

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AÇÃO DO DIODO LASER EMITINDO EM 830 nm,
SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
LESÕES CUTÂNEAS: ESTUDO BIOMÉTRICO E
HISTOLÓGICO EM RATOS.**

SANDRA BASTOS REZENDE

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre Profissional em Lasers Odontológicos.

***Orientador: Prof. Dr. EDISON PUIG
MALDONADO***

Co-orientador: Prof. Dr. EDMIR MATSON

São Paulo
2001

DEDICATÓRIA

À minha família:

Minha mãe Hilda, meu pai Bira e meus irmãos Fernando (in memoriam), Simone e Fábio, base emocional das minhas mais importantes decisões, principalmente nos momentos difíceis que passamos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edison Puig Maldonado, por ter me auxiliado a definir linhas de pensamento para a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia pelo incentivo e pela ajuda inestimável na elaboração deste trabalho;

À Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro sem a qual seria impossível a realização deste trabalho, pelas constantes informações, pelo carinho e amizade;

À minha amiga Profa. Dra. Maria Tereza Jabur, pela força e companheirismo ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos de mestrado pela constante cooperação e pelo privilégio de sua amizade.

Ao meu primo e amigo Dr. Murilo Rezende Melo pela colaboração da execução da análise estatística.

Aos meus tios queridos, Dra. Marilene Rezende Melo e Dr. Evaldo Mariani Melo pelo incentivo ao longo desses anos.

Ao Leonardo, por ter me acolhido com carinho e cedido o computador para a elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Denise Maria Zezell, por ter me apresentado a este mundo fascinante das aplicações do laser nas ciências da vida;

Ao meu primo Marcos Schöemann pela constante cooperação na formatação deste trabalho.

Agradeço à LP Comunicação & Design, em especial à Suzana Pini por ter me cedido computadores para parte do desenvolvimento deste trabalho.

Às secretárias do curso do mestrado profissionalizante lasers em odontologia Maria Aparecida Barbosa e Sandra Cruz pela presteza das necessidades burocráticas e pelo privilégio da ótima amizade.

À GEPL0, pela infra- estrutura utilizada na execução da análise histológica.

À Profa Marilene, pela amizade e assistência na formatação deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Villa, Diretor da Faculdade de Odontologia da Unisa pela colaboração na interpretação da análise histológica.

“Se contemplarmos a humanidade como um todo, veremos que somos animais sociais. Além disso, as modernas estruturas da economia, da educação e de outras atividades demonstram que o mundo se tornou um lugar menor e que nós dependemos muito uns dos outros. Nessas circunstâncias, creio que a única opção é viver e trabalhar juntos em harmonia, tendo em mente o interesse da humanidade como um todo. Essa é a única perspectiva e o único método que devemos adotar para nossa sobrevivência”

(Dalai-Lama)

AÇÃO DO DIODO LASER ($\lambda = 830 \text{ nm}$) SOBRE O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS: ESTUDO BIOMÉTRICO E HISTOLÓGICO EM RATOS

SANDRA BASTOS REZENDE

RESUMO

Nesta pesquisa foi analisado o efeito da aceleração do processo de cicatrização de lesões cutâneas em ratos, utilizando diodo laser emitindo em 830 nm. Os 64 animais selecionados neste estudo foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 16 ratos (G1, G2, G3 e G4). Comparações biométricas e histológicas foram realizadas nos seguintes períodos: 3, 7 e 14 dias após o ato cirúrgico e aplicação do laser. Foram utilizadas três configurações de irradiação, sendo uma contato pontual (G2) e duas uniformes sem contato (G3 e G4), com dois valores de intensidade (G2: $I = 428 \text{ mW/cm}^2$; G3=G4: $I = 53 \text{ mW/cm}^2$), e dois valores de dose (G2=G4: $D = 3 \text{ J/cm}^2$; G3: $D = 1,3 \text{ J/cm}^2$). O grupo 1, considerado controle, não foi submetido a nenhum tratamento. Todas as lesões irradiadas apresentaram aceleração do processo de cicatrização, com relação ao grupo controle. Entretanto, os nossos achados indicam claramente que, dos dois valores de intensidade utilizados, aquele menor (irradiação uniforme) levou aos melhores resultados.

Por outro lado, dos dois valores de dose utilizados, o menor valor desta também levou a resultados mais expressivos e significativos. A combinação do valor de intensidade de 53 mW/ cm² e da dose de 1,3 J/ cm² levaram a resultados ótimos dos pontos de vista biométrico e histológico, apresentando contração mais rápida da lesão, com maior rapidez na neoformação de tecido conjuntivo e epitelial.

ACTION OF DIODE LASER (830NM) ON CUTANEOUS WOUND HEALING PROCESS: BIOMETRICAL AND HISTOLOGICAL STUDY IN RATS

“ABSTRACT”

In this research, it was analyzed the acceleration of the healing process of cutaneous lesions in mice, using a diode laser emitting in 830 nm. The 64 selected animals in this study were randomly divided into four groups of 16 animals each (G1, G2, G3 e G4). Biometric and histological comparisons were accomplished in the following periods: 3, 7 and 14 days after the surgery and laser application. Three laser irradiation configurations were used: a punctual contact (G2) and two non-contact and uniform (G3 and G4). For group G2, the laser intensity was 428 mW/cm², and for groups G3 and G4 it was 53 mW/cm². The total doses were D = 3 J/cm² for groups G2 and G4, and D = 1,3 J/cm² for G3. The first group, G1, was considered control and thus not submitted to any treatment after the surgery. All irradiated lesions presented acceleration of the healing process with regard to the control group. However, our results clearly indicate that the smaller laser intensity (uniform irradiation) led to the best results. On the other hand, the smaller used dose also led to the more

significant and expressive results. The combination of the intensity value of 53 mW/cm² and the dose of 1,3 J/cm² led to optimal results, regarding the biometric and histological analysis, presenting faster lesion contraction, quicker neoformation of epitelial and conjunctive tissue (with more collagen fibers).

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	i
Agradecimento ii	
Resumo iv	
Abstract v	
Índice de Tabelas viii	
Índice de Figuras ix	
Lista de Abreviaturas xi	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5

3.1 A pele	5
3.1.1 Epiderme	6
3.1.2 Derme	6
3.1.3 O tecido conjuntivo da derme	7
3.1.4 As células do tecido conjuntivo	8
3.1.5 A matriz extracelular	11
3.1.6 Colágeno como elemento da matriz extracelular	12
3.1.7 A síntese do colágeno	14
3.1.8 Hipoderme	16
3.2 Cicatrização	16
3.2.1 A cicatrização por segunda intenção	19
3.3 Fenômenos de interação da luz com a matéria	24
3.3.1 Absorção	24
3.3.2 Emissão espontânea	25
3.3.3 Emissão estimulada	26
3.4 Características da luz laser	28
3.4.1 Coerência	28
3.4.2 Monocromaticidade	28
3.4.3 Colimação	28
3.5 Parâmetros de tratamento	29
3.5.1 Comprimento de onda	31
3.5.2 Intensidade	32
3.5.3 Dose de tratamento	33
3.6 Modelos para a ação da bioestimulação laser	34
3.7 Estudos em animais e humanos	39
4 PARTE EXPERIMENTAL	44
5 RESULTADOS	50
5.1 Avaliação biométrica das lesões	50
5.1.1 Análise descritiva	50
5.1.2 Análise inferencial	53
5.2 Avaliação histológica das lesões	56
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÕES	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros de tratamento utilizados nesta pesquisa	48
Tabela 2 : Médias e Desvios Padrão (entre parêntesis) para o tamanho das lesões, em mm	50
Tabela 3 : Médias e Desvios Padrão(entre parênteses) para os percentuais dos tamanhos das lesões em relação aos tamanhos iniciais	51
Tabela 4 : Comparações múltiplas, pelo método LSD, para o percentual do tamanho original das lesões. As diferenças significativas estão hachuradas.	53
Tabela 5: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 3º dia.	54
Tabela 6: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 7º dia. As	

diferenças significativas estão hachuradas	54
Tabela 7: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 14 ^o dia. As diferenças significativas estão hachuradas	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da pele humana sadia (Adaptado por Ribeiro,2000).	6
Figura 2: Organelas presentes em uma célula (Adaptado por Ribeiro,2000).	8
Figura 3: Estriação das fibrilas de colágenos (Adaptado por Ribeiro,2000).	13
Figura 4: Estrutura tripla-hélice da molécula de colágeno (Adaptado por Ribeiro,2000).	14
Figura 5: Cicatrização por primeira intenção (Almeida-Lopes,1999).	18
Figura 6: Cicatrização por segunda intenção (Almeida-	

Lopes,1999).	19
Figura 7: Processo de absorção de um fóton.	25
Figura 8: Processo de emissão espontânea de fótons.	26
Figura 9: Processo de emissão estimulada.	27
Figura 10: formas de interação da luz com o tecido biológico(Adaptado por Ribeiro,2000).	29
Figura 11: Espectro de absorção de alguns cromóforos do tecido (Maldonado,2000).	31
Figura 12: Comprimento de onda de vários lasers utilizados em medicina, e espectro de absorção dos principais cromóforos de tecidos. A linha tracejada corresponde ao diodo laser utilizado neste trabalho(Maldonado,2000).	32
Figura 13: Modelo para a modulação de sistemas biológicos através da LILT(Smith,1991;traduzido por Ribeiro,2000).	37
Figura 14: Fonte e painel de controle do sistema laser utilizado	46
Figura 15: Ponta ativa	46
Figura 16:Raio do feixe em função da ponta ativa.	47
Figura 17: Aplicação pontual(Garcia,1992).	49
Figura 18: Espaçador utilizado na aplicação uniforme	49
Figura 19: Médias e desvios-padrão para o percentual do tamanho das lesões, em relação aos tamanhos iniciais, em função do tempo.	52
Figura 20: Documentação fotográfica do grupo 3 irradiado e grupo 1 controle	56
Figura 21: Fotomicrografia do grupo 1 no 3 ^o dia. A seta indica infiltrado linfoplasmocitário	58
Figura 22: Fotomicrografia do grupo 2 no 3 ^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.	58
Figura 23: Fotomicrografia do grupo 3 no 3 ^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.	59
Figura 24: Fotomicrografia do grupo 4 no 3 dia. A seta indica infiltrado linfo-plasmocitário.	59
Figura 25: Fotomicrografia do grupo 1 no 7 ^o dia. A seta indica infiltrado linfo-plasmocitário.	60
Figura 26: Fotomicrografia do grupo 2 no 7 ^o dia. A seta	

	indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.	60
Figura 27:	Fotomicrografia do grupo 3 no 7 ^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado e destaca-se (pontilhado) a invaginação do epitélio para aumentar a superfície de adesão	61
Figura 28:	Fotomicrografia do grupo 4 no 7 ^o dia. Destaca-se vascularização intensa do tecido conjuntivo.	61
Figura 29:	Fotomicrografia do grupo 1 no 14 ^o dia. Destacam-se epitélio e o tecido conjuntivo neo-formados.	62
Figura 30:	Fotomicrografia do grupo 2 no 14 ^o dia. Destacam-se secreção de queratina e pouca orientação celular do tecido conjuntivo.	62
Figura 31:	Fotomicrografia do grupo 3 no 14 ^o dia. A seta indica epitélio diferenciado, com suas respectivas camadas. Destaca-se também o tecido conjuntivo róseo (presença de fibras colágenas)	63
Figura 32:	Fotomicrografia do grupo 4 no 14 ^o dia. Destacam-se secreção de queratina e orientação celular no tecido conjuntivo.	63
Figura 33:	Fotomicrografia do grupo 2 no 14 ^o dia	64
Figura 34:	Fotomicrografia do grupo 4 no 14 ^o dia	65

LISTA DE ABREVIATURAS

Acrogramas

LASER: L(ight) A(mplification) by S(stimulated) E(mission) of R(adiation); amplificação da luz por emissão estimulada de radiação

LILT: L(ow) I(ntensity) L(aser) T(herapy), terapia com laser de baixa intensidade

MRI: M(agnetic) R(esonance) I(mage), imagem por ressonância

magnética

NMR: N(uclear) M(agnetic) R(essonance), ressonância magnética nuclear

Biologia

ATP:A(denosine) T(ri)P(hosfate), adenosina trifosfato

DNA: D(eoxyribo) N(ucleic A(CID)), ácido desoxirribonucléico

DTPA:D(iethylene)T(riamine)-P(entacetic) A(Cid), ácido etilenotriamino-pentaacético

FGF:F(ibroblast) G(rowth) F(actor), fator de crescimento de fibroblastos

G0: fase do ciclo celular em que as células permanecem bloqueadas num período anterior à síntese de DNA, que difere de um G1 típico (G= gap, intervalo)

G1: fase do ciclo celular anterior à síntese de DNA

HeLa:células de linhagem HeLa

IL-I(nter)L(eukin),interleucina

MRNA: RNA mensageiro

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NK: N(atural) K(illers), células naturais assassinas

PDGF: P(latelet) D(erived) G(rowth) F(actor), fator de crescimento derivado de plaquetas

RNA: R(ibo)N(ucleic) A(cid), ácido ribonucléico

TGF- T(ransforming G(rowth) F(actor), fator de crescimento transformante

TNF: T(umor) N(ecrosis) F(ACTOR), fator de necrose tumoral

Física

A: área

D: dose ou fluência

I: intensidade

λ : comprimento de onda

P: potência

P_m: potência média

T: tempo

Ca: cálcio

GaAs: galium arsenide, arseneto de gálio

GaAlAs: galium aluminum arsenide, arseneto de gálio e alumínio

H: hidrogênio

He-Ne: hélio e neônio

K: potássio

Na: sódio

Nd:YAG: matriz hospedeira YAG dopada com Nd

¹O₂: oxigênio singleto

YAG: Y(trium) A(luminum) G(arnet), granada de ítrio e alumínio;

Y3Al5O12: óxido de ítrio e alumínio

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

g: grama

Gy: Gray

J: Joule

ml: milímetro

mm: milímetro

mW: miliwatt

μ m: micrômetro

nm: nanômetro

s: segundo

W: Watt

1 INTRODUÇÃO

Em medicina e odontologia, busca-se procedimentos minimizadores da dor, ou edema, ou que estimulem a cicatrização com conseqüente ação antiinflamatória, ou ainda a bioestimulação⁽¹⁾ celular da área tratada. Uma enorme variedade de terapias tem surgido ao longo do tempo sempre que ocorrem avanços nas áreas tecnológicas.

Os efeitos de bioestimulação podem ser também provocados por irradiação luminosa de baixa intensidade, sendo conhecido seu efeito, sobre o processo de reparação dos tecidos.

Com o advento do primeiro laser (1960), iniciou-se uma série de desenvolvimentos para a sua utilização em procedimentos terapêuticos e cirúrgicos, tais como execução de cortes e vaporização de tecidos, termoterapias, etc... . Em especial, a irradiação utilizando feixes laser tem levado a resultados significativos também na área de bioestimulação.

Um dos pioneiros na pesquisa da aplicação do laser de baixa intensidade nas áreas biomédicas foi o Professor Endre Mester. Em 1966, seu grupo do hospital Semmelweis, em Budapeste, Hungria, publicou o primeiro trabalho científico referente aos efeitos não térmicos da luz laser sobre a pele de ratos. Nos anos seguintes, foram publicados vários artigos sobre o efeito do laser em feridas, assim como em cultura de leucócitos. Nestes trabalhos demonstrou-se que tanto células em cultura como lesões teciduais podem apresentar bioestimulação, utilizando-se uma certa dose de luz laser.

(1) Bioestimulação é um termo genérico aplicado a qualquer estímulo, agente ou ação que produza uma resposta fisiológica com aumento da atividade funcional.

É conhecido que esta terapia utilizando feixes laser em baixa intensidade não envolve interação térmica, ou seja, a energia dos fótons irá ocasionar efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e no tecido.

Se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas.

Esse efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem a sua função debilitada.(Karu,1989).

Estes efeitos benéficos da radiação laser nos tecidos se processam em diferentes formas: através da indução da atividade mitótica das células epiteliais, estimulando a microcirculação local (Cruães,1984), aumentando a atividade fibroblástica e a velocidade de formação de fibras (Silveira e Lopes,1991), e principalmente, aumentando a síntese de colágeno in vivo (Mester e Jaszagi-Nagy,1973).

Muitos estudos têm mostrado a utilização do laser em baixa intensidade em odontologia, promovendo uma recuperação mais rápida e menos dolorosa, nos casos de ulcerações aftosas, úlceras traumáticas, lesões herpéticas (Iwase et al.,1988, Silva et al.,1992, Eduardo et al., 1996),e em lesões resultantes de cirurgias bucais e exodontias (Pradelli, 1985).

Apesar destas pesquisas demonstrarem o poder de aceleração do processo de reparação tecidual, não existe ainda um modelo completo e suficiente para a compreensão destes efeitos, sendo de grande importância contribuições teórico-experimentais que busquem parâmetros ótimos em tempos viáveis para a prática clínica.

Utilizaremos a sigla *LILT*, proveniente da designação na língua inglesa "*Low Intensity Laser Therapy*", ou terapia laser em baixa intensidade, para referências às técnicas de bioestimulação

laser aqui consideradas.

2 OBJETIVOS

Avaliar biométrica e histologicamente o processo de cicatrização de lesões cutâneas submetidas à radiação laser, utilizando-se o feixe proveniente de um diodo laser de GaAlAs ($\lambda=830\text{nm}$), comparando diferentes modos de aplicação e densidades de energia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A pele

A pele recobre a superfície do corpo e constitui-se de uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes. A Figura 1 mostra a anatomia da pele humana sadia.

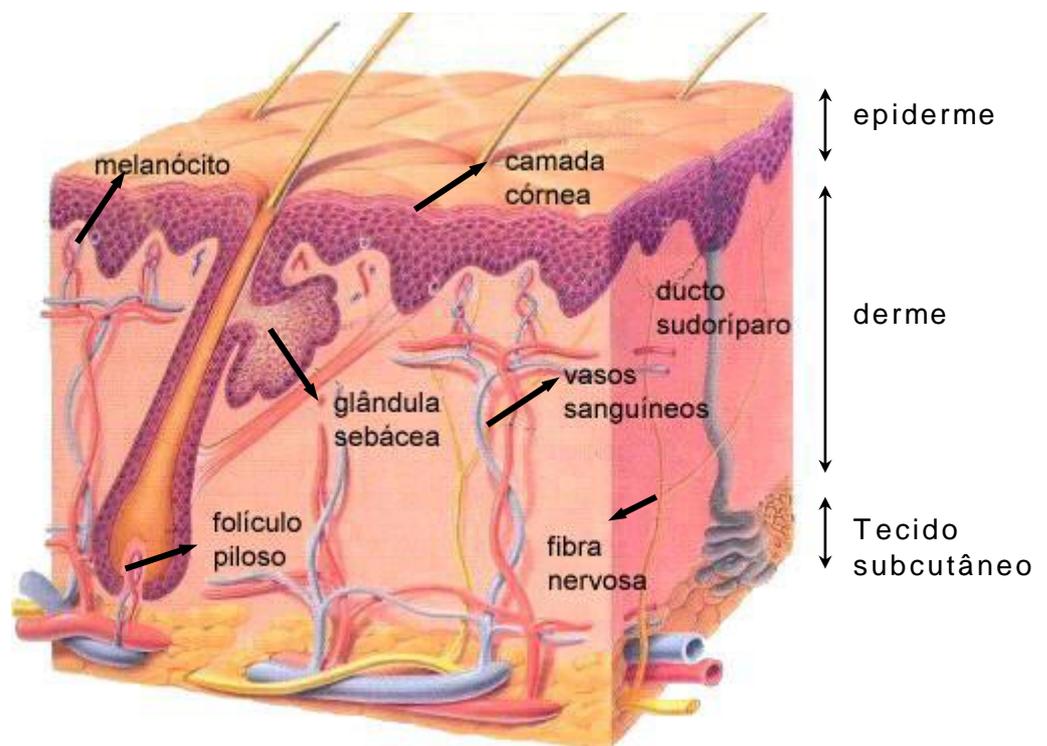


Figura 1: Anatomia da pele humana sadia (Adaptado por Ribeiro,2000).

3.1.1 Epiderme

É constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Além desse epitélio, a epiderme apresenta ainda três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans e de Merkel.

Os melanócitos são as células que produzem o pigmento melanina, protetor contra os raios ultravioleta. As células de Langerhans fazem parte do sistema imunitário e originam-se de células precursoras trazidas da medula óssea pelo sangue. As células de Merkel são tidas como mecanorreceptores. Esta interpretação, no entanto, não é universalmente aceita. Alguns pesquisadores acreditam que as células de Merkel sejam secretoras de hormônios (Junqueira & Carneiro,1995).

A espessura e estrutura da epiderme variam com o local estudado, e ela apresenta, da derme para a sua superfície, as camadas basal ou germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Nas regiões onde a epiderme é mais fina e mais simples, freqüentemente faltam as camadas granulosa e lúcida, bem como a camada córnea é mais reduzida.

3.1.2 Derme

É o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. A derme apresenta espessura variável de acordo com a região observada. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. Essas saliências recebem o nome de papilas dérmicas. Acredita-se que a função das papilas seja aumentar a zona de contato derme-epiderme, trazendo maior resistência à pele (Junqueira & Carneiro,1995).

Descrevem-se na derme duas camadas, de limites poucos

distintos, que são a papilar e a reticular. A camada papilar, mais superficial, é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo. Nesta camada, observam-se fibrilas especiais de colágeno, que se inserem na membrana basal e penetram profundamente na derme. Estas fibrilas teriam a função de prender a derme à epiderme.

A camada reticular, mais profunda, é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso e apresenta, portanto, menos células e fibras colágenas mais abundantes e espessas do que a camada papilar. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, responsáveis em parte pelas características de elasticidade da pele. Além dos vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, também são encontradas na derme as seguintes estruturas derivadas da epiderme: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas.

3.1.3 O tecido conjuntivo da derme

Os tecidos são constituídos por células mais a matriz extracelular. A matriz extracelular, também chamada interstício, é quase inexistente em alguns tecidos, porém em outros é abundante e contém estruturas e moléculas importantes do ponto de vista estrutural e funcional.

O tecido conjuntivo, em particular, caracteriza-se, morfológicamente, por apresentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por elas. Esse material é representado por uma parte com estrutura microscópica definida, as fibras do conjuntivo, e por uma parte não-estruturada, a substância fundamental amorfa. Banhando as células, as fibras e a substância amorfa, há uma pequena quantidade de fluido, o plasma intersticial.

As fibras do tecido conjuntivo são de três tipos principais: colágenas, reticulares e elásticas. Como as fibras colágenas e as reticulares são constituídas pela proteína colágeno, existem na

realidade dois sistemas de fibras: o sistema colágeno e o sistema elástico. Na ferida em processo de cicatrização, as fibras distribuem-se inicialmente de modo randômico. (Smith et.al.,1985)

3.1.4 As células do tecido conjuntivo

O conjuntivo possui células próprias e células vindas do sangue. A divisão de trabalho entre as células do conjuntivo determina o aparecimento de vários tipos celulares, cada um com características morfológicas e funcionais próprias. Essas células são: fibroblasto, macrófago, mastócito, plasmócito, célula adiposa e leucócito. A Figura 2 mostra as principais organelas de uma célula.

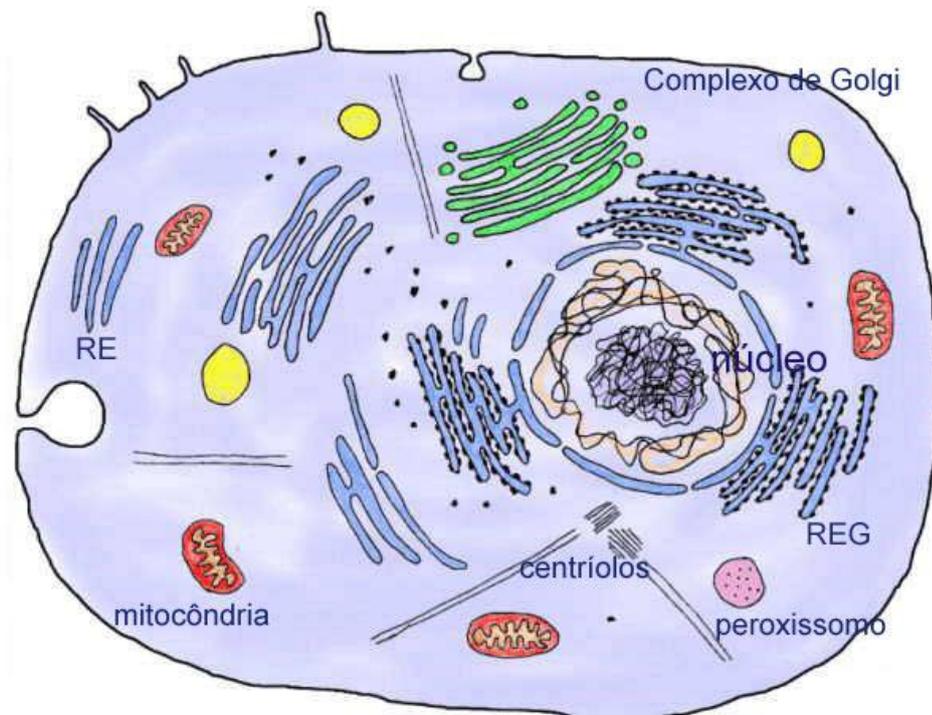


Figura 2: Organelas presentes em uma célula (Adaptado por Ribeiro,2000).

O fibroblasto sintetiza colágeno, elastina, proteoglicanas e

glicoproteínas estruturais. É a célula mais comum no tecido conjuntivo e a principal responsável pela formação das fibras e do material intercelular amorfo.

É uma célula dotada de mobilidade, porém sua movimentação é muito lenta. Há dois tipos extremos de fibroblastos, separados por tipos intermediários. A célula, em intensa atividade sintética, tem morfologia diferente do fibroblasto que já sintetizou muito e que se situa entre as fibras por ele fabricadas. Certos autores reservam a designação de fibroblasto para a célula mais ativa, chamando a célula “inativa” de fibrócito (Junqueira & Carneiro, 1995).

Havendo um estímulo adequado, como ocorre nos processos de cicatrização, o fibrócito pode voltar a sintetizar fibras, reassumindo o aspecto descrito para o fibroblasto. Na cicatrização dos ferimentos, aparece uma célula chamada miofibroblasto, com características intermediárias entre fibroblasto e a célula muscular lisa. Essas células têm a morfologia do fibroblasto, mas contêm grande quantidade de microfilamentos de actina e contêm também miosina. Os miofibroblastos participam do fechamento dos ferimentos, pela contração da cicatriz formada (Junqueira, 1995; Costa, 1999; Berry, 1998). No conjuntivo do adulto, os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando ocorre uma solicitação, como por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo.

O macrófago é uma célula polifuncional oriunda dos monócitos do sangue. Tem grande capacidade de fagocitose e sua morfologia é variável conforme seu estado funcional e sua localização. Os macrófagos podem estar fixos ou em movimento amebóide e atuam como elementos de defesa. Fagocitam restos de células, material intercelular alterado, bactérias e partículas inertes que penetram no organismo. Quando estimulados (por exemplo, nas

infecções), os macrófagos passam por modificações morfológicas e metabólicas, sendo chamados macrófagos ativados. Essas células têm maior atividade fagocitária, maior capacidade de matar e digerir partículas estranhas, produção de lisossomos aumentada e secretam diversas substâncias que participam do processo defensivo atraindo leucócitos e estimulando a atividade de outras células.

O mastócito é uma célula globosa, grande e com citoplasma carregado de grânulos basófilos. A principal função dos mastócitos é produzir e armazenar potentes mediadores químicos do processo inflamatório. Os grânulos dos mastócitos são metacromáticos pois contêm heparina, uma substância anticoagulante, ou então sulfato de condroitina, glicosaminoglicanas sulfatadas. Além de heparina, esses grânulos contêm outros mediadores químicos da inflamação, como a histamina.

O plasmócito se origina do linfócito B ativado e produz anticorpos. São células ovóides e pouco numerosas no conjuntivo normal, exceto nos locais sujeitos à penetração de bactérias e proteínas estranhas, mas aparecem em grande quantidade nas áreas onde existe inflamação crônica.

As células adiposas se originam no embrião, a partir dos lipoblastos. Estas células são parecidas com os fibroblastos, porém logo acumulam gordura no seu citoplasma. As gotículas lipídicas são inicialmente separadas umas das outras, mas depois se fundem, formando gotícula única; característica da célula adiposa unilocular.

Os leucócitos ou glóbulos brancos são constituintes normais do tecido conjuntivo vindos do sangue por migração através da parede dos capilares e vênulas (diapedese). Os leucócitos mais freqüentes no tecido conjuntivo são os neutrófilos eosinófilos e os linfócitos.

3.1.5 A matriz extracelular

A matriz extracelular é o todo do conteúdo do tecido que está fora das células que o compõe. É composta por um conjunto heterogêneo de macromoléculas produzidas pelas próprias células dos tecidos. O tipo de macromolécula, bem como sua organização e quantidade relativa, determinam as propriedades físicas e funcionais dos tecidos. A matriz pode constituir a maioria do tecido como por exemplo na pele, ossos ou cartilagem, ou a minoria, como no tecido nervoso. Atualmente, sabe-se que a matriz não é apenas um componente passivo do tecido, mas pelo contrário, pode influenciar a suas células no que diz respeito a vários fenômenos biológicos importantes como migração, proliferação, desenvolvimento, forma e função (Junqueira & Carneiro, 2000). Didaticamente, pode-se dividir as macromoléculas da matriz em duas classes distintas: fibrilares e não-fibrilares.

Os componentes fibrilares podem ser subdivididos em dois subgrupos, as proteínas estruturais e as de adesão, também chamadas glicoproteínas de matriz. As proteínas estruturais são, principalmente, o colágeno e a elastina. O colágeno confere resistência têncil ao tecido e a elastina, sua elasticidade. As proteínas de adesão promovem a ligação das células aos diferentes elementos da matriz. Pode-se citar como exemplo a laminina, que une as células epiteliais à sua membrana basal, e a fibronectina, que liga e promove a adesão dos fibroblastos com a matriz extracelular do tecido conjuntivo através de um grupo especial de proteínas integrais da membrana chamadas de integrinas.

Os componentes não-fibrilares são representados pelas glicosaminoglicanas e proteoglicanas. As primeiras são polissacarídeos de alto peso molecular e grande quantidade de cargas negativas. As glicosaminoglicanas são encontradas, em sua

maioria ligadas a proteínas e, neste caso denominam-se proteoglicanas. Tais moléculas promovem um meio hidratado, similar a um gel, que permite livremente a difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a corrente sanguínea e as células, além de conferir resistência compressiva aos tecidos.

3.1.6 Colágeno como elemento da matriz extracelular

Como componente majoritário da matriz extracelular da pele e ossos, os colágenos são as proteínas mais abundantes nos mamíferos, respondendo por 25% da massa protéica total do organismo.

No estado fresco, as fibras colágenas são brancas, conferindo essa cor aos tecidos nos quais predominam, e são birrefringentes, pois são constituídas por fibras alongadas e paralelas. Em muitos tecidos aparecem agrupadas em arranjo paralelo, formando feixes de fibras colágenas.

No microscópio eletrônico, verifica-se que as fibrilas colágenas apresentam uma estriação transversal típica. Essa estriação aparece como períodos de 67nm, cada período formado por duas faixas, uma clara e outra escura, conforme exemplifica a Figura 3. Observadas no microscópio de luz, as fibras colágenas são acidófilas, corando-se de róseo pela técnica da hematoxilina-eosina.

As fibras colágenas são constituídas por uma glicoproteína estrutural denominada colágeno, que tem composição de aminoácidos bem características.

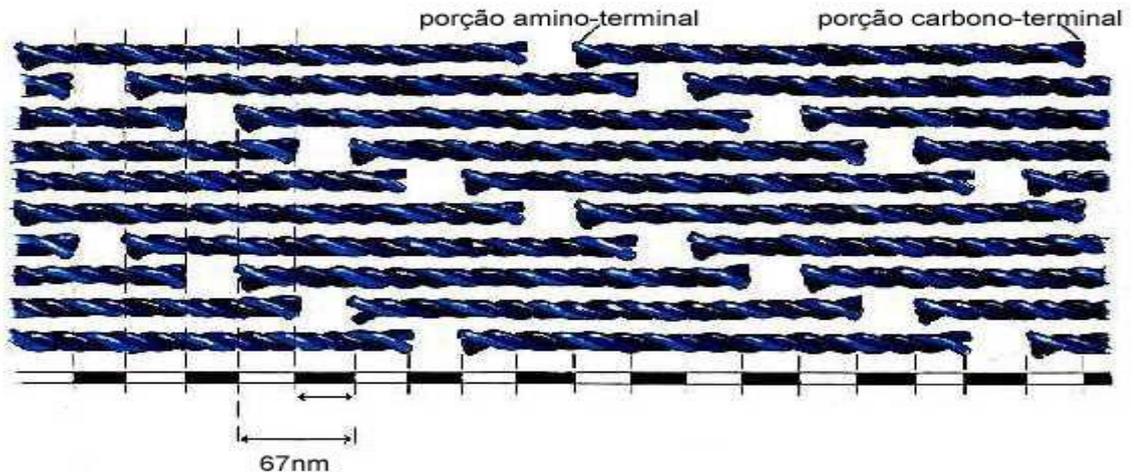


Figura 3: Estriação das fibrilas de colágenos (Adaptado por Ribeiro,2000).

A molécula do colágeno é constituída por três cadeias, denominadas cadeias- α (ver Figura 4). Cada uma delas é composta pela combinação de três aminoácidos sintetizados em seqüência repetidamente, sendo o primeiro deles sempre a glicina.

Estas três cadeias são enroladas em torno uma das outras formando uma tripla-hélice. A riqueza de glicina (33,5% dos aminoácidos totais do colágeno) e de prolina/hidroxiprolina (12%/10%). Confere propriedades especiais à tripla-hélice, graças as suas características moleculares. O primeiro, por ser o menor aminoácido existente permite uma aproximação maior entre as cadeias- α , mantendo –as bem unidas, e o segundo, devido a sua estrutura molecular cíclica, permite uma maior estabilidade helicoidal a cada cadeia- α .

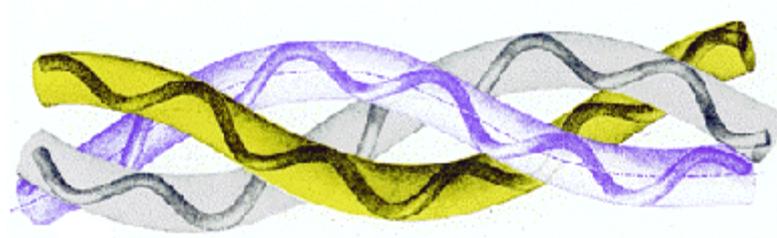


Figura 4: Estrutura tripla-hélice da molécula de colágeno (Adaptado por Ribeiro,2000).

Devido as inúmeras combinações possíveis dos três aminoácidos iniciais, poderia, teoricamente existir mais de 10.000 subtipos de colágeno, contudo, até hoje foram descobertos por volta de 21 subtipos apenas, nomeados com algarismos romanos (exemplo: colágeno tipo I, tipo II, tipo III, etc.). O colágeno tipo I representa mais de 90% do colágeno total e é o principal colágeno da pele e ossos (Junqueira & Carneiro,1995).

3.1.7 A síntese do colágeno

O gene que codifica a cadeia- α do colágeno do tipo I (cuja estrutura molecular é a mais conhecida) tem aproximadamente 44 quilobases de comprimento, com 50 éxons (partes da molécula de um pré mRNA que vão codificar uma cadeia polipeptídica) em média. A maioria dos éxons contém 54 nucleotídeos ou seus múltiplos de comprimento o que sugere que durante a evolução, houve várias duplicações de um gene primordial de colágeno que continha esses 54 nucleotídeos. Estes 54 nucleotídeos codificam exatamente seis seqüências de três aminoácidos, cada uma iniciando-se pela glicina.

Uma vez sintetizado o mRNA , este migra em direção ao retículo endoplasmático rugoso, onde formará polirribossomos que sintetizarão as cadeias- α para dentro do lúmen reticular. Tais

cadeias- α , à medida que são sintetizadas, sofrem hidroxilação de alguns resíduos de lisina e prolina selecionados para tal.

Outra característica importante é que tanto na porção amino-terminal, quanto na porção carbono-terminal, são sintetizados aminoácidos adicionais denominados peptídeos de registro. Esses alinham as cadeias- α entre si de modo a formar a tripla-hélice e a impede de polimerizar (formar fibrilas) com as outras tripla-hélices intracelularmente. A tripla-hélice já formada, ainda com os peptídeos de registro, é denominada procolágeno.

Posteriormente, as moléculas de procolágeno são transportadas ao complexo de Golgi, onde são separadas em vesículas de secreção e transportadas para a periferia da célula por microtúbulos do citoesqueleto celular. Ao sofrerem exocitose, ou seja, agora no meio extracelular, as moléculas de procolágeno sofrem ação da enzima procolágeno peptidase, que separa as cadeias- α dos seus peptídeos de registro. A tripla-hélice, agora denominada tropocolágeno, sofre polimerização umas com as outras, formando as fibrilas de colágeno.

As características da polimerização do tropocolágeno promovem regiões periódicas (a cada 67 nm), onde ocorrem sobreposição de várias moléculas de tropocolágeno ao longo de toda a espessura da fibrila, ao lado de regiões que apresentam espaços livres entre duas dessas moléculas. Dentro de cada fibrila ocorrem ligações cruzadas entre os resíduos de lisina intramolecularmente (dentro da mesma molécula de tropocolágeno). Quanto maior o número dessas ligações, maior será a resistência tênsil que o tecido poderá suportar.

As fibrilas são, então, organizadas segundo a orientação desejada e segundo a função que desempenham no tecido. A célula é a responsável por tal organização e para isso dispõe de dois mecanismos:

- Através da síntese de outros componentes da matriz, que influenciam na orientação das fibrilas de colágeno e as secretam junto ao procolágeno. Assim, eles agem sobre as fibrilas recém-sintetizadas, orientando-as segundo a necessidade do tecido;
 - Através da tração mecânica das fibrilas, com a formação de recessos citoplasmáticos ou migração celular
- Finalmente, após orientar um grupo de fibrilas na mesma direção, esse grupo pode ser chamado de fibras de colágeno e num estágio mais tardio as fibras podem ser organizadas formando verdadeiros cabos na matriz extracelular denominados feixes, ou serem organizadas em camadas com orientações tridimensionais diferentes, umas sobre as outras, que formam a estrutura da maioria dos órgãos.

3.1.8 Hipoderme

É formada por tecido conjuntivo frouxo, que une de maneira pouco firme a derme aos órgãos subjacentes. É a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas na qual se apóia. Dependendo da região em estudo e do grau de nutrição do organismo, a hipoderme poderá ter uma camada variável de tecido adiposo que, quando desenvolvida, constitui o pânículo adiposo.

3.2 Cicatrização

Cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, sendo semelhante quer a lesão tenha sido traumática, quer causada por necrose. Em ambos os casos, o primeiro passo é a instalação de uma reação inflamatória, cujo exsudato que resulta no tecido conjuntivo cicatricial de células fagocitárias reabsorve o sangue extravasado e

os produtos da destruição tecidual. Em seguida, há proliferação fibroblástica e endotelial (Pereira,1998).

A cicatrização inicia-se, portanto, na fase inflamatória, manifestada pela presença constante de macrófagos no local, que fagocitam e digerem restos celulares presentes na área. A real atividade reparativa é atingida através do tecido especializado (tecido de granulação), que está bem formado de três a cinco dias após o início do processo. O tecido de granulação é a marca registrada do processo da cicatrização na inflamação. É constituído pela proliferação de vasos sangüíneos de neoformação (angiogênese), derivados daqueles pré-existentes na área, fibroblastos e células inflamatórias agudas e crônicas.

O reparo final consiste da substituição do tecido lesado por células do mesmo tipo, algumas vezes, não deixando qualquer resíduo da lesão inicial, e da substituição por um tecido conjuntivo, que no seu estado permanente constitui uma cicatriz (Robbins et. al.,1986).

A lesão pode ainda ser classificada em incisional, onde as bordas da ferida se mantêm em contato, como é o caso das feridas cirúrgicas, lineares, onde os bordos são aproximados através de suturas ou esparadrapos.

Em lesões excisionais, os bordos se tornam afastados em consequência da perda de parte dos tecidos da pele. A perda do epitélio e parte da derme superficial pode levar à formação de úlcera. O primeiro caso é denominado cicatrização por primeira intenção e no segundo caso, por segunda intenção. Esta classificação é importante, pois fenômenos diferentes ocorrem em cada tipo de cicatrização (Robbins,1986).

Na cicatrização por primeira intenção ou união primária, a cicatrização ocorre sem contaminação bacteriana significativa e com um mínimo de perda do tecido. Quando há perda mais extensa de

células e tecido, tal como ocorre na superfície dos ferimentos com perda de substância, o processo reparador é mais complicado e a perda de substância deve ser preenchida.

A regeneração das células parenquimais não consegue reconstituir a arquitetura original. O tecido de granulação cresce a partir das margens para completar o reparo. Esta forma de cicatrização é referida como união secundária ou cicatrização por segunda intenção. As Figura 5 e Figura 6 mostram uma representação artística para cicatrização por primeira e segunda intenção, respectivamente.

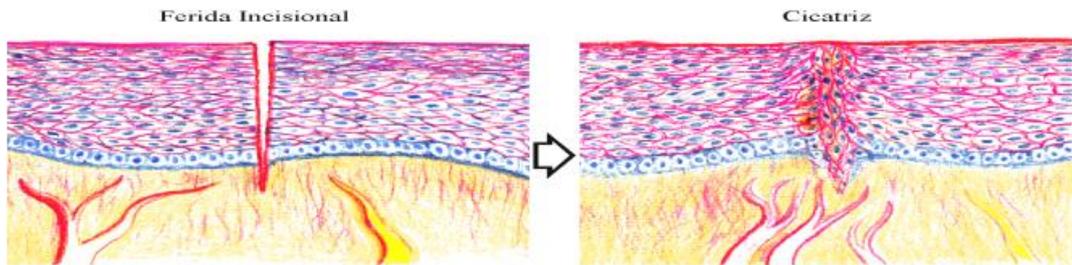


Figura 5: Cicatrização por primeira intenção (Almeida-Lopes,1999).

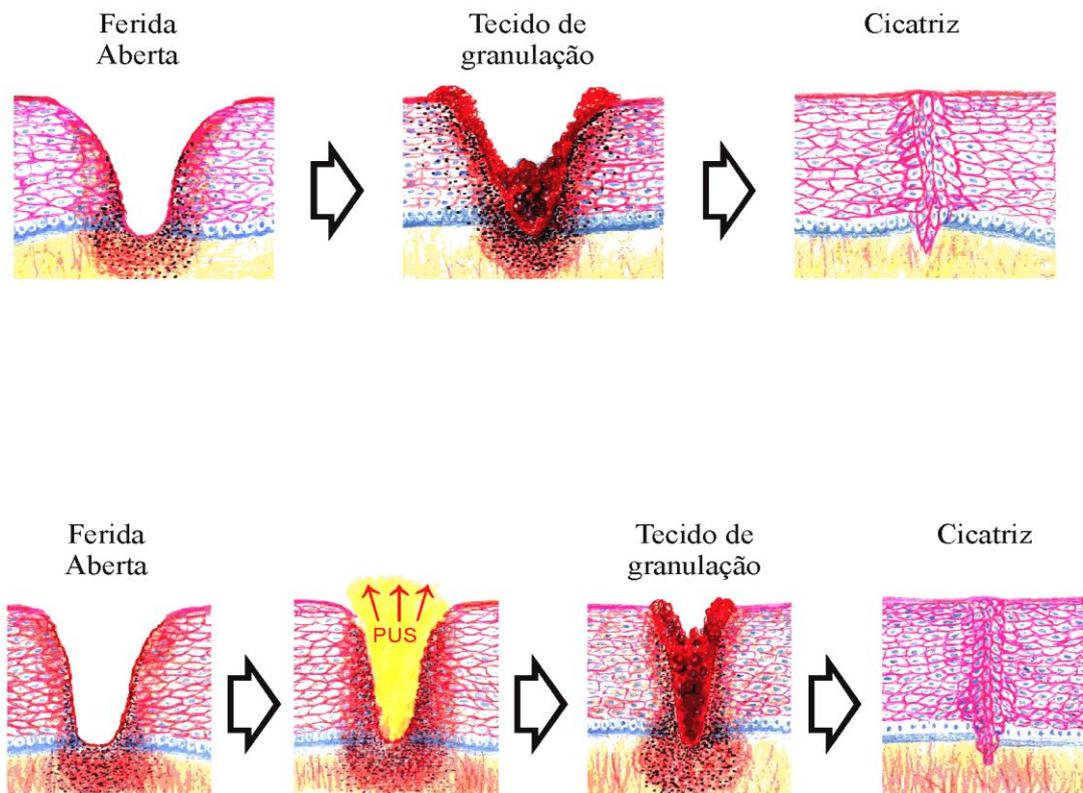


Figura 6: Cicatrização por segunda intenção (Almeida-Lopes,1999).

No nosso experimento, a lesão foi feita com um punch de 8mm de diâmetro, ferida excisional. Neste caso, a cicatrização se dá por segunda intenção.

3.2.1 A cicatrização por segunda intenção

Fase inflamatória

Após injúria tecidual, ocorrendo dilaceração da pele por acidente ou finalidade cirúrgica, inicia-se uma série ordenada de eventos biológicos que servem não apenas para conter a lesão, mas também para preparar as células que não foram danificadas permanentemente para a replicação necessária para a substituição das células mortas.

A seqüência de eventos que tem como objetivo imediato a reparação dos tecidos danificados pode ser dividida em 3 fases:

uma fase inicial que consiste em inflamação, seguida de um estágio de fibroplasia , e acompanhada de remodelagem tecidual e formação de cicatriz. (Robbins et al., 1984)

Nos primeiros momentos da lesão, há o rompimento de pequenos vasos sangüíneos, que causa o extravasamento do sangue e a conseqüente formação de um coágulo. Para que o coágulo se forme, ocorre a ativação de plaquetas, que além de formar o trombo, liberam várias substâncias ativas no local da lesão. Essas substâncias e outras liberadas pelo tecido danificado vão funcionar como quimiotáticos e vasoativos, que promovem a exsudação de fagócitos do sangue para as margens da lesão.

Os estímulos mais importantes são os fibrinopeptídeos gerados pela fibrinólise, as quimiocinas liberadas pelas plaquetas e monócitos do coágulo, e IL-1 e TNF- α , produzidos por macrófagos e monócitos. Aproximadamente seis horas depois, a margem da ferida contém fagócitos, e por volta de vinte e quatro horas, o coágulo já está invadido por essas células, com predomínio dos neutrófilos.

Esses tipos celulares têm como função fagocitar e digerir microorganismos invasores, bem como restos de células mortas. Com quarenta e oito horas, o número de neutrófilos diminui sensivelmente, passando o exsudato a ser constituído predominantemente por macrófagos.

Os macrófagos liberam uma grande quantidade de substâncias (enzimas, citocinas, fatores de crescimento, substâncias vaso ativas e fatores quimiotáticos), que vão atrair outras células inflamatórias e iniciar a formação do tecido de granulação (Pereira,1998). Estimuladas pela falta da célula vizinha morta na lesão, as células da borda do epitélio (queratinócitos) se rediferenciam, tornando-se capazes de apoiar-se na rede de fibrina, adquirir capacidade de migração lateral e fagocitar o exsudato em

seu caminho.

Células endoteliais de capilares crescem em direção ao meio da lesão de ambas as bordas da ferida, em resposta a fatores angiogênicos, TNF- α pelos macrófagos e o metabolismo anaeróbio local é responsável pela produção de lactato.

Formação do tecido de granulação

A formação do tecido de granulação envolve o acúmulo de macrófagos, a proliferação de fibroblastos, a deposição de matriz extracelular e a angiogênese.

Nesta fase portanto , os macrófagos presentes já são maioria. A partir deste momento, os macrófagos controlam o processo de cicatrização através da secreção de fatores de crescimento. Os fibroblastos estão totalmente ativados, proliferando e produzindo fibrilas de colágenos tipo III na fase inicial da cicatrização, e proteoglicanas. Entretanto, por razões ainda desconhecidas, produzem poucas fibras elásticas.(Costa,1999)

Os fibroblastos, apoiando-se na rede de fibrina presente no exsudato destas células, estimulados pelo PDGF liberado, proliferam, migram para o centro da lesão, depositam matriz extracelular e causam a retração da ferida. A matriz extracelular sintetizada pelos fibroblastos serve como substrato para a migração de macrófagos, células angiogênicas e outros fibroblastos.

Nesta fase, começa a substituição da matriz extracelular antiga e lesada por uma matriz nova recém-sintetizada. A produção de colágeno é estimulada por fatores de crescimento (PDGF,FGF e TGF- β) e citocinas (IL-1, IL-4), estas últimas secretadas por leucócitos e fibroblastos ativados no local. Um ponto a ser destacado neste processo é que tão importante quanto a produção

de matriz nova é a degradação da matriz antiga. O resultado final da cicatrização vai depender de um equilibrado balanço entre produção e degradação de componentes da matriz extracelular.(Costa,1999)

A degradação da matriz ocorre nos espaços extracelulares através da ação de uma família de enzimas proteolíticas denominadas metaloproteinasas. As metaloproteinasas são produzidas por vários tipos celulares como fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, e sua secreção é estimulada por fatores de crescimento presentes localmente como o PDGF e o FGF, citocinas como a IL-1 e TNF- α , e estímulo fagocitário.

O processo de migração epitelial é lento (em torno de 0,5 mm/dia), de modo que para diminuir o tempo de ferida aberta e exposta, o tecido de granulação dispõe de dois mecanismos que promovem um fechamento mais rápido da ferida através de sua contração.

O primeiro processo é representado pelo exsudato que, ao secar em contato com o meio ambiente, encolhe e traciona as bordas da lesão, uma em direção à outra; o segundo e mais importante processo ocorre através do aparecimento e contração dos miofibroblastos. Miofibroblastos são fibroblastos que se rediferenciam e passam a sintetizar proteínas contráteis intracelulares semelhantes às do músculo liso, adquirindo a capacidade de contração.

Até hoje, não se sabe o que estimula essa rediferenciação dos fibroblastos, mas acredita-se que existam fatores físicos e químicos envolvidos (Costa,1999). Dessa forma, estando ligados uns aos outros e ao estroma, a sua contração promove a aproximação das bordas da ferida.

Remodelagem do tecido

A última etapa do processo de reparo é também a mais longa. Como as anteriores, é contínua e se inicia com a retirada do ácido hialurônico e fibronectina ainda durante a formação do tecido de granulação, seguida pela deposição de colágenos (principalmente tipo III, mas também tipos I e V) e outros componentes da matriz extracelular. Ocorre a proliferação dos vasos linfáticos, os macrófagos começam a fagocitar a fibrina, o epitélio está quase fechado e, mais importante, intensifica-se a produção do colágeno tipo I pelos fibroblastos, o que macroscopicamente fornece à ferida uma aparência cicatricial.

Posteriormente, muitos vasos e células desaparecem através da apoptose (destruição programada da célula), o que torna a cicatriz cada vez mais pálida. O colágeno torna-se mais resistente através do aumento do número de ligações cruzadas entre suas moléculas, apesar de manter ainda um alto *turnover*. As fibras elásticas continuam escassas. Eosinófilos podem ser vistos nesta fase, mas não se sabe exatamente a sua função, apenas especula-se que liberam fatores de crescimento. (Pereira, 1998)

Uma cicatriz nunca atinge a mesma resistência tênsil que o tecido original possuía, podendo chegar no máximo, até 70-80% da resistência original ao final do processo. (Pereira, 1998)

Para entender como a luz laser de baixa intensidade atua nesse processo de reparação de lesões, é necessário conhecer a estrutura normal dos tecidos envolvidos na injúria e os estágios envolvidos no reparo destes tecidos.

Os efeitos da LILT nos eventos celulares, que ocorrem durante a cicatrização de lesões agudas da pele, é importante no entendimento dos mecanismos que agem nesse processo. Estes estimulam a atividade celular, conduzindo à liberação de fatores de crescimento por macrófagos (Young, 1989), proliferação de queratinócitos (Haas, 1990 Yu, 1996), aumento da população e

desgranulação de mastócitos (El Sayed,1996 Trelles, 2000) e angiogênese(Sroka et al., 1999; Bisht et al.;1994 Túner et al., 1998).

Esses efeitos podem levar a uma aceleração no processo de cicatrização de lesões, devido, em parte, à redução na duração da inflamação aguda, resultando em uma entrada mais rápida no estágio proliferativo de reparo, quando o tecido de granulação é produzido.

3.3 Fenômenos de interação da luz com a matéria

3.3.1 Absorção

Os elétrons que gravitam em torno do núcleo de um átomo podem ocupar diferentes órbitas de posições bem conhecidas. A passagem de um elétron de uma posição para outra mais afastada do núcleo corresponde a um aumento de energia interna do átomo.

Denomina-se estado fundamental o estado que corresponde à energia mínima. Os outros estados, de energia superior àquela do estado fundamental, são estados “excitados”. A passagem do estado fundamental (E1) para o estado excitado (E2) realiza-se pela absorção de uma energia exterior ao átomo. O átomo submetido a um campo eletromagnético pode absorver um fóton com uma determinada frequência e ser conduzido do estado E1, de menor energia, para E2. Tal processo é chamado de absorção (Maillet,1987),conforme exemplifica a Figura 7.

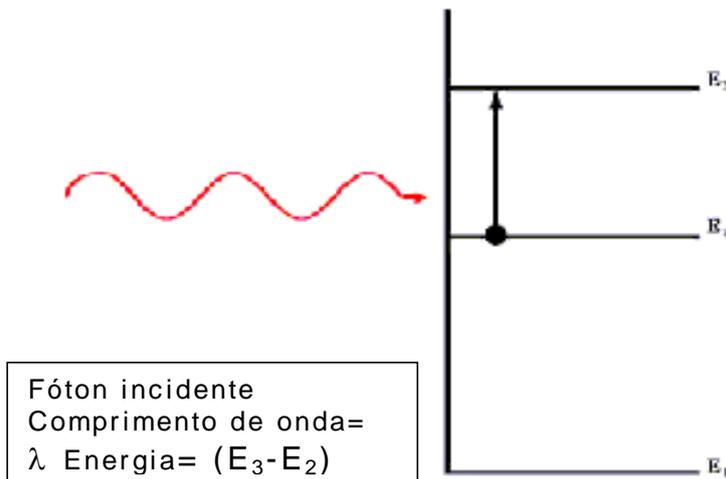


Figura 7: Processo de absorção de um fóton.

3.3.2 Emissão espontânea

A energia adquirida pelo átomo excitado poderá ser perdida espontaneamente por transição de um nível superior E2 para um nível inferior E1, e dar lugar à emissão de uma onda eletromagnética de determinada frequência. A emissão espontânea ocorre quando um átomo efetua espontaneamente a transição de um estado excitado E2 para um estado de menor energia E1, emitindo um quantum de energia, conforme exemplifica a Figura 8.

A emissão espontânea é incoerente, não existindo relação de fase, direção ou de polarização entre todas essas emissões, e a radiação é multidirecional. A emissão espontânea coletiva dá origem à fosforescência ou luminescência, do tipo observado nos interruptores luminosos.

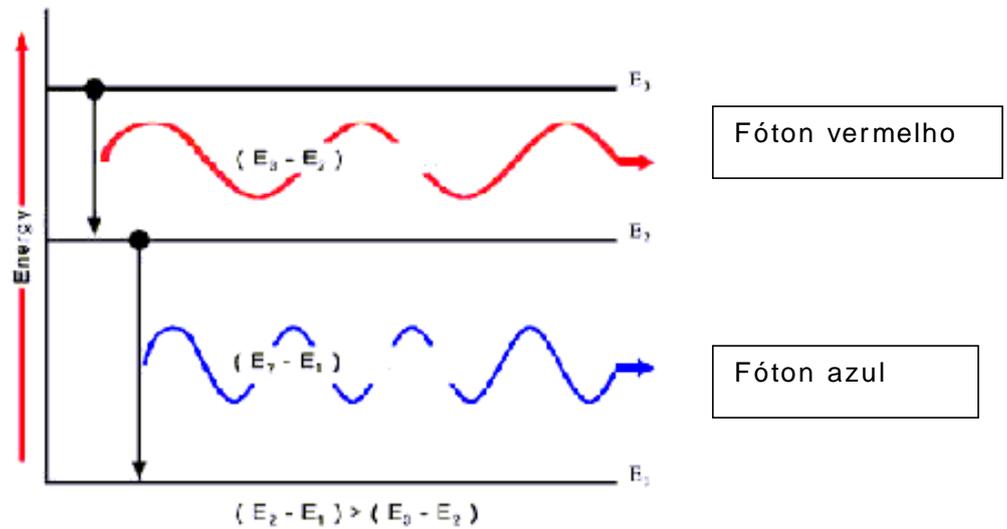


Figura 8: Processo de emissão espontânea de fótons.

3.3.3 Emissão estimulada

A emissão estimulada é provocada pela chegada de um fóton, de energia igual àquela possível de ser liberada pelo átomo, que retorna do nível superior E_2 ao nível inferior E_1 , ou seja, deve ter a mesma frequência que o fóton cuja emissão ele vai induzir resultando em dois fótons induzidos. A Figura 9 retrata este processo.

Assim se prepararmos convenientemente o sistema de tal forma que ele possua a população no estado de maior energia, maior que a população do estado de menor energia, podemos ter amplificação óptica. Isso só ocorre quando houver inversão de população.

Essa inversão estimulada possui propriedades notáveis: as radiações induzidas e indutoras têm a mesma fase, a mesma direção e a mesma frequência. Portanto, não existe qualquer discriminação física possível entre o fóton indutor e o fóton induzido, e tudo ocorre como se houvesse uma verdadeira

“Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”. É esta, portanto, a explicação do termo “LASER”(Maillet ,1987).

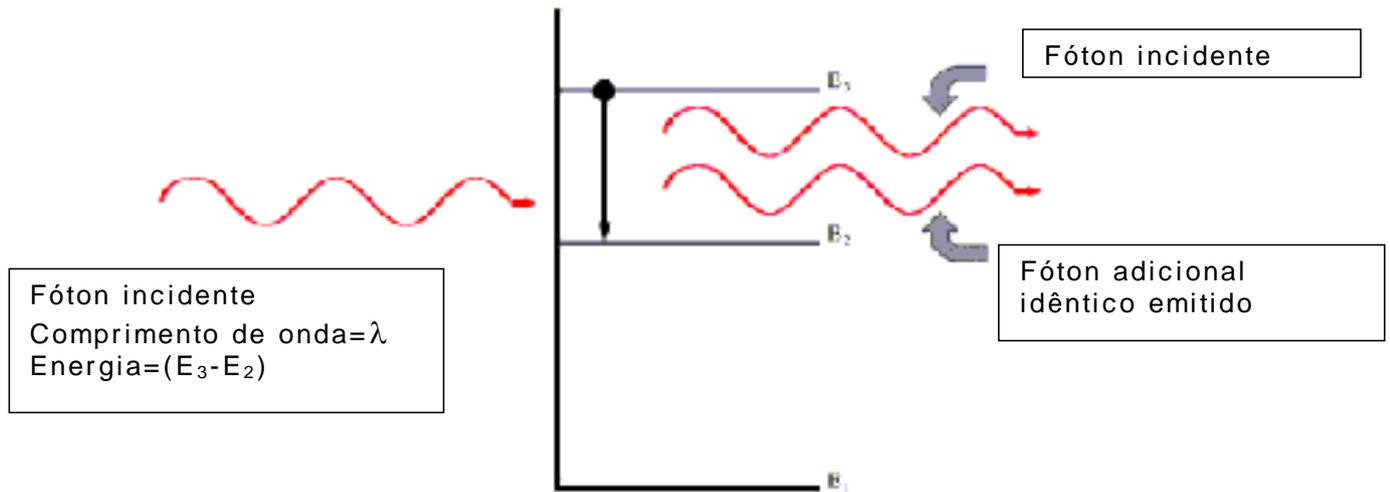


Figura 9: Processo de emissão estimulada.

3.4 Características da luz laser

3.4.1 Coerência

É quando os fótons se propagam em fase no tempo e no espaço. A coerência proporciona à radiação um único caminho para o qual todas as ondas caminham de forma ordenada no espaço. A superfície emissora de um laser é constituída pela lâmina semi-refletora que forma uma das extremidades da cavidade ressonante.

Tal propriedade de vibração em fase, em todos os pontos dessa superfície, denomina-se coerência espacial. Assim a emissão coerente permite que se obtenham enormes concentrações de energia por unidade de superfície.

A coerência temporal está relacionada ao comprimento de coerência dos lasers que pode ser medida em metros chegando, muitas vezes, a quilômetros.

Uma lâmpada comum não apresenta o fenômeno de coerência, uma vez que ao produzir emissão espontânea de luz, essas ondas deixam a fonte de maneira desordenada, com direção e sentidos diversos, caminhando cada uma para um local diferente.

3.4.2 Monocromaticidade

Ocorre quando fótons estimulam fótons da mesma frequência.

A luz branca comum é uma mistura de cores e quando atravessa um prisma, forma um espectro visível ao olho humano que varia do vermelho ao violeta.

A luz laser consiste de ondas que possuem um comprimento específico e, portanto, com uma única cor.

3.4.3 Colimação

Ocorre quando os fótons se propagam em fase no tempo e

no espaço.

Devido ao fato de que cada fóton emitido possui o mesmo comprimento de onda, o feixe laser sairá paralelo por conta do pequeno ângulo de divergência e também unidirecional.

3.5 Parâmetros de tratamento

A luz interage com um tecido biológico de quatro formas: reflexão, transmissão, absorção e espalhamento. A Figura 10 retrata a interação da radiação com a pele.

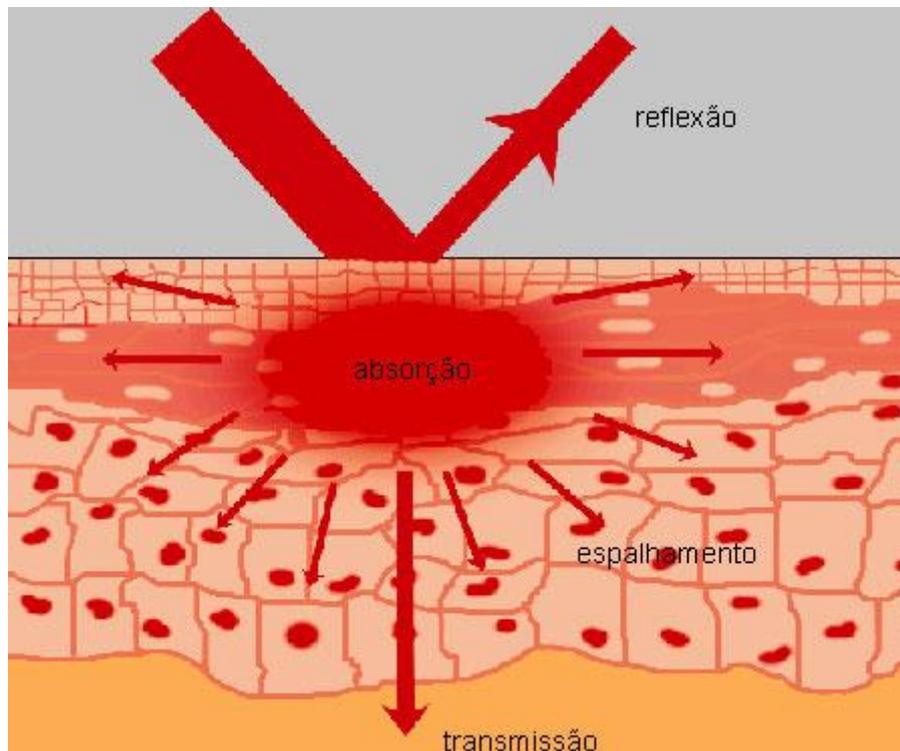


Figura 10: formas de interação da luz com o tecido biológico(Adaptado por Ribeiro,2000).

A interação da radiação laser com o tecido deve produzir uma mudança física e/ou química, que resulte na resposta biológica desejada. Frequentemente, os parâmetros desta irradiação são

determinados empiricamente e catalogados. Esta resposta biológica é dependente da dose de radiação (definida a seguir), do número de tratamentos realizados, e com menor dependência do comprimento de onda da radiação.

O espectro de absorção de um sistema biológico permite a avaliação da **profundidade de penetração** da radiação laser, em função do seu comprimento de onda. É desejável para esta aplicação biomédica de lasers que a radiação apresente uma penetração significativa no tecido, promovendo uma exposição o mais homogênea possível, nas diversas camadas do tecido, à luz de intensidade adequada. Os tecidos biológicos possuem cromóforos (substâncias que absorvem luz), tais como a melanina, hemoglobina, hemomoléculas, porfirinas etc. (ver Figura 11), que ao absorverem a luz laser (processo ressonante), podem atrapalhar o processo de irradiação de camadas mais profundas do tecido.

A profundidade de penetração no tecido para lasers compreendidos entre os comprimentos de onda de 590 nm e 1,5 μ m está entre 2 a 8 mm e o espalhamento predomina sobre a absorção (Zezzel,2000).

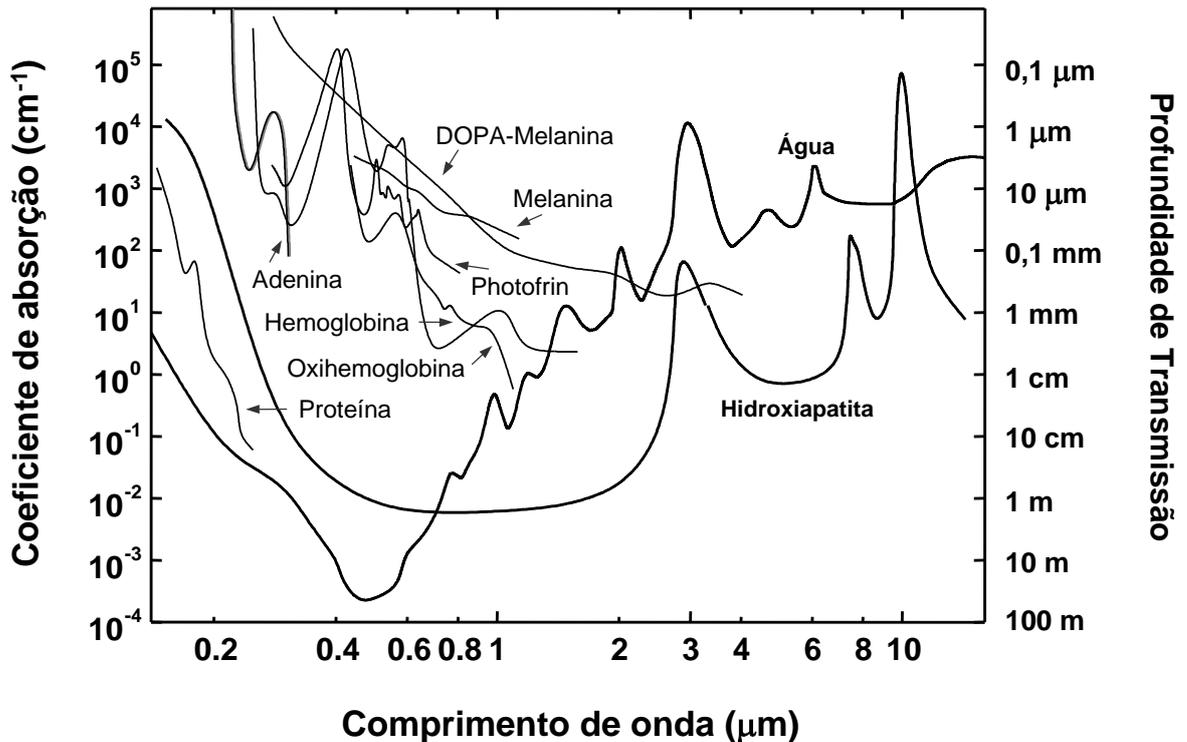


Figura 11: Espectro de absorção de alguns cromóforos do tecido (Maldonado,2000).

3.5.1 Comprimento de onda

Para a radiação apresentar uma penetração significativa no tecido (como desejado), é importante a escolha do comprimento de onda da radiação.

Empiricamente, têm se obtido bons resultados com a radiação do laser de He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$), principalmente para úlceras e regeneração nervosa. Por outro lado, lasers de GaAs emitindo em $\lambda = 904 \text{ nm}$ têm sido utilizados para o tratamento de lesões mais profundas, tendo maior influência no pós-operatório quanto a dor e inchaço. Lasers de GaAlAs emitindo em $\lambda = 790 \text{ nm}$ ou 830 nm são também boas alternativas para o tratamento de dor, edema e úlcera crônicas(Tunér,1999).

Vários outros lasers, entretanto, têm sido utilizados para LILT apresentando resultados também positivos. Na Figura 12, são apresentados os comprimentos de onda dos principais lasers

médicos, sobrepostos aos espectros de absorção dos principais cromóforos.

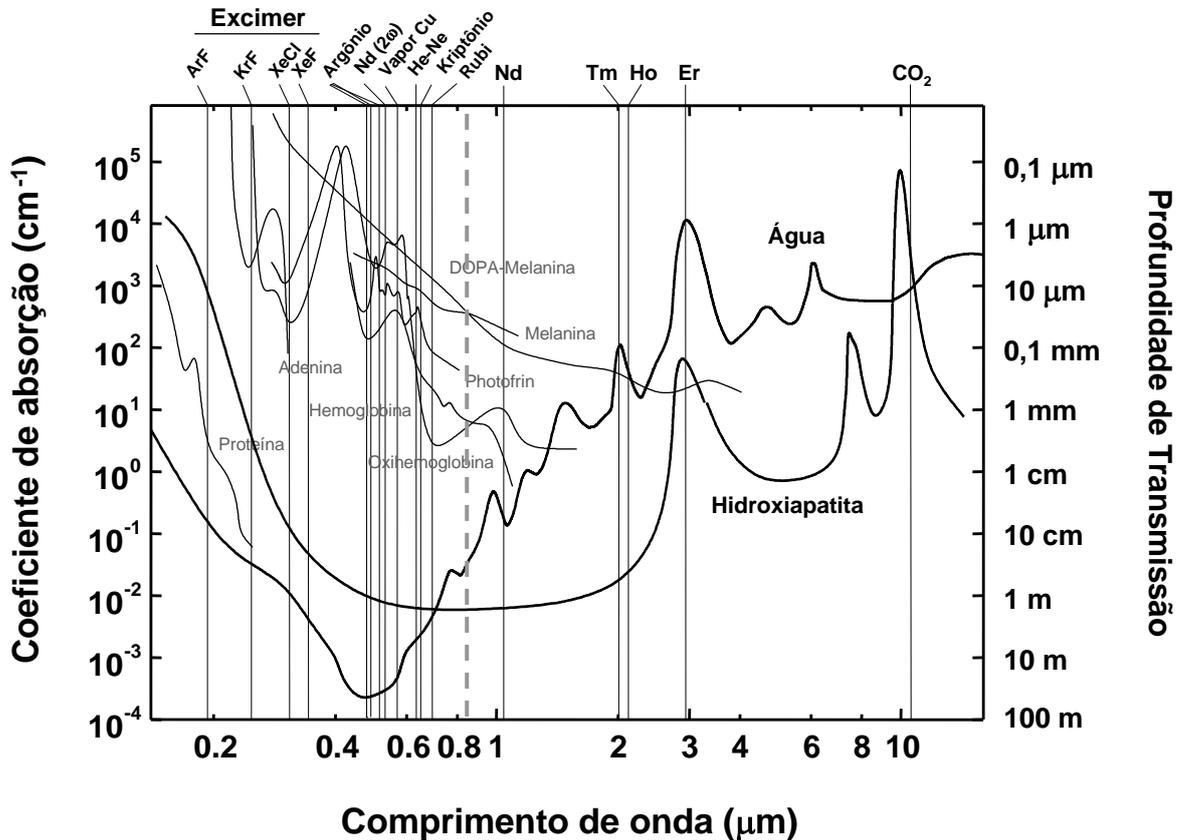


Figura 12: Comprimento de onda de vários lasers utilizados em medicina, e espectro de absorção dos principais cromóforos de tecidos. A linha tracejada corresponde ao diodo laser utilizado neste trabalho(Maldonado,2000).

3.5.2 Intensidade

É a grandeza física que permite avaliar a possibilidade de dano térmico, sendo a potência de luz incidente, por unidade de área. Quando o regime do laser é pulsado, a potência varia entre um valor máximo (potência pico) e zero, de forma que é a potência média do laser que é significativa para o cálculo da dose. Se o regime de operação do laser for contínuo, a potência do laser permanece constante por todo período de tempo e é igual a

potência média. Comumente na literatura, a intensidade é dada em W/cm^2 .

Interações da luz com o tecido que apresentam contribuições de efeitos térmicos são verificadas para intensidades médias superiores a $0,5 W/cm^2$. Assim, procura-se ajustar a irradiação do tecido lesionado de maneira a se utilizar intensidades abaixo deste limite (tipicamente, da ordem de $0,1W/cm^2$), mesmo no caso de aplicação pontual, onde a intensidade pode ser alta nos pontos de aplicação (mesmo sendo baixa na média, na área da lesão). No caso pulsado, procura-se não ultrapassar este limite ($0,5 W/cm^2$) mesmo nos instantes de máximo de potência dos pulsos, se os pulsos são longos (da ordem de segundos).

É conhecido (empiricamente) que o valor de intensidade luminosa média utilizado é influente na qualidade do resultado final da LILT.

3.5.3 Dose de tratamento

Este é um dos mais importantes parâmetros. O termo *dose*, tradicionalmente empregado na terminologia da área de bioestimulação laser, corresponde à grandeza física conhecida por fluência, ou seja, energia por unidade de área. Utiliza-se este termo, entretanto, devido aos tempos envolvidos serem tipicamente longos (vários segundos) e pelo fato de se utilizar no cálculo da dose a potência *média* do laser (mesmo no caso de lasers chaveados ou pulsados).

A dose tem a mesma unidade da grandeza fluência, sendo dada em J/cm^2 . Deve-se calcular o valor da dose multiplicando-se a intensidade, P/A (onde P é a potência em watts e A é a área em cm^2), pelo tempo t em segundos: $D = P \cdot t / A$ (J/cm^2).

Usualmente, o ajuste de parâmetros de irradiação tem como ponto de partida um valor de dose preconizado. Assim, tendo-se escolhido um valor de potência aplicado à área da lesão (ou potência por unidade de área), calcula-se o tempo de exposição para atingir o valor de dose desejado.

Muitos autores como Mester, acreditam que não se deve ultrapassar uma densidade de energia de $12\text{J}/\text{cm}^2$, pois então poderíamos causar um efeito inibidor (Tunér,1999).

3.6 Modelos para a ação da bioestimulação laser

Karu, em 1989, publicou um artigo de revisão sobre a fotobiologia dos efeitos do laser de baixa intensidade. Neste trabalho são compilados numerosos estudos quantitativos de efeitos provocados por luz monocromática visível, em baixa intensidade, sobre células (Escherichia Coli, fermentos, células HeLa, fibroblastos de hamsters chineses e linfócitos humanos). Condições ideais de irradiação(comprimento de onda, dose e intensidade) que conduzem à estimulação da atividade desejada, são apresentadas. As conclusões foram:

- a bioestimulação laser é um fenômeno fotobiológico. Luz coerente não é necessária para estes efeitos
- os fotoaceitadores primários são componentes da cadeia respiratória. Isso explicaria a universalidade dos efeitos com laser de baixa densidade de potência;

Os componentes da cadeia respiratória podem ser fotoaceitadores no caso da estimulação do metabolismo celular, bem como da inibição, dependendo da dose de luz. Em baixas doses, a irradiação causa regulação redox do metabolismo celular; em altas doses, prevalece o efeito fotodinâmico;

- o quantum de luz é somente um desencadeador para a regulação do metabolismo celular. Isso explicaria as

- baixas doses e intensidades necessárias;
- a magnitude do efeito da bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Isso explicaria por que o efeito não é sempre possível;
 - os efeitos terapêuticos da LILT poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células em G0 e G1, ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis.

Segundo Kamikawa (1992), os mecanismos dos efeitos do laser em baixa intensidade operam em virtude de ações fotoquímica e fotofísica do laser.

A ação fotoquímica se dá sobre os cromóforos da cadeia respiratória, de grande importância para se iniciar o efeito terapêutico. A ação fotofísica do laser se dá sobre as ligações de hidrogênio.

Smith (1991), propôs uma modificação do modelo de Karu para explicar os efeitos produzidos por luz visível e infravermelha. No modelo de Karu, a luz visível produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas), que finalmente conduzem à fotorresposta (biomodulação).

Enquanto que a luz visível provavelmente inicia a cascata de eventos na cadeia respiratória das mitocôndrias, através de eventos fotoquímicos (provavelmente a fotoativação de enzimas), Smith sugere que, devido as propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais Ca^{++}), conduzindo à mesma resposta final.

O modelo para a LILT, sugerido por Smith, é mostrado na

Figura 13.

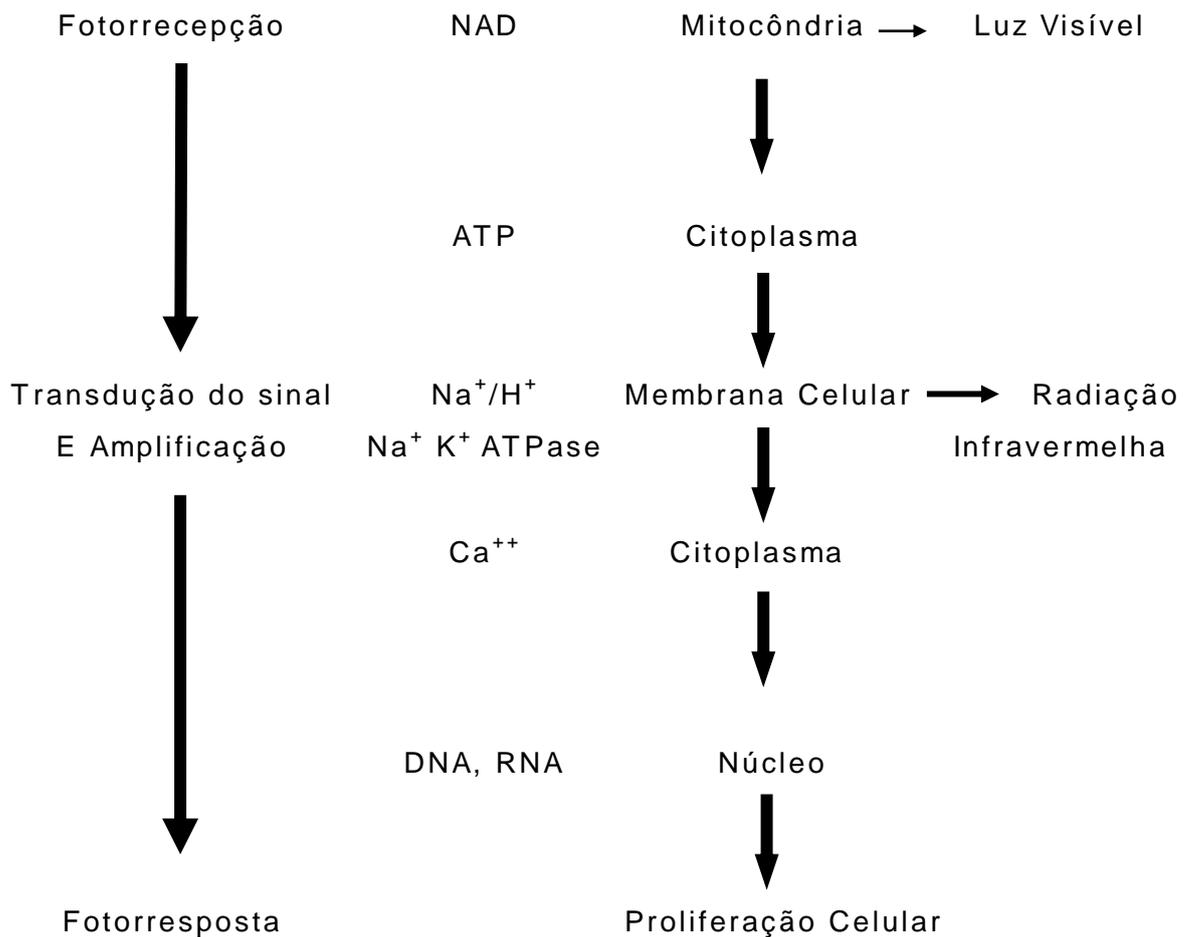


Figura 13: Modelo para a modulação de sistemas biológicos através da LILT (Smith, 1991; traduzido por Ribeiro, 2000).

Segundo Kamikawa e Ohnishi (1992), (que estão de acordo com Smith), a ação fotoquímica do laser sobre os cromóforos é importante para iniciar o efeito terapêutico, mas esta explicação não abrange todos os lasers utilizados nessa terapia. Por esta razão, eles realizaram um experimento utilizando H-NMR para observação da flutuação dos sinais de prótons induzida pela radiação laser ($\lambda=830\text{nm}$, $P=10\text{mW}$, emissão contínua; $\lambda=904\text{nm}$, $P_m=10\text{mW}$, emissão pulsada). Dos resultados obtidos, os autores sugeriram que a ação fotofísica do laser sobre ligações de hidrogênio pode ser um dos mecanismos essenciais dos efeitos da

LILT.

Karu (1995), concluiu também que as respostas biológicas de células à radiação visível ou próxima ao infravermelho ocorrem em decorrência de mudanças físicas e/ou químicas nas moléculas fotoaceitadoras, componentes da cadeia respiratória (citocromo a/a3 nas mitocôndrias e citocromo d em *E. Coli*).

Como resultado da fotoexcitação de estados eletrônicos, as seguintes mudanças físicas e/ou químicas, pode ocorrer alteração das propriedades redox e aceleração de transferência de elétrons, mudanças na atividade bioquímica em razão do aquecimento local transitório de cromóforos, auto-oxidação de um elétron e produção de 1O_2 .

Diferentes canais de reação podem ser ativados para se alcançar o macroefeito fotobiológico. As primeiras mudanças físicas e/ou químicas induzidas pela luz nas moléculas fotoaceitadoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas na célula, as quais não precisam de posterior ativação de luz e ocorrem no escuro (transdução do fotossinal e cadeias de amplificação).

Essas reações são conectadas com mudanças nos parâmetros da homeostase celular. Acredita-se que o ponto crucial seja uma alteração do estado redox celular, uma variação buscando oxidação é associada com estimulação da vitalidade celular e uma variação buscando redução, é ligada à inibição.

Células com um pH mais baixo que o normal, onde o estado redox é alterado na direção reduzida, são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora de luz que aquelas com os respectivos parâmetros sendo ótimos ou próximos a ótimo. Esta circunstância explica as possíveis variações nas magnitudes observadas com os efeitos da LILT.

A ação da luz sobre o estado redox de uma célula, via cadeia respiratória também explica a diversidade dos efeitos

obtidos com a LILT. Além de explicar muitas controvérsias nesta área (isto é, a diversidade de efeitos, a magnitude variável ou ausência de efeitos em certos estudos), o mecanismo de regulação redox proposto pode ser uma explicação fundamental para alguns efeitos clínicos da radiação, por exemplo, os resultados positivos alcançados no tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambas caracterizadas por acidose e hipoxia.

Karu (1999), em um artigo mais recente, referente aos mecanismos de ação primários e secundários da radiação emitida no intervalo do visível ao infravermelho próximo sobre células, discute a enzima citocromo c oxidase como o possível fotoaceitador, quando células são irradiadas com luz monocromática no intervalo visível ao infravermelho. A transdução e amplificação do fotossinal na célula conduziriam a uma cascata de reações conectadas com alterações nos parâmetros da homeostase celular, que pode acontecer na ausência de luz (mecanismos secundários).

3.7 Estudos em animais e humanos

A terapia laser em baixa intensidade vem sendo estudada desde a década de sessenta, com trabalhos publicados por Endre Mester e seu grupo de Budapeste, que demonstra efeitos não-térmicos desta irradiação na pele de ratos. Mester demonstrou que células em cultura, assim como tecidos, podem ser estimulados por uma certa dose de luz laser.

Doses muito baixas não têm nenhum efeito, ou insuficiente. Doses muito altas são também menos eficientes ou sem efeitos. As primeiras pesquisas foram realizadas com o laser de rubi ($\lambda=694\text{nm}$), e uma das primeiras observações sobre o efeito da LILT foi o rápido e inesperado crescimento de pelos (em áreas raspadas e depois irradiadas com laser) em ratos.

Atualmente existem ao redor de duas mil pesquisas relatadas na literatura. Entretanto, algumas informações obtidas ainda são discordantes, principalmente em função da falta de um protocolo comum. Encontra-se uma grande variedade de valores de doses aplicadas, assim como modelos e métodos que não são freqüentemente reproduzíveis.

Esta revisão de literatura considerará, portanto, alguns entre os muitos artigos publicados internacionalmente, que tratam dos efeitos não térmicos da luz nos tecidos ou células.

Mester e Jaszszagi-Nagy (1973), estudando a cicatrização de feridas em ratos e utilizando uma dose $4\text{J}/\text{cm}^2$ observaram um aumento da velocidade de cicatrização até depois do 3º dia e uma estabilização em torno do 6º e 7º dias com uma progressiva diminuição depois do 7º dia. Concluíram que houve um aumento na produção de colágeno no tecido cicatricial da área tratada com laser em aproximadamente 30% a 50% em relação à área controle.

Longo et al.,(1987) descreveram uma acentuada proliferação fibroblástica e regeneração epitelial nos sítios feridos experimentalmente em ratos utilizando o laser de AsGaAl.

Walsh (1987), em uma revisão da terapia laser em baixa intensidade, afirma que o uso do LILT sobre os fibroblastos gengivais (em cultura) pode influenciar o processo de cicatrização de ferida, através da sua transformação em 24 horas em miofibroblastos, os quais são responsáveis pela contração da ferida.

Garcia (1992) em sua tese de livre docência, estudou por meio de observações clínicas, biométricas e histopatológicas, o comportamento de feridas cutâneas provocadas em ratos e submetidas à ação do laser de Arseneto de Gálio com uma dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$. Nos intervalos de tempo de 9 a 12 e 19 segundos, observou que quando utilizou o laser o processo de reparação foi mais

rápido, com maior contração da ferida, e histologicamente houve elevada taxa de crescimento epitelial.

Nara et al.,(1992) estudaram os efeitos da irradiação com três tipos de lasers em baixa densidade de potência: um laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$, $P=5\text{mW}$), e dois lasers de semicondutor ($\lambda=790\text{nm}$ e 830nm , $P= 34\text{mW}$ e 14 mW , respectivamente), na proliferação de fibroblastos humanos e os resultados foram comparados in vitro.

Os fibroblastos da polpa humana foram obtidos de subculturas e estas foram incubadas por 48 horas em meios suplementados por soro antes da irradiação laser. Cada laser foi usado no modo de emissão contínua e a irradiação foi realizada quatro vezes, no intervalo de dose total $0,05\text{J}/\text{cm}^2$ a $2,0\text{J}/\text{cm}^2$. Depois da incubação as células foram fixadas e coradas em lâminas e o número de núcleos foi contado. O laser de He-Ne mostrou a capacidade de acelerar a proliferação de fibroblastos da polpa em uma baixa dose de irradiação ($0,1\text{J}/\text{cm}^2$). Por outro lado, os lasers de semicondutor falharam em produzir qualquer efeito estimulativo sobre estes fibroblastos.

Eduardo, Cecchini e Cecchini (1996) apresentaram cinco estudos clínicos sobre os benefícios do laser em baixa intensidade na cicatrização de tecido mole oral. Lesões como herpes e úlceras aftosas foram irradiadas com laser de GaAlAs ($\lambda=790\text{nm}$), em doses dependentes da área de irradiação. Em todos os casos eles concluíram que a terapia com a luz laser pode acelerar a cicatrização das feridas causadas por ulcerações aftosas, assim como aliviar a dor das áreas afetadas. Os autores também preconizam a associação de lasers de Nd:YAG e GaAlAs no tratamento dessas lesões.

Walker et al., (2000) verificaram o efeito da LILT na cicatrização de feridas pré irradiadas com raios-X em

camundongos. Sessenta camundongos foram separados em cinco grupos experimentais. Em todos os grupos, uma área bem definida do dorso foi exposta a 20Gy de raiosX. Setenta e duas horas após a irradiação, foi feita incisão numa área de 7X7mm no dorso dos camundongos.

Dois grupos serviram como controle, e os outros três foram tratados com um laser de GaAlAs ($\lambda = 660\text{nm}$) de emissão pulsada, nas doses de $0,5\text{J}/\text{cm}^2$; $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ e $4,0\text{J}/\text{cm}^2$, $I=45\text{mW}/\text{cm}^2$, três vezes por semana, até o completo fechamento da ferida. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que o tratamento com laser, nos parâmetros estudados, não causou efeito benéfico na taxa de contração das feridas, quando comparado ao grupo controle.

Recentemente, Ribeiro (2000) observou aceleração na cicatrização de queimaduras criadas artificialmente na pele de ratos e camundongos após a radiação laser de He-Ne, na dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$ correspondendo a uma exposição de 3 minutos, aplicadas em uma série de quatro aplicações, duas vezes por semana. Seu estudo permite concluir que a irradiação laser muda o padrão normal de atividade fibroblástica durante o processo de reparação, e estimula inicialmente a síntese de colágeno logo no início da cicatrização, o que pode ser importante para seu resultado final, dependendo da orientação da polarização incidente.

Schaffer et al., (2000) pesquisaram o efeito de um laser de diodo (780nm) em pele humana normal, pelo aumento de contraste dependente do tempo, mediante imagem por ressonância magnética. Seis voluntários sadios foram irradiados na sola do pé direito com $5\text{J}/\text{cm}^2$ e intensidade de $100\text{mW}/\text{cm}^2$. A imagem por ressonância magnética é utilizada para quantificar a acumulação local de gadolínio-DTPA (ácido etilenotriamino-penta-acético), seu conteúdo local na corrente local do volume sanguíneo, bem como

sua distribuição ao espaço extra-celular. As imagens foram obtidas antes e depois da aplicação do laser. Quando o laser foi aplicado, a razão sinal-ruído aumentou depois da irradiação, de acordo com o aumento do contraste por MRI. Foi observado que, após biomodulação com a radiação laser, a cicatrização de feridas melhorou e a dor foi reduzida. Os autores sugeriram que estes efeitos podem ser explicados pelo aumento do fluxo sanguíneo na área.

Simunovic et al. (2000) estudando cicatrização de feridas em coelhos utilizando um laser de He-Ne com $\lambda = 632,8\text{nm}$ e 4J/cm^2 observaram efeitos significativos sobre a resistência elástica dos tecidos, crescimento epidérmico, concentração linfocítica e formação de colágeno. Densidade de energia mais elevadas ($20,24\text{J/cm}^2$) aplicadas sobre as feridas produziram menos efeitos ou mesmos efeitos opostos.

No mesmo estudo, em humanos, analisando 74 pacientes com lesões provocadas por acidentes de trânsito e por acidentes esportivos, utilizando diodo (AsGaAl) com $\lambda = 830\text{nm}$ e outro laser de He-Ne com $\lambda = 632,8\text{nm}$, obtiveram um aumento de 25% a 35% da cicatrização, uma melhor recuperação funcional dos pacientes operados e um alívio maior da dor.

Rodrigues(2001),verificou a aceleração do processo de cicatrização de lesões irradiadas da mucosa oral decorrentes do aparelho ortodôntico fixo, utilizando um diodo laser emitindo em 830nm, irradiando por contato da ponta ativa com a lesão, com $d=1,3\text{J/cm}^2$ e $P=30\text{mW}$.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Para a realização do presente estudo , foram utilizados 64 ratos adultos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) , com massa corpórea variando entre 160 e 220 gramas. Estes animais procederam do Biotério da Faculdade de Odontologia do “Campus de Araçatuba, UNESP”.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tratados com ração granulada comercial e água *ad libitum*, antes e durante todo o período experimental.

Os ratos foram anestesiados com solução injetável de hidrato de cloral a 10% (0,4 ml por 100 g de massa corpórea) e tricotomizados na região dorsal. Após anestesia, foram efetuados com auxílio de um “*PUNCH*”, de aproximadamente 8mm de diâmetro, a remoção de um fragmento circular de pele na região mediana do dorso.

.

Os 64 ratos foram divididos em 4 grupos de 16 ratos, conforme descrição abaixo:

- **Grupo 1 (G1)** - considerado controle, não foi submetido à nenhum tratamento.
- **Grupo 2 (G2)** - as lesões foram submetidas à aplicação do laser, com contato “pontual” da ponta ativa e a ferida, em 8 localizações distintas da periferia da lesão e num ponto central(ver Figura 17). A dose de energia utilizada por ponto foi de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (Garcia,1992),com 30mW de potência durante 7s.
- **Grupo 3 (G3)** - as lesões foram submetidas à aplicação do laser de forma uniforme, sem contato com a lesão, utilizando-se um espaçador, desenhado para esta

finalidade (ver Figura 18). A dose de energia utilizada foi de $1,3\text{J}/\text{cm}^2$.(Ribeiro,1991) , com 60 mW de potência durante 25s.

- **Grupo 4 (G4)** - as lesões foram submetidas à aplicação do laser de forma também uniforme, sem contato com a ferida, utilizando-se um espaçador, porém com dose de energia de $3\text{J}/\text{cm}^2$ (Garcia,1992), com 60mW de potência durante 56s. A Tabela 1 resume os parâmetros de tratamento.

Utilizamos um laser de diodo de baixa potência (Kondortech,modelo BioWave LLLT, São Carlos, Brasil- Figura 14) , que está integrado em um equipamento próprio para utilização em LILT (fonte, painel de controle, peça de mão e ponteira para entrega do feixe). Este laser emite no comprimento de onda de 830 nm (na região do infravermelho próximo), com potência máxima (medida) de 60 mW. O sistema de entrega do feixe se dá por uma ponteira cilíndrica de cristal conforme pode ser observado na Figura 15. O diâmetro do feixe nesta ponteira é de 3mm, correspondendo a uma área de $0,071\text{ cm}^2$. A divergência do feixe (medida) é de 20 graus. A Figura 16 mostra o raio do feixe em função da distância da ponta ativa.



Figura 14: Fonte e painel de controle do sistema laser utilizado



Figura 15: Ponta ativa

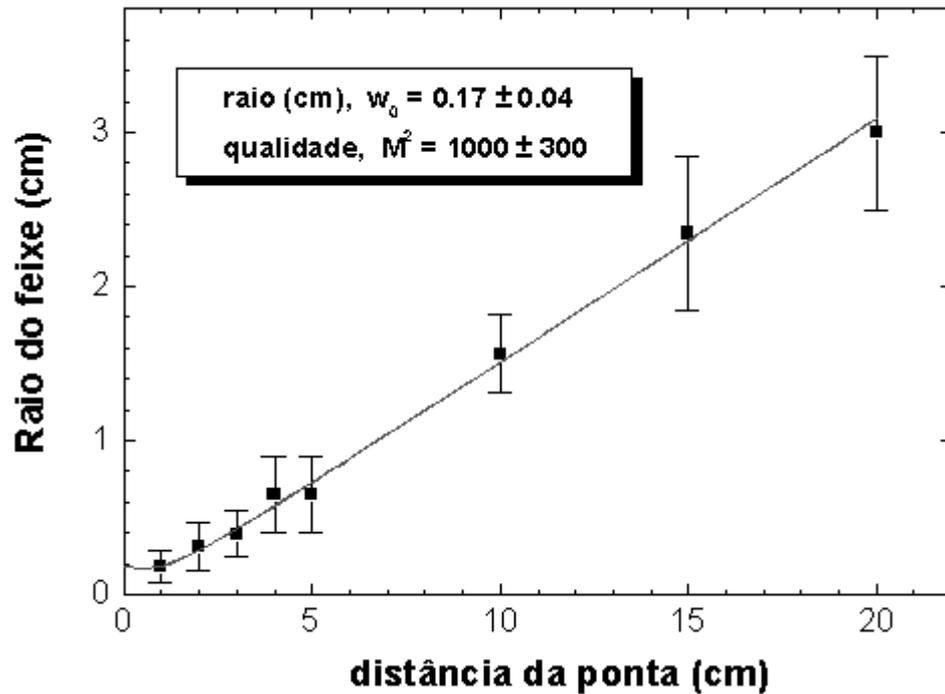


Figura 16: Raio do feixe em função da ponta ativa.

Dos 64 animais utilizados, vinte e oito ratos foram avaliados em relação à taxa de contração da ferida (análise biométrica). Os 36 animais restantes foram sacrificados para análise histológica.

Decorridos 3, 7 e 14 dias do ato cirúrgico e aplicação do laser, três animais de cada grupo foram sacrificados (por inalação de éter sulfúrico) para análise histológica. As biópsias foram colhidas cuidadosamente, de maneira a incluir parte da pele adjacente às bordas da ferida e de todo o tecido cicatricial em sua profundidade. Todas as biópsias obtidas foram fixadas em formalina 10% por 24 horas. A seguir, as biópsias foram incluídas em parafina, e orientadas de forma a permitir a realização de cortes transversais, semi-seriados com 6 μ m de espessura. Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina e Tricrômio de Masson Para análise biométrica posterior, foram realizadas

medidas do diâmetro interno da ferida, nos mesmos períodos (3,7,14 dias após a radiação), utilizando-se paquímetro (Starrett, Brasil; modelo 727- 6/150), nos 28 animais restantes.

A evolução dos tamanhos das feridas foi analisada de duas formas. A primeira correspondeu aos valores reais medidos nos momentos 0, 3, 7 e 14 dias pós-operatório, comparando-os a partir dos valores no instante zero, ou seja pelo percentual do tamanho das feridas em relação ao instante inicial.

GRUPO	Tempo Total	Potência (mW)	Tempo de Aplicação por Ponto	Densidade de Energia (J/cm ²)	Intensidade (W/cm ²)
G1 (controle)	Não foi submetido à nenhum tratamento				
G2 (pontual)	63s	30mW	7s	3 J/cm ²	0,428 (W/cm ²)
G3 (uniforme)	25s	60mW	-----	1,3 J/cm ²	0,053 (W/cm ²)
G4 (uniforme)	56s	60mW	-----	3 J/cm ²	0,053 (W/cm ²)

Tabela 1: Parâmetros de tratamento utilizados nesta pesquisa

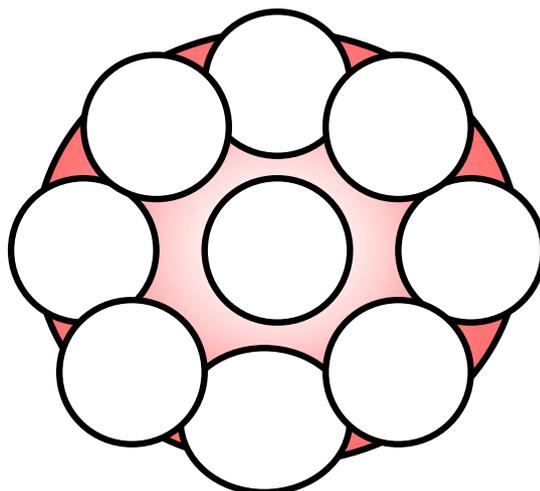


Figura 17: Aplicação pontual(Garcia,1992).

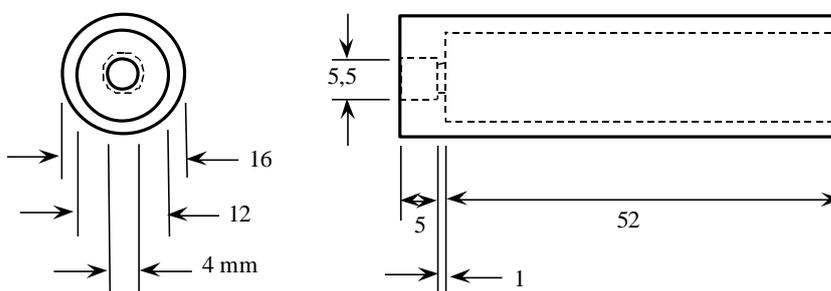


Figura 18: Espaçador utilizado na aplicação uniforme

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação biométrica das lesões

5.1.1 Análise descritiva

A Tabela 2 abaixo contém as médias e os desvios padrão para o tamanho das lesões ao longo do tempo, levando às seguintes observações:

Grupo	tempo (dias)			
	0	3	7	14
1	8,39 (1,01)	7,09 (0,85)	6,47 (0,69)	1,91 (0,53)
2	8,72 (0,69)	7,00 (0,77)	5,84 (0,63)	2,69 (1,26)
3	8,24 (1,71)	6,96 (1,69)	5,35 (1,25)	0,89 (1,00)
4	8,30 (0,94)	7,29 (0,81)	6,09 (0,89)	0,89 (0,80)
Total	8,41 (1,10)	7,09 (1,03)	5,94 (0,94)	1,59 (1,17)

Tabela 2 : Médias e Desvios Padrão (entre parêntesis) para o tamanho das lesões, em mm

- para todos os grupos existe um decréscimo no tamanho da ferida;
- no instante inicial e no 3º dia as diferenças entre as médias dos grupos não é muito grande;
- no 7º dia podemos observar o Grupo 3 com uma média ligeiramente menor que os demais e o grupo controle (Grupo 1) se destacando com valor maior que os demais grupos;

➤ no 14^o dia os grupos 3 e 4 apresentaram a mesma média de tamanho das lesões, e os grupos 1 e 2 apresentaram valores médios maiores;

Os valores relativos dos tamanhos das lesões, em relação aos tamanhos iniciais, são mostrados na Tabela 3, e na Figura 19. Nesse caso, podemos fazer observações semelhantes às feitas acima:

Grupo	tempo (dias)		
	3	7	14
1	84,8 (7,0)	76,5 (4,6)	22,4 (5,6)
2	80,6 (9,4)	67,2 (7,8)	30,7 (14,5)
3	84,3 (6,9)	65,6 (12,3)	11,1 (12,6)
4	88,1 (5,7)	73,5 (8,6)	10,6 (9,6)
Total	84,6 (7,4)	70,8 (9,4)	18,7 (13,4)

Tabela 3 : Médias e Desvios Padrão(entre parênteses) para os percentuais dos tamanhos das lesões em relação aos tamanhos iniciais

- para todos os grupos existe um decréscimo nos tamanhos das lesões;
- no 3^o dia as diferenças entre as médias dos grupos não é muito grande;
- no 7^o dia podemos observar os grupos 2 e 3 com uma média ligeiramente menor que os demais e o grupo controle (Grupo 1) se destacando com valor maior que os demais grupos;

- no 14º dia os grupos 3 e 4 apresentaram médias muito próximas e o grupo 2 mostrou-se aparentemente pior do que o grupo controle;

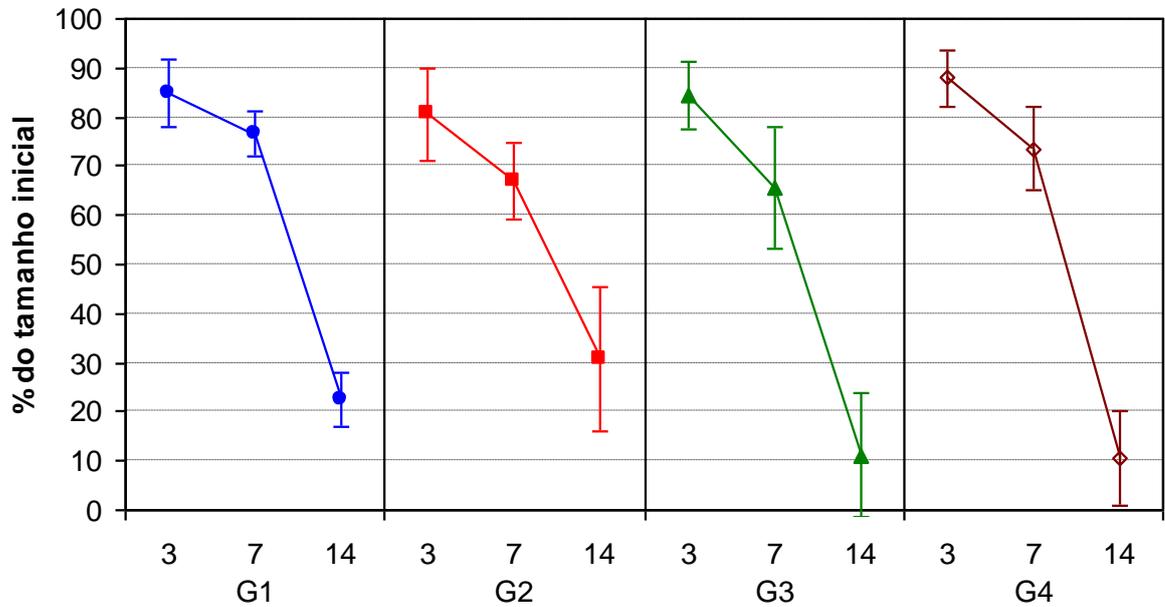


Figura 19: Médias e desvios-padrão para o percentual do tamanho das lesões, em relação aos tamanhos iniciais, em função do tempo.

5.1.2 Análise inferencial

Para estudar melhor as diferenças em relação aos fatores Tempo e Grupo, fizemos comparações múltiplas para as médias, utilizando o método *LSD* – "*Least Square Difference*" (Tabela 4)

	Tempo	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
		3	7	14	3	7	14	3	7	14	3	7	14
Grupo 1	3	0,07 1	0,00 0	0,30 0	0,00 1	0,00 0	0,65 7	0,00 0	0,00 0	0,66 6	0,01 5	0,00 0	
	7	0,07 1	0,00 0	0,42 7	0,07 4	0,00 0	0,19 0	0,01 7	0,00 0	0,02 3	0,54 4	0,00 0	
	14	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,10 8	0,00 0	0,00 0	0,03 8	0,00 0	0,00 0	0,02 1	
Grupo 2	3	0,30 0	0,42 7	0,00 0	0,01 2	0,00 0	0,57 7	0,00 2	0,00 0	0,13 6	0,15 7	0,00 0	
	7	0,00 1	0,07 4	0,00 0	0,01 2	0,00 0	0,00 3	0,47 5	0,00 0	0,00 0	0,20 9	0,00 0	
	14	0,00 0	0,00 0	0,10 8	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 1	0,00 0	0,00 0	0,00 0	
Grupo 3	3	0,65 7	0,19 0	0,00 0	0,57 7	0,00 3	0,00 0	0,00 1	0,00 0	0,38 5	0,05 6	0,00 0	
	7	0,00 0	0,01 7	0,00 0	0,00 2	0,47 5	0,00 0	0,00 1	0,00 0	0,00 0	0,05 6	0,00 0	
	14	0,00 0	0,00 0	0,03 8	0,00 0	0,00 0	0,00 1	0,00 0	0,00 3	0,00 0	0,00 0	0,93 3	
Grupo 4	3	0,66 6	0,02 3	0,00 0	0,13 6	0,00 0	0,00 0	0,38 5	0,00 0	0,00 4	0,00 0	0,00 0	
	7	0,01 5	0,54 4	0,00 0	0,15 7	0,20 9	0,00 0	0,05 6	0,05 6	0,00 4	0,00 0	0,00 0	
	14	0,00 0	0,00 0	0,02 1	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 0	0,00 3	0,93 0	0,00 0	0,00 0	

Tabela 4 : Comparações múltiplas, pelo método LSD, para o percentual do tamanho original das lesões. As diferenças significativas estão hachuradas.

As comparações hachuradas na Tabela 4 (valores inferiores a 0,05 para a diferença de mínimos quadrados) indicam resultados médios com diferença significativa. Selecionando-se as comparações apenas entre grupos, para cada dia (fixo), obtém-se as tabelas abaixo (Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1		0,300	0,657	0,666
Grupo 2	0,300		0,577	0,136
Grupo 3	0,657	0,577		0,385
Grupo 4	0,666	0,136	0,385	

Tabela 5: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 3º dia.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1		0,074	0,017	0,544
Grupo 2	0,074		0,475	0,209
Grupo 3	0,017	0,475		0,056
Grupo 4	0,544	0,209	0,056	

Tabela 6: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 7º dia. As diferenças significativas estão hachuradas

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Grupo 1		0,108	0,038	0,021
Grupo 2	0,108		0,001	0,000
Grupo 3	0,038	0,001		0,933
Grupo 4	0,021	0,000	0,933	

Tabela 7: Comparações múltiplas pelo método LSD para o percentual do tamanho original no 14º dia. As diferenças significativas estão hachuradas

Analisando apenas as comparações selecionadas nessas últimas tabelas, podemos concluir que:

- no 3º dia não temos diferenças significativas entre os quatro grupos para o percentual de diminuição do tamanho das feridas;
- no 7º dia somente existe diferença significativa entre o grupo controle e o grupo 3;
- no 14º dia temos dois grupos significativamente diferentes formados pelo controle e grupo 2 (iguais entre si) e pelos grupos 3 e 4 (iguais entre si).

Fotografias das lesões provocadas no dorso de ratos com auxílio de um punch de aproximadamente 8 mm são mostradas à seguir:

GRUPO 3 irradiado



0 dias



3 dias

GRUPO 1 controle



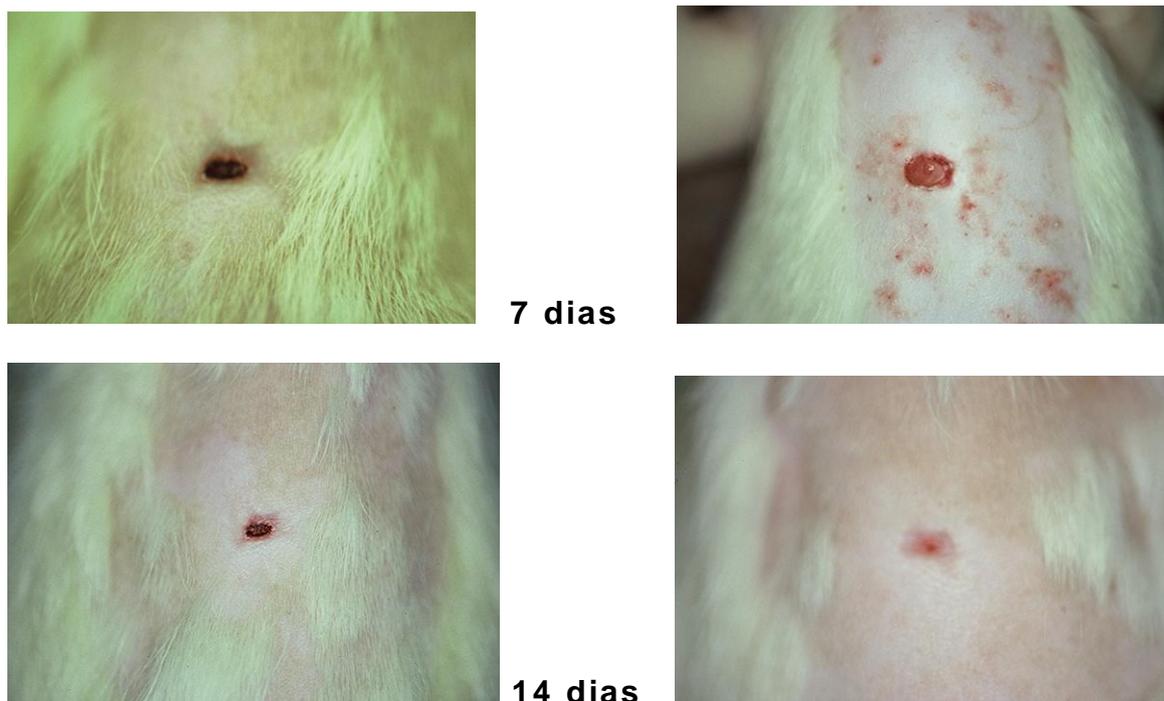


Figura 20: Documentação fotográfica do grupo 3 irradiado e grupo 1 controle

5.2 Avaliação histológica das lesões

A análise histológica foi feita, em sua maior parte, pelo Grupo de Estudos e Pesquisas em Laser em Odontologia (GEPLO), da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba / UNESP.

Para as amostras correspondentes ao terceiro dia após aplicação do laser, a análise realizada ao microscópio de luz demonstrou que havia início de proliferação fibroblástica e capilar em todos os espécimes irradiados analisados. No grupo controle, entretanto, observou-se ausência de proliferação conjuntiva. (Figura 21 até Figura 24)

No sétimo dia, o grupo controle apresentava ainda evidências de inflamação (Figura 25), enquanto que os outros

grupos não apresentavam esta característica.(Figura 26 até Figura 28)

O grupo 2, entretanto, apresentou maior secreção de queratina pelo epitélio quando comparado ao grupo controle, no 14^o dia.(Figura 29 e Figura 30)

O grupo 4, entretanto, indicou uma maior aceleração do processo cicatricial (em todos os espécimes) em relação ao grupo 2, o que também é evidenciado pela melhor orientação celular (Figuras 30 e 32) e melhor orientação das fibras colágenas (Figura 33 e 34) no 14^o dia.

O grupo 3, por sua vez, apresentou uma resposta tecidual superior aos outros grupos em todos os períodos estudados (3^o, 7^o e 14^o dia), como evidenciado na Figura 23, Figura 27 e Figura 31.

As figuras a seguir foram obtidas utilizando-se a técnica de coloração - hematoxilina e eosina.

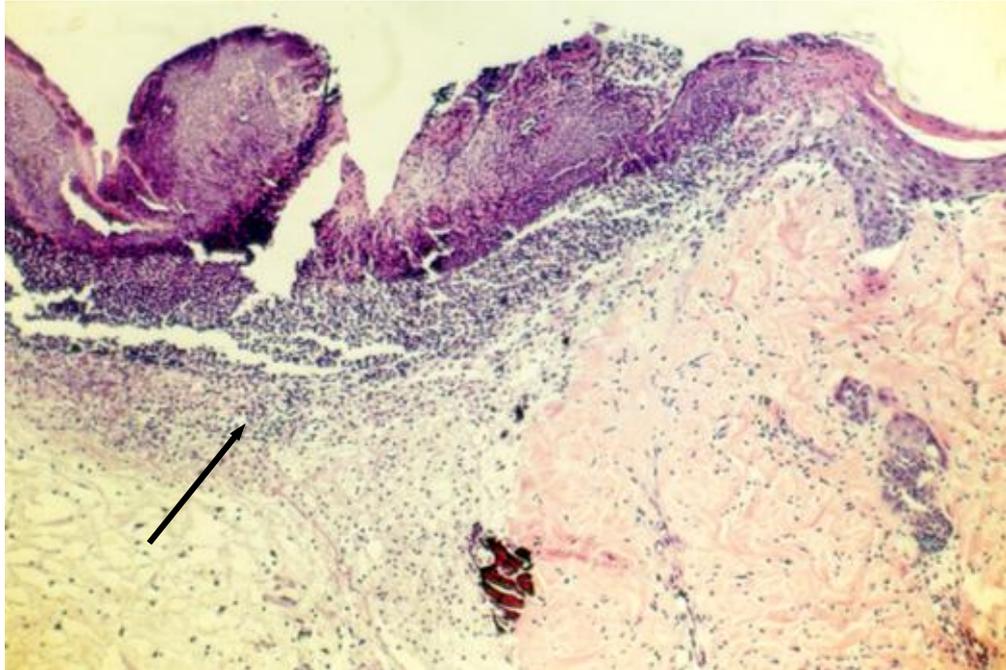


Figura 21: Fotomicrografia do grupo 1 no 3^o dia. A seta indica infiltrado linfoplasmocitário

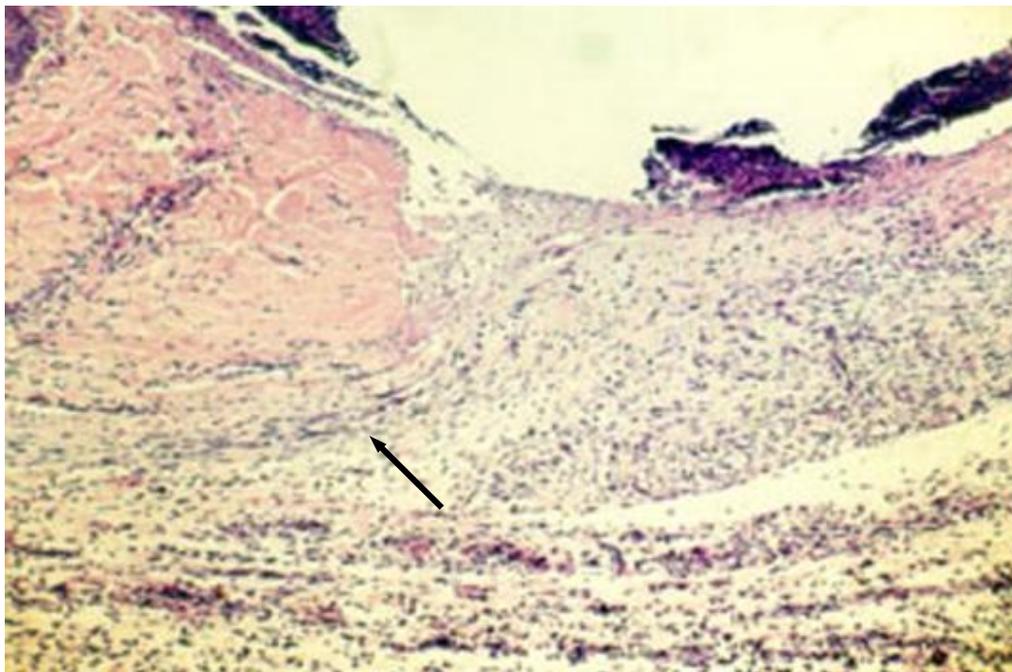


Figura 22: Fotomicrografia do grupo 2 no 3^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.

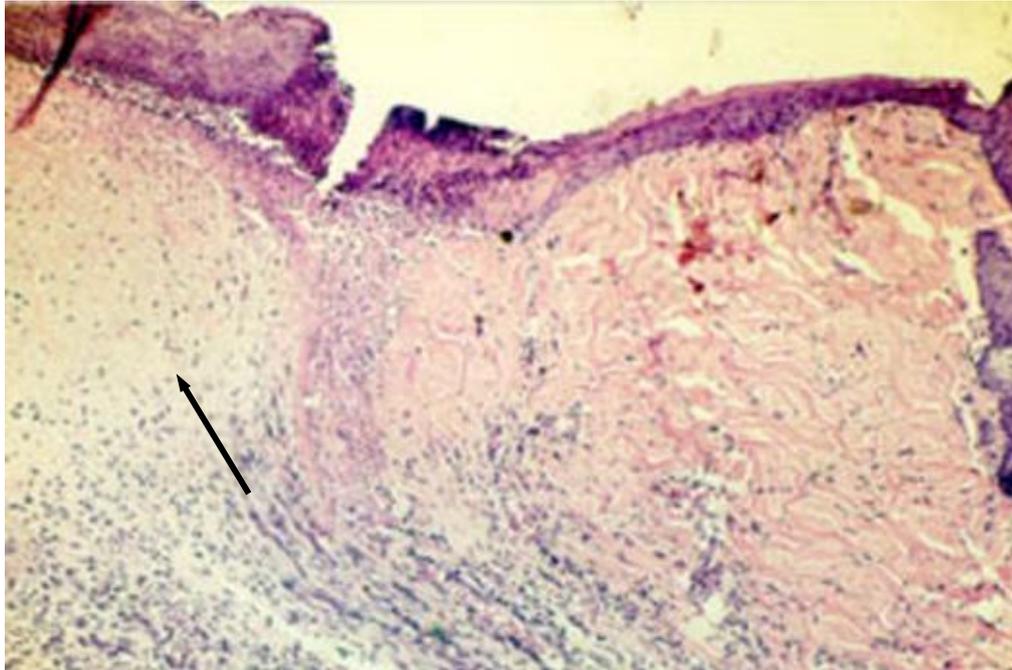


Figura 23: Fotomicrografia do grupo 3 no 3^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.

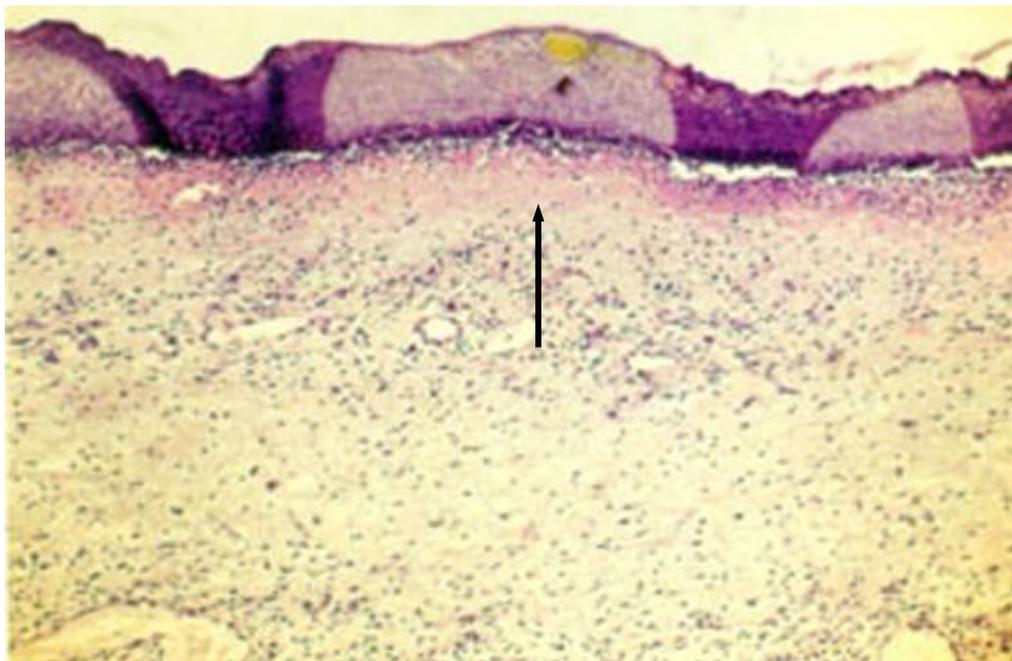


Figura 24: Fotomicrografia do grupo 4 no 3 dia. A seta indica infiltrado linfo-plasmocitário.

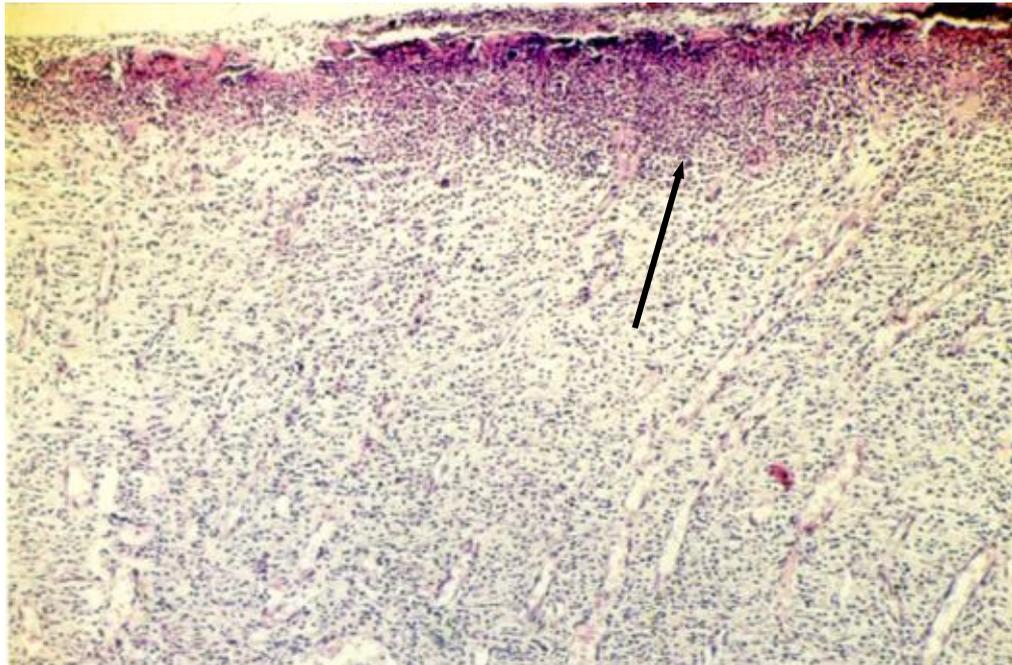


Figura 25: Fotomicrografia do grupo 1 no 7^o dia. A seta indica infiltrado linfo-plasmocitário.

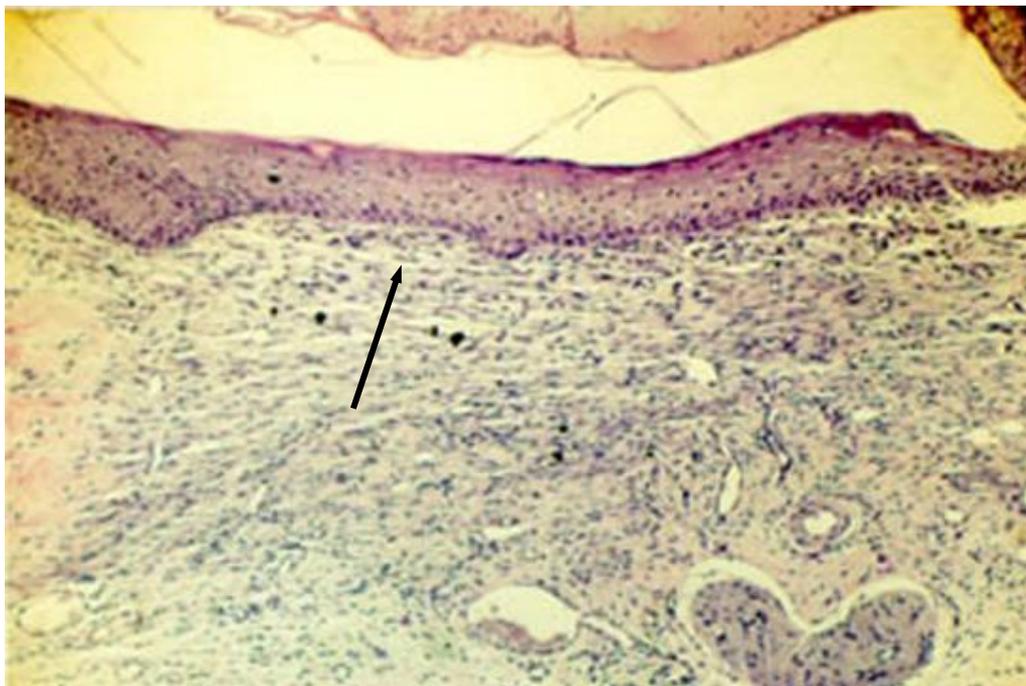


Figura 26: Fotomicrografia do grupo 2 no 7^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado.

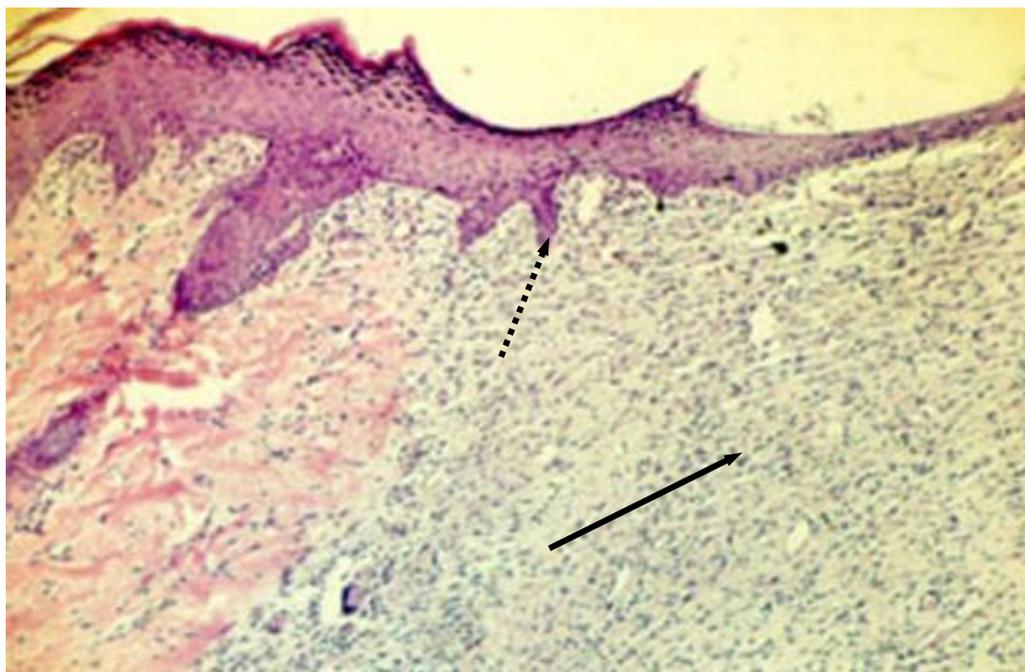


Figura 27: Fotomicrografia do grupo 3 no 7^o dia. A seta indica tecido conjuntivo frouxo neo-formado e destaca-se (pontilhado) a invaginação do epitélio para aumentar a superfície de adesão

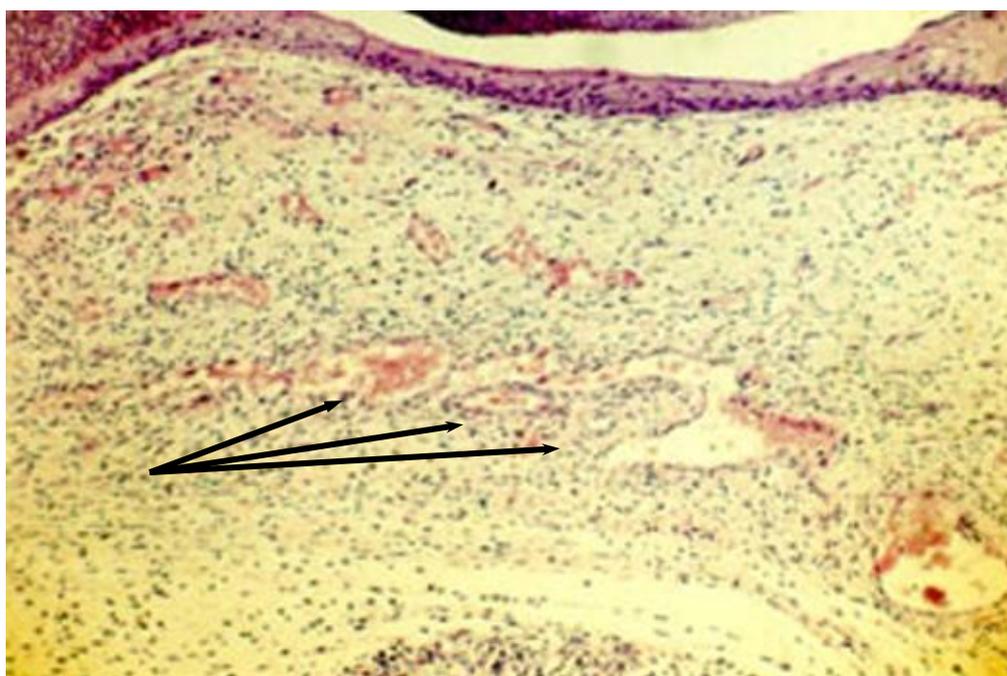


Figura 28: Fotomicrografia do grupo 4 no 7^o dia. Destaca-se vascularização intensa do tecido conjuntivo.

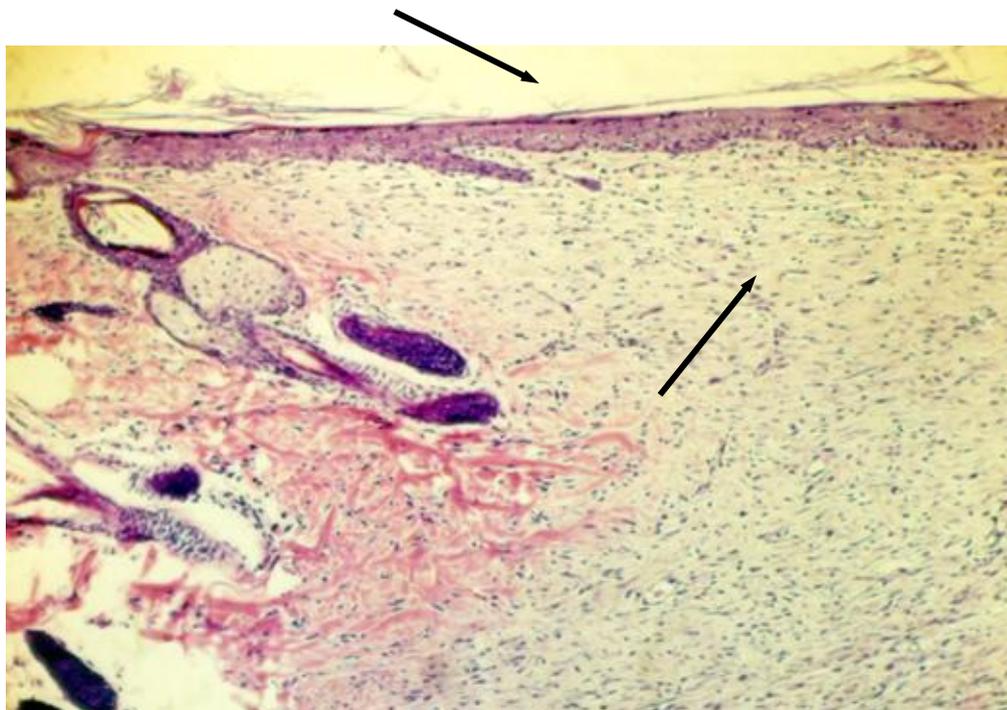


Figura 29: Fotomicrografia do grupo 1 no 14^o dia. Destacam-se epitélio e o tecido conjuntivo néo-formados.

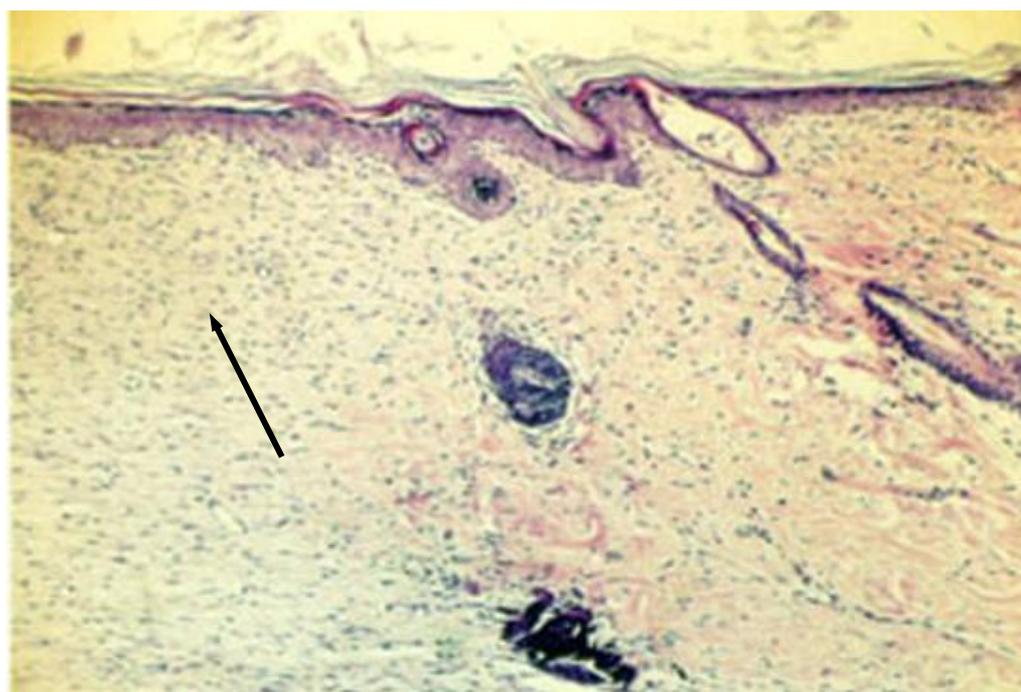


Figura 30: Fotomicrografia do grupo 2 no 14^o dia. Destacam-se secreção de queratina e pouca orientação celular do tecido conjuntivo.

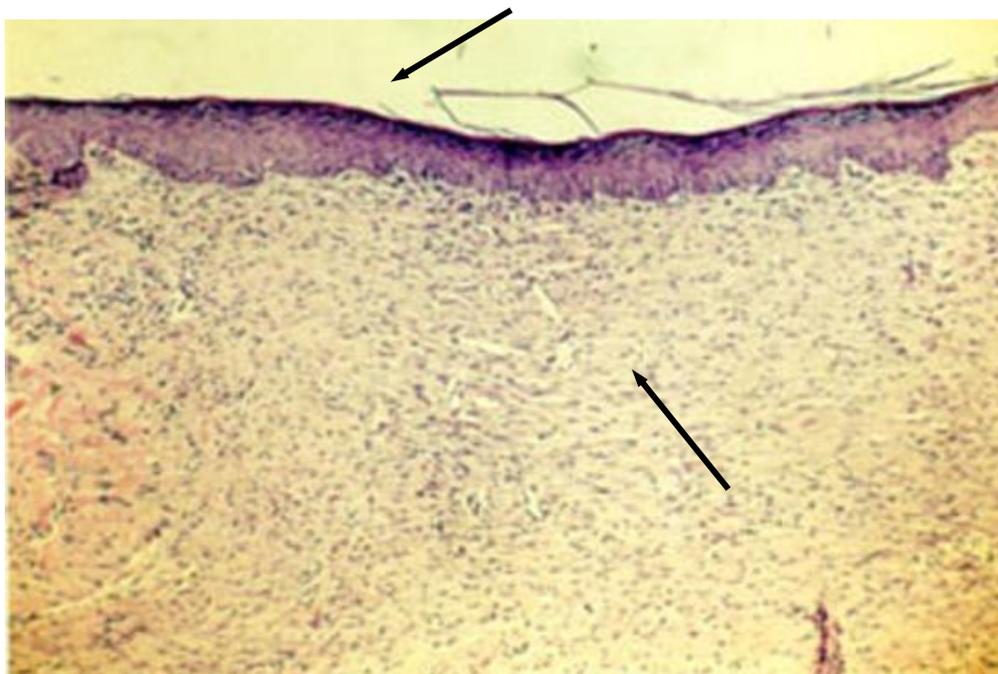


Figura 31: Fotomicrografia do grupo 3 no 14^o dia. A seta indica epitélio diferenciado, com suas respectivas camadas. Destaca-se também o tecido conjuntivo róseo (presença de fibras colágenas)

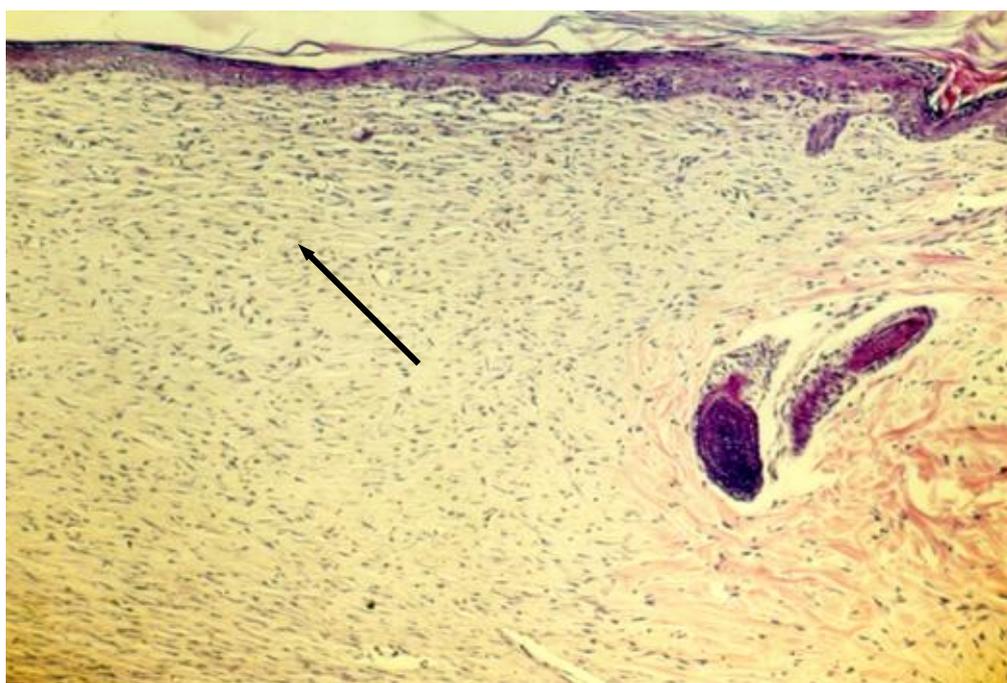


Figura 32: Fotomicrografia do grupo 4 no 14^o dia. Destacam-se secreção de queratina e orientação celular no tecido conjuntivo.

As figuras a seguir foram obtidas utilizando-se a técnica de colaração- tricômio de masson. As fibras colágenas são coradas em azul quando se utiliza esta técnica. Podemos notar a melhor orientação das fibras colágenas do grupo 4 em relação ao grupo 2.

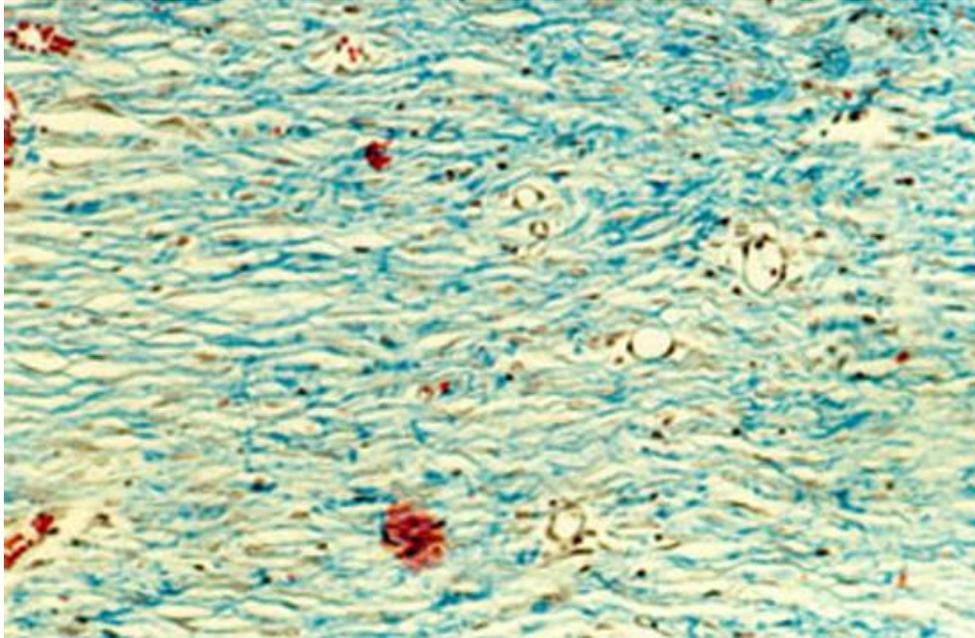


Figura 33: Fotomicrografia do grupo 2 no 14^o dia

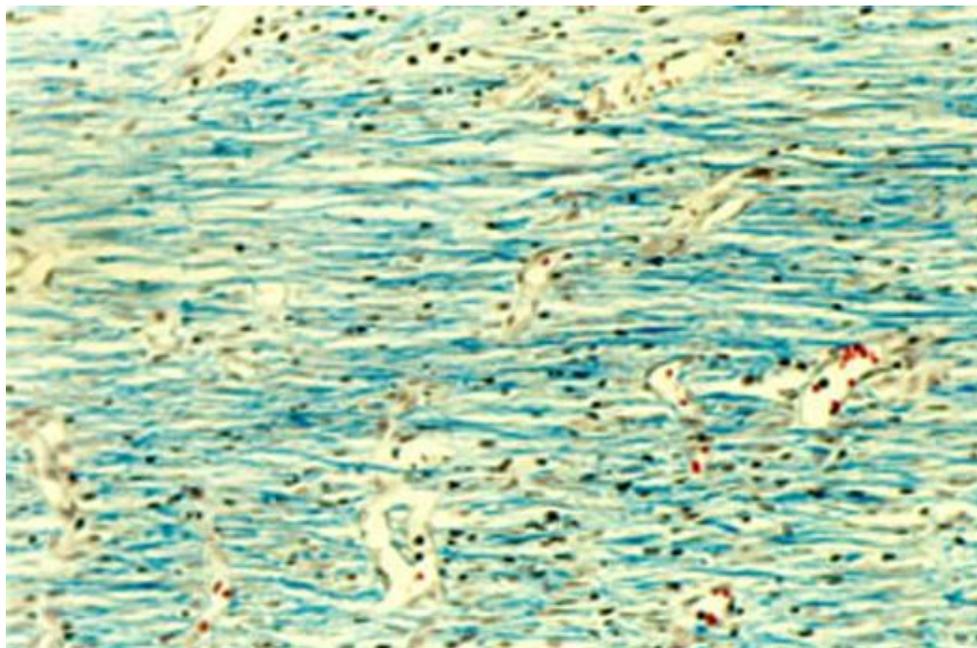


Figura 34: Fotomicrografia do grupo 4 no 14^o dia

6 DISCUSSÃO

O estudo do processo de reparação tecidual tem sido, nos últimos anos, no curso da história médica, objeto de vários estudos, os quais procuram esclarecer os diferentes mecanismos que interferem no processo de cicatrização do tecido lesado.

Mais recentemente, os efeitos do laser em baixa intensidade vem sendo examinado, não só em bases experimentais *in vitro*, como também sobre bases clínicas, para melhorar a cicatrização de feridas pós-cirúrgicas, implantes e cirurgia a retalho. O uso do laser e a existência de biomateriais como a hidroxiapatita, colas biológicas à base de cianocrilato, membranas de colágeno e artefatos de titânio, têm revolucionado a ciência médica (Siqueira Júnior e Dantas, 2000). Desta forma, no que concerne à aplicação tópica de medicamentos sobre feridas, há vários trabalhos que procuraram abordar a aceleração da cicatrização por segunda intenção, alguns com resultados satisfatórios com a associação de antibiótico e aminoácido (

Carvalho et al., 1977).

A partir da década de 80, novas perspectivas de utilização dos lasers em baixa intensidade surgiram, pois foram feitos os primeiros estudos *in vivo*. Os trabalhos demonstraram que o laser provoca alterações no metabolismo celular iniciando-se com uma vasodilatação periférica (Mayayo et al., 1989 ; Benedicenti , 1992); desgranulação de mastócitos (Silveira e Lopes, 1991); estimulação mitocondrial (Karu, 1999); aumento da produção de ATP, síntese de histamina e heparina (Trelles e Mayayo, 1992); aumento da síntese de DNA (Loevschall e Arenholt-Bindslev, 1994); aumento da proliferação fibroblástica (Boulton e Marshall, 1986; Lubart et al., 1995; Skinner et al.,1996; Simunovic et al.;2000) e aumento do potencial regenerativo dos tecidos biológicos (Trelles et al.,1988; Mester e Jaszgagi-Nagy,1973; Abergel et al., 1984; Rigau et al, 1994), apresentando efeitos gerais como efeitos antiinflamatórios, antiedematosos e analgésicos (Cruanes,1984).

Relatos de outros autores demonstraram que a reparação de feridas é aumentada pela elevada tensão de oxigênio local, e que a redução do oxigênio disponível, inibe o processo de reparação (Pai et al.,1972). Assim como, grande parte do oxigênio do tecido envolvido na reparação das feridas é levado à área através do sangue (Polack, 1979), soma-se à possível capacidade do laser promover vasodilatação local (Benedicenti, 1983) e angiogênese (Chomete et al.,1987), deixando o tecido bem vascularizado. Isto provavelmente determinará, maior quantidade de oxigênio na região injuriada, promovendo dessa forma aceleração do processo de reparação. Estudos indicam que o efeito benéfico da hiperoxia tecidual sobre a taxa de fechamento de feridas abertas é caracterizado pela taxa de epitelização aumentada (Pollack,1979). O mecanismo de ação do laser em baixa intensidade, no processo de reparação tecidual não está totalmente

esclarecido, porém, não há dúvidas de que o laser aumenta a velocidade de cicatrização (Mester et al., 1972).

Do ponto de vista histológico, as irradiações realizadas seguindo os três procedimentos descritos neste trabalho, resultaram em efeitos de aceleração de cicatrização.

As doses de 3 J/cm² e 1,3 J/cm² foram baseadas nas pesquisas de Garcia (1992) e Rodrigues (2001). No primeiro trabalho observou-se uma aceleração do processo de reparação em lesões cutâneas provocadas em ratos e no segundo observou-se uma aceleração da cicatrização de lesões na mucosa oral, decorrentes de aparelho ortodôntico fixo.

O grupo 2 correspondeu à aplicação pontual de radiação, procurando reproduzir o procedimento estabelecido por Garcia (1992). Pudemos observar que as lesões assim tratadas apresentaram uma evolução histológica mais avançada com relação ao grupo controle. Entretanto, nada pode ser inferido da análise biométrica para este grupo.

Podemos observar que, apesar da aplicação da mesma dose (fluência total) nos grupos 2 e 4, verificou-se uma maior aceleração dos processos cicatriciais neste último, evidenciada pela maior orientação celular e das fibras colágenas no tecido conjuntivo. A esta observação, acrescentam-se os nossos resultados de análise biométrica, onde verificou-se que a diminuição dos tamanhos relativos das lesões para o grupo 4 claramente supera (em média) aquela correspondente para o grupo 2, no 14^o dia.

Os grupos irradiados 3 e 4 têm em comum, por sua vez, o fato de que a radiação foi aplicada de forma uniforme e com mesma intensidade, e têm como única diferença o valor de dose (fluência total) aplicada (1,3 J/cm² no grupo 3 e 3 J/cm² no grupo 4).

No nosso estudo, o grupo 3 apresentou a melhor resposta de aceleração tecidual, em todos os períodos estudados. Isso se evidencia pela maior rapidez na neoformação de tecido conjuntivo (com maior presença de fibras colágenas) e epitelial. Além disso, verificou-se uma maior diferenciação do epitélio no 14^o dia, podendo-se observar todas as suas camadas. Quanto à análise biométrica, verificou-se também que a análise comparativa dos tamanhos relativos das lesões para este grupo são consistentes com a comparação histológica, sendo que supera o grupo controle no sétimo e décimo quarto dia, superando também o grupo dois neste último dia estudado.

Recentemente, Sommer et al. (2001), demonstraram que é necessário um limiar de densidade de energia e intensidade para haver resposta biológica, e que esses dois parâmetros são independentes um do outro.

Em nosso trabalho 1) tendo superado os limiares de densidade de energia e intensidade para haver resposta biológica, 2) evitando-se os valores de intensidade que levam a efeitos térmicos, e 3) utilizando-se doses que correspondam a tempos de exposição viáveis para a prática clínica, pudemos demonstrar experimentalmente que existem valores ótimos para estes parâmetros quanto à resposta final ao tratamento que podem ser claramente determinados.

7 CONCLUSÕES

Dentro das condições e parâmetros estudados na presente pesquisa podemos concluir que o laser de GaAlAs ($\lambda=830\text{nm}$) acelera a resposta biológica do processo de cicatrização das lesões cutâneas em ratos, nas seguintes combinações de intensidades e doses: melhor resposta($I=53\text{ mW/cm}^2$ e $D=1,3\text{ J/cm}^2$

– aplicação uniforme); seguida ($I=53 \text{ mW/cm}^2$ e $D=3 \text{ J/cm}^2$ – aplicação uniforme); seguida ($I=428 \text{ mW/cm}^2$ e $D=3 \text{ J/cm}^2$ – aplicação pontual).

. Os nossos resultados indicam claramente que, dos dois valores de dose e dos dois valores de intensidade utilizados; a combinação de menor valor ($I=53 \text{ mW/cm}^2$ e $D=1,3 \text{ J/cm}^2$ – aplicação uniforme)levou a resultados mais expressivos e significativos dos pontos de vista biométrico e histológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABERGEL,R.P.; LYONS,R.F.; CASTEL, J.C.; DWYER, R.M.; UITTO,J. Biostimulation of wound healing by lasers. Etal approaches in animal models and in fibroblast cultures, apud: SKINNER, S.M.;GAGE,J.P.; WILCE,P.A.; SHAW,R.M.A. Preliminary

study of the effects of laser radiation collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal**,1987, v.41, p.191.

2. ALMEIDA-LOPES, L. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999.

3. BENEDICENTI, A. **Manuale di laser terapia Del cavo orale**. Castello: Maggioli, p.157, 1982.

4. BENEDICENTI, La valutazione dell'effeto della luce Laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo (Protocollo sperimentale su mesentere di ratto Sprague Dowley). **Parodont. Stmat.**, (Nuova), v.22, n.1, p. 37-46, 1983.

5. BERRY, D.P.; HARDING, K.G.; STANTON, M.R.; JASANI, B.; EHRLICH, HPb. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.102, p.124-131, 1998.

6. BISHT, D.; GUPTA, S.C.; MISRA, V.; MITAL, V.P.; SHARMA, P. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, v.100, p.43-6, 1994.

7. BOULTON, M.; MARSHALL, J. He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro, apud: PARIZZOTO, N.A. **Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica espectroscopia por infravermelho**. Tese (Doutoramento). Campinas, (SP), 1998. Universidade Estadual de Campinas.

8. CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de nebacetin e gingilone em feridas infectadas. Estudo clínico e histológico em ratos. **Ars. Cvr. Odont**, v.4, p.27-33, apud: GARCIA, V.G. **Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do raio laser. Estudo clínico, biométrico e**

histológico em ratos. Tese (Livre- Docência).Araçatuba(SP),1992. Universidade Estadual Paulista.

9. CHOMETTE, G.; AURIOL,M.;ZEITOUN,R.;MOUSQUES,T. Effect du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II- Effect sur la cicatrization. Etude em microscopie optique, histoenzymologie et microscopie eletronique. **J. Biol. Buccale**.,v.15, n.1, p. 51-57, março 1987.

10.COSTA,A.M.A. Contribuição ao estudo dos mecanismos envolvidos na reparação tissular: miofibroblastos e matriz extracelular.**Tese de Doutorado**, ICB/USP,1999.

11.CRUÃNES,J.C. **La terapia laser,hoy**. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec,S.A 1984, p.53.

12.EDUARDO, C.P.; CECCHINI,S.C.L. CECCHINI,R.C. Benefits of low Featherstone, Joel M. White. **Laser in dentstry II**. San Jose, Ca: SPIE 2672, p. 27-33 ,1996.

13.EL SAYED, S.O.;DYSON,M.Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg. Med.**, v.19,p.433-7,1996.

14.GARCIA, V.G. Comportamento de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser com diferentes potências e frequências. Estudo clínico, histológico e biométrico. **Tese (livre docência)** ,UNESP,Araçatuba; São Paulo,1992).

15.HAAS,A.F.;ISSEROFF,R.R.;WHEELAND,R.G.;ROOD,P.A.;GRAVES,P.J. Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J.Invest.Dermatol.**, v.94,p.822-6,1990.

16.IWASE,T.; HORI,N.; MORIOKA,T. Possible mechanisms of the He-Ne lasers effects on the cell membrane characteristics. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.4,p.166-171,1988.

17.JUNQUEIRA,L.C;CARNEIRO,J. **Histologia Básica**.Guanabara Koogan,Rio de Janeiro, Brasil,1995.

18.JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil,2000.

19.KAMIKAWA,K.; OHNISHI,T. Essential mechanisms of low power laser effects. In: **Laser Applications in Medicine and Surgery**. Monduzzi, Bologna, p.11-18,1992.

20.KARU,T.Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**,v.56,p.691-704,1989.

21.KARU,T. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. In:Effects of low-power light on biological systems, september 14-15,1995. **Proceedings**. Barcelona,Spain.p.2

22.KARU,T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochem. Photobiol. B. Biol.**, v.49,p.1-17,1999.

23.LOEVSCHALL,H.; ARENHOLT-BINDSLEV,D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.14, p.347-354, 1994.

24. LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, A. G. Effects of diodes-laser silver arsenide-aluminium (AsGaAl) 904nm on healing of experimental wounds, apud: SKINNER, S. M.; GAGE, J. P.; WIL E, P. A.; SHAW, R. M. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal**, v. 41, p. 191, 1996.

25. LUBART, H. F.; SINYKOV, M.; GROSSMAN, N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy. **Laser Therapy**, v. 7, p. 101-106, 1995.

26. MAIMAN, T. H. Stimulated optical radiation in rubi. **Nature**, v. 107, p. 493-4, 1960.

27. MALDONADO, E. P. Interação da luz laser com tec. biológicos: aplicações. **Apostila de Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia**, IPEN/FOUSP, 2000.

28. MAYAYO, E.; TRELLES, M. A.; CALDERHEAD, R. G.; SANTAFE, M.; TOMAS, J.; RIGAU, J. Short term ultrastructural changes in soft tissue (endomysium) after LLLT helium-neon laser irradiation. **Laser Therapy**, p. 119-126, 1989.

29. MESTER, E.; SZENDE, T. S.; SCHER, A. Stimulation of wound healing by laser rays. **Acta Chirurgica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 13, p. 315-324, 1972.

30. MESTER, E.; JÁSZSAGI-NAGY, É. The effect of laser radiation on wound healing and collagen biosynthesis. **Studia Biophysica**, v. 35, p. 227-230, 1973.

31. MESTER, E. A laser sugar alkalmazása a gyógykezelésben. **Orv. Hetilap**. v. 107, p. 1012, 1996 apud ALMEIDA-LOPES, L. Análise em

vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva **Dissertação de Mestrado** humana tratados com laser de baixa potência., Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999.

32.NARA,Y.; TSUKAMOTO,Y.; FUKUTANI,S.; YAMAGUCHI,N.;MORI,M; MORIOKA,T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. **Lasers Life Sci.**,v.4,p.249-256,1992.

33. PAI, M.P.; HUNT, T. K. effect of varying oxygen tensions on healing of open wounds. **Surg. Gynec. Obstet.**, v.135, p. 756, 1972.

34.PEREIRA,F.E.L. Etiopatogênese Geral das Lesões. Em: **Bogliolo-Patologia Geral**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil p.19-37,1998.

35.POLLACK, S.V. Wound healing: A review. I. The biology of wound healing. **J.Dermat.Surg.Oncol.**, v.5,n.5, p.389-393, 1979.

36.PRADELLI,P.; De l'utilisation des lasers Hélium-Néon. **Chir.Dent. France**,v.55,p.37-39,1985.

37.RIBEIRO,M.S. Estudo teórico-experimental dos efeitos não térmicos da radiação laser polarizada em tecidos vivos. **Dissertação de Mestrado**, IPEN/CNEN-SP,1991.

38.RIBEIRO,M.S. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos; Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. **Tese de**

Doutorado, na área de Tecnologia Nuclear-Materiais, IPEN/USP, 2000.

39. RIGAU, J.; SUN, CHUNG-HO.; TRELLES, M.A.; BERNS, M. Effects of the 633 nm. Laser on the behavior and morphology of primary fibroblast culture. **Spie**, v.2630, p. 38-42, 1994.

40. ROBBINS, S.L., COTRAN, R.G., KUMAR, V. Inflammation and repair. In: ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. ed. **Pathologic basis of diseases**. 3rd.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1984. p.40-84.

41. ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KIMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil, 1986.

42. RODRIGUES, M.J. Estudo dos efeitos da radiação na aceleração de cicatrização de lesões orais provocadas por aparelho ortodôntico. **Tese de Mestrado**, IPEN/FOUSP, 2001.

43. SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; SCHAFFER, P.M.; BUSH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effects of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.54, p.55-60, 2000.

44. SILVA, N.M.M.; CECCHINI, R.C.M., EDUARDO, C.P. Aplicações clínicas do soft laser em odontologia. **Rerv. Paul. Odontologia**, v.14. Power lasers on oral soft tissue. In: HARVEY A. Wigdior, John D. B. n.4, p.30-32, jul/ago 1992.

45. SILVEIRA, J.C.; LOPES, E.E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de AsGa- 904nm (Estudo

experimental em cobaias- *Cavia porcellus*). **Arq. Cent. Estud. Curso Odontol.**, Belo Horizonte. v.28,p.73-96, 1991.

46. SIMUNOVIC, Z.; TROBONJACA, T.; TROBONJACAM, Z. Treatment of Medial and Lateral Epicondylitis- Tennis and Golfer's Elbow-with low level laser therapy: a multicenter double blind, placebo-controlled clinical study on 324 patients. **J.Clin.Laser Med. Surg.**, v.16, p.145-151, 1998.

47. SIMUNOVIC, Z.; IVANKOVICH, A.D.; DEPOLO, A. A wound healing of animal and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: A randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, p.67-73, 2000.

48. SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. Cap.17, p.222-223.

49. SKINNER, S.M.; GAGE, J.P.; WILCE, P.A.; SHAW, R.M.A. Preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. **Australian Dental Journal**, v.41, p.188-92, 1996.

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

51. SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, J.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica, Mamíferos**. Rio de Janeiro, 1985.

52.SOMMER,A.P.; PINHEIRO,A.L.B.; MESTER, A.R.; FRANKE, R-P; WHELAN,H.T. Biostimulatory window in low-intensity laser activation lasers, and NASAS light emitting diode array system **J. Clin. Laser Med. Surg**, 19: 29-33,2001.

53.SROKA,R.; SCHAFFER,M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T.; SCHRADER-REICHARD,U.;BUSCH,M.;SCHAFFER,P.M.;DUHMKE,E.; BAUMGARTNER,R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers Surg.Med.**v.25, p.263-271,1999.

54.TRELLES, M.A.; MAYAYO,E.; RIGAU,J.; BAUDIN,G. Histamine & low power laser. **The Journal of Bloodless Medicine & Surgery**, v.6,p. 15-16,1998.

55.TRELLES, M.A.; RIGAU,J.; VELEZ, M. LLLT in vivo effects on mast cells. In: **Lasers in Medicine and Dentistry**, European Medical Laser Association, p.169-185, 2000.

56.TÚNER,J.; HODE,L. **Low-level laser therapy**:clinical practice and scientific background. Prima Books, Sweden, 1998.

57.TÚNER,J. and HODE,L. **Low Level Laser Therapy**. Sweden: Prima Books,1999.

58.WALKER,M.D.; RUMPFS.; BAXTER G.D.; HIRST D.G.; LOWE A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Laser Surg. Med.** ,v.26,p.41-7,2000.

59.WALSH,L.J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part1. Soft tissue applications. **Australian Dental Journal**,v.42,p.247-54,1997.

60. YU, H-S.; CHANG, K-L.; YU, C-L.; CHEN, J-W.; CHEN, G-S. Low energy He-Ne laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 107, p. 593-6, 1996

61. ZEZEL, D. Efeitos Biológicos da Luz Laser. **Apostila de aula do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia.** IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.