J/cm² e exposição de 30mW, a um valor máximo de 46,9% quando irradiados com 6 J/cm² e 15 mW de potência da exposição. Teve os valores mais elevados para as combinações: densidade 6 J/cm² com 3 exposições de 30 e 15 mW, com valores de 4,3% e 4,0% respectivamente.

- ▶ □ Ao nível de significância considerada, todos os modelos foram rejeitados, indicando a existência de associação entre a exposição, condição dos embriões e a densidade. O modelo de independência condicional da exposição e da condição do embrião, dado a densidade, é rejeitado. (P = 0,486).

Na avaliação com 8 dias o maior percentual de eclosão ocorreu entre os embriões controle. Entre os irradiados, este percentual variou de 91,0%, para a combinação da densidade 3 J/cm² e exposição de 50 mW, até o valor de 96,4% na densidade de 3 J/cm² com exposição de 15 mW. Os percentuais de malformados/mortos entre os irradiados variou 1,5% a 4,5% e teve os valores mais elevados para as combinações: densidade 6 J/cm² com 3 exposições de 30 e 15 mW, com valores de 4,5% e 4,0% respectivamente (Tabela 10). Todos os modelos são significativos. O modelo de independência condicional da exposição e condição dos embriões, dado cada nível de densidade, foi significativo, ao nível de significância é fortemente significativo (P < 0,001).

TABELA 10 – Condição dos embriões com 8 dias segundo a densidade (J/cm²) e a exposição (mW) utilizada.

Densidade (J/cm ²)	Exposição (mW)	Embriões eclodidos		Embriões não eclodidos				Total	
				Malformados/mortos		Aparentemente Normais			
		N	%	N	%	N	%	N	%
Controle	Controle	453	98,0	5	1,1	4	0,9	462	100,0
3	15	452	96,4	11	2,3	6	1,3	469	100,0
	30	445	92,3	9	1,9	28	5,8	482	100,0
	50	466	91,0	19	3,7	27	5,3	512	100,0
6	15	516	94,8	22	4,0	6	1,1	544	100,0
	30	508	94,2	24	4,5	7	1,3	539	100,0
	50	520	95,9	8	1,5	14	2,6	542	100,0

Na tabela 11, para seis dias de avaliação, destacam-se:

- ▶ □ Em estágio de clivagem e densidade de 3 J/cm², o maior percentual(59,9%) de eclosão ocorreu para os embriões irradiados com 50 mW de exposição e o menor percentual (41,9%) para os casos irradiados com 30 mW.
- ▶ □ Em estágio de clivagem e densidade de 6 J/cm², o maior percentual (48,1%) de eclosão ocorreu para os embriões irradiados com 50 mW de exposição e o menor percentual (31,8%), para os casos irradiados 15 mW. Para 30 mW este percentual foi de 34, 8%.
- ▶ □ Em Blástula, a densidade de 3 J/cm² o percentual de eclosão variou de 31,3% a 37,1%, sendo menor para os casos irradiados 30 mW e maior para os irradiados a 15 mW.

- ▶ □ Em estágio de Blástula a densidade de 6 J/cm², o maior percentual (55,3%) de eclosão ocorreu para os embriões irradiados com 15 mW, de exposição e o menor percentual (30,8%) para os casos irradiados com 50 mW este percentual foi de 45,1%.
- ▶ □ Ressalta-se que os modelos foram ajustados para cada estágio embrionário. Com exceção modelo completo, todos os demais modelos foram rejeitados para o estado embrionário clivagem, enquanto que para Blástula todos os modelos foram rejeitados.

TABELA 11 – Condição dos embriões com 6 dias segundo o estágio embrionário, a densidade e a exposição utilizada.

Estádio Embrionário	Densidade (J/cm ²)	Exposição (mW)	Condição dos Embriões				Total	
			Embriões eclodidos		Não eclodidos			
			N	%	N	%	N	%
Clivagem	3	15	73	55,3	59	44,7	132	100,0
		30	72	41,9	100	58,1	172	100,0
		50	97	59,9	65	40,1	162	100,0
	6	15	62	31,8	133	68,2	195	100,0
		30	55	34,8	103	65,2	158	100,0
		50	78	48,1	84	51,9	162	100,0
Blástula	3	15	125	37,1	212	62,9	337	100,0
		30	97	31,3	213	68,7	310	100,0
		50	119	34,0	231	66,0	350	100,0
	6	15	193	55,3	156	44,7	349	100,0
		30	172	45,1	209	54,9	381	100,0
		50	117	30,8	263	69,2	380	100,0

Para 8 dias de avaliação entre os embriões irradiados (tabela 12), destacam-se:

- ▶ □ Independente dos fatores, o percentual de eclosão oscilou de 89,9 a 97,7%.
- ▶ □ Em clivagem, na densidade de 3 J/cm², o maior percentual de eclosão ocorreu com 15 mW de exposição e o menor percentual ocorreu na exposição de 50mW.
- ▶ □ Em clivagem, na densidade de 6 J/cm², o maior percentual de eclosão ocorreu com 50 mW de exposição e o menor com 30mW.
- ▶ □ Em Blástula, na densidade de 3 J/cm², o maior percentual de eclosão ocorreu na exposição de 15 mW e os outros dois percentuais foram bastante próximos.
- ▶ □ Em Blástula, na densidade de 6 J/cm², os percentuais de eclosão variaram de 95,4% a 96,1%.

Ressalta-se que os modelos foram para cada estágio embrionário. Para clivagem todos os modelos foram rejeitados. Para Blástula todos os modelos foram rejeitados, exceto o modelo de independência condicional entre densidade e exposição dado que houve eclosão.

TABELA 12 – Condição dos embriões com 8 dias segundo o estágio embrionário, a densidade e a exposição utilizada.

Estádio Embrionário	Densidade (J/cm ²)	Exposição (mW)	Condição dos Embriões				Total	
			Embriões eclodidos		Não eclodidos			
			N	%	N	%	N	%
Clivagem	3	15	129	97,7	3	2,3	132	100,0
		30	166	96,5	6	3,5	172	100,0
		50	149	92,0	13	8,0	162	100,0
	6	15	183	93,8	12	6,2	195	100,0
		30	142	89,9	16	10,1	158	100,0
		50	157	96,9	5	3,1	162	100,0
Blástula	3	15	323	95,8	14	4,2	337	100,0
		30	279	90,0	31	10,0	310	100,0
		50	317	90,6	33	9,4	350	100,0
	6	15	333	95,4	16	4,6	349	100,0
		30	366	96,1	15	3,9	381	100,0
		50	363	95,5	17	4,5	380	100,0

5 DISCUSSÃO

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho são sugestivos de que o *Biomphalaria glabrata* nas formas embrionárias mostraram-se sensíveis a irradiação com L.B.I. estes dados estão de acordo com os encontrados por Kawano, Okazaki e Melo em seus experimentos com radiação ionizante.

Os resultados mostram que o LBI produziu uma bioestimulação aqui representada pelo aumento do período de eclosão dos embriões irradiados.

Este aumento da velocidade de multiplicação celular, observado nesta pesquisa, foi também observado por Baxter et al (1997); Garcia et al (1995); Oliveira et al (1997) e agaiby et al (2000); que trabalharam com o comportamento de células e tecidos, submetidos ao L.B.I.

As modificações observadas em embriões na fase de blástula quando expostos ao Laser de 15 mW, foram mais evidentes do que as obtidas com exposições de 30 mW e 50 mW. Dados da literatura indicam o uso de vários níveis de potência de Laser Nicoli Filho (1991) utilizou em seus trabalhos 0,75 mW, Cernavin et al (1994) usaram 1 mW e Miloro & Repassky (2000) empregou 70 mW em seus experimentos, porém em nenhum desses trabalhos houve a preocupação de um estudo comparativo com relação a eficácia dos diferentes níveis de potência utilizada. Do ponto de vista molecular Karu *apud* Baxter (1997); Manteifel et al (1997); Sroka et al (1999) sugerem existir estruturas subcelulares de natureza cromófora, onde ocorreria a interação da energia do Laser com a matéria. É possível que a maior eficácia do Laser de janela 15 mW aqui observada esteja relacionada com um maior tempo de absorção de energia pelas estruturas cromóforas referida

por esses autores. Por outro lado Pinheiro (1997) utilizando LBI com diferentes potências, no tratamento de patologias oro-faciais obteve seus melhores resultados quando utilizou a potência de 15 mW.

Outro parâmetro pouco estudado é a densidade energética, não existindo ainda um consenso sobre esta variável. Mc Daniel et al (1996) usaram em seus experimentos doses de 2 a 4 Joules, Parek et al (1999) variaram de 50 a 100 Joules, Srokan et al (1999), para seus estudos utilizaram de 4 a 8 Joules. Na presente pesquisa foram usadas as doses de 3 e 6 Joules, fornecendo um resultado (tabela 3) significativo quando comparado com o controle, porém, não significativo quando comparado entre si. Embriões irradiados com 3 Joules eclodidos no sexto dia do experimento (39,8%), embriões irradiados com 6 Joules eclodidos no sexto dia do experimento (41,7%). Estes resultados, embora preliminares, indicam não haver diferença de eficácia quando se varia a densidade energética nos níveis considerados.

Os dados encontrados na tabela 2 relativos aos estudos comparativos dos efeitos do laser sobre embriões de *B. glabrata* no estágio de clivagem e blástula indicam uma precocidade da eclosão no primeiro estágio no sexto dia de observação, onde o número de eclosões foi 8,8% maior.

Na análise comparativa entre os estádios embrionários de clivagem e blástula, quando irradiados, o primeiro, mostrou-se mais significativo em produzir eclosões no sexto dia. De acordo com a tabela 2, os irradiados em estágio de clivagem tiveram um número de eclosão 8,8% mais adiantados em relação aos de blástula. Este fato é sugestivo de que pode existir uma relação inversa entre a energia de ativação fornecida ao sistema e o número de células envolvidas.

Outro fato importante aqui observado foi um discreto aumento do número de embriões malformados e mortos entre os irradiados comparativamente ao controle (tabelas 5 e 7). Percebe-se que os percentuais de malformados e mortos, entre os embriões irradiados, foram correspondentes mais elevados em clivagem do que em blástula. Tal fato pode ser atribuído ao aumento da velocidade mitótica nas células irradiadas, uma vez que estas tiverem um ganho energético, conforme os estudos de Benedicenti & Martino; Garcia e Viterbo *apud* (1997), onde indicam um aumento de 2,2 % na síntese de ATP para os trabalhos de Benedicenti & Martino. Com o aumento da velocidade mitótica poderia está dificultando o fenômeno do reparo nuclear, produzindo, assim, embriões malformados e mortos em maior do que os não irradiados.

Considerando o parâmetro densidade energética, observa-se que doses maiores produziram um número maior de embriões malformados e mortos, de acordo com a tabela 6. Ainda, na mesma tabela, observa-se que embriões em estádios embrionários de clivagem foram mais sensíveis, produzindo um número maior de malformações. O que pode estar relacionado com o volume da massa celular e absorção de energia.

Na tabela 7, onde se relaciona a intensidade energética de 15 mW, 30 mW e 50 mW com relação ao estágio embrionário e o número de malformados e mortos, fica mais uma vez evidenciada a maior sensibilidade do estágio de clivagem. Resultados semelhantes foram obtidos por Okazaki e col (1996) quando utilizaram radiação ionizante neste mesmo modelo experimental.

Quando se associou densidade energética e potência para o estágio embrionário de blástula, tanto para D.E. = 3 Joules quanto para 6 Joules o melhor

desempenho foi para a potência de 15 mW, conforme tabela 11 e 12, fato comprovado por Pinheiro et al (1997) .

6 CONCLUSÕES:

A radiação Laser de Baixa Intensidade (LBI) emitida pelo arseniato de alumínio e gálio de 684 nm demonstrou possuir efeito estimulante de atividades biológicas em embriões *Biomphalaria glabrata*.

- ▶ □ Embriões de moluscos de *B. glabrata* nos estádios de clivagem e blástula demonstraram ser absorvedores desta forma de radiação;
- ▶ □ O estágio de clivagem os embriões de moluscos *B. glabrata* se revelaram absorvedores desta forma de radiação quando comparado com o estágio de blástula;
- ▶ □ A antecipação da eclosão dos embriões na fase de blástula quando expostos ao Laser de 15 mW, foram mais evidentes do que as obtidas com exposições de 30 mW e 50 mW;
- ▶ □ Variações da densidade energética de 3 e 6 Joules para mesma potência de 15 mW não promovem mudanças de absorção de energia mensuráveis pela metodologia adotada no modelo experimental utilizado;
- ▶ □ A radiação laser de arseniato de alumínio e gálio com comprimento de onda de 684 nm confere um pequeno incremento da mortalidade e da malformação de embriões *B. glabrata*.

- ▶ □ Estudos mais aprofundados são necessários como forma de promover um melhor aproveitamento desta modalidade de energia na biologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAIBY, A. et al. **Laser Modulation of angiogenic factor production by T. Lym, phocytes** Laser in surgery and medicine, 26: 357-363, 2000.

ALBERTS, B. et al . **Biologia Molecular da Célula**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artes Médicas.p.653-k 1997.

BARATTOL et al. **A new type of very low-power modulated laser: soft-tissue changes induced in osteoarthritic patients revealed by sonography**. Int j. clin. Pharm.res. XX (1/2) 13-16(2000).

BARBERIS, G. et al. In vitro synthesis of prostaglandin E₂ By sinovial tissue after helium-neon Laser radiation in rheumatoid arthretis. **Journal of clinical laser & surgery**; vol. 14, n. 4, pp.175-177,1996.

BAXTER, D. G. et al. **Terapeutics Laser medical division of**. London: Person professional Ltda,1997.

BRASSEAU, L. et al. Low level renomatóided arthritis: A metaanalysis. **Journal Rheumatology**, 27;1961 – 2000.

CAMPANA, V. et al. Effectos of dicoflenac sodium and he: Ne Laser irradiation on plasmatic Fibrinogen levels in inflammatory processes. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. V. 16, Nº 6, 1998.

CERNAVIN, I. Laser Applications in dentistry: a Review of the literature. **Australian Journal**: 39 (1): 28-32; 1994.

CICONELLI, K. C. et al. Utilização da luz de baixa densidade de potência de GaAlAs como agente analgésico e anti-inflamatório em cirurgia de implante orais. **JBC – Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**. Vol. I, p.19 e 20, 1997.

_____. Bioestimulação óssea utilizando Laser de baixa densidade de potência diodo semi-condutor 830nm em caso de micro-mini implante. **JBC – Jornal Brasileiro de Odontologia Clínica**. Vol. 2, n.11 p.39 e 41, 1999.

DORTBUDAK, O. et al . **Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft Laser**. Clin oral impl res, 1: 540-545, 2000.

GARCIA, V.G.; et al. Ação da radiação laser. **Revista gaúcha de odontologia**, Porto Alegre, v.93, n.4.p. 191 –194, jul-ago,1995.

GARCIA, V. G; KINA, J. R; MILANEZI, L. A. Avaliação biométrica de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio Laser com diferentes frequências e potências. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**, V.8 (1), p. 36-42. 1995.

_____. Reparação de feridas de extração dental submetidas ao tratamento com raio Laser – estudo histológico em ratos. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**. Vol.9.n.1, jan/jun.pp33-42.1996.

_____. Estudo *in vitro* da ação dos raios Laser de bioestimulação em amostras de *Streptococcus* e *staphylococcus*. **Revista da Faculdade de Odontologia de Lins**. Vol. 10. nº 2. jul./dez. p. 16-22, 1997.

GENOVESE, W. J.. **Laser na odontologia**. São Paulo: Ed. Pierópolis, 2000.

KAWANO, T. et al. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae). **A Practical Guide to the Main Stages. Malacologia.** 34 (1-2): 25-32. 1992.

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L., KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne Laser: Appearance of giant mitochondria. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology** 38 25-30.1997.

MELO, A. M. M. de A. **Estudo dos Efeitos da Radiação Gama de ⁶⁰Co Sobre Larvas de "*Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)"** [Tese de Doutorado em ciências de tecnologia nuclear - IPEN] São Paulo, 1998.

MC DANIEL, D. H. et al. Treatment of stretch Marks with the 585-nm flashlamp-pumped pulsed dye Laser. **Dermatology Surgery** ; 22; 332-337 .1996.

MILORO, M.; RESPASKY, M. Low-level Laser effect on neurosensory recovery after sagittal ramus osteotomy. **Oral surgery oral medicine oral pathology.** Vol. 89 n 1,p.12 a 18, jan. 2000.

NICOLLI FILHO, W. D. **Efeitos dos raio Laser tipo Hélio-Neônio (He - Ne) no processo de reparo em feridas de extração dental. (Estudo histológico em ratos).** [Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da UNESP – Araçatuba – São Paulo, 1991.

OLIVEIRA, J. A. G. P. de. Ação das irradiação Laser (arsênio – gálio) sobre a cronologia do processo de reparo em feridas cutâneas, estudo histológicos em ratos. **Revista Odontológica do Brasil Central.** Ano 6, N.º 21, p. 28-31. 1997.

PAREKH, S. G. et al. Photodynamic modulation of wounds healing with BPD-MA and casp. **Laser in surgery and medicine**, 24: 375-381,1999.

PINHEIRO, A. L. B. & col. Low-level Laser Therapy in the management of disorders of the maxilofacial region. **Journal of clinical Laser medicine & surgery**. Vol.15, n.4. Mary Ann Liebert, incpp.181-183.1997.

PINHEIRO, A. L.B. low level Laser therapy is an important tool to tre at disorders of the maxilofacial region. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. Vol..12, nº. 4, 1998.

SCHINDL, A. et al. **Diabethic foot ulcer: successful treatment by low** – intensity Laser trerapy. *Dermatology*. 198;314-316, Viena, 1999.

SCHINDL, A.; NEUMANN R. Low intesity Laser therapy is na effective treatment for recurrent herpes simplex infection results from a randomized double-blind placebo – conttrolled study. **The journal of investigative dermatology**. P.221-223,1999.

SILVA, N. M. M. da. Aplicações clínicas do soft Laser em odontologia. **Revista Paulista de Odontologia**. ano XIV n.4 julho/agosto. São Paulo,1992.

SILVEIRA, J.C.; SILVEIRA, L. DE B. Da influência do raio Laser Ga As 904 nm na drenagem do sulco fisiológico gengival em humanos. *Periodontia* nº. 1, p. 3 - 13. 1992.

SILVEIRA, J. C. da. Gengivite Descamativa Crônica Terapêutica pela irradiação Laser GaAs 904. **Relato de caso clínico**. *Periodontia*, vol.2 n. 3.pp.93-13.1993.

SILVEIRA, J. C. da; LOPES, E. E. **Alguns aspectos dos mastócitos sob ação do raio Laser de Ga-As – 904nm** (Estudo experimental em cobaias – *Cavia porcellus*.

Aro.cent.est. curso de odontologia, Belo Horizonte, 28($\frac{1}{2}$):73 – 96 jan/dez.1995.

SKOKAN, R. et al. **Effectts on the mitosis of normal and tumor cells induced By light treatment of different wavelengts**. *Laser in surgery and medicine*; 25: 263 – 271. 1999.

STADLER, I. **830nm Irradiation increases the wound tensile strenth in a diabetic murine model**. *Laser in surgery and medici*. 28;220. 2001.

TAM, G.. Low Power Laser terapy and analgesic action. **Journal of clinical laser medicine & Medicine & surgey**;v. 17nº p.29 a 33. 1999

TUNER, J. & HODE, L.. It's all in the paramenters: a critical analyses of some well – known negative studies on low-level therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. Vol. 16, N.º 5. Mary Ann Liebert, inc. p. 245-248. 1998.

WALSH, L. J. **The current status of low level laser trepapy in dentistry**. Part 1. Soft tissue applicatons. *Aust Dent J*. 1997; 42; 247-54.1997.(b)

_____. The Current Status of Low Level Laser Therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. **Australian Dental Journal**. 42(5): 302-6, 1997(a).

_____. The current statatus of low level Laser therapy in dentistry. Soft tissue applications. **Australian dental journal**. 42:4. P.247 a 254, 1999.