



BR0645462



INIS-BR--4043

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

**ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA RADIAÇÃO LASER  
EM BAIXA INTENSIDADE SOBRE MASTÓCITOS DE  
HIPERPLASIAS FIBROSAS INFLAMATÓRIAS CORADAS E  
NÃO CORADAS POR AZUL DE TOLUIDINA**

**IRIS SAWAZAKI**

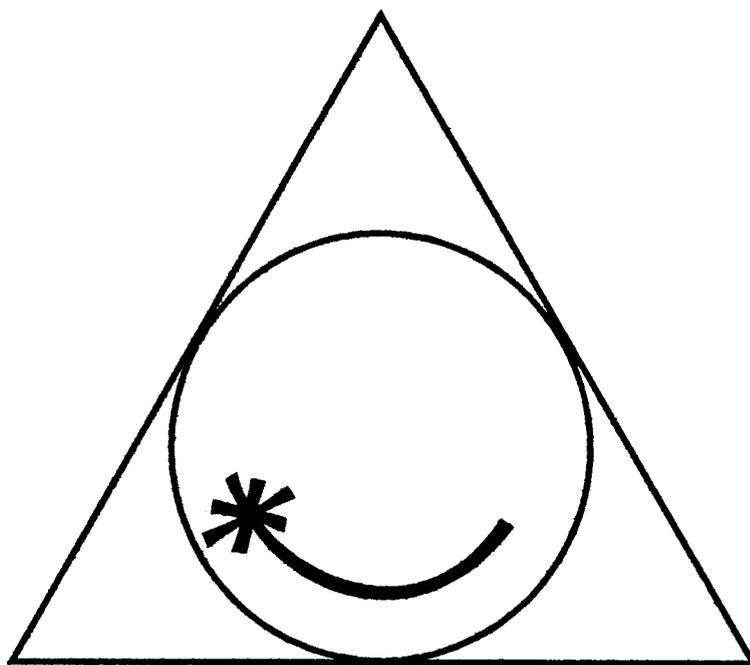
Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre Profissional na área de Lasers  
em Odontologia.

Orientador:  
Prof. Dr. Edmir Matson

Co-Orientadora:  
Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro

**São Paulo  
2001**



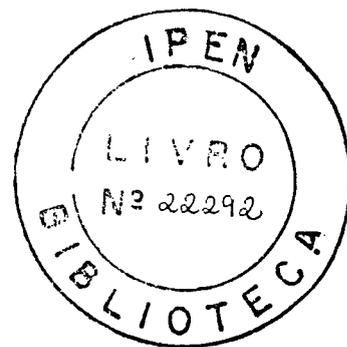


**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM  
ODONTOLOGIA**

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**  
**Faculdade de Odontologia da**  
**Universidade de São Paulo**

**Estudo comparativo do efeito da radiação laser em baixa intensidade sobre mastócitos de hiperplasias fibrosas inflamatórias coradas e não coradas por azul de toluidina**

**Iris Sawazaki**



Trabalho apresentado para obtenção  
do grau de Mestre Profissional em  
Lasers em Odontologia.

**Orientador: Prof. Dr. Edmir Matson**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Martha  
Simões Ribeiro**

2001, São Paulo

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**  
**Faculdade de Odontologia da**  
**Universidade de São Paulo**

**Estudo comparativo do efeito da radiação laser em baixa intensidade sobre mastócitos de hiperplasias fibrosas inflamatórias coradas e não coradas por azul de toluidina**

**Iris Sawazaki**

Trabalho apresentado para obtenção do grau de Mestre Profissional em Lasers em Odontologia.

**Orientador: Prof. Dr. Edmir Matson**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro**

2001, São Paulo

## SUMÁRIO

	Página
Dedicatória	III
Agradecimentos	IV
Lista de tabelas	VI
Lista de figuras	VII
Resumo	IX
Abstract	X
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LASERES E SUAS PROPRIEDADES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Radiação Eletromagnética e Laseres.....	4
2.2 Transições Eletrônicas e Moleculares.....	6
2.3 Equipamento laser.....	8
2.4 Princípios da Inversão de População.....	9
2.5 Feixe Laser.....	10
2.6 Sistemas de Entrega de Feixe.....	10
2.7 Tipos de Regime de Operação Laser.....	11
2.8 Interação da Luz Laser com o Tecido Biológico.....	11
2.9 Laseres Mais Relevantes de Uso Odontológico.....	13
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1 Do Efeito dos Laseres de Baixa Intensidade.....	16

3.1.1	Registro no FDA.....	19
3.1.2	Parâmetros de Tratamento.....	20
3.1.3	Mecanismos de Funcionamento da Luz Laser em Baixa Intensidade Sobre o Tecido.....	22
3.2	Da Hiperplasia Fibrosa Inflamatória.....	27
3.3	Dos Mastócitos no Processo de Inflamação e Reparo.....	31
3.4	Da Desgranulação de Mastócito Estimulado pela Luz Laser de Baixa Intensidade.....	43
3.5	Da Aplicação de Corante Exógeno Como Agente Fotossensibilizador Tecidual.....	44
3.6	Do Azul de Toluidina a 1%.....	47
4.	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>50</b>
5.	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>51</b>
6.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
7.	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>72</b>
8.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
9.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>

## DEDICATÓRIA

Á minha família:

Minha mãe Izabel, meu pai Mario e meus irmãos Renato e Marcio , base emocional das minhas mais importantes decisões.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edmir Matson , por ter me auxiliado a definir linhas de pensamento para a pesquisa.

À minha co-orientadora e amiga Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro sem a qual seria impossível a realização deste trabalho. Minha admiração e meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia pelo incentivo, apoio e importantes sugestões no delineamento desta pesquisa.

Ao amigo Prof. Msc. Lauro Toyoshi Mizuno que me acolheu na clínica de Estomatologia da Centro Odontológico Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e possibilitou a realização da pesquisa clínica.

Ao amigo Prof Feis Feres Junior pelo empréstimo do equipamento laser para realização da pesquisa .

Ao Prof. Dr. Tadashi Akatsu que possibilitou a análise das lâminas e teceu valiosas considerações sobre este trabalho .

À Profa Edna Mizuno, aos alunos e monitores da disciplina de Estomatologia da UEL pela criteriosa triagem de pacientes para a pesquisa.

À amiga e mestranda Jane Tonani pelo auxílio na realização das cirurgias de biópsia.

Ao Prof. Dr. Moacyr Domingues Novelli do departamento de Estomatologia da FOU SP pelas importantes sugestões e críticas que me auxiliaram a melhorar a pesquisa.

À técnica superior Patrícia Leonel Gaudino do Laboratório de Anatomia Patológica da FOUSP pelos ensinamentos quanto ao preparo e montagem de lâminas.

Ao Dr. Carlos Floriano de Moraes , do Laboratório APC , que me ajudou a definir uma técnica de coloração para análise das lâminas e me orientou na análise dos mastócitos.

Ao amigo Prof. Msc. Lívio de Barros Silveira pela valiosa troca de informações e orientação na metodologia de contagem de mastócitos.

Ao Laboratório Álvaro por ter cedido o fotomicrografo .

Ao auxiliar técnico Marcos Roberto Kochak do setor de Genética do Laboratório Álvaro e ao técnico Edison Barbosa da Cunha da UNIOESTE( Universidade Estadual do Oeste do Paraná) pelo auxílio nas fotos de lâminas

Ao amigo Prof. Fabio Kursheidt que, enquanto tenente chefe do laboratório de bioquímica do Posto Médico da Guarnição de Cascavel, cedeu o microscópio óptico para análise histológica.

Ao médico Ivair Calone, pela revisão dos textos, pela força e companheirismo ao longo do desenvolvimento da pesquisa .

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 amiga Profa Msc Maria Renata Nogueira Sales Costa pelas importantes considerações sobre o trabalho.

À amiga Lilian Leika Ikeda pela amizade e acolhida na cidade de São Paulo.

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

**Lista de Tabelas:**

Tabela 1 Substâncias pré formadas existentes nos grânulos dos mastócitos e basófilos.

Tabela 2 Funções dos mediadores de mastócitos.

Tabela 3 Número de mastócitos totais e desgranulados contados em cinco campos microscópicos.

Tabela 4 Soma dos mastócitos totais e desgranulados dos 5 campos visuais

Tabela 5 Índice de desgranulação.

Tabela 6 Arco seno da raiz quadrada do índice de desgranulação.

Tabela 7 Médias dos tratamentos e teste de Tukey.

**Lista de Figuras:**

- Figura 1 Emissão espontânea.
- Figura 2 Absorção.
- Figura 3 Emissão espontânea.
- Figura 4 Desenho esquemático de um laser constando todos os seus componentes.
- Figura 5 Formas de interação da luz laser com o tecido biológico.
- Figura 6 Hiperplasia fibrosa inflamatória. Aumento de 20x. Coloração HE.
- Figura 7 Mucosa normal. Aumento de 20X.
- Figura 8 Mastócito – forma arredondada.
- Figura 9 Mastócito – forma alongada.
- Figura 10 Aparelho laser de baixa intensidade utilizado na pesquisa.
- Figura 11 Identificação dos recipientes para biópsia.
- Figura 12 Caso clínico inicial. Hiperplasia fibrosa inflamatória em fundo de vestibulo inferior anterior.
- Figura 13 Anestesia local infiltrativa ao redor da lesão.
- Figura 14 Remoção do terço central (controle).
- Figura 15 Aplicação do laser no terço direito. Modo contato.
- Figura 16 Remoção do terço aplicado laser.
- Figura 17 Aplicação do corante sobre o terço esquerdo.
- Figura 18 Aplicação do laser sobre o terço corado. Modo contato.
- Figura 19 Remoção do terço corado.
- Figura 20 Remoção total da lesão e sutura.

Figura 21 Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. HE. Aumento de 40x. Esquema demonstrativo do método de observação dos cinco campos microscópicos. E-epitélio, C-conjuntivo. Os círculos pretos indicam os cinco campos a serem observados.

Figura 22 Mastócito desgranulando.

Figura 23 Mastócito íntegro.

Figura 24 Campo histológico da área aplicado laser.

Figura 25 Campo histológico da área aplicado laser.

Figura 26 Campo histológico da área controle.

Figura 27 Campo histológico da área controle.

Figura 28 Campo histológico da área corada/laser.

Figura 29 Campo histológico da área corada/laser.

**Estudo comparativo do efeito da radiação laser em baixa intensidade sobre mastócitos de hiperplasias fibrosas inflamatórias coradas e não coradas por azul de toluidina**

**Iris Sawazaki**

**RESUMO**

Este trabalho apresenta uma análise comparativa dos efeitos da radiação laser de baixa intensidade sobre a desgranulação de mastócitos em hiperplasias fibrosas inflamatórias submetidas ou não a uma coloração por azul de toluidina. O corante foi utilizado no intuito de aumentar a absorção da luz laser pelo tecido. A lesão foi dividida em três partes iguais, sendo aplicados três tipos de tratamento sobre cada terço da lesão. Um dos terços foi removido para controle, o outro terço aplicado laser e imediatamente removido e o outro, corado topicamente, aplicado laser e imediatamente após, removido. Sendo que a ordem destas etapas foi aleatoriamente alternada a fim de que o tempo entre uma etapa e outra não interferisse na análise estatística do índice de desgranulação de mastócitos. Verificou-se um índice de desgranulação de mastócitos de 49% para o grupo controle, 87% para o grupo laser e 88% para o grupo corado/laser. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre o terço aplicado laser e o terço corado e aplicado laser, porém em relação ao controle, a diferença deste em relação ao grupo laser e laser/corante foi significativo no nível de 1% de probabilidade.

**A comparative study of the effect of low laser radiation on mast cells in inflammatory fibrous hyperplasia colored and not colored by the toluidine blue.**

**Iris Sawazaki**

**Abstract**

This study shows a comparative analysis of the effects of the laser radiation in low intensity on the mast cell degranulation in inflammatory fibrous hyperplasia when they are colored or not by the toluidine blue. The dye was used in order to increase the absorption of the laser light by the tissue. The injure was divided in three equal parts, and each part received a different kind of treatment. One of them was removed to be the control, the second part was laser treated and then immediately removed and the last one, after being superficially colored, was laser treated and then immediately removed . The order of the stages was randomly changed , then the time between the stages would not interfere in the statistical analysis of the mast cell degranulation rates. It was found that the mast cell degranulation rates were 49% for the control group, 87% for the laser group and 88% for the colored/laser group. There was no significant statistical differences between the group laser treated and the one colored/laser treated. However, there was a significant difference between the control and the treated group ( $P \leq 0,01$ ).

## 1. INTRODUÇÃO

O laser de baixa intensidade vem se tornando uma ferramenta importante no consultório odontológico, na melhoria da qualidade de atendimento e promoção de saúde bucal. Os mecanismos de ação biológica dos lasers de baixa intensidade não estão totalmente esclarecidos, mas sua comprovada eficácia clínica é relatada em muitas pesquisas e incentiva a classe odontológica a pesquisar mais sobre este assunto tão vasto, visando melhorar as técnicas de aplicação, assim como elucidar os possíveis mecanismos envolvidos em cada processo de biomodulação promovido pela ação da luz laser.

Suas indicações mais conhecidas são para tratamento de úlceras venosas ou arteriais resistentes à cicatrização e sua ação analgésica e antiinflamatória como verificada por ABRAMOVICI (1994). Efeitos terapêuticos têm sido documentados como um ativador de reparação tecidual, reparação óssea, regeneração nervosa, assim como estimulador da atividade fagocitária e da proliferação de fibroblastos (SCHNEIDER, 1989).

A vasodilatação é um dos efeitos biológicos caracterizada pela ação dos lasers de baixa intensidade em tecidos e um dos principais efeitos correlacionados à melhora no processo cicatricial (ESCOLA,1985 e SCHINDL,1998) e no efeito analgésico como proposto por SIMUNOVIC(1996). Segundo TRELLES(2000) a vasodilatação não ocorre imediatamente , mas poucos minutos após a irradiação e continua mesmo depois de ter cessado a aplicação do laser. Este efeito prolongado suporta a idéia que este fenômeno não é devido a uma ação térmica, confirmando o já enfatizado por CRUAÑES (1984) .

O fato do aumento de circulação permanecer mesmo após o término da aplicação sugere que o efeito não se dá somente por um efeito físico ligado à ação direta da luz sobre o receptor celular, mas também a um efeito sobre o metabolismo celular ou a um mediador vascular humoral.

A resposta da radiação com laser em baixa intensidade com aumento de circulação pode ser relacionado a um mecanismo hormonal específico, possivelmente originado da secreção de mastócitos, o qual produz e armazena várias substâncias biologicamente ativas chamadas de aminas (TRELLES, 1992).

Este trabalho propõe-se a estudar os efeitos da luz laser de baixa intensidade sobre mastócitos da hiperplasia fibrosa inflamatória submetidos ou não a uma coloração por solução de azul de toluidina a 1%.

Baseado em trabalhos como de KARU (2000), onde esta cita que uma molécula fotoceptora não especializada em absorção de luz pode absorver luz em certos comprimentos de onda e transferir a energia para outras moléculas que, ativadas podem causar uma reação química nos tecidos vizinhos é que, também estuda-se neste trabalho, a possibilidade de um possível aumento do

efeito da luz laser no tecido humano previamente corado por uma solução azul de toluidina a 1% na resposta celular imediata do mastócito .

## 2. LASERES E SUAS PROPRIEDADES

O termo LASER é um acrônimo na língua inglesa *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou seja, amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação (MAILLET, 1987).

### 2.1 Radiação Eletromagnética e Laseres

Quando tratamos de radiação eletromagnética alguns conceitos devem ser evidenciados. A relação entre a frequência e o comprimento de onda pode ser sumarizada no espaço livre pela equação

$$\lambda = c/f \quad (1)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda (em metros),  $c$  é a velocidade da luz (em metros por segundo) e  $f$  é a frequência (em Hertz).

A porção do espectro eletromagnético na qual opera a grande maioria dos laseres está na faixa do raios X, ultravioleta, visível, infravermelho e microondas. A luz apresenta caráter dual, os fenômenos de reflexão, refração, interferência, difração, polarização e dispersão da luz podem ser explicados pela teoria ondulatória e os de emissão e absorção podem ser explicados pela teoria corpuscular.

Da teoria ondulatória temos que a luz consiste de um campo eletromagnético oscilante. Uma onda eletromagnética é descrita por suas propriedades características: comprimento de onda, frequência, amplitude, velocidade e polarização.

Da teoria corpuscular temos que um feixe de luz é composto por um número inteiro de fótons. Fótons são partículas, pacotes de energia, quanta de luz, cuja energia é descrita por :

$$E = h \cdot \nu \quad (2)$$

Onde: E é a energia do fóton ( em Joule), h é constante de Plank ( $6,6 \cdot 10^{-34}$  J.s ) e  $\nu$  é a frequência.

Dado que o comprimento de onda e a frequência são relacionados no espaço livre, como descrito na equação (1) , uma simples substituição resulta no seguinte:

$$E = hc/\lambda \quad (3)$$

Onde E = energia de fóton (J)

h = constante de Planck

c = velocidade da luz (m/s)

$\lambda$  = comprimento de onda (m)

Analisando estas equações podemos observar que, associado aos menores comprimentos de onda da luz estão fótons carregando maiores quantidades de energia. (PARIZZOTO, 1998).

## 2.2 Transições Eletrônicas e Moleculares

A mecânica quântica estabelece que os elétrons ligados a um núcleo atômico podem possuir apenas energias bem definidas, chamadas "quantificadas", ou seja, que assumem valores discretos. A cada uma dessas diferentes energias corresponde um estado do átomo isolado, denominado "estado estacionário", caracterizado por um dos valores da seqüência dos níveis acessíveis de energia  $E_1, E_2, \dots, E_i$ . A cada energia corresponde uma configuração das camadas eletrônicas: a configuração de energia mínima é estável e denomina-se estado fundamental.

Em presença de um campo eletromagnético, um átomo pode efetuar uma transição de um estado estacionário inicial, por exemplo de energia  $E_1$ , para um estado final de energia  $E_2$ . Os diferentes processos de interação da radiação eletromagnética com um sistema atômico são três:

**Emissão espontânea:** Nesse processo, um átomo efetua "espontaneamente" uma transição de um estado excitado  $E_2$  para um estado de menor energia  $E_1$  emitindo um quantum de energia.

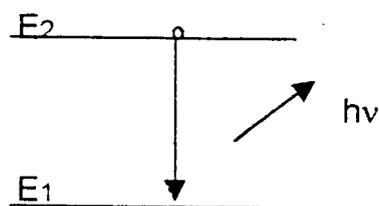


Figura 1: Emissão espontânea.

Absorção: Um dos elétrons muda para a camada (órbita) mais externa, adquirindo energia, passando para um estado de energia excitado devido à absorção de um fóton de energia correspondente à diferença de energia entre dois níveis deste sistema (MAILLET, 1987).

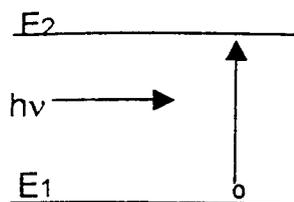


Figura 2 : Absorção.

Emissão estimulada: Em presença de um campo, um fóton de energia exatamente igual ao fóton a ser estimulado induz um átomo a efetuar uma transição do nível superior E2 para o nível E1. O átomo emite um segundo fóton, do qual não apenas a frequência, como também a direção, fase e polarização são idênticas as características do fóton indutor.

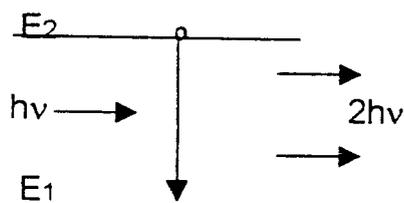


Figura 3: Emissão estimulada.

Este último processo é fundamental para entendermos como ocorre a amplificação da luz pela emissão estimulada de radiação.

### 2.3 Equipamento Laser

Um laser é constituído por 3 elementos principais: um meio de ganho, um sistema de bombeamento e um ressonador óptico.

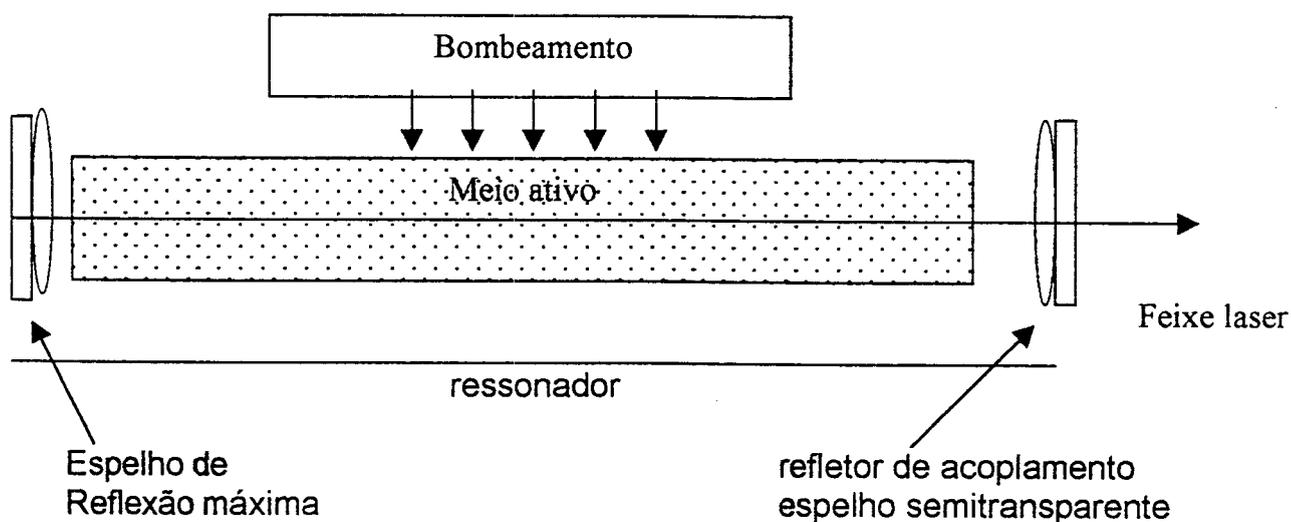


Fig. 4: Desenho esquemático de um laser constando todos os seus componentes (MAILLET, 1987).

O meio de ganho, ou meio ativo, é um meio que possui uma estrutura apropriada de níveis de energia discretos que se excitam facilmente e possuem a capacidade de armazenar a energia recebida do exterior por um processo chamado inversão de população. Uma onda eletromagnética incidente sobre este

material, com frequência correspondente à diferença de energia entre os estados destes átomos, íons ou moléculas, pode ser amplificada, pois os fótons incidentes podem fazer com que os átomos no estado de energia mais alta decaiam para um estado de energia mais baixa através da emissão de fótons adicionais, sendo a radiação emitida (estimulada) completamente indistinguível da radiação incidente (estimulante).

Este meio ativo pode ser líquido, sólido ou gasoso.

Entre os meios ativos sólidos mais comuns atualmente se encontram os cristais de terras raras em matrizes de óxidos ou fluoretos ( Nd:YAG, Nd: YLF, Er:YAG, Er: YSGG etc) ou Ti:Safira e também os lasers de vidro dopados com terras raras e os lasers de semicondutor, dos quais os mais conhecidos são os de GaAs e GaAlAs. Entre os lasers a gás mais comuns estão os lasers de CO<sub>2</sub>, o laser de argônio, de He-Ne, de criptônio, etc. Os lasers líquidos mais comuns utilizam corantes orgânicos, como rodamina, dissolvidos em etanol e são freqüentemente bombeados por outros lasers. (WORKSHOP, 1999)

## **2.4 Princípios da Inversão de População**

Este fenômeno pode ser obtido quando um material laser tem sua energia de equilíbrio modificada de tal maneira, que alguma energia seja armazenada nos átomos, íons ou moléculas deste material, na forma de estado excitado. A quebra deste equilíbrio é realizado através do bombeamento e faz com que o nível superior seja o mais povoado.

No caso dos lasers de diodo , ou de semicondutor, que utilizam junções semicondutoras do tipo p-n como meio laser ativo, o método de bombeamento é o se dá através da passagem de corrente elétrica. No laser de diodo a energia elétrica é diretamente convertida em luz sem a necessidade de uma fonte luminosa adicional .

O ressonador óptico é o responsável pela múltiplas passagens de ida e volta de uma onda eletromagnética no meio ativo, amplificando assim o campo eletromagnético na cavidade. No caso dos lasers de diodo, que são constituídos de camadas de cristal , uma das quais tem alta concentração de elétrons enquanto a outra tem baixa concentração, o crescimento do contato elétrico permite a formação de um ressonador laser entre as faces polidas do cristal contendo o movimento transversal dos fótons.

## **2.5 Feixe Laser**

A radiação laser tem como propriedades colimação (feixe não divergente), monocromaticidade ( fótons estimulam fótons de mesma frequência) e a coerência ( fótons se propagam em fase no tempo e no espaço) .

## **2.6 Sistemas de Entrega de Feixe**

Podem ser feitos diretamente, ou através de endoscópios , lentes, microscópios, braços articulados, guias de onda oco e ainda através de fibras ópticas. O sistema de entrega por fibras ópticas é o mais desejável para aplicações em sistemas

biológicos por ser mais flexível e permitir o acesso a várias regiões, sendo este também o sistema de entrega dos lasers semicondutores.

## 2.7 Tipos de Regimes de Operação Laser

**Operação contínua:** Emissão em forma de um feixe de potência, forma espacial constante. Não varia com o tempo (inversão de população estacionária). A única variável controlada pelo operador é o nível de potência.

**Operação pulsada:** Emissão intermitente. Pulsos de energia emitidos a intervalos regulares de tempo (a inversão de população é variável com o tempo).

Operador pode variar a energia e a largura temporal de cada pulso e também a taxa de repetição.

Alguns mecanismos especiais colocados intracavidade alteram a forma temporal com que o elemento ativo é despopulado. Mecanismos como no caso do chaveamento (*Q-switch*) e do travamento de modos (*Mode-locking*) criam pulsos ultracurtos e de alta potência.

## 2.8 Interação da Luz Laser com o Tecido Biológico

A luz laser interage com um tecido biológico de quatro formas: reflexão, transmissão, absorção e espalhamento.

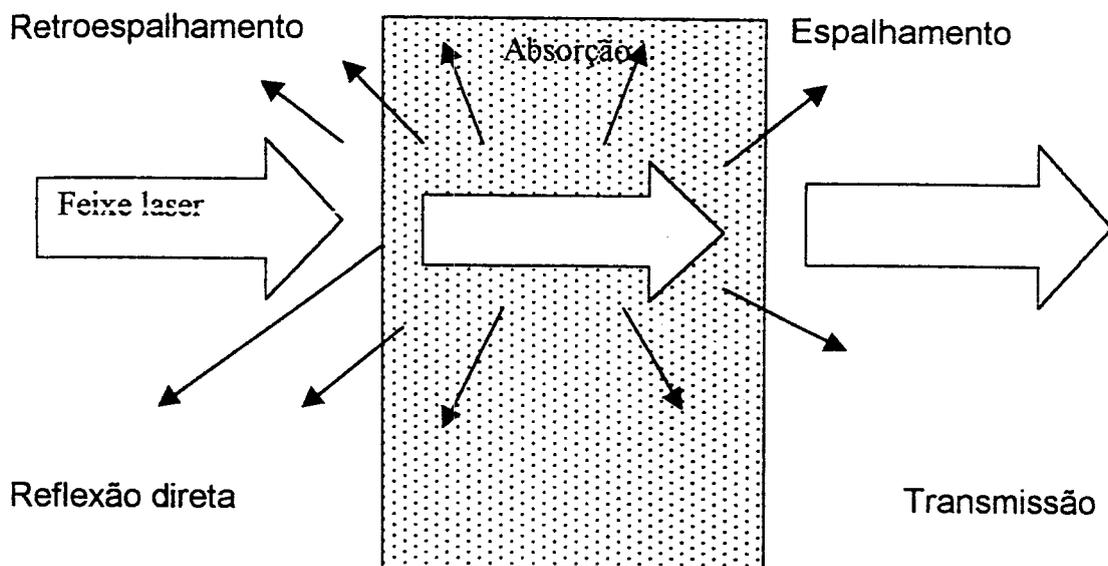


Figura 5 : Formas de interação da luz laser com o tecido biológico (ZEZZEL,2000).

Em uma incidência perpendicular da luz o laser na pele, apresenta 4 a 7% de reflexão difusa, sendo que a fração da radiação que passa para a epiderme e a derme é de 93 a 96% da luz incidente, podendo então sofrer espalhamento ou absorção (CASTRONUOVO, 1992).

A profundidade de penetração no tecido para lasers compreendidos entre os comprimentos de onda 590  $\mu\text{m}$  e 1.5  $\mu\text{m}$  está entre 2 a 8 mm e o espalhamento predomina sobre a absorção .

No caso dos processos ressonantes a luz é absorvida pelo tecido, levando neste caso a uma transferência de energia.

As aplicações dos lasers podem se dar através de interações fotoquímicas, térmicas, fotoablação, ablação induzida por plasma e fotorrupção.

## 2.9 Lasers Mais Relevantes de Uso Odontológico

**Laser de CO<sub>2</sub>:** Aplicação em cirurgia de tecido mole, opera no modo contato, usualmente entregue via braços articulados ou guia de onda ocos. Comprimento de emissão principal é em  $\lambda$  10.6  $\mu$ m ressonante com tecidos que tenham alto conteúdo de água e hidroxiapatita. São os mais eficientes, com até 30% de eficiência. Alta qualidade de feixe. Os lasers de guia de onda oco baixam o custo do equipamento. A potência do laser é alta, desde que seu método de refrigeração seja eficiente. Tamanho do aparelho compatível com o consultório.

**Laser de Neodímio:** Aplicação em cirurgia orais menores, endodontia e prevenção de cáries. Operam na região do infravermelho em  $\lambda$  1064nm. A absorção dos tecidos biológicos nesta região é principalmente devido à melanina e hemoglobina, com pobre absorção da água. Ajustando a energia de saída e o tempo de exposição podem ser conseguidos hemostasia e coagulação. O sistema de entrega geralmente é através de fibra óptica. Podem ser pulsados ou contínuos. Os contínuos não são recomendados para uso intraoral devido a sua profundidade de penetração e possíveis efeitos térmicos indesejáveis. Dimensão

do equipamento compatível com o consultório e necessidade de manutenção com a troca da fibra óptica.

**Laser de Érbio:** Indicado para tratamento de tecidos duros. Comprimento de onda de emissão em  $\lambda$  2.94  $\mu\text{m}$ , é muito bem absorvido pela água e 100 vezes menos pela hidroxiapatita. Atua em modo contato e não contato e remove os tecidos duros por processo de ablação. Sistema de entrega via fibra óptica ou braço articulado. Custo de manutenção com fibra óptica .

**Laser de Argônio:** Indicado para procedimentos de corte, vaporização e coagulação na gengiva e mucosa oral, no modo contínuo com fibra óptica e em dentística como fotopolimerizador de resinas específicas para lasers. Comprimentos de onda de emissão em 488nm e 514,5nm. A absorção do tecido é principalmente devido à hemoglobina, hemosiderina e melanina. Sistema de entrega: fibra óptica (WORKSHOP, 1999).

**Laser de Hólmio:** O Laser de Ho:YLF emite radiação luminosa no comprimento de onda de 2,065  $\mu\text{m}$  coincidindo com um dos picos de máxima absorção da água, o que propicia uma menor profundidade de penetração de ablação , sem a necessidade da introdução de pigmentos. Desta forma o Ho:YLF apresenta maior absorção pela água quando comparado ao Ho:YAG que emite em 2,1  $\mu\text{m}$ .

Seus estudos indicam para sua aplicação em prevenção de cáries.

**Laser de Hélio-Neônio (HeNe):** Emite luz visível com um comprimento de onda de 633 nm (vermelho) e 543.5 nm (verde). Geralmente trabalha no modo contínuo, mas pode ser pulsado, se chopado, ou por uma unidade similar e neste caso metade do rendimento é perdido. Sua potência útil de saída é comumente entre 1 a 10 mW, direto ou via fibra ótica para um tratamento de investigação.

Laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs): Possui comprimento de onda entre 620nm a 1500nm, os quais são determinados pelo tipo de material semiconductor utilizado. No uso terapêutico é normalmente entre 820 nm e 830 nm, que é invisível na faixa do infravermelho e no vermelho, visível, entre 670 nm e 688 nm.

Este laser funciona no modo contínuo, mas pode ser pulsado, e neste caso pode ser do tipo super pulsado como o GaAs (Arseneto de Gálio), e do tipo *switched*, o que significa que metade de sua potência é perdida comparada com o modo contínuo (TUNÉR, 1999).

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Do Efeito dos Laseres em Baixa Intensidade

A célula tem um limiar de sobrevivência, segundo o tecido onde ela está localizada e segundo seu estado fisiológico. Quando trabalhamos respeitando esse limiar de determinada célula, oferecemos a ela uma baixa intensidade de energia, que será utilizada de maneira que irá estimular sua membrana, ou suas mitocôndrias. Dessa forma, estaremos induzindo essa célula à biomodulação, ou seja, ela trabalhará buscando um estado de normalização da região afetada, isso denomina-se Low Intensity Laser Therapy (LILT), ou seja terapia laser em baixa intensidade. Sua principal indicação são todos os quadros patológicos onde se gostaria lograr melhor qualidade e maior rapidez do processo reparacional (quadros de pós-operatório, reparação de tecido mole, ósseo e nervoso), quadros de edema instalado (onde se busca uma mediação do processo inflamatório), ou nos quadros de dor (crônicas e agudas). Quando, ao contrário, se oferece uma densidade tão alta de energia a ponto dessa energia transformar-se em dano térmico e ultrapassar o limiar de sobrevivência dessa célula, estaremos utilizando o laser com finalidade cirúrgica e estaremos trabalhando com laseres em alta intensidade (LOPES, 1999).

Os aspectos biofísicos da LILT podem ser discutidos sob dois pontos de vista: do ponto de vista eletromagnético e do ponto de vista termodinâmico.

Do ponto de vista eletromagnético, sistemas vivos são principalmente governados por interações eletromagnéticas. Cada interação entre moléculas, macromoléculas ou células vivas é basicamente eletromagnética e governada por fótons. Por esta razão espera-se que uma influência eletromagnética, como da luz laser, com seu determinado comprimento de onda tenha um notável impacto na regulação dos processos vivos.

Células fagocitárias humanas naturalmente emitem luz que podem ser detectadas por métodos de contagem de fótons. Moléculas de oxigênio singleto são a principal fonte desta luz emitida nos comprimentos de onda: 480 nm, 570 nm, 633 nm, 760 nm, 1060 nm e 1270 nm. Por outro lado, células humanas (leucócitos, linfócitos, fibroblastos, etc) podem ser estimuladas por laser em emissão de baixa intensidade, justamente nestes comprimentos de onda.

Do ponto de vista termodinâmico, sistemas vivos são sistemas abertos o qual necessitam de um metabolismo para manter seu estado de organização. Este estado somente pode existir se houver um equilíbrio termodinâmico através de dissipação de calor. Este equilíbrio termodinâmico pode ser sensibilizado mesmo por um pequeno estímulo. Por isso, espera-se que mesmo a luz laser em baixa intensidade com o comprimento de onda adequado deva ser capaz de influenciar na dinâmica de regulação dos sistemas vivos.

Por exemplo, a transição de uma célula em estado de repouso para seu estado de atividade de divisão é influenciado por uma pequena flutuação.

Estímulos externos podem induzir este estado de transição. Esta fase de transição induzida por luz pode ser bem ilustrada por várias reações químicas e fisiológicas. Uma das mais importantes reações bioquímicas localizadas na mitocôndria é a oxidação de NADH ( Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) na cadeia respiratória de células aeróbicas. Esta reação tem sido encontrada mostrando oscilações e um comportamento capaz de absorver e amplificar fótons de mesmo comprimento de onda. (KLIMA,2000)

KARU (1992) também afirma que o rápido aquecimento local de cromóforos absorvedores da cadeia respiratória, na ordem de fentossegundos, é capaz de estimular atividade bioquímica.

O laser em baixa intensidade vem sendo estudado desde a década de sessenta com trabalhos publicados por Endre Mester e seu grupo de Budapeste que relata cientificamente os efeitos não térmicos da luz laser na pele de ratos. Nos anos seguintes, artigos foram publicados sobre efeitos em feridas e leucócitos em cultura. Mester demonstrou que células em cultura e tecido podem ser estimuladas por uma certa dose da luz laser. Doses muito baixas não tinham nenhum ou efeito insuficiente. Doses muito altas eram também menos eficientes ou sem efeitos. Estas primeiras pesquisas foram realizadas com o laser de rubi ( $\lambda$  694 nm).

Uma das primeiras observações sobre o efeito da LILT foi o rápido e inesperado crescimento dos pelos em áreas raspadas e depois irradiadas com laser nos ratos experimentais.

Em 1967, Carney et al usando o mesmo tipo de laser demonstraram um aumento na síntese de colágeno nas feridas de pele tratadas com densidades de energia de 0.4 – 2.5 J/cm<sup>2</sup>.

Há agora novas 2000 pesquisas relatadas na literatura na qual o efeitos biológicos dos laseres em baixa intensidade tem sido demonstrados (TUNÉR, 1999).

Há muitas vantagens com a LILT. Primeiro ela não apresenta riscos de ionização de células. Não é invasiva, é indolor, não causa câncer, não aumenta o crescimento de tumores e pode ser combinada com outros tratamentos. Efeitos colaterais são raros. (BENEDICENTI, 1982; BRUGNERA, 1998)

### **3.1.1 Registro no FDA (*Food and Drug Administration*)**

Nos Estados Unidos o uso da LILT é proibido , na Europa é usado pelos clínicos freqüentemente.

No Japão, o uso da LILT como uma modalidade médica foi aprovado pelo governo japonês em 1987 e sua aplicação em seguros de saúde começou em 1996. Em Israel , contudo, não é aprovada.

No Brasil não há proibição para o uso da LILT e a maioria dos equipamentos laseres vem passando por processo de aprovação na vigilância sanitária.

### 3.1.2 Parâmetros de Tratamento

Os seguintes parâmetros são conhecidos como sendo de significativa importância nos resultados do tratamento: escolha do comprimento de onda adequado, medida da dose, densidade de potência, o método de tratamento com o laser, frequência do pulso, profundidade de penetração e o número total de tratamentos.

Comprimento de onda:

É importante o uso do comprimento de onda adequado para determinado tratamento. Mas ainda não é possível determinar o melhor comprimento de onda para cada tratamento.

Sabe-se que o laser de He-Ne ( $\lambda$  633-635nm) é a melhor opção para úlceras e regeneração nervosa.

O laser de GaAs é a melhor escolha para tratamento de lesões mais profundas e tem uma maior influência no pós-operatório quanto a dor e inchaço.

O laser de GaAlAs é uma boa alternativa para tratamento de dor e edema e tem-se uma boa experiência com úlceras crônicas (TUNÉR, 1999).

Área de Tratamento

Para o cálculo da dose, potência e tempo de tratamento é necessário saber a área de tratamento, que freqüentemente é expressa em  $\text{cm}^2$ .

Experiências práticas demonstram que é mais benéfico tratar pequenas áreas mais intensamente e depois tratar as áreas próximas, do que tratar grandes áreas por um longo período de tempo em uma só vez

### Intensidade

A intensidade é dada por watts por  $\text{cm}^2$  e avalia a possibilidade de dano microtérmico.

Para obtermos um efeito bioestimulador é necessário que a intensidade não seja muito baixa, mesmo que a dose de tratamento seja alta. Baixas intensidades não podem ser compensadas inteiramente pelo tempo.

VAN BREUGEL(1992), demonstra em seus estudos que a intensidade e o tempo de exposição são parâmetros importantes e que a intensidade isoladamente é importante. Tratar uma área com 40 mW por 10 segundos é mais benéfico do que tratar com 10 mW por 40 segundos.

### Dose de tratamento

Este é o mais importante dos parâmetros. A dose e o intervalo de tratamento dependem das condições do tecido, se a inflamação é aguda ou crônica, mas também se a intenção é o alívio da dor ou alcançar um efeito mais prolongado. Especificar a dose certa não é fácil. Numerosos parâmetros devem ser levados em conta como: comprimento de onda, contato ou não contato com o tecido, tipo de tecido, inflamação aguda ou crônica, qual a profundidade, condições gerais do paciente, cor da pele, etc.

Experiências práticas demonstram que é mais benéfico tratar pequenas áreas mais intensamente e depois tratar as áreas próximas, do que tratar grandes áreas por um longo período de tempo em uma só vez

### Intensidade

A intensidade é dada por watts por  $\text{cm}^2$  e avalia a possibilidade de dano microtérmico.

Para obtermos um efeito bioestimulador é necessário que a intensidade não seja muito baixa, mesmo que a dose de tratamento seja alta. Baixas intensidades não podem ser compensadas inteiramente pelo tempo.

VAN BREUGEL(1992), demonstra em seus estudos que a intensidade e o tempo de exposição são parâmetros importantes e que a intensidade isoladamente é importante. Tratar uma área com 40 mW por 10 segundos é mais benéfico do que tratar com 10 mW por 40 segundos.

### Dose de tratamento

Este é o mais importante dos parâmetros. A dose e o intervalo de tratamento dependem das condições do tecido, se a inflamação é aguda ou crônica, mas também se a intenção é o alívio da dor ou alcançar um efeito mais prolongado. Especificar a dose certa não é fácil. Numerosos parâmetros devem ser levados em conta como: comprimento de onda, contato ou não contato com o tecido, tipo de tecido, inflamação aguda ou crônica, qual a profundidade, condições gerais do paciente, cor da pele, etc.

### Cálculo da dose

Dada uma intensidade recomendada, a dose é a quantidade de energia administrada ao tecido. É equivalente à fluência luminosa da exposição laser utilizada. A dose é calculada por:

$$D = \frac{P \cdot t}{A} \quad (\text{J/cm}^2)$$

A

P é a potência em watts

t é o tempo em segundos

A é a área em cm<sup>2</sup>

Desta expressão, para uma dose preconizada, conhecendo-se a intensidade e a área a ser irradiada, pode-se calcular o tempo de exposição.

A dosimetria diz respeito à unidade de superfície irradiada e não à totalidade de radiação no paciente nem da lesão independente.

Muitos autores como Mester, acreditam que não se deve ultrapassar uma densidade de energia de 12 J por unidade de superfície, pois então poderíamos causar um efeito inibidor (TUNÉR, 1999).

### **3.1.3 Mecanismos de Funcionamento da Luz Laser em Baixa Intensidade Sobre o Tecido**

O tratamento com laser de baixa intensidade não é baseado em efeito térmico, mas nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos nas células e tecidos.

Uma resposta fotobiológica envolve a absorção de um específico comprimento de onda de luz por algum fotorreceptor. Assim, tal molécula absorvedora participa numa reação metabólica na célula (WHITSON, 1972).

Quando incidimos luz laser sobre um local, muitas reações são verificadas onde a luz incide. Certas funções celulares são estimuladas e isto é particularmente evidente na célula com diminuição de suas funções (KARU, 1987).

É discutido que cromóforos, na forma de porfirinas por exemplo, têm uma importância particular no papel da biomodulação. Pesquisadores têm demonstrado com o uso da NMR (Ressonância Magnética Nuclear) que algumas vezes uma molécula de oxigênio singleto é formada quando o tecido é irradiado com luz laser. O oxigênio singleto é um radical livre que influencia na formação de ATP ( Adenosina Trifosfato) , o qual constitui -se no combustível da célula e sua reserva de energia. Adicionalmente, tem se pesquisado que o balanço dos íons de cálcio na célula é afetado (TUNÉR, 1999). A influência da luz laser no processo de oxidação tem sido demonstrado por KARU (1987) e outros. Karu sugere que o citocromo  $a/a_3$ , um elo importante na respiração, é um importante fotorreceptor.

Está demonstrado que a absorção das radiações eletromagnéticas compreendidas entre o ultravioleta até as infravermelhas, passando pelo visível, se efetuam em sua maior parte na derme e epiderme (CRUAÑES, 1984).

Na terapêutica física, a absorção se quantifica em energia absorvida depositada em uma região orgânica. Este suprimento energético será o que define a magnitude e extensão dos efeitos. Quando para este suprimento energético se utiliza de potências maiores a 1 Watt, a conversão da energia absorvida se dissipa em forma de calor e ondas de choque. Na medida que utilizamos potências mais elevadas o efeito calórico é superior , mas não mais penetrante (CRUAÑES, 1984).

Quando o suprimento energético se realiza com baixas intensidades praticamente não existem efeitos mecânicos, não há dissipação calórica e a conversão se efetua provocando efeitos bioquímicos e bioelétricos.

O comprimento de onda da emissão determinará o tipo de pigmento, célula, tecido que absorverá mais esta radiação (CRUAÑES, 1984).

Um grande número de componentes celulares possuem bandas de absorção na região do visível (WILDEN, 1998) e manifestam fotoativação através de reações bioelétricas. A energia absorvida nas mitocôndrias pode ser avaliada por reações fotoquímicas conduzindo a um aumento da atividade de enzimas oxidativas. A absorção de fótons pelos citocromos, presentes em grande número nas cristas mitocondriais, poderia levar a um aumento da síntese protéica.

A magnitude dos efeitos da bioestimulação dependem do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Isto explica porque nem sempre o efeito biomodulador é observado. Desta forma, no tecido saudável, o tratamento a laser parece não ter efeito, mas vários estudos levantam questões que nos levam a crer que este conceito deva ser revisto. Toda radiação, mesmo em tecido saudável, ativa uma variedade de processos, como por exemplo, a produção de oxigênio singlete. Se nenhum trauma ocorrer, estes produtos desaparecem rapidamente e o estado normal se restabelece. Se o trauma ocorrer imediatamente após a irradiação, contudo, o sistema de defesa está num estado mais favorável. Se um tecido a ser operado está em condições fisiológicas ruins (edema, inflamação, etc.) a energia laser é muito melhor no pré-operatório.(TUNÉR,1999). Estudos como de BARASCH (1995) onde se estudou o tratamento com o laser de hélio-neônio para prevenção de mucosite oral em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, assumiu-se como metodologia a aplicação de laser no pré-operatório,

cinco dias antes do transplante obtendo bons resultados quanto a redução da severidade dos sintomas e da dor.

Os efeitos fotobiológicos podem convencionalmente ser divididos em diretos e indiretos. Os mecanismos pelos quais estes efeitos se manifestam não estão totalmente esclarecidos, mas algumas possibilidades para os mecanismos primários ou diretos sobre as moléculas receptoras podem ser traçados:

Efeitos diretos ou primários:

São aqueles relacionados à interação entre fótons e moléculas no tecido.

- Mudanças nas propriedades das reações redox (óxido-redução) e a aceleração da transferência de elétrons (KARU, 1987);
- Mudanças na atividade bioquímica induzida pelo aquecimento transitório local dos cromóforos absorvedores (KARU, 1992);
- A ação fotofísica sobre as ligações de hidrogênio (WILDEN, 1998b);
- Reordenação da bicamada lipídica com conseqüente alteração da permeabilidade celular (RIBEIRO, 2000).

Efeitos indiretos ou secundários:

São aqueles relacionados com mudanças químicas induzidas pelos mecanismos primários.

- Metabolismo celular e síntese de colágeno mais acentuada em fibroblastos (VAN DER VEN, 1998);
- Influência na dor (DONATO, 1993);

Estuda-se que o mecanismo possa estar ligado ao aumento da síntese de endorfinas, aumento do potencial de ação de células nervosas, diminuição da atividade das fibras C e diminuição de bradicinina.

- Estimulação da formação de DNA e RNA no núcleo da célula ( KARU, 1995) ;
- Efeitos sobre o sistema imunológico (SAMOILOVA, 1998);
- Formação de capilares mais pronunciada pela liberação de fatores de crescimento(SCHINDL, 1998);
- Aumento na atividade de leucócitos (VALENTINA, 1998).

### 3.2 Da Hiperplasia Fibrosa Inflamatória

A hiperplasia fibrosa inflamatória possui como sinônimas os termos tumor por traumatismo de dentadura, epúlide fissurada e tecido exuberante e , em especial quando localizada em fundo de sulco vestibular, tem recebido a nomenclatura de tecido redundante e granuloma *fissuratum* (SHAFFER, 1984; TOMASI, 1988; KIGNEL, 1997).

A hiperplasia é uma forma de adaptação celular. A adaptação celular é uma forma da célula se adaptar ao seu ambiente para que não sofra lesão. Esta é então um estado intermediário entre a célula normal não estimulada e a célula lesada superestimulada (ROBBINS, 1994).

Segundo TOMASI (1988) é classificada como um processo proliferativo não neoplásico.

É considerada uma das reações teciduais mais comuns a uma dentadura mal-adaptada segundo SHAFFER(1984), TOMASI(1988), GOMEZ(1992). Apresenta como características clínicas o desenvolvimento de rodetes alongados de tecido no fundo de sulco de vestíbulo, nos quais a borda da dentadura se adapta perfeitamente. Esta proliferação de tecido, em geral , é de desenvolvimento lento e , provavelmente, resulta tanto da reabsorção da crista alveolar como do traumatismo provocado pelas dentaduras frouxas.

Esta prega de tecido exuberante usualmente não apresenta inflamação clínica intensa, embora possa haver irritação e mesmo ulceração na base da prega na qual a dentadura se encaixa. A lesão é firme à palpação.

O diagnóstico clínico, em geral, não é dificultoso em função da presença de trauma evidente. A remoção do agente causador, por longo período de tempo, determina constantemente a diminuição do volume da lesão, em decorrência da redução do componente inflamatório, sendo necessária a remoção cirúrgica para a eliminação total (TOMASI, 1988).

Segundo CASTRO (1997), em um estudo de 665 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória de fórnix do vestíbulo bucal, concluiu que há predominância desta lesão em mulheres, a raça branca é mais acometida, a lesão é por excelência benigna, não observando nenhum caso de malignização.

Apresenta como característica histológica uma proliferação de tecido conjuntivo e epitelial acompanhada de quadro inflamatório (FIG.6). Frequentemente, também existe hiperortoceratose ou paraceratose. O tecido conjuntivo está representado principalmente por grossos feixes de fibras colágenas com poucos fibroblastos ou vasos sangüíneos, a menos que exista uma reação inflamatória ativa. Esta reação, todavia, é observada com freqüência na base da fissura adjacente à borda da dentadura, especialmente se o tecido estiver ulcerado superficialmente.

Um achado histológico adicional observado com freqüência no epitélio da superfície da hiperplasia fibrosa inflamatória é a distrofia ceratina mucopolissacarídica, também denominada "acúmulo de plasma". Sua ocorrência não se limita à hiperplasia inflamatória, podendo ser encontrada também no epitélio bucal em várias outras condições, especialmente as que envolvem

irritação do epitélio. Esta distrofia ceratina mucopolissacarídica histologicamente consiste em “lagos” de material homogêneo, eosinófilo, na camada espinhosa superficial, onde parecem ter substituído as células individuais (SHAFFER, 1984).

Em condições de normalidade a mucosa do fórnice vestibular é fina e está frouxamente aderida ao periósteo por uma camada submucosa bem definida de tecido conjuntivo frouxo e pode conter pequenas glândulas mista. O epitélio é fino e não queratinizado e as cristas epiteliais e as papilas são baixas e muitas vezes inteiramente ausentes (BHASKAR, 1989). Ver figura 7.

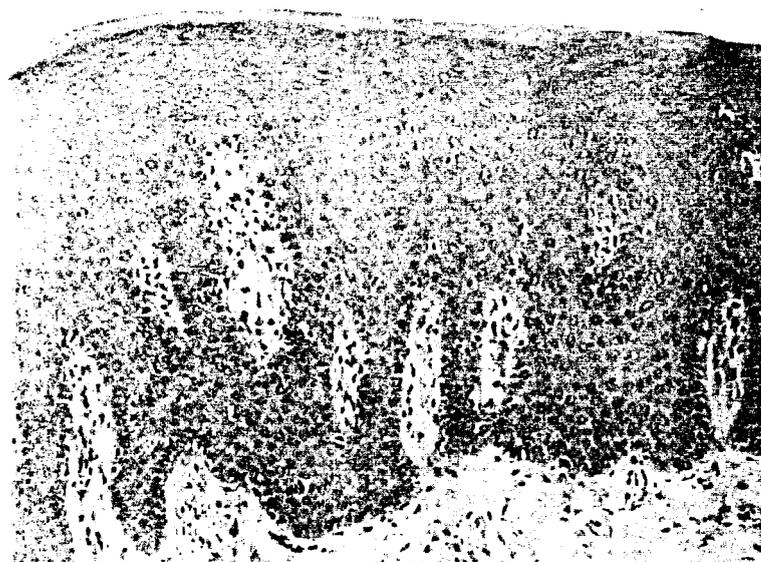


Figura 6: Hiperplasia fibrosa inflamatória aumento de 20x. Coloração de H.E. (Hematoxilina – Eosina).



Figura 7: Mucosa normal . Aumento de 20x ( EVERSON,1995).

### 3.3 Dos Mastócitos no Processo de Inflamação e Reparo

O processo inflamatório é uma resposta tissular que ocorre basicamente no tecido conjuntivo de modo específico; daí que se considera como um fenômeno essencialmente mesenquimal. Uma das características do mesênquima primitivo é a grande capacidade defensiva de responder ativamente frente a corpos ou substâncias estranhas. No tecido conjuntivo, devem-se diferenciar diversas estruturas, as quais todas, em grau maior ou menor, participam do processo inflamatório. Dentro das células deve-se salientar os mastócitos ( ou mastzellen de Ehrlich) , os fibroblastos, as células macrofágicas e as células leucocitárias, de caráter fagocitário, provenientes do sangue. Os vasos sanguíneos (também de origem mesenquimática) são parte integrante importante do tecido conjuntivo. Fibras, como as colágenas em especial, as finas de reticulina, fibronectina e elásticas formam, com a substância amorfa ou fundamental (constituída por glicosaminoglicanos e proteoglicanos), a parte não celular do tecido conjuntivo. Deve-se acrescentar a presença importante adicional de fibras nervosas, tanto sensitivas como eferentes do sistema autônomo, que embora não sejam elementos conjuntivos propriamente ditos, integram a fisiologia do tecido conjuntivo apto para a reação de defesa e de reparação (DOUGLAS, 2000).

Deste modo, quando o organismo for agredido pelo agente flogogênico, o tecido conjuntivo pode reagir, determinando a inflamação, na qual participam todos os elementos referidos integrantes do tecido conjuntivo.

O agente flogogênico tem a capacidade de interferir sobre determinadas células lesando-as, isto é, provocando nelas uma ação cujos resultados são expressos finalmente como inflamação. Aparentemente, é variável segundo a característica do agente flogogênico, e também o tipo de célula reativa; mas dentro delas, são os mastócitos, os monócitos ( e outros macrófagos) e os polimorfonucleares, os elementos mais importantes como células-alvos atingidas pelo estímulo flogogênico, e onde se produzem as modificações metabólicas e funcionais iniciais que vão representar o gatilho flogogênico que dá lugar ao processo inflamatório e se vai expressar pela liberação de substâncias de efeito flogístico - são os chamados mediadores da inflamação - ou seja, que vão determinar, em grande parte, as características reacionais da inflamação. A inflamação, deste modo, é um processo eminentemente dinâmico, daí que se prefira falar melhor de processo inflamatório, sob o ponto de vista funcional.

Reconhecem-se fases evolutivas no processo inflamatório, de acordo com a ação e a reação promovida pelo agente flogogênico. Estas fases são sincrônicas com as fases da resposta geral frente à agressão ou *stress* (DOUGLAS,2000). Contudo, uma vez cessada a inflamação, o tecido afetado entra numa segunda etapa, que deve reparar as estruturas destruídas e/ou alteradas, bem como repor o número de células afetadas preenchendo as áreas desaparecidas ou danificadas, conjunto este de reações denominado de processo de reparação (GUYTON,1996; JUNQUEIRA,1997; ROBBINS,1994).

A histamina, um dos principais mediadores da fase imediata da inflamação, é o principal responsável pelo aumento de permeabilidade vascular, causando contração muscular endotelial e alargando as junções celulares endoteliais (JUNQUEIRA, 1997).

A histamina, uma pequena molécula derivada do aminoácido histidina está presente em grande quantidade na forma de grânulos distribuídos no citoplasma de mastócitos e sua desgranulação pode ser causada por vários estímulos como:

- injúria física como trauma, frio e calor;
- reações imunes envolvendo anticorpos para mastócitos;
- fragmentos do sistema complemento chamados anafilatoxinas;
- histamina derivada de proteína de leucócitos;
- neuropeptídeos;
- citocinas IL1, IL8 ( JUNQUEIRA, 1997).

Em humanos a histamina causa dilatação das arteríolas e aumenta a permeabilidade vascular das vênulas, contudo contrai as artérias. A histamina age na microcirculação via receptor H1 (JUNQUEIRA, 1997).

Os mastócitos são células que têm distribuição orgânica muito ampla, estão espalhadas através de todo o organismo, sendo sua localização preferencialmente perivascular, ou seja, orientam-se de acordo com a disposição dos vasos sanguíneos. Contudo, é possível que os mastócitos também se encontrem em locais avasculares, por exemplo, dentro do nervo, entre os axônios ou mesmo no sistema nervoso central, particularmente no hipotálamo.

Recebem a denominação de *mast*, que significa cevar, ou seja, alimentar em excesso, de acordo com a interpretação de Ehrlich, o qual atribui a estas células um papel básico de armazenamento (DOUGLAS, 2000).

Os mastócitos podem assumir duas formas segundo STERNBERG(1996): a forma arredondada e a forma alongada (FIG.8 e 9).

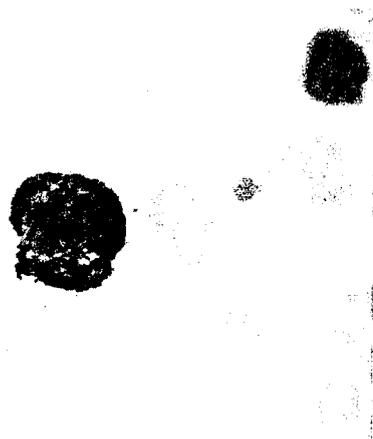


Fig.8 Mastócito - forma arredondada STERNBERG(1996).



Fig 9. Mastócitos - forma alongada STERNBERG(1996).

Muitos estímulos flogogênicos atuam como secretagogos, porque produzem esvaziamento dos grânulos dos mastócitos.

Na tabela seguinte pode ser observado alguns dos principais constituintes dos grânulos dos mastócitos. Dentre eles, há mediadores pré-formados; outros provavelmente não estão pré-formados, mas são velozmente sintetizados a partir da aplicação do estímulo flogogênico, enquanto outros são formados somente bem após a aplicação do estímulo; são mediadores ativados pelo estímulo flogogênico.

Tabela 1: Substâncias pré-formadas existentes nos grânulos dos mastócitos e basófilos:

Substâncias pré-formadas	Efeitos principais promovidos
Histamina	<p>Pró-inflamatório: através de receptor H1</p> <p>Aumento da permeabilidade vascular</p> <p>Quimiocinesia</p> <p>Vasodilatação</p> <p>Maior formação de muco</p> <p>Antinflamatórios: através de receptor H2</p> <p>Aumento de AMPc</p> <p>Regula HSF e hipersensibilidade secundária</p>
Serotonina ou 5-OH triptamina	<p>Aumento da permeabilidade vascular</p> <p>Vasodilatação ou vasoconstrição, segundo o local e espécie.</p>
Heparina e sulfato de condroitina	<p>Anticoagulante</p> <p>Anticomplemento</p> <p>Vasodilatação – em altas concentrações</p>
Caliceína	<p>Formação de bradicinina</p> <p>Vasodilatação</p>
Ativador de caliceína	<p>Ativa vários sistemas : cininas; coagulação; complemento</p>

Ativador do fator de Hageman	Similar ao anterior
$\beta$ -glicuronidase	Degradação de glicosaminoglicanos
Arilsulfatase-A	Relaxamento da musculatura lisa
VIP ou peptídeo intestinal vasoativo	
Fatores Quimiotáticos(CF)	Liberação de enzimas lisossomais
Eosinófilos ou ECF	Quimiotaxia para eosinófilos
NCF ( neutrófilos)	Expressão de receptores para C3b e C4b
ECF de peso molecular intermediário	Similar ao anterior

As aminas tem uma diversidade de ação capaz de estimular processos biológicos. São substâncias que possuem um importante efeito vasoativo com múltiplas reações na atividade circulatória, mudanças nos fatores quimiotáticos e influência no processo inflamatório.

Tabela 2 : funções dos mediadores de mastócitos

Produção de IgE
Quimiotaxia
Citotoxicidade
Pigmentação
Proliferação epidérmica
<i>Turnover</i> do tecido conjuntivo
Vasodilatação
Angiogênese
Hematopoiese
Prurido

A histamina é uma das aminas com maior efeito múltiplo nos processos biológicos desenvolvidos tecidualmente. Além do mais, a histamina quando combinada com outros componentes, desempenha um papel importante na inflamação , atividade vascular, regeneração tecidual e na resposta imune não-específica.

O objetivo da histamina é a vasodilatação de pequenas vias aumentando sua permeabilidade e provocando vasoconstrição das artérias de grande calibre. A histamina é o principal mediador do processo de permeabilidade vascular (JUNQUEIRA,1997).

Os mediadores secundários podem dar continuidade à da inflamação iniciada pelos mediadores primários. Além destes, poderiam ser indicados convencionalmente como mediadores químicos ativados ou terciários, não porque sejam de importância menor, mas tratar-se-ia daqueles elementos formados no

sangue (não nas células) , sob a ação de enzimas granulares ou de enzimas lisossomais liberadas pela ação de alguns componentes primários dos grânulos (ECF, por exemplo); entre estes mediadores destacam-se as cininas plasmáticas ou plasmacinas, particularmente bradicinina.

A presença de mediadores químicos permite já a iniciação da fase reacional ou exsudativa da inflamação, caracterizada pela resposta vascular e celular, que se manifesta pelos sinais clássicos da inflamação de Celso (dor, rubor, calor e tumor).

Os mastócitos são as grandes células livres do tecido conjuntivo e são facilmente identificadas pela presença de inúmeros grânulos no seu citoplasma e, em alguns casos , eles podem até mesmo obscurecer o núcleo.

Os mastócitos também contém histamina, proteases neutras como triptase e quimase e um fator quimiotático para eosinófilos. Visto através do microscópio eletrônico, os mastócitos apresentam um pequeno núcleo arredondado, muitas mitocôndrias, um retículo endoplasmático irregular e um pequeno complexo de Golgi.

As centenas de grânulos específicos encontrados nos mastócitos estão entre 0,3 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro e possuem várias densidades. As características ultraestruturais de seus grânulos são muito variadas e mostram uma superfície irregular, alguns contém pequenas inclusões cilíndricas irregulares na forma de um pergaminho enrolado em uma matriz grânula fina. Em um corte transversal, podem ser observadas que estas inclusões consistem em camadas concêntricas cuja dimensão são similares a um tipo de bicamada lipídica. Em outros mastócitos, os grânulos mostram uma matriz densa cercada de uma área central clara ocupada por uma malha de linhas densas paralelas.

Mastócitos e basófilos contém em seus citoplasmas histaminas e outros mediadores da inflamação. Mastócitos e basófilos possuem superfície receptora para imunoglobulina IgE. Estas similaridades conduziam ao pensamento de que os mastócitos eram originários dos basófilos, mas atualmente é conhecido que são duas células diferentes.

Os basófilos são células menores que os mastócitos e geralmente possuem núcleo bilobulado. Além de que estão presentes somente no sangue e, assim como outros leucócitos granulócitos, seu ciclo de vida é de poucos dias e são incapazes de proliferar. Os mastócitos estão presentes nos tecidos, seu ciclo de vida é de algumas semanas-a meses e são capazes de divisão. Contudo, ambas as células são originárias da medula óssea.

Os basófilos amadurecem na medula óssea e então circulam, enquanto os precursores de mastócitos segundo ROBBINS(1994),CHURCH (1999), DOUGLAS(1999) e TRELLES (2000), aparecem circulando no sangue em curto período de tempo antes de passarem ao tecido onde adquirem grânulos e tornam-se completamente diferenciados.

Os mastócitos estão distribuídos pelo organismo apesar de serem abundantes nas áreas adjacentes a pequenos vasos e abaixo do epitélio dos sistemas respiratório e intestinal .

Os mastócitos agem como sentinelas para que o sistema imune possa detectar a presença de proteínas estranha e começar uma resposta inflamatória local. Sua ativação dá origem a uma rápida liberação de potentes mediadores armazenados em seus grânulos, gerando então lentamente uma série de citocinas que são usadas para atrair outras células que também participam da defesa do hospedeiro.

Praticamente todos os processos de desgranulação requerem  $\text{Ca}^{++}$ , energia, ativação de serina-esterase, com participação freqüente do AMPc (Adenosina Monofosfato cíclica) e reforçamento da fosfatidil-serina.

A primeira etapa deste importante processo parece ser a ativação de uma enzima, a serina-esterase dos fosfolípidos das membranas, que inicia dois processos paralelos e simultâneos: Aumento da atividade fosfodiesterásica e metilação dos fosfolípidos da membrana.

#### Aumento da atividade fosfodiesterásica:

O aumento da atividade fosfodiesterásica reduz a concentração de AMPc intracelular, determinando menor atividade fosfoquinásica e reduzida incorporação de  $\text{P}^{32}$  às proteínas específicas. Com isto é facilitada a contração dos microfilamentos e a drenagem dos grânulos através dos microtúbulos do mastócito, processo que requer  $\text{Ca}^{++}$ , dado que as proteínas contráteis dos microfilamentos funcionam em forma similar às proteínas contráteis do miofilamento do músculo estriado. Daí também a necessidade de energia disponível e ativação de ATPase celular. Os grânulos são expulsos integralmente por exocitose pelos microtúbulos abertos na superfície celular por fusão das membranas perigranulares à membrana plasmática, eliminando-se todos os elementos intragranulares, que agora se comportam como mediadores primários da inflamação.

#### Metilação dos fosfolípidos da membrana:

Este mecanismo determina maior fluidez da membrana, por formação de fosfatidilcolina, substância do qual é liberado logo após o ácido araquidônico, ácido graxo poliinsaturado essencial, que é o ponto de formação de prostanóides ou eicosanóides, como leucotrienos e prostaglandinas que agem como

mediadores secundários da inflamação. Chamam-se secundários porque foram formados sob a influência do estímulo flogogênico.

Deste modo, a extrusão dos grânulos dos mastócitos e a liberação de seu conteúdo significa que aparecem no meio extracelular substâncias biologicamente ativas que podem iniciar o processo inflamatório. São os mediadores químicos primários, entre os quais se destacam a histamina, serotonina, proteínas e peptídeos quimiotáticos, como ECF-A (fator quimiotático de eosinófilos) e NCF (Fator quimiotático de neutrófilos) de alto peso molecular, enzimas, como arilsulfatase,  $\beta$ -glicuronidase, peroxidase e outras hidrolases (DOUGLAS, 2000).

O mastócito sobrevive à intensa desgranulação e pode formar novos grânulos (JUNQUEIRA, 1997).

Segundo TRELLES (2000), os mastócitos, como células secretoras, deve, em efeito, reagir ao aumento de ATP resultado da radiação laser. Aumentar a atividade dos mastócitos deve-se a uma série de ações que incluem perturbação do balanço de íons de cálcio, ativação de serina esterase, a uma exigência de uma quantidade de energia e a uma alteração intracelular de adenosina 3':5'-monofosfato cíclico, a qual conduz a uma degradação celular.

Sob a irradiação laser, várias substâncias, especialmente histamina, heparina, prostaglandina D2, deveriam ser liberadas e também passar ao sistema circulatório ou atuar localmente. A histamina liberada, a qual tem um notável efeito sobre músculo liso e vasos sanguíneos, causa dilatação, que é mantida através de sucessivos tratamentos com laser e estimula a reparação tecidual.

Por outro lado, a síntese de prostaglandina D2, recentemente confirmada como um constituinte do mastócito, ajudaria a explicar o efeito antiinflamatório da radiação laser devido à intensa atividade de substâncias secretadas pelo

mastócito, o qual age também, diretamente, na regulação da inflamação ou, indiretamente, sobre os mediadores da inflamação secundária. Deve ser acentuado que em nenhuma publicação do uso clínico do laser de baixa intensidade, foi relatado trombose vascular ou qualquer indicativo de um início de trombose, o que sugere que a heparina é um agente mediador neste caso (TRELLES,2000).

O mais significativo achado após aplicação de LILT *in vivo* no tecido é a vasodilatação capilar com ausência de dano na arquitetura tecidual subjacente.

Clinicamente ou experimentalmente, a indução de vasodilatação deve conduzir a uma geração ou regeneração de tecido cutâneo ou mesenquimal devido ao aumento de suprimento sanguíneo para a área irradiada. Além disso, o edema intersticial inicial se dá provavelmente devido ao aumento de líquido nas áreas intersticiais causado pelas fenestrações da membrana celular (TRELLES,2000).

### 3.4 Da Desgranulação de Mastócitos Estimulado pela Luz Laser em Baixa Intensidade

Vários trabalhos têm relatado a ação do laser em baixa intensidade na desgranulação de mastócitos. Alguns autores como ESCOLA (1985), que já verificavam o aumento da microcirculação, já levantavam a hipótese de este efeito ser resultante da desgranulação de mastócitos provocada pela ação da luz laser. Um dos primeiros trabalhos, e que deu origem ao desenvolvimento desta linha de pesquisa, foi o realizado pelo professor JUAREZ CORRÊA DA SILVEIRA (1991) o qual relata o aumento significativo de mastócitos em desgranulação no tecido sob irradiação laser na dose de  $9 \text{ J/cm}^2$  sobre pele intacta de *cavia porcellus* em vários intervalos de tempo de 0,4,8,24,72,120,144 e 168 horas .

EL-SAYED e DYSON (1996), em trabalho realizado em ratos , avaliaram os efeitos em número de mastócitos e desgranulação com frequências diferentes sobre as feridas. Os autores concluíram que o aumento em número de mastócitos não é dependente da frequência, entretanto a desgranulação é.

Recentemente, SILVEIRA ( 2001), também verificou a desgranulação de mastócitos na parede não mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa intensidade na dose de  $8 \text{ J/cm}^2$  .

### 3.5 Da Aplicação de Corante Exógeno como Agente Fotossensibilizador Tecidual

A aplicação de corantes exógenos como agente fotossensibilizador vem sendo amplamente estudada como método auxiliar para aumentar a absorção da luz laser por bactérias, células e tecido biológico ( OKAMOTO,1992; BURNS,1993; ESPINOSA,1999; LOPES JUNIOR,2000).

Em estudos de LOPES JÚNIOR (2000) foram utilizados ratos (n=48), que após exodontia do incisivo superior direito e obtenção experimental do quadro de alveolite, foram divididos em 4 grupos (n=12) que receberam o seguinte tratamento: grupo I - feridas permaneceram infectadas (alveolite) não recebendo nenhum tratamento; grupo II - foram tratadas com azul de metileno (100 microgramas/ml) aplicado topicamente; grupo III - foram tratadas com laser em baixa intensidade de Arseneto de Gálio e Alumínio, que seguiu o seguinte protocolo:  $\lambda$  635 nm, emissão pulsada, potência de 4 mW, área de 2 mm<sup>2</sup>, energia de 0,96 J, densidade de energia de 3,2 J/cm<sup>2</sup>, 240 segundos de tempo de exposição, aplicação única de forma contato, aplicado externamente sobre o tecido gengival da porção média do alvéolo dentário; grupo IV - feridas foram tratadas com a associação da droga fotossensibilizadora e laser em baixa intensidade da mesma forma que as do grupo II e III, respectivamente.

Os autores concluíram que: 1) o uso de droga fotossensibilizadora não

provocou efeitos indesejáveis ao processo de reparação alveolar; 2) que as feridas tratadas somente com laser demonstraram processo de reparação mais evoluído e diferenciado que as controles; 3) que a associação de droga fotossensibilizadora ao laser de baixa intensidade demonstrou processo de reparação mais evoluído e diferenciado do que aquele verificado nas feridas tratadas somente com laser, droga e controle (não tratadas) .

Em outra pesquisa ESPINOSA (1999) provocaram por intermédio de um "punch" de aproximadamente 8 mm de diâmetros, feridas cutâneas na região dorsal-de ratos (n=60), que foram submetidas aos seguintes procedimentos: no grupo I (n=12) as feridas não sofreram nenhum tratamento; no grupo II (n=12) as feridas foram tratadas com laser  $\lambda=635\text{nm}$ ; as do grupo III (n=12) foram tratadas com laser  $\lambda=904\text{nm}$ ; nas do grupo IV (n=12) foram tratadas com azul de metileno (100 microgramas/ml) aplicado topicamente sobre as bordas das feridas e a seguir tratadas com laser  $\lambda =635\text{nm}$  e as do grupo V (n=12) receberam aplicação tópica de azul de metileno, nas mesmas condições das do grupo IV e a seguir foram tratadas com laser de  $\lambda= 904$  nanômetros.

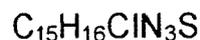
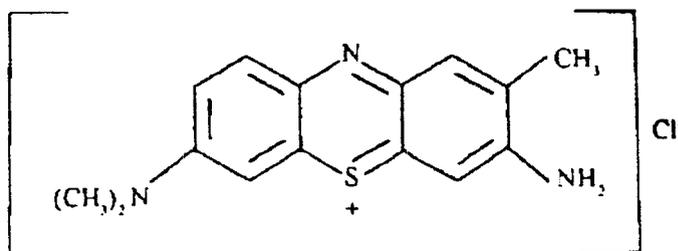
Os autores concluíram que : (1) as feridas tratadas somente com laser ( $\lambda =635\text{nm}$  e  $\lambda= 904\text{nm}$ ) e as tratadas com a associação de droga fotossensibilizadora mais laser, mostram processo de reparação mais diferenciado quando comparado com as não tratadas (controles); (2) As feridas tratadas com laser  $\lambda=635\text{nm}$  mostraram reparação bem mais evoluída que as tratadas com laser  $\lambda=904\text{nm}$ ; (3) as feridas tratadas com a associação da droga fotossensibilizadora com laser  $\lambda=635\text{nm}$ , foram as que demonstraram

resultados mais diferenciados e evoluídos, em todos os períodos experimentais (3, 7, 14 dias), quando comparada com as feridas dos demais grupos.

### 3.6 Do Azul de Toluidina a 1%

O azul de toluidina é um corante catiônico metacromático do grupo das tiazinas que cora seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais, tais como os ácidos fosfóricos, sulfúrico e carboxílico. Apresenta afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA presente no citoplasma que fixam o corante e coram-se profundamente.

O azul de toluidina apresenta a seguinte estrutura química:



3 - amino - 7 - dimetilamino - 2 - metilfenotiazina clorada. C: 58,91%, H: 5,27%, Cl: 11,59%, N: 13,74%, S: 10,48% - Peso molecular: 305,83. É solúvel em água e álcool e, em solução, é azul ou violeta. O pH da solução está entre 2,5 e 3,5 (ROCHA, 1995).

Os mecanismos exatos de coloração dos tecidos *in vivo* pelo azul de toluidina são desconhecidos, sendo propostas algumas teorias para explicar a penetração e retenção do corante nas células atípicas: coloração de componentes ácidos

teciduais , como o DNA e RNA; maior afinidade para o DNA nuclear que para o RNA do citoplasma celular; as células atípicas contêm maior quantidade de DNA nuclear que as células normais devido ao aumento da relação núcleo/citoplasma; e os canais intercelulares entre as células atípicas são mais amplos que os das células dos tecidos normais, permitindo a penetração do corante nas camadas celulares mais profundas.

O emprego tópico do azul de toluidina *in vivo* foi descrito inicialmente para evidenciação de alterações malignas no colo uterino. Tem sido utilizado em várias áreas médicas para evidenciar lesões suspeitas de malignidade. O azul de toluidina tem a propriedade de corar, *in vivo* , os núcleos celulares e a intensidade de coloração está diretamente relacionada com a densidade nuclear por unidade de área. Portanto, as atípias celulares e os carcinomas , ricos em células e com grande densidade nuclear, coram-se com maior evidência e são facilmente distinguíveis do epitélio normal. A intensidade da coloração depende da alteração epitelial, podendo variar de um azul pálido em uma displasia leve a um azul escuro em um carcinoma. O corante evidencia apenas alterações no tecido epitelial, não atingindo as camadas mais profundas (ROCHA,1995).

O corante azul de toluidina a 1% utilizado nesta pesquisa como droga fotossensibilizadora na tentativa de aumentar a absorção da luz laser não causa danos ao tecido humano ou a saúde geral do indivíduo, quando aplicado topicamente, sendo que sua indicação primária é como método complementar no processo de diagnóstico de células neoplásicas, onde este é usado como corante aplicado sobre lesão suspeita de malignidade, conforme recomendação do Ministério da Saúde. A maioria do tecido epitelial cora após a aplicação do azul de toluidina a 1%, mas na mucosa normal ou em lesões benignas são

descoloridas após aplicação do ácido acético a 1%, enquanto que nas áreas suspeitas de malignidade o corante é retido.

#### 4. PROPOSIÇÃO

-Analisar o efeito da radiação laser em baixa intensidade sobre desgranulação de mastócitos em hiperplasias fibrosas inflamatórias .

-Realizar estudo comparativo do efeito da radiação laser em baixa intensidade sobre desgranulação de mastócitos em hiperplasias fibrosas previamente coradas por azul de toluidina e não coradas.

## 5. METODOLOGIA

Local de realização da pesquisa - parte clínica/laboratorial

A pesquisa clínico-laboratorial realizou-se no ambulatório de estomatologia da disciplina de estomatologia do Centro Odontológico Universitário Norte do Paraná (COUNP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e no laboratório de patologia bucal da mesma universidade, após devida aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Bioética em Pesquisa.

As pessoas que participaram desta pesquisa são pacientes do COUNP que passaram por uma prévia triagem clínica e foram encaminhados à disciplina de estomatologia por possuírem lesão bucal compatível com hipótese diagnóstica de hiperplasia fibrosa inflamatória causada por prótese removível mal adaptada.

Estas pessoas foram examinadas pelo monitor e/ou aluno da disciplina, supervisionados pelo professor responsável, para então ser indicado, remoção cirúrgica (biópsia excisional), sendo que a lesão com esta hipótese diagnóstica não apresentava qualquer suspeita de malignidade, como manchas e úlceras.

As pessoas dentro das condições acima citadas que foram selecionadas para participar da pesquisa, estavam dentro dos critérios especificados abaixo:

1. Faixa etária entre 30 e 60 anos de idade e em perfeitas condições de saúde e sanidade mental.

2. Portadoras de prótese total mal adaptada superior ou inferior .
3. Lesão com extensão mínima de três centímetros localizada em fundo de saco de vestibulo superior ou inferior.
4. Sem uso da prótese mal adaptada causadora da lesão há pelo menos duas semanas, conforme protocolo da própria disciplina .

Segundo o protocolo da disciplina de estomatologia da UEL, os pacientes com hipótese diagnóstica de hiperplasia fibrosa inflamatória causada por prótese mal adaptada e sem suspeitas de malignidade são cadastrados em prontuário (dados pessoais, anamnese, autorização de tratamento , descrição e história da lesão), para então serem encaminhados para biópsia excisional, devendo ficar duas semanas sem o uso da prótese, sendo esta retida na disciplina até a data da cirurgia, para que no ato do procedimento operatório a lesão não esteja com quadro clínico inflamatório.

5. Não possuíam pigmentação melânica, devido à interferência destes pigmentos intrínsecos na absorção da luz laser.
6. Se do sexo feminino, não estavam grávidas ou amamentando.

As pessoas que se incluíram dentro destes itens acima citados, foram devidamente informadas e esclarecidas e , somente após o consentimento verbal e escrito desta em participar da pesquisa, foi prosseguida a pesquisa. Anexo o parecer favorável do Comitê de Bioética.

Foram selecionadas um total de oito pacientes .

O paciente foi atendido por um operador ( aluno e ou monitor da disciplina de estomatologia) supervisionado por professor responsável , cabendo ao pesquisador a aplicação do laser de baixa de intensidade e auxílio na remoção cirúrgica da lesão.

O paciente participante da pesquisa passou por prévia antisepsia do rosto e lábios com clorexidina 2%, seus olhos foram protegidos por óculos específicos para laser de baixa intensidade no comprimento de onda posteriormente descrito.

A lesão foi dividida em três partes aproximadamente iguais de forma que a parte central foi removida para controle, o segundo terço foi aplicado laser e removido e o terceiro terço corado com azul de toluidina, aplicado laser na mesma dose e removido.

A lesão, após prévia anestesia local pelo operador, foi removida de acordo com as seguintes seqüências:

1º - Terço central removido para controle;

2º - Segundo terço direito ou esquerdo aplicado laser de forma pontual, em contato e imediatamente removido;

3º - Terceiro terço direito ou esquerdo corado com azul de toluidina, aplicado laser no mesmo protocolo e imediatamente removido;

A seqüência também foi alternada aleatoriamente conforme descrito abaixo:

1º - Terço central removido para controle;

2º - Segundo terço direito ou esquerdo corado com azul de toluidina, aplicado laser na dose de 8 J/cm<sup>2</sup> e imediatamente removido;

3º - Terceiro terço direito ou esquerdo aplicado laser no mesmo protocolo e imediatamente removido.

E também realizando a 2º e/ou a 3º etapa antes de se remover o controle.

A variação na seqüência fez-se para evitar interferência da incisão e do tempo operatório entre a 1º, 2º e a 3º etapa da seqüência cirúrgica na desgranulação de mastócitos.

O aparelho laser de baixa intensidade que foi utilizado possui as seguintes especificações:

- potência : 15 mW
- densidade de energia ajustável : 0 a 15 J/cm<sup>2</sup>
- divergência do feixe laser : 8° x 28°
- area de irradiação : 5 mm
- comprimento de onda: 670nm (visível em vermelho)
- emissor do laser: diodo AsGaAl .

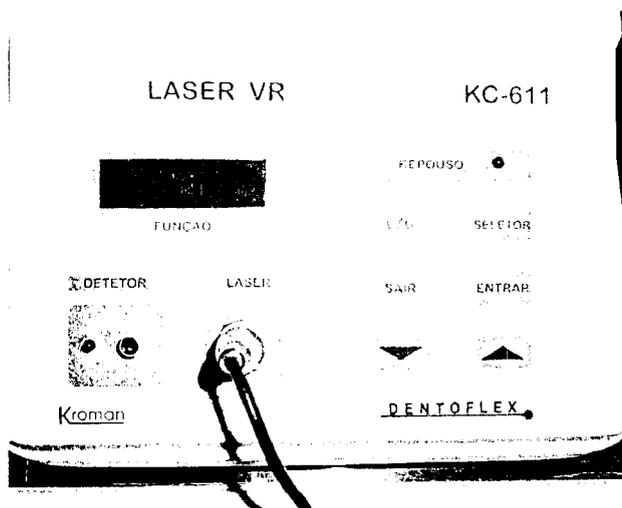


Fig 10 : Aparelho laser de baixa intensidade utilizado na pesquisa.

A aplicação do laser fez-se no modo contato de forma pontual sobre o centro de cada terço da lesão.

A dose utilizada foi de 8 J/cm<sup>2</sup>, tanto para o terço que foi aplicado somente o laser, quanto o terço que foi aplicado o laser sobre o tecido previamente corado.

Aplicação do corante:

A concentração do corante azul de toluidina foi a 1% sendo sua composição descrita abaixo:

Azul de toluidina .....1g  
Água destilada.....100ml  
pH.....3,00

O corante azul de toluidina foi aplicado com cotonete sobre a lesão e o laser imediatamente após aplicado sobre a lesão.

Durante a aplicação do laser, o operador , auxiliar (pesquisadora) estavam devidamente paramentados (luvas, máscaras, avental cirúrgico e gorro) e usando óculos de proteção para o laser de baixa intensidade neste comprimento de onda.

Finalizado a remoção completa da lesão , foi realizada a sutura e as recomendações pós operatórias de rotina do ambulatório. O paciente retornou em sete dias para remoção de sutura e exame e foi encaminhado para disciplina de prótese total e fixa da mesma Universidade para confecção de nova prótese.

Os fragmentos da lesão foram acondicionados em recipiente de biópsia próprio contendo formol 10% identificados da seguinte forma:

Recipiente número 1: 1/3 da lesão com tratamento laser

Recipiente número 2: 1/3 da lesão controle

Recipiente número 3: 1/3 da lesão corada e tratado com laser



Fig 11 Identificação dos recipientes para biópsia.

Todos os três recipientes foram encaminhados para o laboratório de patologia bucal para análise histopatológica e diagnóstico conforme rotina da própria disciplina. Após analisadas as peças, estas foram utilizadas para esta pesquisa sendo então processadas e coradas pela técnica de GIEMSA para evidenciação de mastócitos.

Técnica de GIEMSA modificada pelo Laboratório de Anatomia Patológica de Cascavel (APC).

- 1- Desparafinar por 10 minutos no xilol, sendo 5 minutos em cada cuba.
- 2- Lavar em água corrente
- 3- Lavar em água destilada
- 4- Deixar por 12 horas na solução GIEMSA ( 1,5 ml de GIEMSA em 36 ml de água destilada)
- 5- Lavar em água acética 0,5% até atingir a coloração roxa.
- 6- Lavar em água corrente
- 7- Secar
- 8- Passar em 2 cubas de álcool 95, 4 cubas de álcool absoluto e 4 cubas de xilol

9- Montar lâmina.

Análise de mastócitos:

As lâminas foram analisadas através de microscopia de luz (Olympus CH30).

Foi realizada a contagem do número de mastócitos íntegros e mastócitos desgranulados no tecido conjuntivo subepitelial em 5 campos microscópicos diferentes a partir do epitélio utilizando aumento de 400 x (ocular 10x , objetiva 40).

As lâminas obtidas foram também identificadas com o número de registro do paciente no prontuário seguidos de dígito 1, 2 ou 3 conforme especificado também no recipiente de biópsia.

Caso clínico demonstrativo da metodologia clínica para procedimento de biópsia excisional da hiperplasia fibrosa inflamatória. Paciente L.A., 52 anos , sexo feminino.



Fig.12: Caso clínico inicial

Hiperplasia fibrosa inflamatória em fundo de vestibulo inferior anterior.



Fig.13: Anestesia local infiltrativa

ao redor da lesão.



Fig.14:Remoção do terço central (controle)



Fig.15: Aplicação de laser no terço direito.

Modo contato .



Fig.16: Remoção do terço aplicado laser.



Fig.17: Aplicação do corante sobre o terço esquerdo.



Fig.18: Aplicação de laser sobre o terço Corado. Modo contato.



Fig.19: Remoção do terço corado



Fig.20: Remoção total da lesão e sutura.

## 6. RESULTADOS

Os materiais obtidos nas biópsias foram processados a lâminas e primeiramente passaram pela técnica de coloração de Hematoxilina Eosina (HE) para fins de diagnóstico. As lâminas obtidas foram analisadas pelo patologista bucal do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UEL Prof. Dr. Tadashi Akatsu e , após confirmado o diagnóstico de hiperplasia fibrosa inflamatória, as lâminas referentes ao terço controle, ao terço aplicado laser e ao terço corado e aplicado laser passaram pela coloração de GIEMSA para evidenciação de mastócitos.

Nas lâminas coradas pela técnica de GIEMSA foram contados os mastócitos íntegros e desgranulados em cinco campos microscópicos diferentes tendo como base o epitélio (FIG.21). Os mastócitos íntegros e desgranulados foram tabelados (TAB. 3 e 4), representados em gráficos e foram analisados estatisticamente.

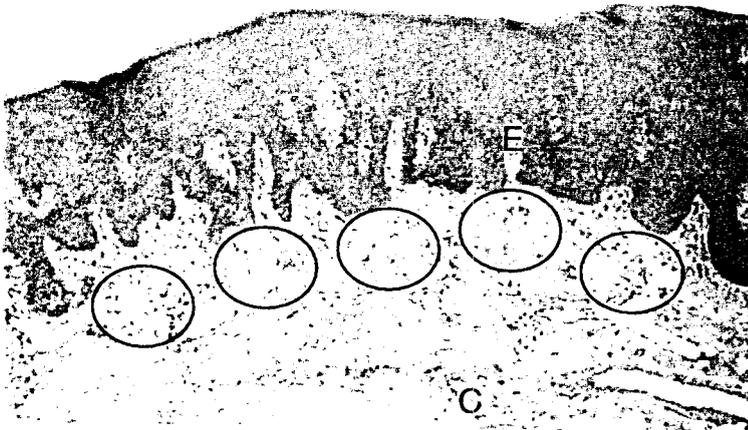


Fig.21: Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. HE. Aumento de 40x. Esquema demonstrativo do método de observação dos cinco campos microscópicos. E-epitélio, C-conjuntivo. Os círculos pretos indicam os cinco campos a serem observados.

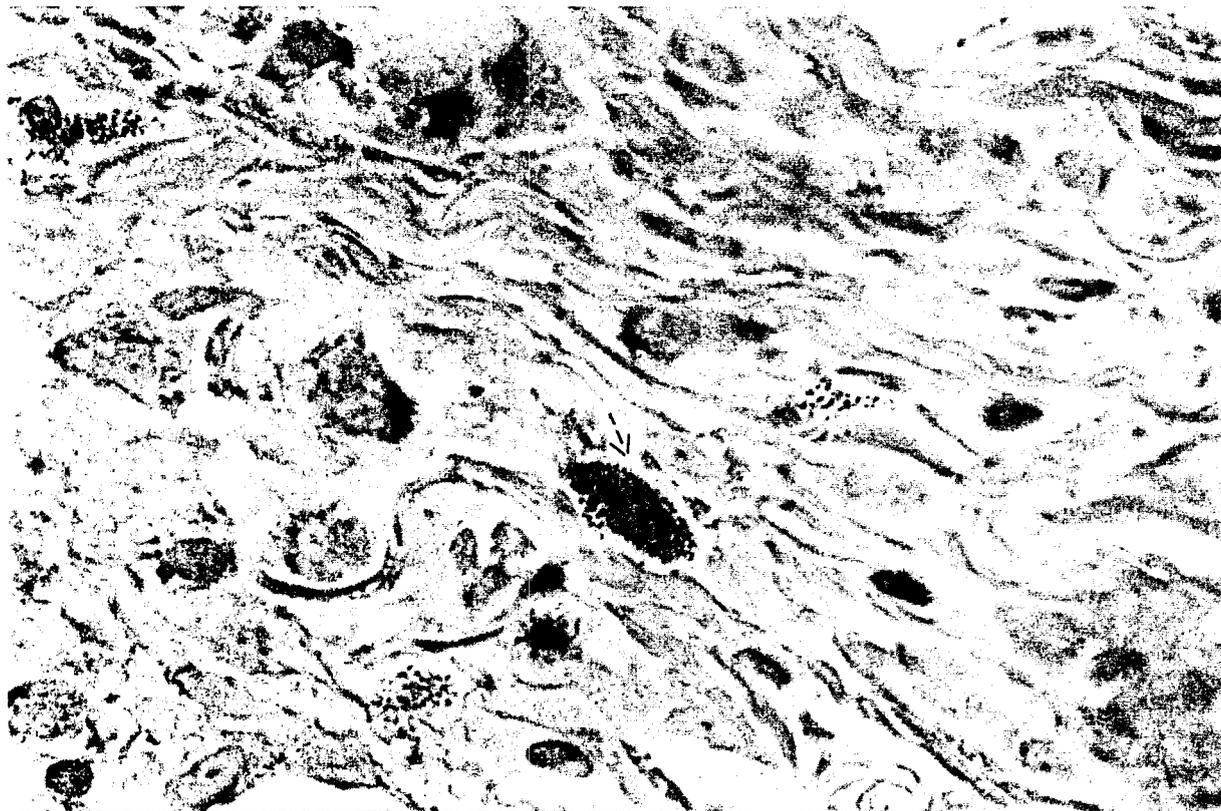


Fig. 22: Mastócido desgranulando. Aumento de 1000X. Coloração de GIEMSA.

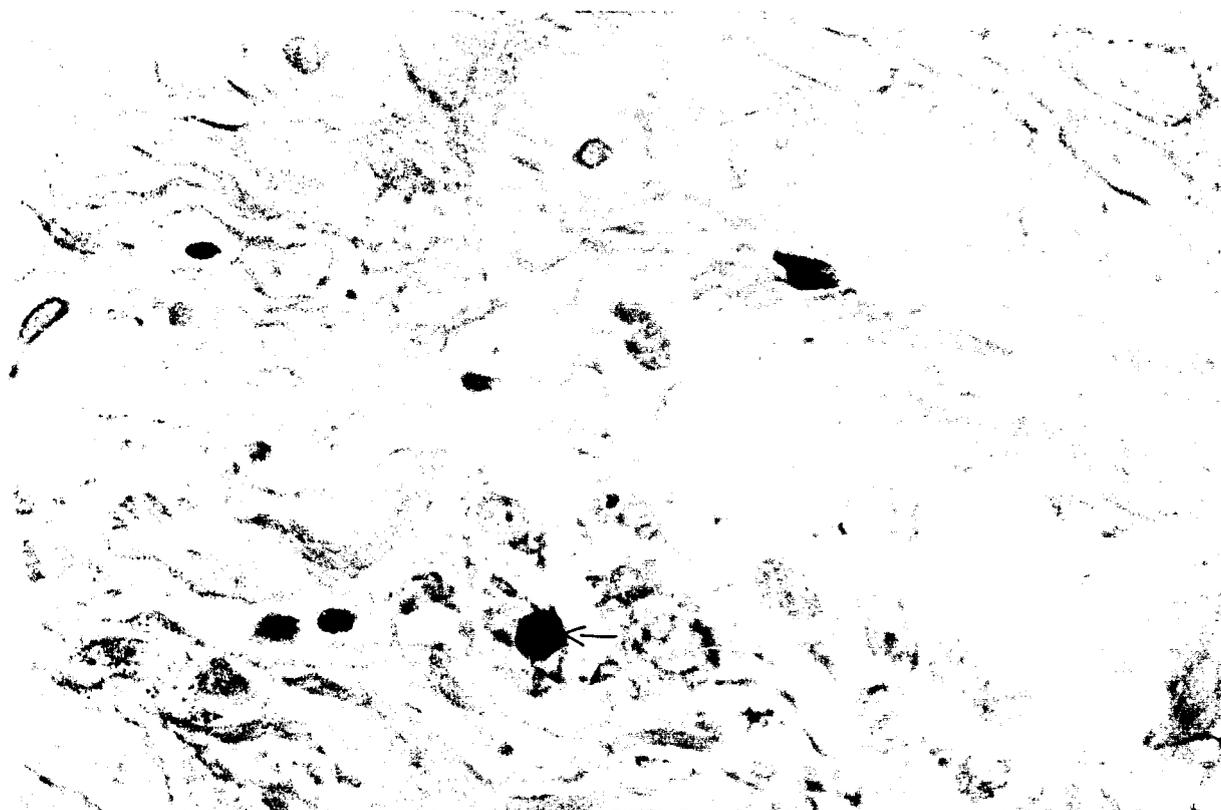


Fig. 23: Mastócito íntegro. Aumento de 1000X. Coloração de GIEMSA.

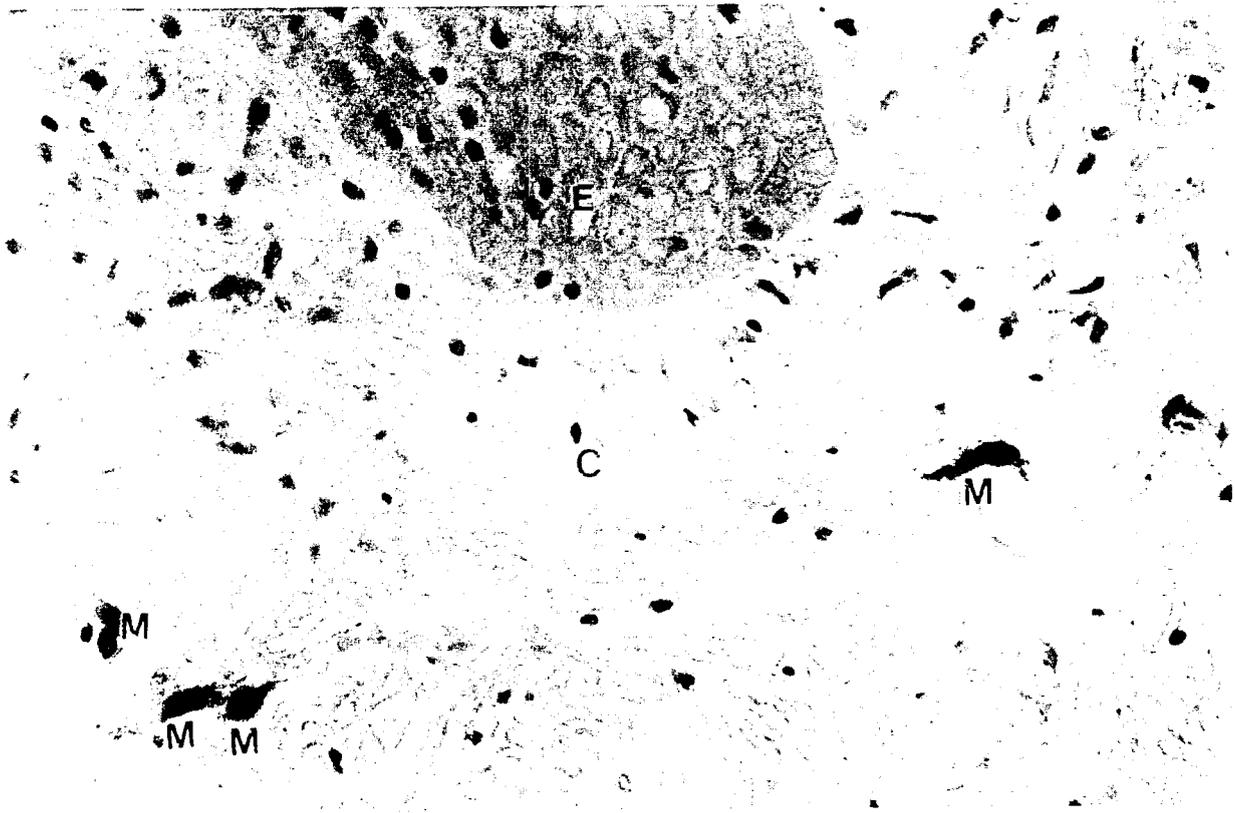


Fig.24: Campo histológico da área aplicado laser. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

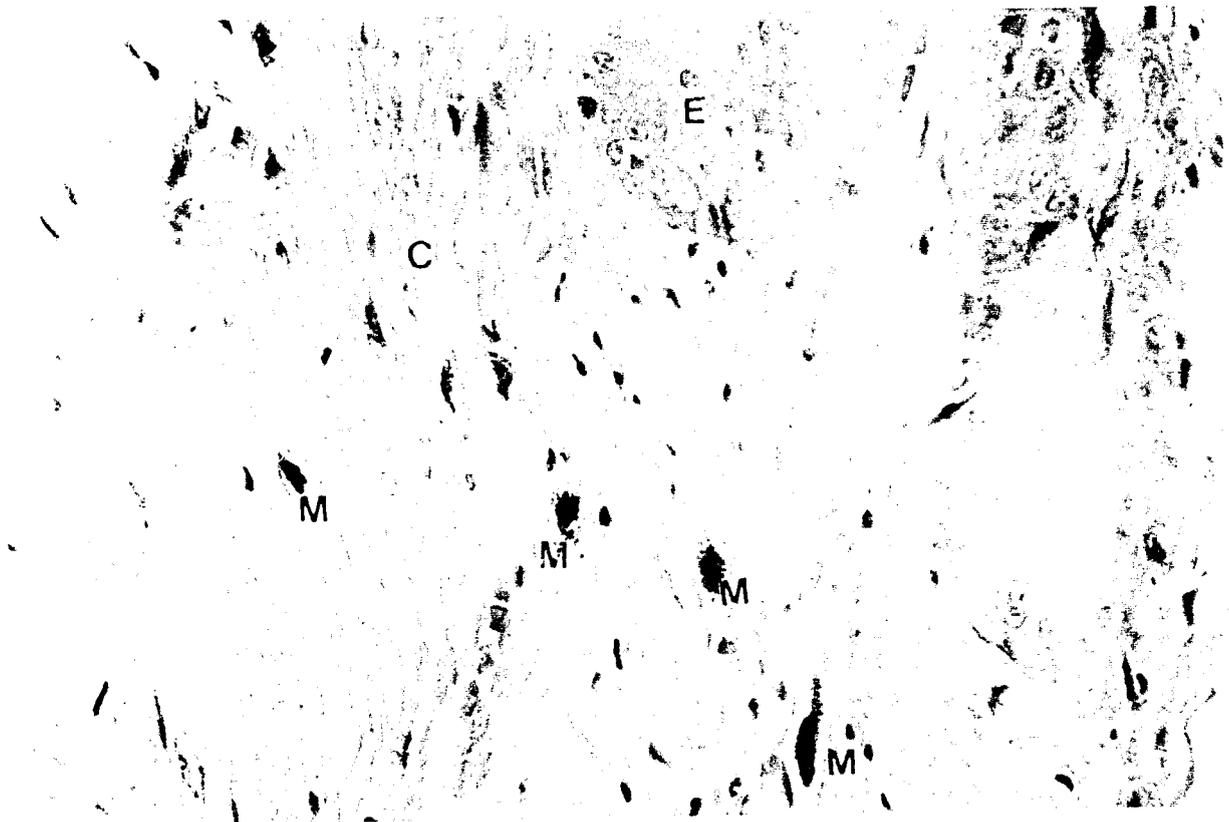


Fig. 25: Campo histológico da área aplicado laser. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

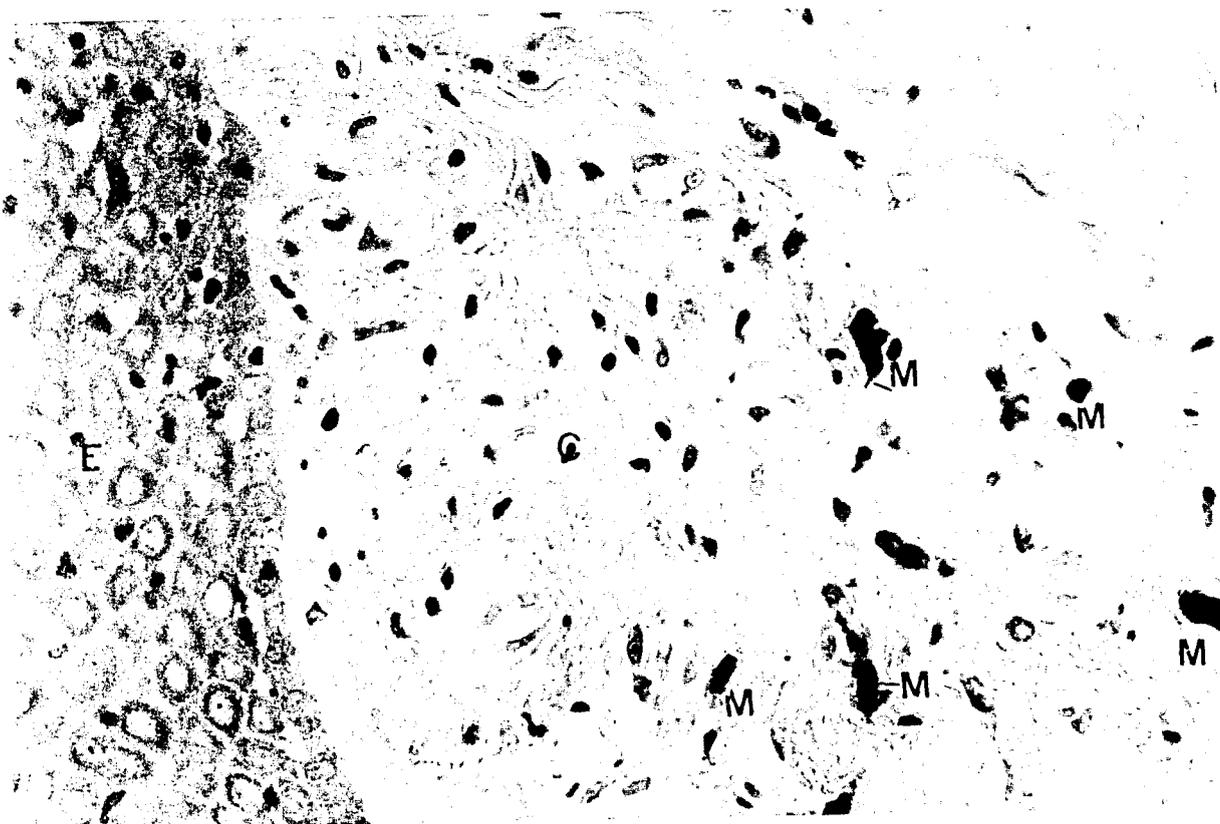


Fig.26: Campo histológico da área controle. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

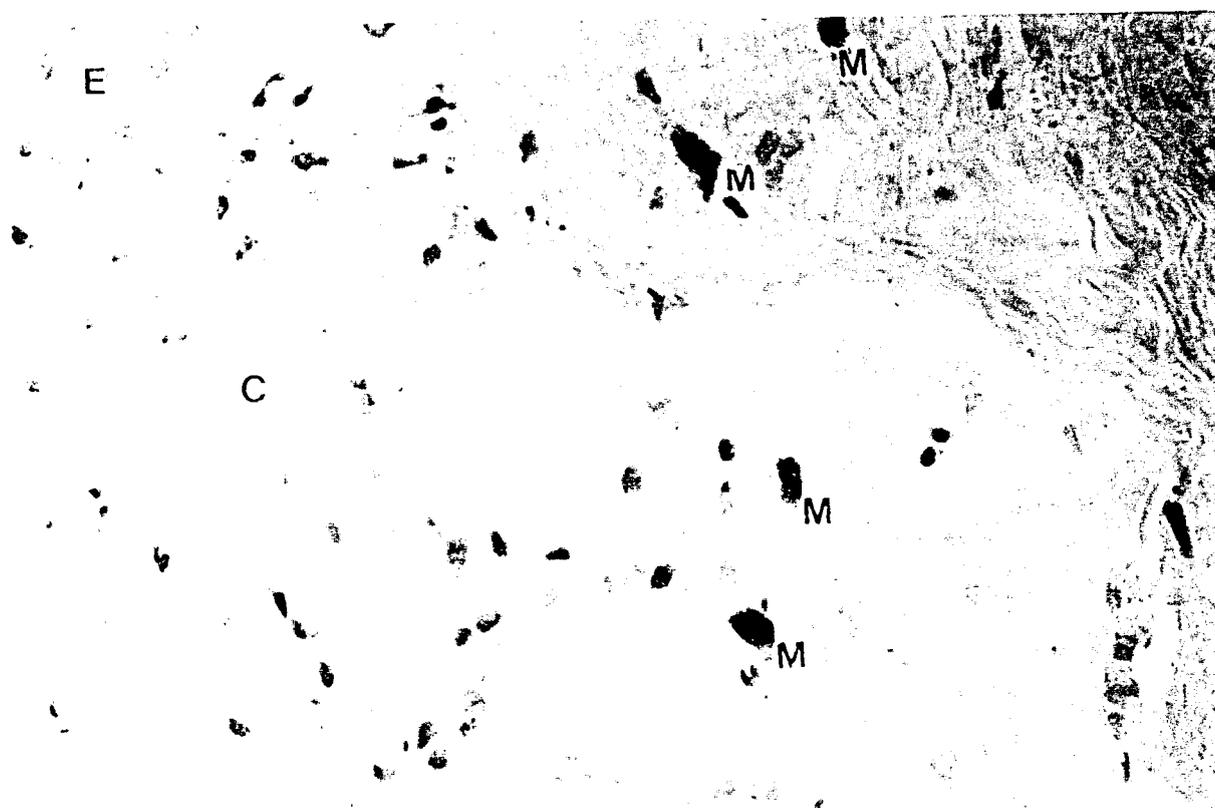


Fig.27: Campo histológico da área controle. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

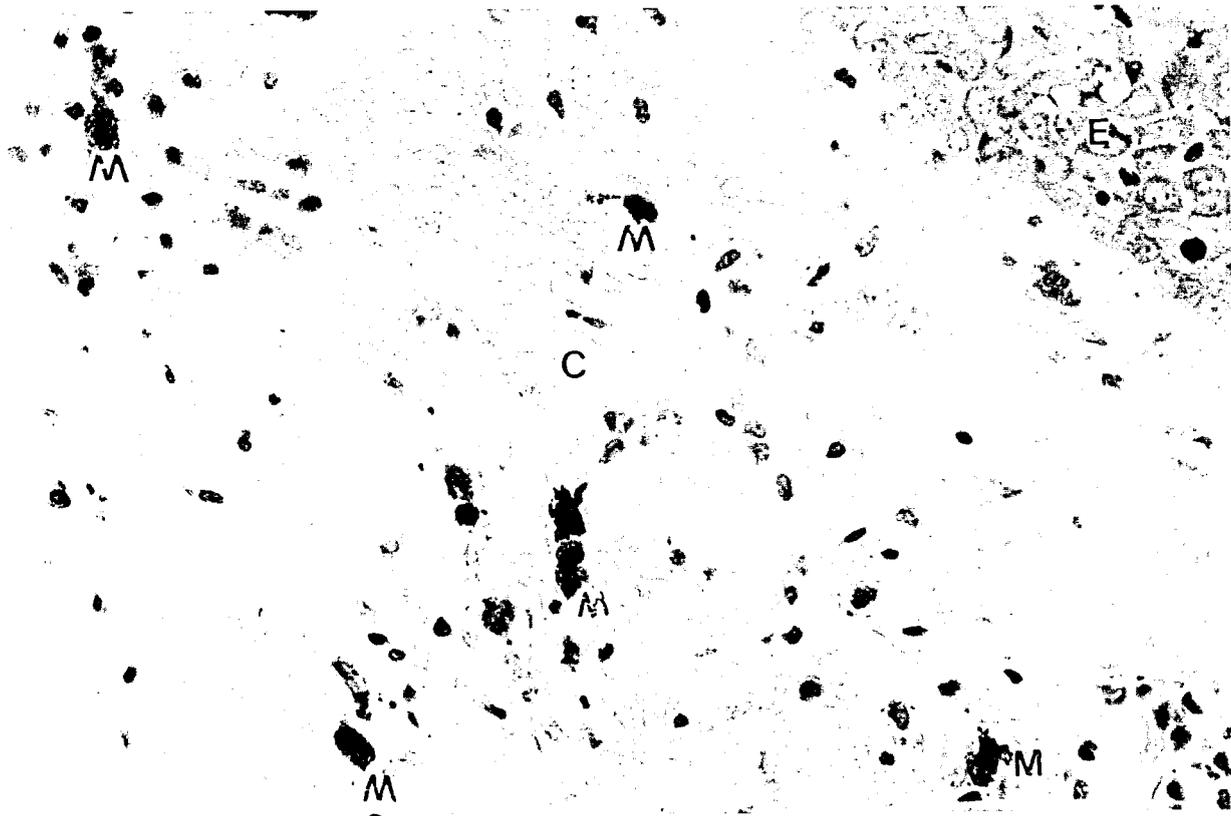


Fig.28: Campo histológico da área corada/laser. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

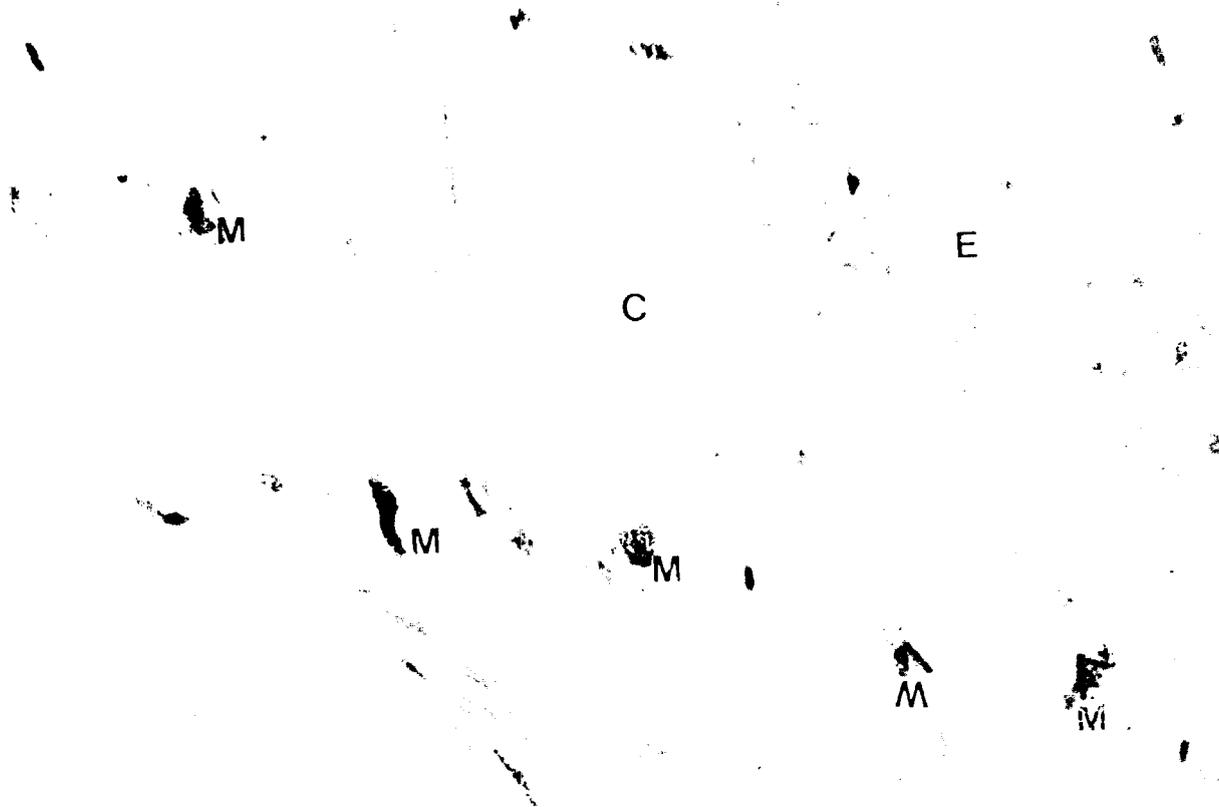


Fig.29: Campo histológico da área corada/laser. GIEMSA. Aumento de 400x. Tecido conjuntivo com mastócitos. E-epitélio, C-conjuntivo, M-mastócito.

Tabela 3 : Número de mastócitos totais e desgranulados contados em cinco campos microscópicos 10x40 na região subepitelial da hiperplasia fibrosa inflamatória.

Cliente	Mast	1( Laser)					2(controle)					3(corada/laser)				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
D.E	DE	10	05	06	04	03	03	02	01	00	02	04	04	02	03	05
	TO	13	05	06	04	04	03	05	03	04	03	06	04	04	04	05
M.A.	DE	00	00	07	09	03	00	02	05	03	00	10	08	14	10	07
	TO	05	05	07	09	04	03	05	06	10	02	12	11	18	13	10
J.N.	DE	04	03	02	03	02	02	02	00	01	01	07	05	06	03	02
	TO	04	03	02	03	03	04	03	01	02	02	07	07	06	03	02
J.R.	DE	01	03	07	08	06	03	03	03	06	00	04	08	02	01	03
	TO	02	03	07	08	07	04	05	06	11	05	04	08	02	01	03
L.A.	DE	04	10	09	06	03	04	02	04	02	04	03	07	02	04	04
	TO	04	11	10	08	03	04	03	04	04	04	03	07	02	05	07
N.B.	DE	10	15	14	15	11	02	02	04	00	01	08	25	11	07	17
	TO	13	15	16	16	13	04	04	08	03	14	09	26	11	07	17
M.S.	DE	10	08	12	10	07	07	04	05	05	02	04	01	03	04	02
	TO	10	10	13	11	07	10	04	09	09	03	04	03	03	04	02
A.S.	DE	04	06	08	11	10	00	03	03	05	03	04	04	05	05	08
	TO	04	06	10	12	13	05	06	05	09	03	04	04	05	06	10

Tabela 4 : Soma dos mastócitos totais e desgranulados dos 5 campos visuais e seu respectivo índice de desgranulação.

### MASTÓCITOS

Mastócitos:	totais			desgranulados			índice de desgranulação		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
cliente	soma 5 campos	soma 5 campos	soma 5 campos						
D.E.	32	18	23	28	08	18	0,87	0,44	0,78
M.A.	30	26	64	19	10	49	0,63	0,38	0,77
J.N.	15	12	25	14	06	23	0,93	0,50	0,92
J.R.	27	33	18	25	15	18	0,93	0,45	1,00
L.A.	36	19	24	32	16	20	0,89	0,84	0,83
N.B.	73	33	70	65	09	68	0,89	0,27	0,97
M.S.	51	35	16	47	23	14	0,90	0,66	0,87
A.S.	45	28	29	39	14	26	0,87	0,50	0,90

Gráfico 1. Número de mastócitos por paciente

Tratamento: Laser

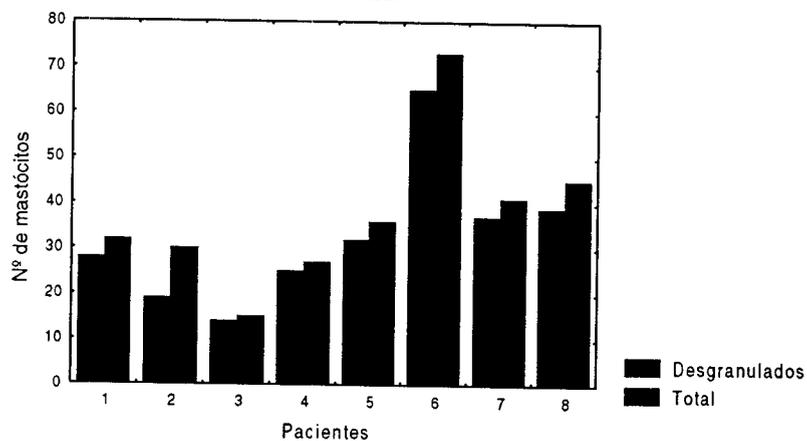


Gráfico 2. Número de mastócitos por paciente

Tratamento: Controle

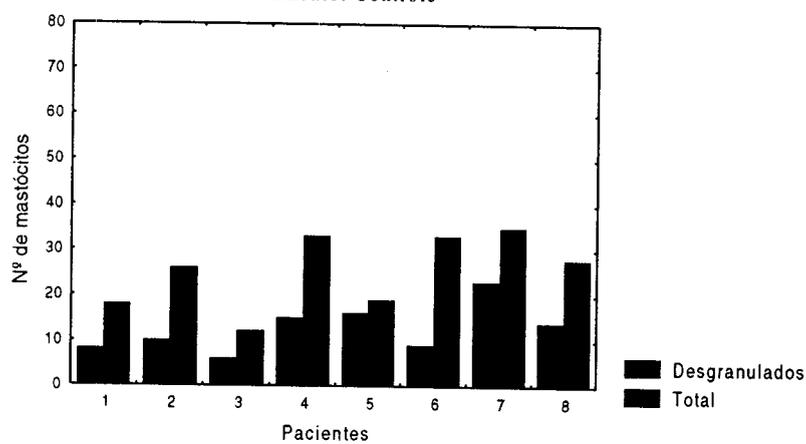
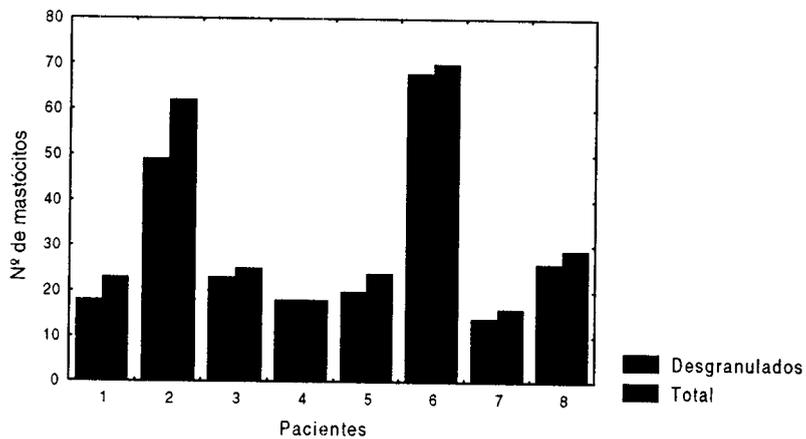


Gráfico 3. Número de mastócitos por paciente

Tratamento: Corada/Laser



Neste trabalho foi utilizado como variável resposta o índice de desgranulação (ID) que é o quociente entre o número de mastócitos desgranulados e o número total de mastócitos (SILVEIRA,2001).

Para o conjunto de dados utilizado temos:

Controle	Laser	Corada/Laser
$ID = \frac{101}{204} = 0,4951$	$ID = \frac{259}{299} = 0,8662$	$ID = \frac{236}{269} = 0,8773$

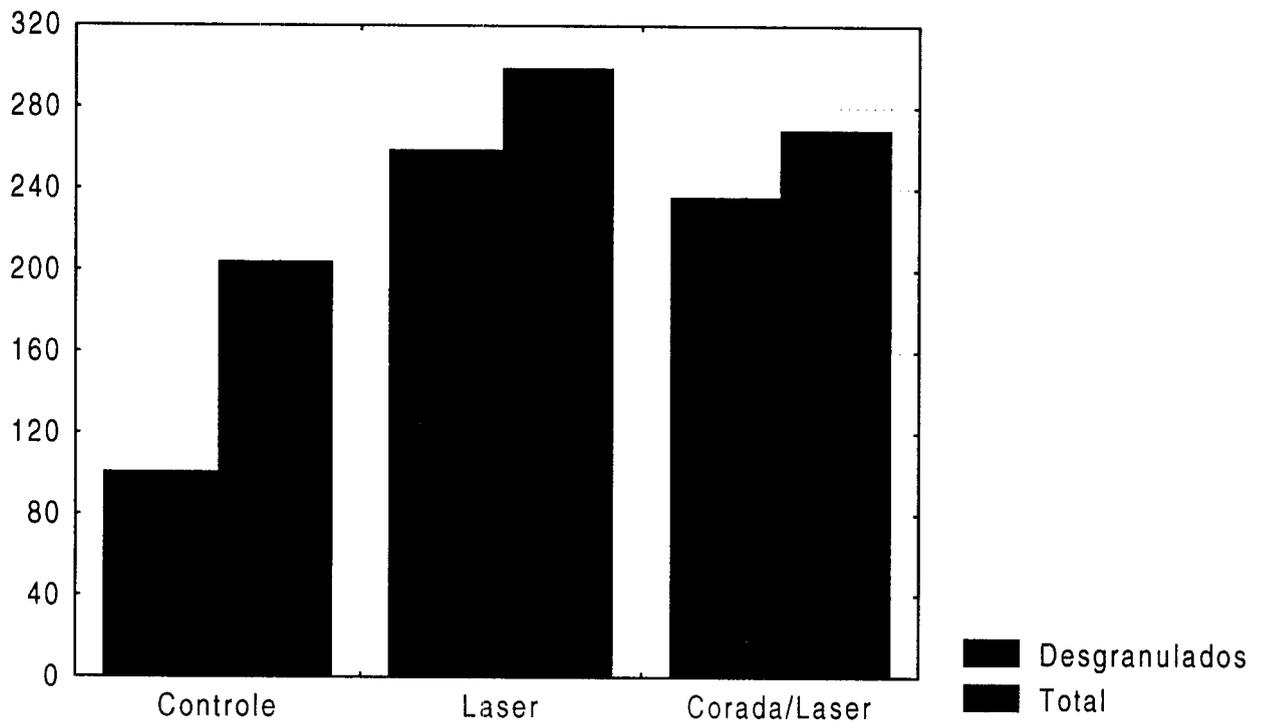
Portanto, temos que:

Controle: 49,51% de mastócitos desgranulados;

Laser: 86,62% de mastócitos desgranulados;

Corada/Laser: 87,73% de mastócitos desgranulados.

Gráfico 4. Soma total de mastócitos



## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O método utilizado foi a análise de variância no delineamento em blocos ao acaso, onde foram comparados 3 tratamentos (laser, controle e corada/Laser) em 8 pacientes (blocos) para a variável índice de desgranulação.

Tabela 5: Índice de Desgranulação.

Pacientes	Tratamentos		
	Laser	Controle	Cor./Laser
1	0,875	0,444	0,783
2	0,633	0,385	0,766
3	0,933	0,500	0,920
4	0,926	0,455	1,000
5	0,889	0,842	0,833
6	0,890	0,273	0,971
7	0,902	0,657	0,875
8	0,867	0,500	0,897
Média	0,864	0,507	0,881
Variância	0,0093	0,0302	0,0070

Inicialmente foi realizada uma análise preliminar afim de verificar as hipóteses básicas para validade da análise de variância. Nesta análise, verificou-se que a hipótese de normalidade dos erros não foi atendida (teste de Shapiro Wilk). Para contornar este problema, realizou-se a análise com os dados transformados. A transformação recomendada (BANZATTO e KRONKA, 1989) para dados referentes à proporção é a arco seno. Os dados referentes ao índice de desgranulação, transformados em arco seno, são apresentados a seguir:

Tabela 6: Arco seno da raiz quadrada do índice de desgranulação.

Pacientes	Tratamentos		
	Laser	Controle	Cor./Laser
1	69,3	41,8	62,2
2	52,7	38,4	61,1
3	75,0	45,0	73,6
4	74,2	42,4	90,0
5	70,5	66,6	65,9
6	70,6	31,5	80,2
7	71,8	54,2	69,3
8	68,6	45,0	71,3

Verificou-se que, com a transformação, a hipótese de normalidade dos erros foi atendida (teste de Shapiro Wilk).

Na análise de variância o teste foi significativo para os tratamentos ao nível de 1% de probabilidade e concluiu-se que pelo menos dois tratamentos possuem efeitos diferentes em relação ao índice de desgranulação, com uma confiança superior a 99% de probabilidade. Aplicou-se, então, o teste de Tukey para comparar as diferenças entre todos os pares de tratamentos. Os resultados foram os seguintes:

Tabela 7: Médias dos tratamentos e teste de Tukey.

	Médias transformadas	Médias não transformadas
Tratamentos	(1)	
Corada/Laser	71,700 a	0,881
Laser	69,088 a	0,864
Controle	45,613 b	0,507

(1) Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si, com 99% de probabilidade.

O teste foi realizado com as médias transformadas e o resultado obtido é estendido para as médias originais (não transformadas).

Os tratamentos corada/laser e laser foram significativamente superiores ao tratamento controle, e não apresentaram diferença significativa entre si.

## 8. DISCUSSÃO

Aplicando a LILT em hiperplasias fibrosas inflamatórias com ou sem prévia coloração por azul de toluidina observamos que há um aumento significativo na desgranulação de mastócitos .

O efeito do laser sobre a desgranulação de mastócitos foi escolhida como observação de referência para verificar o efeito ou não efeito do laser de baixa intensidade sobre o tecido e a associação de um corante como um dos objetos de estudo para verificar se este pode aumentar a ação da luz laser.

A escolha pela lesão hiperplasia fibrosa inflamatória foi devido a esta ser de caráter benigno, alta incidência na população adulta portadora de prótese total mal adaptada e cujo tratamento consiste em remoção cirúrgica total. Todas as hiperplasias fibrosas inflamatórias que compuseram a amostragem deste trabalho estavam sem ulcerações ou seja , com epitélio íntegro e sem características clínicas de inflamação aguda.

A escolha de um corante como o azul de toluidina deveu-se, principalmente ao fato deste ser um corante inócuo ao tecido bucal, já usado na odontologia e principalmente por ser este de cor azul-arroxeadado, sendo uma das cores complementar do vermelho (OKAMOTO, 1992) , cor emitida pela luz laser de baixa intensidade utilizada neste trabalho ( $\lambda=670\text{nm}$ ), a fim de diminuir o espalhamento e a reflexão e, aumentar a absorção da luz laser pelo tecido, visto

que comprimentos de onda compreendidos entre 0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$ , o espalhamento domina em relação à absorção e a profundidade de penetração vai de 8 a 10 mm (RIBEIRO,2000).

Para afastarmos a hipótese de que o corante azul de toluidina pudesse estar influenciando na desgranulação de mastócitos por uma possível irritação química, foram escolhidos três voluntários que possuíam hiperplasia fibrosa inflamatória a serem biopsiadas excisionalmente e, sobre um lado da lesão foi aplicado corante e no outro não. Numa análise descritiva, os dois lados apresentaram o mesmo comportamento dos mastócitos nos três pacientes quando analisados histologicamente.

A escolha pela dose de 8  $\text{J}/\text{cm}^2$ , assim como o método de contagem de mastócitos íntegros e desgranulados, foi baseada na pesquisa de SILVEIRA (2001) onde verifica-se o aumento de desgranulação de mastócitos em parede não mineralizada da bolsa periodontal em proporções bastantes semelhantes a este trabalho entre os grupos controle e o grupo tratado com laser com apenas uma aplicação.

O que verificou-se é que não houve diferenças estatisticamente significativas entre o tecido somente tratado com laser e o tecido corado e tratado com laser, apesar de descritivamente percebermos um leve aumento na desgranulação de mastócitos neste último. Já em relação ao controle, tanto o grupo laser como o corado/laser, apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

O corante azul de toluidina parece não ter influenciado positivamente no aumento da ação da luz laser sobre a desgranulação de mastócitos. Este fato pode ter acontecido devido a este corante apresentar como característica a pouca profundidade de penetração no tecido. É possível que houvesse um aumento

significativo na desgranulação de mastócitos se fosse usado um tipo de corante com maior profundidade de penetração, mas que após a aplicação do laser fosse facilmente removido do tecido .

Outra hipótese seria a aplicação do azul de toluidina a 1% sobre tecidos com o epitélio rompido permitindo que este corasse partes do tecido conjuntivo que constitui a arena da resposta inflamatória. Lembrando que neste trabalho o corante sempre foi aplicado sobre o tecido epitelial da lesão não rompido.

Estudos com aplicações de diferentes níveis de concentrações de azul de toluidina poderiam também ser realizados para testar uma concentração ideal para corar mais profundamente a mucosa bucal normal.

Fica evidente que a luz laser de baixa intensidade , nas condições como foi utilizada, mesmo quando aplicada sobre um tecido com o epitélio íntegro e muitas vezes apresentando acantose, sem características clínicas de inflamação, menos vascularizado e ricos em fibras colágenas como a hiperplasia fibrosa inflamatória, provoca desgranulação de mastócitos em quantidades significativas, podendo exercer um caráter pró-inflamatório.

O aumento na desgranulação de mastócitos pode estar relacionado ao aumento da produção de ATP estimulado pela radiação laser como já estudado por KARU (1992).

Este aumento na desgranulação de mastócitos em tecido com epitélio íntegro poderia auxiliar na aplicação de áreas onde se deseja um efeito de vasodilatação periférica ou angiogênese sem rompimento epitelial.

O sangramento durante o ato operatório foi observado pelo operador e auxiliar e não parece ter havido diferenças clínicas observáveis entre uma biópsia sem aplicação prévia de laser e com aplicação prévia. Este fato poderia gerar

controvérsias, visto que, histologicamente os tecido irradiados apresentaram um alto índice de desgranulação de mastócitos, o que presume em liberação de histamina que é um mediador químico que aumenta a vasodilatação periférica. Porém, em pesquisa de TRELLES e MAYAYO(1992) é relatado que esta vasodilatação não ocorre imediatamente, mas após alguns minutos da irradiação. O paciente quando indagado na consulta após sete dias sobre o sangramento após algumas horas do ato operatório também não relatou sangramento excessivo ou anormal. Este fato pode estar relacionado ao fato que o tecido irradiado foi imediatamente e totalmente removido após a aplicação e , como a profundidade de penetração não ultrapassa a 10 mm, o efeito da irradiação foi quase que totalmente confinado a área e profundidade da lesão cuja espessura variaram entre 5 a 10mm.

Quanto a cicatrização , esta processou-se em tempo normal.

Na análise histológica foram encontradas todas as características inerentes a uma hiperplasia fibrosa inflamatória .

## 9. CONCLUSÕES

Concluimos que:

1. Houveram diferenças estatisticamente significantes entre os índices de desgranulação de mastócitos dos grupos: laser e controle e os grupos corado/laser e controle.
2. Não houveram diferenças significativas na desgranulação de mastócitos entre os grupos laser e corado/laser.

Anexo



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL DO NORTE DO PARANÁ  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CEP 008/01

Londrina, 21 de março de 2001.

Ao Sr.

**Prof. Dr. Edimir Matson**

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

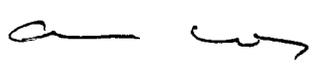
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

N e s t a

Prezado Senhor,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou e **aprovou** o Projeto de Pesquisa "ESTUDO COMPARATIVO DO EFEITO DA IRRADIAÇÃO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE MASTÓCITOS EM HIPERPLASIAS FIBROSAS CORADAS E NÃO CORADAS POR AZUL DE TOLUIDINA," da Mestranda Iris Sawazaki, bem como o Termo de Consentimento Informado que está de acordo com a Resolução 196/96 – CNS.

Atenciosamente



Dr. Marcos Menezes Freitas de Campos  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Coordenador

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMOVICI, A.; ROISMAN P.; HIRSH, A.; SEGAL, S.; FISCHER, J. He-Ne laser irradiation accelerate healing process of open gingival wounds in cats. IN: PROGRESS IN BIOMEDICAL OPTICS, january 22-25, 1994, Los Angeles, California. **Proceedings of: Laser Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems IV**. L.A, California, SPIE, 1994 v.2128. p.248-253.
2. ALBERTS, B. ET AL. **Biologia Molecular da Célula**. 3 ed. Artes Médicas. Porto Alegre, 1997.
3. ARAÚJO, N.S.; ARAÚJO, V.C. **Patologia Bucal**. 1ed. Artes Médicas. Porto Alegre, 1984. p.60.
4. BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação Agrícola**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, p.247, 1989.
5. BARASCH, A.; PETERSON, D.; TANZER, J.M. Helium-neon laser effects on conditioning induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients. **CANCER**, v.76, n.12, dec.15, 1995.
6. BENEDICENTI, A. **Manuale de laser terapia cavo orale**. Castelo Maggioli, 1982.

7. BHASKAR, S.N. **HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA ORAL DE ORBAN**. 10 ed. Artes Médicas. Porto Alegre, 1989.
8. BRUGNERA, A. JR. **Lasers na Odontologia Moderna**. São Paulo: Ed Pancast, 1998.
9. BURNS, T.; WILSON, M.; PEARSON G.J. Sensitization of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. **J.Med.Microbiol.** v.38, p.401 a 405, 1993.
10. CASTRO, A.L. **Hiperplasia Fibrosa Inflamatória de Fórnix do Vestíbulo Bucal: Estudo clínico e histológico de 665 casos**. Araçatuba (SP), 1997. Tese (livre docência) – Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – UNESP.
11. CASTRONUOVO, G.F.; GIAVELLI, S. The skin role during a low level laser therapy. In :LASER BOLOGNA . 3 rd. WOLD CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY FOR LOW POWER LASER APLICATIONS IN MEDICINE. Sep 9-12, 1992. **Proceedings**. Bologna, Italy.
12. CHURCH, M.K; CLOUGH, G.F. Human skin mast cells: in vitro and in vivo studies. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 83 (5), p.471-5, nov. 1999.
13. CRUAÑES, J.C. **La Terapia Laser, Hoy**. Barcelona: Centro de Documentación láser de Meditec. Junio , 1984 .
14. DIDIER COWEN, M.D. ET AL. Low Energy Helium-Neon Laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. **Inst. J.Radiation Oncology Biol. Phis.** , v.38, n.4, p. 697-703, 1997.
15. DONATO, A. C.; BORAKO, S. **Laser Clínico**. São Paulo: Ed. Robe, 1993.

16. DOUGLAS, C.R. **Pato/Fisiologia Geral**. 1 ed. Robe editorial. São Paulo, 2000.
17. EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Effect of Laser Pulse Repetition Rate and Pulse Duration on Mast Cell Number Degranulation. **Lasers in Surgery and Medicine**. Vol. 19, 1996. p. 433-437.
18. ESCOLA, R.; LU, R.; ESCOLA, M.J. Contribution à l'étude ultrastructurale de tissus gingivaux irradiés au soft laser Hélium-Néon. **Le Chirurgien Dentiste de France**, v.3, n.276, janvier 1985.
19. ESPINOSA, C. R. **Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com laser ou com solução fotossensibilizadora associada ao laser de bioestimulação**. Estudo histológico em ratos. Marília: 1999. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia – UNIMAR.
20. EVESON, J.W. **Atlas Colorido de Patologia Bucal**. Artes Médicas. Porto Alegre, 1995.
21. FAROUK, A.H. et al. Comparison of Wound Healing Process Using Argon and Krypton Lasers. **J.Clin Laser Med Surg**. v 15, p.209-215, 1997.
22. GOMEZ, R.S.; FIGUEIREDO, F.P.; CAPISTRANO, H.M.; LOYOLA, A.M. Levantamento das biópsias bucais realizadas na Faculdade de Odontologia da UFMG. **Arq. Centro Estud. Curso Odontol**; 19(2): p.105-113, jul-dez. 1992.
23. GUYTON, A.C.; HALL, E.J. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9º ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1996.
24. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ., 1997.

25. KARU, T.I. Photobiological Fundamentals of Low – Power Laser Therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v.qf 23, n.10.out.,1987.
26. KARU, T.I. PHOTOBIOLOGY OF LOW –POWER LASER EFFECTS. **Health Physics**, v.56, n.5 (may), 1989. p.691-704.
27. KARU, T.I. Local pulsed heating of absorbing chromophores as a possible primary mechanism of low power laser effects. . In :LASER BOLOGNA . 3rd. WOLD CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY FOR LOW POWER LASER APLICATIONS IN MEDICINE. Sep 9-12, 1992. **Proceedings**. Bologna, Italy.
28. KARU, T. Mechanisms of Interaction of Monochromatic Visible Light with Cells. In:EFFECS OF LOW-POWER LIGHT ON BIOLOGICAL SYSTEMS , September 14-15, 1995. **Proceedings** . Barcelona, Spain.p. 2.
29. KARU,T. Mechanisms of Low-Power Laser Light Action on Cellular Level. In: SIMUNOVIC, Z. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low level laser therapy : LLLT**. Rijeka: Vitagraf, 2000. p.98-125.
30. KATCHBURIAN, E.;ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Panamericana. São Paulo, 1999.
31. KIGNEL, S. **Diagnóstico Bucal**. Ed. Robe, São Paulo, 1997. p. 211-214.
32. KLIMA, H. Biophysical Aspects of Low Level Laser Therapy. In : SIMUNOVIC, Z. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low level laser therapy : LLLT**. Rijeka: Vitagraf, 2000. p.75-96.

33. LICHTENSTEIN, D.; MORAG B. Laser Therapy in Ambulatory Patients with Venous Stasis Ulcers. In: 2<sup>nd</sup> CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY, September 2-5, 1998. **Proceedings**. Kansas City, Missouri, USA. p. 31-32.
  
34. LOPES JÚNIOR, W. - Reparação em feridas de extração dental, infectadas, tratadas com droga fotossensibilizadora, associada ou não ao laser de baixa intensidade. Estudo histológico em ratos. . **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Odontologia – UNESP, Araçatuba, 2000.
  
35. LOPES, L.A. Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. **Dissertação de mestrado**. São José dos Campos, SP, 1999
  
36. MAILLET, H. **O Laser**. Princípios e técnica de aplicação. São Paulo: Ed. Manole, 1987.
  
37. MISERANDINO, Leo J. **Lasers in Dentistry**. Quintessence Publishing Co, Inc. 1995.
  
38. MOTA, I. The mast cell revisited. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V.28, 1995. P.895-901.
  
39. NICCOLI FILHO, W.D. Eficácia da radiação de dois diferentes tipos de laser de baixa energia (He-Ne e As Ga Al) na prevenção de mucosites orais em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. **Tese ( livre docência)** – Faculdade de odontologia do "Campus de São José dos Campos da Universidade Est. Paulista. São José dos Campos, 1995.

40. NIEMZ, M.H. **Laser Tissue Interactions Fundamental and Applications**. Springer Vergg Berlin Heidelberg, 1996.
41. OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-Mediated Bactericidal Effect of He-Ne Laser Irradiation on Oral Microorganisms. **Lasers in Surgery and Medicine**. V.12, p.450-458, 1992.
42. PARIZOTTO, 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 e Espectroscopia por Infravermelho**. Campinas (SP):1998. Tese (doutoramento) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da UNICAMP.
43. PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. Ed.13. Piracicaba: Nobel.p.467, 1990.
44. RAW, I.; COLLI, W. **BIOENERGÉTICA**. União Pan-Americana. Washington, D.C., 1967.
45. RIBEIRO, M. **Lasers de Baixa Intensidade**. Apostila de aula do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia. IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.
46. ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 5 th ed. International Edition; W.B. Saunders, 1994.
47. ROCHA, W.C. Uso do azul de toluidina como método auxiliar na detecção de displasias epiteliais e carcinomas da mucosa bucal. **Dissertação de Mestrado**. PUCRS. Porto Alegre, 1995.
48. ROITT, I.M. **Immunology of Oral Diseases**. Blackwell Scientific Publication. Austrália, 1980.
49. ROSSI, W. **Geração de Harmônicos**. Apostila de aula do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia. IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.

50. RYDÉN, H.; PERSSON, L. Effect of low level energy laser irradiation on gingival inflammation. **SWED DENT J.** vol.18, 1994. P. 35-41.
51. SAMOILOVA, K.A.; OBOLENSKAYA, A.V.; VOLOGDINA, S.A.; SNOPOV, E.V. Single Skin exposure to visible polarized light induces rapid modification of entire circulating blood. 1. Improvement of rheologic and immune parameters. In: EFFECTS OF LOW-POWER LIGHT ON BIOLOGICAL SYSTEMS IV, September 8-9, 1998. **Proceedings.** Stockholm, Sweden. p. 90.
52. SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L. Increased Dermal Neovascularization after Low Dose Laser Therapy of a Chronic Radiation Ulcer Determined By a Video Measuring System. In: 2<sup>nd</sup> CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY, September 2-5, 1998. **Proceedings.** Kansas City, Missouri, USA. p. 34.
53. SCHNEIDER, N.P.; SOUDRY, M.; REMUSAT, M. FRANQUIN, J.C.; MARTIN, P.M. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence International**, v.20, n.12, p.887-893, 1989.
54. SHAFFER, W.G. ET AL. **Tratado de Patologia Bucal.** 4 ed. Interamericana, Rio de Janeiro, 1984.
55. SILVEIRA, J.C.; LOPES, E.E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs – 904nm (estudo experimental em cobais – cavia porcellus). **Arq.Cent.Estud.Curso Odontol.**, Belo Horizonte, 28 (1/2): 73 – 96, jan/dez 91
56. SILVEIRA, J.C.; SILVEIRA, L.B. Da Influência do raio Laser Ga As 904 nm n Drenagem do Fluido do Sulco Fisiológico Gengival em Humanos. **Revista Semestral da Sociedade Brasileira de Periodontologia.** Vol 1, nº 1, Abril-Setembro, 1992. P. 3-13.

57. SILVEIRA, L.B. Verificação do comportamento de mastócitos na parede não mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa intensidade. **Dissertação de Mestrado**. FOUASP/IPEN, São Paulo, 2001.
58. SIMUNOVIC, Z. Low Level Laser Therapy with Trigger Points Technique: A Clinical Study on 243 Patients. **Journal of Clinical Laser Medicine & -Surgery**, v. 14, n. 4, p. 163-167, 1996.
59. STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**. Lippincott. Raven ed. Philadelphia, NY, 1996.
60. TOMMASI, A. F. **Diagnóstico em Patologia Bucal**. 1 ed. Artes Médicas, São Paulo, 1988.
61. TRELLES, M.A.; MAYAYO, E. Mast cell are implicated in Low power Laser effect effect on tissue. A preliminary study. **Laser in Medical Science**. V.7, p.73-77.1992.
62. TRELLES, M.A. ; RIGAU, J. ; VÉLEZ, M. LLLT in vivo effects on mast cells. In : SIMUNOVIC, Z. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low level laser therapy : LLLT**. Rijeka: Vitagraf, 2000. p.169-186.
63. TUNÉR, J. and HODE, L. **Low Level Laser Therapy**. Sweden: Prima Books, 1999.

64. VALENTINA, M.; KARU, T. Activation of chromatin in T-lymphocytes under the He-Ne laser radiation. In: EFFECTS OF LOW-POWER LIGHT ON BIOLOGICAL SYSTEMS IV, September 8-9, 1998. **Proceedings**. Stockholm, Sweden. p. 12.
65. VAN BREUGHEL, H. et al. Power Density and Exposure Time of HeNe Laser Irradiation Are More Important Than Total Energy Dose In Photo-Biomodulation of Human Fibroblasts in Vitro. *Laser Surg Med.*, v.12, p. 528, 1992.
66. VAN DER VEM, A. ; LEYS, A.; VERBUYST, C. The Influence of IR-Laser on Proliferation of Fibroblasts : An in vitro study. In: 2<sup>nd</sup> CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY, September 2-5, 1998. **Proceedings**. Kansas City, Missouri, USA. p. 20.
67. VIEIRA JR, Nilson Dias. **Introdução ao Lasers**. Apostila de aula do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia. IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.
68. WEISCH, O. **Atlas Colorido de Citologia , Histologia e Anatomia Microscópica Humana**. 5<sup>o</sup> ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999.
69. WETTER, N. **Sistemas de entrega** . Apostila do curso do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia. IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.
70. WILDEN, L.; KARTHEIN, R. Import of Radiation Phenomena of Electrons and Therapeutic Low Level Laser in Regard to the Mitochondrial Energy Transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**. V.16, n.3, p.159-165, 1998.
71. WILDEN, L.; KARTHEIN, R. The Role Radiation Phenomena of Electrons and Low-Level Laser In Regard To The Cellular Energy Transfer. In: 2<sup>nd</sup> CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY, September 2-5, 1998. **Proceedings**. Kansas City, Missouri, USA. p. 50.

72. WHITSON, G.L. **Concepts in Radiation Cell Biology**. Academic Press. New York, 1972.
73. Workshop: Utilização Clínica do Laser. **Manual**. IPEN/ABO/FOUSP/FDCTO. São Paulo, 1999.
74. YOSHIO NARA, D.D.Sc et al. Recovery of Lymphocyte Blastoid Transformation invitro by He-Ne Laser. **Surgical and Medical LASERS**. v.6, p.204-206, 1990.
75. ZECELL, D. **Efeitos Biológicos da Luz Laser**. Apostila de aula do Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia. IPEN/FOUSP. São Paulo, 2000.
76. ZUBAY, G.L. **Biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed. Wm.C.Brown Publishers. USA, 1998.



M22292



***Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares***

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000

Fone (0XX11) 3816-9000 - Fax (0XX11) 3812-3546

SÃO PAULO - São Paulo

[Http://www.ipen.br](http://www.ipen.br)

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear e associada à Universidade de São Paulo para fins de ensino de Pós-Graduação.