



BR0645205

BR0645205



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO E DO
COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO DE AMOSTRAS DE PELE
SADIA E QUEIMADA IRRADIADAS PELO *LASER* DE
HE-NE LINEARMENTE POLARIZADO**

DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais.

Orientadora:
Dra. Martha Simões Ribeiro

**São Paulo
2002**

0001.17

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

563

**ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO E DO COEFICIENTE DE
ATENUAÇÃO DE AMOSTRAS DE PELE SADIA E QUEIMADA IRRADIADAS
PELO LASER DE He-Ne LINEARMENTE POLARIZADO**

DANIELA DE FÁTIMA TEIXEIRA DA SILVA



**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear – Materiais**

**Orientadora:
Dra. Martha Simões Ribeiro**

**SÃO PAULO
2002**

ANÁLISE DA BIRREFRINGÊNCIA DO COLÁGENO E DO COEFICIENTE DE ATENUAÇÃO DE AMOSTRAS DE PELE SADIA E QUEIMADA IRRADIADAS PELO LASER DE He-Ne LINEARMENTE POLARIZADO

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

RESUMO

A terapia *laser* em baixa intensidade é caracterizada pela sua habilidade em induzir efeitos não térmicos e processos fotobiológicos não destrutivos. Embora seja utilizada por mais de 40 anos, essa fototerapia não é ainda uma modalidade terapêutica bem estabelecida. Este estudo teve dois objetivos: (a) quantificar a organização do colágeno por microscopia de polarização em amostras de pele normal e queimada no décimo sétimo dia pós-criação das lesões. Duas direções de polarização do *laser* foram consideradas, uma paralela à coluna vertebral do animal e outra perpendicular à direção relativa; (b) determinar o coeficiente de atenuação relativo da intensidade de luz pela técnica de imagem de distribuição de luz em amostras de pele normal e queimada durante o processo de reparação tecidual. Para isso, somente a polarização paralela do feixe *laser*, em relação à coluna vertebral, foi considerada. Para alcançar esses objetivos foram criadas queimaduras de aproximadamente 6 mm de diâmetro com N₂ líquido no dorso de ratos e realizadas irradiações nos dias 3, 7, 10 e 14 pós-criação das lesões com dose de 1 J/cm². As lesões controle não foram irradiadas. Os resultados mostraram que: (a) os espécimes irradiados com o *laser* de He-Ne polarizado paralelamente à coluna tinham fibras colágenas mais organizadas; (b) as amostras de pele queimada apresentaram coeficiente de atenuação maior do que as amostras de pele sadia. Esses resultados são importantes para a otimização da dosimetria associada à terapia com *laser* em baixa intensidade na aceleração de cicatrização de feridas.

**ANALYSIS OF THE COLLAGEN BIREFRINGENCE AND THE RELATIVE
ATTENUATION COEFFICIENT OF HEALTH AND BURNED SKIN
IRRADIATED WITH LINEARLY POLARIZED HE-NE LASER**

Daniela de Fátima Teixeira da Silva

ABSTRACT

Low-intensity laser therapy is characterized by its ability to induce athermic effects and nondestructive photobiological processes. Although it has been in use for more than 40 years, this phototherapy is still not an established therapeutic modality. The objectives of this study were: (a) to quantify the collagen fibers organization by polarized light microscopy in normal and burned skin samples at day 17 post-injury considering a preferential axis as the animal's spinal column and aligning the linear laser polarization in two directions of polarization, parallel or perpendicular to this axis; (b): to determine the relative attenuation coefficient for the intensity light by the technique of imaging the light distribution in normal and burned skin during wound healing process taking only parallel direction of polarization. To reach the objectives, burns about 6 mm in diameter were created with liquid N₂ on the back of the rats and the lesions were irradiated on days 3, 7, 10 and 14 post-wounding, D= 1 J/cm², to investigate the effects of low-intensity linearly polarized He-Ne laser beam on skin wounds healing. Control lesions were not irradiated. The results have demonstrated that: (a) the skin samples irradiated with linearly parallel polarized He-Ne laser beam showed collagen fibers more organized; (b) burned skin samples presents a higher attenuation coefficient than normal skin samples. These results are important to optimize low intensity laser therapy dosimetry on acceleration wound healing.

*Aos meus pais Eraldo (in memoriam) e
Olívia, pela formação moral, ética e
educacional que me deram.*

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Dra. Martha Simões Ribeiro**, com quem aprendi que orientar é uma tarefa nobre e difícil, porém perfeitamente possível. Com certeza, meus futuros alunos terão muito o que agradecer a essa amiga encantadora.

À **Profª. Dra. Denise Maria Zezell**, orientadora durante a iniciação científica e essencial para meu amadurecimento na carreira acadêmica.

Ao **Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal**, pela atenção dedicada e pelas valiosas instruções.

À **Profª. Dra. Telma Maria Tenório Zorn**, que admiro como pessoa, pesquisadora, orientadora, professora e colaboradora.

À **CAPES** e à **FAPESP**, pelo financiamento desta pesquisa.

Ao **IPEN**, pela infra-estrutura fornecida.

Ao **CLA**, especialmente ao **Prof. Nilson**, por oferecer as condições necessárias para execução deste trabalho.

Ao **Biotério** do **IPEN**, pela pronta colaboração, em especial à **Profª. Nancy**, ao **Calixto** e ao **Cícero**.

Aos colegas do **Laboratório de Biologia da Reprodução de Mamíferos**, do **ICB-USP**, em especial à **Cleuza**, **Maurício**, **Luciane**, **Fabiano**, **Carlinhos**, **Sebastian** e **Fernanda**, pela constante disposição em ajudar e colaborar com a preparação das amostras biológicas.

Ao **Walter Miyakawa**, pelas sugestões, ensinamentos e, como ele mesmo diz, pelas "trocas de figurinhas"! Esse amigo me fez perceber que o pensamento é apenas um lampejo entre duas longas noites, mas que tal lampejo é tudo.

Ao **Sandro Fernando Stolf**, um amigo para toda a vida e alguém que me faz colocar continuamente em questão as minhas próprias opiniões, aliás, condição essa preliminar para qualquer inteligência.

Ao **Luciano** e à **Andrea**, pelas valiosas discussões e pelas horas de descontração que todos nós merecemos e necessitamos ter.

À **Silvia**, por me ajudar na manipulação dos animais.

A todos os alunos do **Laboratório de Lasers em Ciências da Vida**, que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Ao Sr. Braga, que fez uma breve, porém importante participação neste trabalho levando-me ao ICB com os ratinhos

Ao Marcos, Paulinho e Valdir, pela construção do suporte para as amostras biológicas.

À Solange e à Dra. Izilda, pela deposição do filme fino nas lâminas biológicas.

Às secretárias da Pós-Graduação do IPEN, Aninha, Ilze e Verinha, pela constante paciência.

Às secretárias do CLA, Elza e Isabel, pela disposição em ajudar, sempre.

Ao meu irmão João Carlos e às minhas irmãs Eliane e Fernanda por compreenderem minha ausência.

Aos meus cunhados Mônica, Jota e Luís pelos momentos familiares que me aliviam a tensão!

Aos meus sobrinhos, Thaís e João Luca, por me fazerem brincar e virar novamente criança!

À Sra. Lourdes e Renata, por me acolherem em casa nos inúmeros dias em que saí tarde da noite do instituto. Serei eternamente grata a essa minha segunda família.

À toda minha família, que eu amo e me orgulho.

Aos meus amigos, pelo apoio e humor.

À Deus, pela garra que não me deixa abrir mão.

*Nunca se percebe o que já foi feito; só
percebemos o que ainda está por fazer.*
Marie Curie

LISTA DE ABREVIATURAS

ASCII: *American Standard Code for Information Interchange*

AsGa: *Arsenide Galium*

AsGaAl: *Arsenide Galium Aluminum*

C: controle

°C: grau Celsius

cm: centímetro

D: dose ou fluência

He-Ne: hélio e neônio

HEX80: corante hematoxilina e eosina; magnificação 80 vezes

I: intensidade

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

J: joule

KHz: quilohertz

L//: irradiada com polarização alinhada paralelamente à coluna vertebral

L⊥: irradiada com polarização alinhada perpendicularmente à coluna vertebral

LILT: *Low Intensity Laser Therapy*

µm: micrometro

N₂: nitrogênio molecular

nm: nanometro

S: sadia

USP: Universidade de São Paulo

W: watt

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Objetivos.....	10
1.2. Apresentação do Trabalho.....	11
2 INTERAÇÃO DO LASER COM TECIDOS BIOLÓGICOS.....	12
2.1. Reflexão e refração.....	12
2.2. Absorção.....	15
2.3. Espalhamento.....	17
2.4. Atenuação.....	24
3 PELE.....	27
3.1. Matriz extracelular.....	28
3.2. Colágeno.....	29
4 REPARAÇÃO TISSULAR.....	31
5 LASER NA REPARAÇÃO CUTÂNEA.....	34
5.1. Revisão Bibliográfica.....	34
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
6.1. Organização do colágeno.....	41
6.2. Coeficiente de atenuação relativo.....	44
7 RESULTADOS.....	48
7.1. Organização do colágeno.....	48
7.2. Coeficiente de atenuação relativo.....	55
8 DISCUSSÃO.....	68
9 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

Lasers de baixa potência foram introduzidos como modalidade terapêutica na década de 60, devido às baixas densidades de energia utilizadas e aos comprimentos de onda capazes de penetrar no tecido. Desde então, encontram-se na literatura vários estudos em células^{1, 2, 3, 4}, animais^{5, 6, 7} e humanos^{8, 9, 10, 11, 12}. Entretanto, a relação exposição-resposta não foi ainda esclarecida e os mecanismos básicos responsáveis pelos efeitos observados no intervalo de doses terapêuticas não são completamente entendidos. Sabe-se, contudo, que os valores de energia conseguidos com este tratamento produzem mudanças mínimas e insignificantes no gradiente de temperatura; o aquecimento induzido está no intervalo de 0,1 a 0,5 °C¹³.

Atribuem-se os resultados clínicos positivos desta terapia a uma seqüência de eventos celulares e moleculares, na qual os fatores determinantes na resposta fotoquímica, fotofísica e/ou fotobiológica são o comprimento de onda, a intensidade, a fluência (dose), a concentração de cromóforos ativos e as propriedades ópticas (reflexão, transmissão, absorção, espalhamento e anisotropia) do tecido tratado, bem como o seu estado fisiológico. No caso específico da terapia com *lasers* em baixa intensidade (LILT- *Low Intensity Laser Therapy*) é proposto que componentes da cadeia respiratória sejam os primeiros absorvedores do quantum de luz, desencadeando uma cascata de eventos que conduz à resposta final, por exemplo, à cicatrização cutânea¹⁴.

Apesar da vasta quantidade de trabalhos encontrados na literatura, nota-se que as informações sobre os efeitos não-térmicos do *laser* em tecidos biológicos não são conclusivas, relatando na sua maioria casos clínicos ou observacionais com pouco embasamento científico.

Em contrapartida, as propriedades ópticas de tecido patológico têm recebido maior atenção por parte da comunidade científica. Por exemplo, Kolárova e colaboradores, em um estudo sobre a penetração da luz *laser* nas diferentes camadas da pele mostrou, *in vitro*, que as propriedades ópticas dos espécimes são diferentes para pele normal e para tecido de granulação de úlceras¹⁵. A medida da profundidade de penetração da luz *laser* no tecido de granulação foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a profundidade de penetração em pele normal de espessura similar. Já estudos *in* ou *ex vivo* que investigam a distribuição da luz no tecido sob condição patológica são mais escassos na literatura. Pode-se citar Melo e colaboradores, os quais analisaram as propriedades ópticas de diferentes

tecidos de rato em relação à distribuição espacial da intensidade de luz. Para todos os tecidos foram observados decaimento exponencial da radiação e distribuição circular do espalhamento causado. Além disso, em fígado cirrótico o decaimento foi muito mais pronunciado que em fígado sadio¹⁶. Investigar as propriedades ópticas de tecidos sob uma condição patológica, portanto, é essencial para otimizar a dosimetria associada à LILT.

Em trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em colaboração com o Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP)¹⁷, mostrou-se que a direção de polarização do feixe de *laser* incidente desempenha um papel importante na cicatrização de queimaduras da pele, particularmente na formação do tecido conjuntivo da derme. A análise morfológica indicou que o colágeno na matriz extracelular estaria em um estágio de organização mais avançado nas lesões irradiadas com a polarização alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal, quando comparado às lesões controle (sem irradiação) e àquelas irradiadas com a polarização alinhada perpendicularmente à coluna vertebral. No entanto, uma análise quantitativa não foi realizada.

O *laser* em baixa intensidade é utilizado como terapia alternativa para aceleração de cicatrização de feridas há três décadas. Porém, seus mecanismos de ação necessitam ainda de estudos para que sejam melhor compreendidos e para que esta terapia possa ser utilizada de modo mais eficaz.

1.1. Objetivos

- ◆ Quantificar a organização do colágeno na matriz extracelular de feridas irradiadas com o *laser* de He-Ne linearmente polarizado em baixa intensidade por microscopia de polarização.

- ◆ Obter o coeficiente de atenuação relativo de pele sadia, pele lesada não irradiada e pele lesada irradiada pelo *laser* de He-Ne linearmente polarizado em baixa intensidade, durante o processo de cicatrização tecidual pela variação espacial de intensidade e distribuição de luz detectadas por uma câmera digital.

1.2. Apresentação do trabalho

Considerando o caráter interdisciplinar deste tema, o próximo capítulo trata da interação do *laser* com os tecidos biológicos, o qual descreve os fenômenos básicos que ocorrem quando a matéria é exposta à luz. Os capítulos três e quatro retratam a anatomia da pele e o processo de reparação tissular, respectivamente, os quais não têm a pretensão de detalhar o assunto, mas apenas destacar os aspectos mais relevantes para a compreensão dos resultados obtidos. No quinto capítulo é feita uma revisão da literatura sobre a terapia *laser* em baixa intensidade utilizada para tratamento de feridas cutâneas. O capítulo seis, materiais e métodos, está dividido em duas partes. A primeira parte trata do procedimento experimental para execução do primeiro objetivo e a segunda parte apresenta a metodologia para atingir o segundo objetivo. Os demais capítulos do trabalho são divididos entre os resultados obtidos e a discussão.

2. INTERAÇÃO DO LASER COM TECIDOS BIOLÓGICOS

Cinco fenômenos podem ocorrer em consequência da interação da radiação eletromagnética com tecidos biológicos: reflexão, refração, absorção, espalhamento e transmissão.

A reflexão e a refração são inter-relacionadas pela lei de Fresnel e, por isso, são estudadas em conjunto. Somente os fótons não refletidos, não absorvidos ou espalhados na mesma direção do feixe incidente são transmitidos pelo tecido. A razão entre as intensidades da radiação transmitida e incidente é chamada transmitância.

O tipo de tecido e o comprimento de onda incidente determinam qual fenômeno acima é o predominante. Aliás, o comprimento de onda é importante para determinar o índice de refração e os coeficientes de absorção e espalhamento.

2.1. Reflexão e refração

A reflexão é definida como a radiação eletromagnética que incide numa superfície e retorna para o meio de origem. Em geral, a superfície refletora é uma interface física entre dois materiais de índices de refração diferentes, tal como o ar e o tecido.

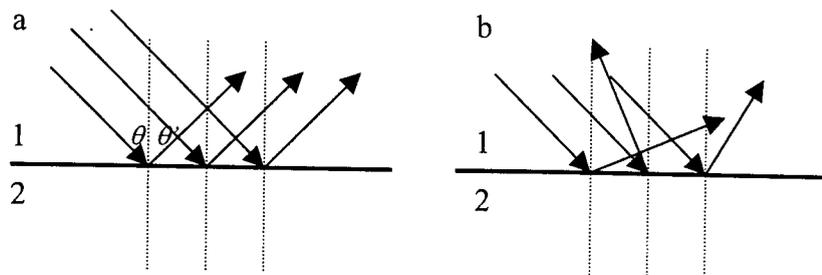


Figura 2.1: (a) Reflexão especular. (b) Reflexão difusa.

O ângulo θ é medido entre a superfície normal e o feixe incidente. O ângulo θ' é medido entre a superfície normal e o feixe refletido.

Quando a superfície é lisa, assume-se que suas irregularidades são pequenas quando comparadas ao comprimento de onda da radiação incidente, ocorrendo a reflexão especular (figura 2.1a). Por outro lado, quando a rugosidade da superfície é igual ou maior que o comprimento de onda da radiação incidente, ocorre a reflexão difusa (figura 2.1b). Esse último caso é um fenômeno comum para os tecidos biológicos.

A refração ocorre quando uma superfície refletora separa dois meios com índices de refração diferentes (figura 2.2). Este fenômeno ocorre em consequência da mudança de velocidade da luz incidente.

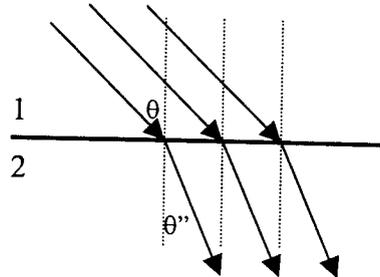


Figura 2.2: Refração da luz.

A relação matemática que governa a refração é a lei de Snell, dada por:

$$\frac{\text{sen } \theta}{\text{sen } \theta''} = \frac{v}{v'}$$

(2.1)

θ : ângulo de incidência, já definido anteriormente.

θ'' : ângulo de refração.

v : velocidade da luz antes de atingir a superfície refletora.

v' : velocidade da luz após atingir a superfície refletora.

Os índices de refração são assim definidos:

$$n = \frac{c}{v} \quad n = \frac{c}{v'}$$

(2.2)

c : velocidade da luz no vácuo.

Das equações (2.1) e (2.2) é possível relacionar:

$$n \operatorname{sen} \theta = n' \operatorname{sen} \theta'' \quad (2.3)$$

Apenas para $\operatorname{sen} \theta > n'/n$ a refração não acontece, pois neste caso há a reflexão total.

A refletividade de uma superfície é a medida da quantidade de radiação refletida. É definida como a razão da amplitude do campo elétrico refletido e a amplitude do campo elétrico incidente. A refletância é a razão das intensidades correspondentes e igual ao quadrado da refletividade. Tanto refletividade quanto refletância dependem do ângulo de incidência, da polarização da radiação e dos índices de refração dos meios envolvidos. As relações entre refletividade e refração são comumente conhecidas como lei de Fresnel:

$$\frac{E'_s}{E_s} = -\frac{\operatorname{sen}(\theta - \theta'')}{\operatorname{sen}(\theta + \theta'')} \quad (2.4)$$

$$\frac{E'_p}{E_p} = \frac{\operatorname{tg}(\theta - \theta'')}{\operatorname{tg}(\theta + \theta'')} \quad (2.5)$$

$$\frac{E''_s}{E_s} = \frac{2 \operatorname{sen} \theta'' \cos \theta}{\operatorname{sen}(\theta + \theta'')} \quad (2.6)$$

$$\frac{E''_p}{E_p} = \frac{2 \operatorname{sen} \theta'' \cos \theta}{\operatorname{sen}(\theta + \theta'') \cos(\theta - \theta'')} \quad (2.7)$$

E : amplitude do vetor campo elétrico da radiação incidente

E' : amplitude do vetor campo elétrico da radiação refletida

E'' : amplitude do vetor campo elétrico da radiação refratada

s : plano de oscilação perpendicular ao plano de incidência

p : plano de oscilação paralelo ao plano de incidência

Podia-se esperar que a intensidade do feixe refratado fosse complementar à intensidade do feixe refletido, tal que a soma de ambos fosse igual à intensidade incidente. Contudo, isto não é correto porque a intensidade é definida como potência por unidade de área e a secção transversal do feixe refratado é diferente da secção transversal dos feixes incidente e refletido, exceto para incidência normal. Somente a energia total nestes feixes é conservada.

As refletâncias são dadas por:

$$R_s = \left(\frac{E'_s}{E_s} \right)^2 \quad (2.8)$$

$$R_p = \left(\frac{E'_p}{E_p} \right)^2 \quad (2.9)$$

O ângulo no qual $R_p = 0$ é chamado ângulo de Brewster. Quando os meios são ar e água, mesmo com incidência normal, isto é, $\theta = 0$, as refletâncias, tanto para R_s quanto para R_p , são aproximadamente 2%.

2.2. Absorção

A absorção ocorre quando a onda eletromagnética não retorna a partir da superfície incidente e nem se propaga no meio (figura 2.3). A absorbância do meio é definida como a razão das intensidades absorvida e incidente.

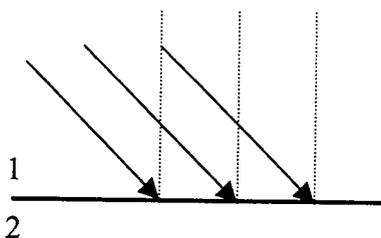


Figura 2.3: Absorção da luz.

Parte da energia da radiação absorvida é convertida em calor ou em vibração das moléculas que compõem o tecido. Um meio transparente permite a passagem da luz sem qualquer absorção, ou seja, a energia radiante total que entra e sai desse meio é a mesma. Já um meio opaco reduz a energia da radiação incidente praticamente a zero. Os termos transparente e opaco são relativos, pois são dependentes do comprimento de onda.

A habilidade de um meio absorver radiação eletromagnética depende de alguns fatores, principalmente da constituição eletrônica de seus átomos e moléculas, do comprimento de onda da radiação, da espessura da camada absorvedora e de parâmetros internos, tal como temperatura e concentração de agentes absorvedores. Duas leis são frequentemente aplicadas para descrever tanto o efeito da espessura, lei de Lambert (2.10), quanto o efeito da concentração, lei de Beer (2.11), sobre a absorção:

$$I(z) = I_0 e^{-\alpha z} \quad (2.10)$$

$$I(z) = I_0 e^{-\kappa' cz} \quad (2.11)$$

z : eixo óptico

$I(z)$: intensidade na distância z

I_0 : intensidade incidente

α : coeficiente de absorção do meio

c : concentração de agentes absorvedores

κ' : depende dos demais parâmetros internos

Quando ambas as leis descrevem o mesmo comportamento de absorção, tornam-se conhecidas como lei de Beer-Lambert. Da equação 2.10, obtêm-se:

$$z = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{I_0}{I(z)} \quad (2.12)$$

O inverso do coeficiente de absorção α é referido como comprimento de absorção L , isto é:

$$L = \frac{1}{\alpha} \quad (2.13)$$

O comprimento de absorção mede a distância z que terá intensidade $I(z)$ reduzida a $1/e$ de seu valor incidente I_0 .

Nos tecidos biológicos, a absorção é causada principalmente por moléculas de água e macromoléculas, como proteínas e pigmentos. Uma janela terapêutica é delimitada entre 600 nm e 1200 nm, em razão de não haver fortes absorções nem das macromoléculas, nem da água. Nessa faixa do espectro eletromagnético, a radiação penetra mais profundamente nos sistemas biológicos e por esta razão esses comprimentos de onda são mais utilizados na LILT.

2.3. Espalhamento

Quando partículas carregadas e confinadas elasticamente são expostas às ondas eletromagnéticas, seus movimentos passam a ser de acordo com o campo elétrico incidente. Se a frequência da onda é igual à frequência natural das vibrações livres das partículas, ocorre ressonância, acompanhada por quantidade considerável de absorção.

O espalhamento, por outro lado, ocorre quando a frequência da onda não corresponde à frequência natural das partículas. A oscilação resultante é determinada pela vibração forçada. Em geral, esta vibração terá a mesma frequência e direção daquela da força elétrica da radiação incidente. Sua amplitude, porém, é muito menor do que para o caso da ressonância. Além disso, a fase da vibração forçada difere da fase da onda incidente, fazendo com que os fótons diminuam a velocidade ao penetrarem num meio denso. Por isso, o espalhamento pode ser considerado como origem básica da dispersão.

Dependendo da maneira em que a energia do fóton incidente é convertida, há o espalhamento elástico ou inelástico.

No caso elástico, os fótons incidente e espalhado têm a mesma energia. Um caso especial do espalhamento elástico é o espalhamento Rayleigh. Sua restrição é que as partículas espalhadoras sejam menores do que o comprimento de onda da radiação

incidente. Nesse tipo de fenômeno, encontra-se uma relação entre intensidade espalhada e índice de refração: o espalhamento é inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda, afirmação essa conhecida como lei de Rayleigh.

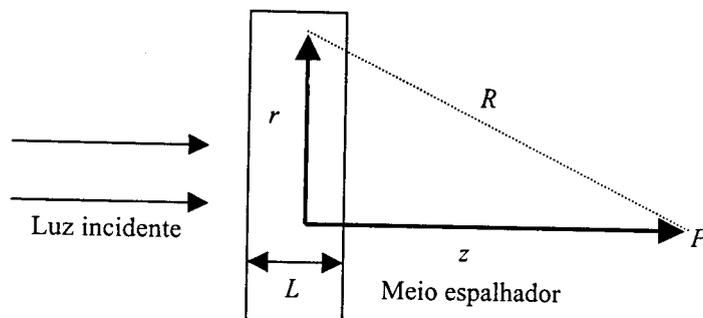


Figura 2.4: Espalhamento Rayleigh

Na figura 2.4, uma onda eletromagnética plana incide sobre um meio espalhador com espessura total L .

Em determinado tempo, o campo elétrico da onda incidente pode ser expresso por:

$$E(z) = E_0 e^{ikz} \quad (2.14)$$

E_0 : amplitude do campo elétrico incidente

k : vetor propagação

z : eixo óptico

Em primeira aproximação, assume-se que a onda original alcança o ponto P do eixo óptico com adição de uma pequena contribuição de espalhamento. A perda na intensidade por conta do espalhamento é descrita por uma relação similar à absorção:

$$I(z) = I_0 e^{-\alpha_s z} \quad (2.15)$$

α_s : coeficiente de espalhamento

Diferenciando a equação 2.15 em relação a z :

$$dI = -\alpha_s I dz \quad (2.16)$$

A intensidade espalhada pelo meio de espessura L , como esquematizado na figura 2.4, é então proporcional a α_s e L :

$$I_s \sim \alpha_s L \quad (2.17)$$

Assumindo que há NL átomos por unidade de área no meio espalhador, com N denotando a densidade de átomos espalhadores, a intensidade espalhada por um destes átomos pode ser descrita pela relação:

$$I_1 \sim \frac{\alpha_s L}{NL} = \frac{\alpha_s}{N} \quad (2.18)$$

Então, a amplitude do campo elétrico correspondente é:

$$E_1 \sim \sqrt{\frac{\alpha_s}{N}} \quad (2.19)$$

Como consequência da interferência de todas as ondas espalhadas, a amplitude do espalhamento total pode ser expressa por:

$$E_s \sim NL \sqrt{\frac{\alpha_s}{N}} = L \sqrt{\alpha_s N} \quad (2.20)$$

A amplitude na distância z do eixo óptico é obtida adicionando-se as amplitudes de todas as ondas esféricas espalhadas à amplitude da onda plana incidente, ou seja:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} + L\sqrt{\alpha_s} N \int_0^\infty \frac{e^{ikR}}{R} 2\pi r dr \right) \quad (2.21)$$

$$R^2 = z^2 + r^2$$

Em determinado z :

$$r dr = R dR \quad (2.22)$$

Isto reduz a equação 2.21 a:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} + L\sqrt{\alpha_s} N 2\pi \int_z^\infty e^{ikR} dR \right) \quad (2.23)$$

Se um trem de onda tem comprimento finito, o espalhamento $R \longrightarrow \infty$ pode ser desprezado. Assim, da equação 2.23:

$$E(z) = E_0 \left(e^{ikz} - L\sqrt{\alpha_s} N \frac{2\pi}{ik} e^{ikz} \right) \quad (2.24)$$

Inserindo o comprimento de onda $\lambda = 2\pi/k$:

$$E(z) = E_0 e^{ikz} \left(1 + i\lambda L\sqrt{\alpha_s} N \right) \quad (2.25)$$

De acordo com o que foi assumido, a contribuição do espalhamento, isto é, o segundo termo entre parênteses na equação 2.25, é pequena comparada ao primeiro termo. Então, eles podem ser aproximados como os dois primeiros termos de uma expansão de:

$$E(z) = E_0 \exp[i(kz + \lambda L \sqrt{\alpha_s} N)] \quad (2.26)$$

Assim, a fase da onda incidente é alterada pela quantidade $\lambda L \sqrt{\alpha_s} N$ como consequência do espalhamento. Este valor deve ser igual à expressão da diferença de fase:

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} (n-1)L \quad (2.27)$$

Essa diferença ocorre quando a luz se propaga a partir de um meio livre para um meio com índice de refração n . Então:

$$\lambda L \sqrt{\alpha_s} N = \frac{2\pi}{\lambda} (n-1)L \quad (2.28)$$

$$n-1 = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sqrt{\alpha_s} N \quad (2.29)$$

Das equações 2.17 e 2.29, desprezando-se a dependência entre comprimento de onda e índice de refração, finalmente é possível obter a lei de Rayleigh do espalhamento:

$$I_a = \frac{1}{\lambda^4} \quad (2.30)$$

Se o ângulo de espalhamento θ for considerado, mais detalhada será a análise:

$$I_s(\theta) \sim \frac{1 + \cos^2(\theta)}{\lambda^4} \quad (2.31)$$

Se $\theta = 0$, o espalhamento é para frente, na mesma direção da onda incidente.

Nesta obtenção da lei de Rayleigh, a absorção foi desprezada. Assim, as equações 2.29 e 2.31 são válidas apenas para comprimentos de onda distantes de qualquer banda de absorção. Absorção e espalhamento serão considerados simultaneamente na seção 2.4.

Quando as partículas espalhadoras têm extensão comparável ao comprimento de onda incidente, o espalhamento Rayleigh não é aplicável e outro tipo de fenômeno é definido: o espalhamento Mie.

A teoria do espalhamento Mie é mais complexa e, portanto, serão apenas enfatizados dois aspectos importantes que o diferem do fenômeno Rayleigh. Primeiro, o espalhamento Mie mostra fraca dependência sobre o comprimento de onda ($\sim \lambda^{-x}$ com $0,4 \leq x \leq 0,5$) comparado ao Rayleigh ($\sim \lambda^{-4}$). Segundo, o espalhamento Mie apresenta preferência pela direção da onda incidente. Contudo, o espalhamento Rayleigh é proporcional a $1 + \cos^2(\theta)$, de acordo com a equação 2.31. Assim, as intensidades dos retroespalhamentos e daqueles com a mesma direção do feixe incidente, são iguais.

Nos tecidos biológicos, os fótons são preferivelmente espalhados na mesma direção do feixe incidente¹⁸. Este fenômeno não pode ser explicado pelo espalhamento Rayleigh. Além disso, a dependência do comprimento de onda é mais forte do que prediz o espalhamento Mie. Desta forma, nem Rayleigh nem Mie descrevem completamente o espalhamento nos tecidos. Portanto, é conveniente definir uma função probabilidade, $p(\theta)$, de um fóton a ser espalhado por um ângulo θ . Se a probabilidade não depender de θ , o espalhamento é dito isotrópico. Caso contrário, o espalhamento é chamado anisotrópico.

A medida da anisotropia do espalhamento é dada pelo coeficiente de anisotropia g , onde $g=1$ significa espalhamento na mesma direção da onda incidente, $g=-1$ significa retroespalhamento e $g=0$, espalhamento isotrópico. Em coordenadas polares, o coeficiente g é definido por:

$$g = \frac{\int_{4\pi} p(\theta) \cos \theta d\omega}{\int_{4\pi} p(\theta) d\omega} \quad (2.32)$$

$p(\theta)$: função probabilidade

$d\omega = \sin \theta d\theta d\phi$: elemento do ângulo sólido

Por definição, o coeficiente de anisotropia g representa o valor médio do cosseno do ângulo de espalhamento θ . Para a maioria dos tecidos biológicos, g pode assumir valores de 0,7 a 0,99. Portanto, os ângulos de espalhamento estão entre 8° e 45° . Em meios túrbidos, os coeficientes de anisotropia e espalhamento relacionam-se por um mesmo parâmetro, chamado coeficiente de espalhamento reduzido: $\alpha_s' = \alpha_s (1 - g)$.

O termo importante na equação 2.32 é a função probabilidade $p(\theta)$, também chamada função de fase e freqüentemente normalizada por:

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\theta) d\omega = 1 \quad (2.33)$$

Várias funções de fase são teoricamente propostas: Henyey-Greenstein, Rayleigh-Gans, δ -Eddington e Reynolds¹⁹. A função de Henyey-Greenstein é a que melhor concorda com as observações experimentais e é dada por:

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (2.34)$$

Quando representada pela forma abaixo, torna-se uma função conveniente para manuseio:

$$p(\theta) = \sum_{i=0}^{\infty} (2i+1)g^i P_i(\cos \theta) \quad (2.35)$$

P_i : polinômios de Legendre

2.4. Atenuação

Grande parte dos tecidos biológicos sofre, simultaneamente, absorção e espalhamento¹⁸. Por este motivo, são chamados meios túrbidos. O coeficiente de atenuação total destes tecidos é expresso por:

$$\alpha_t = \alpha_a + \alpha_s \quad (2.36)$$

Em meios túrbidos, o livre caminho médio óptico dos fótons incidentes é determinado por:

$$L_t = \frac{1}{\alpha_t} \quad (2.37)$$

Apenas em alguns casos pode-se desprezar a relação entre esses dois coeficientes, mas é importante considerar ambos os processos. Assim, torna-se conveniente definir um parâmetro adicional, o albedo óptico a :

$$a = \frac{\alpha_s}{\alpha_t} = \frac{\alpha_s}{\alpha_a + \alpha_s} \quad (2.38)$$

Se $a = 0$, a atenuação é exclusivamente consequência da absorção. Se $a = 1$, somente o espalhamento ocorre. Para $a = 1/2$, $\alpha_a = \alpha_s$. Geralmente absorção e espalhamento ocorrem em proporções variadas.

Quando meios túrbidos são analisados, outro parâmetro é utilizado, a profundidade óptica d :

$$d = \int_0^s \alpha_t ds' \quad (2.39)$$

ds' : representa um segmento do caminho óptico

s : comprimento total do caminho óptico

No caso de atenuação homogênea, isto é, coeficiente de atenuação constante, a equação 2.39 torna-se:

$$d = \alpha_t s \quad (2.40)$$

A vantagem em utilizar o albedo a e a profundidade óptica d , ao invés dos coeficientes de espalhamento e de absorção, é que tanto a , quanto d , são parâmetros adimensionais, e as informações contidas no par a e d , são as mesmas contidas no par α_a e α_s .

Ao considerar meios túrbidos, a normalização da função de fase, dada pela equação 2.33 deve ser alterada para:

$$\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} p(\theta) d\omega = a \quad (2.41)$$

Se a função probabilidade aproximar-se de zero, o espalhamento é desprezível. Então as equações 2.34 e 2.35 devem ser mudadas:

$$p(\theta) = a \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (2.42)$$

$$p(\theta) = a \sum_{i=0}^{\infty} (2i + 1) g^i P_i(\cos \theta) \quad (2.43)$$

O coeficiente de espalhamento reduzido, definido por $\alpha_s' = \alpha_s (1 - g)$ relaciona-se com o coeficiente de atenuação, segundo a literatura¹⁸, por: $\alpha_t' = \alpha_a + \alpha_s'$.

Neste trabalho, desenvolveu-se um aparato experimental para a medição do coeficiente de atenuação, durante o processo de cicatrização, em amostras de pele sadia e queimada.

3. PELE

A Fisiologia é o ramo da Biologia que estuda as funções orgânicas dos seres vivos, sendo didaticamente dividida em diversos sistemas, entre eles, o Sistema Tegumentar, responsável pela pele.

A pele é o tecido orgânico que cobre a superfície dos corpos de todos os vertebrados, formada por uma camada exterior, chamada epiderme, e outra interior, chamada derme (figura 3.1). Aves e mamíferos apresentam uma terceira camada, a hipoderme.

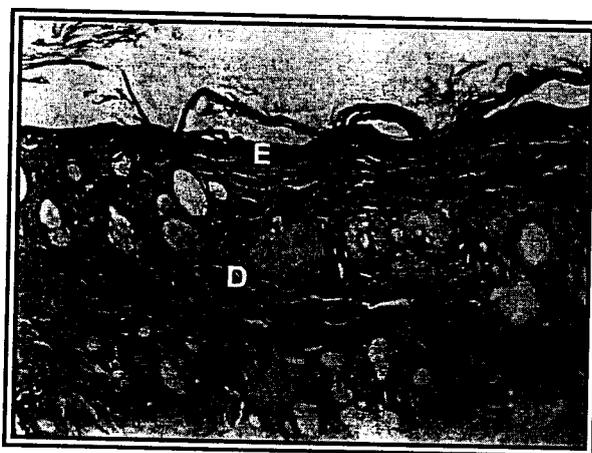


Figura 3.1: Fotomicrografia de pele sadia de rato. Observa-se uma epiderme delgada (E) revestindo uniformemente a superfície da pele. A derme subjacente (D) exibe grande quantidade de feixes de colágeno, poucas células do tecido conjuntivo e anexos da pele: glândulas sebáceas e folículos pilosos. HEX80.

A epiderme origina-se do ectoderma somático e é constituída por um tecido epitelial pluriestratificado pavimentoso. A camada celular mais profunda deste epitélio é denominada germinativa (camada de Malpighi), cujas células se acham em contínuas divisões mitóticas, produzindo células para a substituição das superficiais, que continuamente morrem e se desprendem do tecido. Nos vertebrados terrestres, as células mais superficiais são mortas devido a uma total impregnação pela proteína queratina, substância impermeável que, formando a chamada camada córnea, confere uma proteção ao animal principalmente contra a desidratação.

A derme situa-se logo abaixo da epiderme e é bem mais espessa que esta. Embriologicamente, tem origem mesodérmica e é constituída por tecido conjuntivo, contendo vasos linfáticos, vasos sangüíneos, nervos e porções basais de glândulas. Predominantemente, contém fibroblastos, os quais são responsáveis pela secreção de colágeno e elastina, oferecendo suporte e elasticidade à pele.

A hipoderme é uma camada localizada imediatamente abaixo da derme, constituída de tecido conjuntivo extremamente rico em tecido adiposo, aparecendo somente nas aves e mamíferos. Além do papel de reserva nutritiva (gordura), desempenha importante papel auxiliar na regulação da temperatura corpórea, devido ao fato da gordura funcionar como uma camada isolante, reduzindo, assim, a perda de calor para o meio (nos animais homeotérmicos).

A pele contém uma variedade de "acessórios", principalmente folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, os quais se originam embriologicamente na epiderme. As funções da pele nos vertebrados são muitas: proteção mecânica e contra microorganismos patogênicos; recepção de estímulos do meio externo; excreção de catabólitos (peixes e mamíferos); regulação da temperatura nos homeotermos (aves e mamíferos); regulação da concentração de sais nos líquidos corpóreos (mamíferos); acúmulo de substância de reserva, a gordura, nos homeotermos; nutrição de mamíferos jovens (glândulas mamárias); ataque e defesa; e identificação sexual (coloração).

Ratos são bastante utilizados em pesquisas sobre *laser* em cicatrização de lesões porque são baratos, reproduzem-se facilmente e em grande número, são de fácil manuseio e a cicatrização das feridas ocorre de duas a três semanas. Por isso a pele destes animais de experimentação foi utilizada neste trabalho.

3.1. Matriz extracelular

A matriz extracelular é todo conteúdo do tecido que está fora das células que o compõem. É formada por um conjunto heterogêneo de macromoléculas produzidas pelas próprias células dos tecidos. O tipo de macromolécula, bem como sua organização e quantidade relativa determinam as propriedades físicas e funcionais dos tecidos. A matriz pode constituir a maioria do tecido, como é o caso da pele, ossos e cartilagens ou a minoria, como ocorre no tecido nervoso. Atualmente sabe-se que a matriz não é uma componente passiva do tecido, pelo contrário, pode influenciar as suas células em vários fenômenos biológicos importantes, tais como migração, proliferação, desenvolvimento,

forma e função²⁰. Didaticamente, as macromoléculas da matriz extracelular são divididas em duas classes distintas: fibrilares e não fibrilares.

As componentes fibrilares podem ser divididas em dois subgrupos: estrutural e de adesão. Pertencem ao grupo das fibrilas estruturais o colágeno e a elastina. O primeiro confere resistência tênsil ao tecido e o segundo, elasticidade. Já as proteínas de adesão promovem a ligação das células aos diferentes elementos da matriz. São exemplos desse grupo de fibrilas de adesão a laminina, a qual une as células epiteliais à sua membrana basal, e a fibronectina, que liga e promove a adesão dos fibroblastos à matriz extracelular do tecido conjuntivo por intermédio das integrinas.

As componentes não fibrilares são representadas pelas glicosaminoglicanas e proteoglicanas. As primeiras são polissacarídeos de alto peso molecular e grande quantidade de cargas negativas. Além disso, são freqüentemente encontradas ligadas às proteínas e neste caso, passam a se chamar proteoglicanas. Tais moléculas promovem um meio hidratado, similar a um gel, permitindo livre difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a corrente sangüínea e as células. Também conferem resistência compressiva aos tecidos.

3.2. Colágeno

Os colágenos constituem uma família de glicoproteínas com pelo menos vinte tipos até agora conhecidos. Agregam-se em fibrilas e fibras cujos feixes são visíveis e distinguíveis à microscopia de luz graças a particularidades morfológicas e topográficas especiais.

O colágeno tipo I é o principal colágeno em tendões, dentina e pele de animais adultos. Porém nesta, os feixes formam uma rede tridimensional, entrecruzando-se formando uma malha.

A fibra do colágeno é constituída de unidades precursoras, tropocolágenos, agregadas e ligadas com alta ordem molecular, sendo possível afirmar tratar-se de um estado de agregação com elevado grau de cristalinidade, tendo a birrefringência como propriedade intrínseca. Este fato resulta da estrutura primária (composição e seqüência de aminoácidos) e dos tropocolágenos constituírem três cadeias polipeptídicas com uma estrutura em tripla hélice. Nas duas extremidades da tripla hélice (triplex) estendem-se porções das cadeias peptídicas que não estão formando triplex. Estas extensões não helicoidais são denominadas de telopeptídios C (de COOH) e N (de NH₂) terminais e sua

importância é revelada por uma remoção enzimática, responsável pela agregação lateral dos tropocolágenos. Cada uma das cadeias do tropocolágeno tem um total de mil aminoácidos com comprimento de 300 nm e largura de 1,4 nm. O que torna o colágeno com características físicoquímicas peculiares é a sua composição em aminoácidos, pois a cada três aminoácidos, o terceiro é sempre glicina, -X-Y-Glicina. Ainda como particularidade aparecem os aminoácidos prolina e hidroxiprolina, os quais chegam a 20% dos aminoácidos das cadeias do colágeno. Vale salientar que a lisina hidroxilada forma hidroxilisina, tendo importante papel para ligar galactose e dissacarídeo da lactose-glicose, servindo de ligação cruzada entre as moléculas de colágeno e proporcionando estabilidade²¹.

4. REPARAÇÃO TISSULAR

Várias situações podem traumatizar o organismo, entre elas, exposição a agentes químicos ou físicos e a organismos como bactérias, vírus e fungos. O trauma e a inflamação aguda, que é a primeira resposta do organismo à agressão, causam morte celular e destroem a matriz extracelular.

O processo de reparação tissular vai substituir por um novo tecido as células mortas e a matriz extracelular destruída. A reparação tissular envolve basicamente: a regeneração das células especializadas, através da proliferação das sobreviventes (quando possível), a formação do tecido de granulação e a reconstrução do tecido. Estas etapas se sobrepõem e se completam.

O resultado final do processo depende do tipo de tecido danificado e da extensão do trauma. Por exemplo, na epiderme, se o trauma é superficial, o tecido formado tem as mesmas características e desenvolve as mesmas funções que o tecido original. Isto é possível pois os queratinócitos se regeneram facilmente a partir de células fontes presentes na camada basal da epiderme. No caso do músculo esquelético, as células especializadas não podem se regenerar e são substituídas por tecido conjuntivo, o que causa o comprometimento das funções normais. No caso da epiderme diz-se que ocorreu regeneração e no caso do músculo que houve reparação com formação de cicatriz.

O resultado final do processo de reparação tissular depende não apenas da extensão e do tipo do trauma, mas também da capacidade das células sobreviventes de repovoar a área danificada. As células podem ser classificadas em três grupos de acordo com a capacidade de proliferar na vida adulta, e, conseqüentemente, de repovoar uma área danificada: lábeis, estáveis e permanentes. As células permanentes, que incluem neurônios e células musculares cardíacas, não têm capacidade de proliferar na vida adulta. As células lábeis proliferam-se continuamente durante toda a vida do indivíduo para substituir células que se perdem como conseqüência da exfoliação; neste caso incluem-se as células epiteliais da pele e do trato gastrointestinal. As células estáveis possuem a capacidade de proliferar na vida adulta, mas em condições normais a taxa de proliferação é muito reduzida; nesta categoria incluem-se células do tecido conjuntivo como fibroblastos e condrócitos, e células parenquimais como hepatócitos e células tubulares renais.

O processo de reparação tissular é freqüentemente estudado na pele. Tomando-se a derme como modelo, as etapas estudadas serão representativas das etapas do processo

de reparação na maior parte dos órgãos. Didaticamente, o processo de reparação pode ser dividido em três etapas que se sobrepõem: inflamação, formação do tecido de granulação e remodelagem.

A inflamação se inicia no momento em que o tecido é agredido. O rompimento de pequenos vasos sangüíneos causa o extravasamento de sangue e a conseqüente formação de um coágulo. Para que o coágulo se forme, ocorre a ativação das plaquetas, que além de formar trombo, liberam várias substâncias ativas no local da lesão. Essas substâncias e outras liberadas pelo tecido danificado vão funcionar como quimiotáticos para leucócitos e outros tipos celulares. Os primeiros leucócitos a chegarem no local da lesão são os neutrófilos, seguidos dos monócitos. Ambos os tipos celulares têm como função fagocitar e digerir microorganismos invasores e também restos de tecido e células mortas. Além disso, os macrófagos liberam uma grande quantidade de substâncias (enzimas, citoquinas, fatores de crescimento, substâncias vaso-ativas e fatores quimiotáticos) que atrairão outras células inflamatórias e iniciarão a formação do tecido de granulação.

A formação do tecido de granulação envolve o acúmulo de macrófagos, a proliferação de fibroblastos, a deposição de matriz extracelular e a angiogênese. Os fibroblastos, quando estimulados pelas substâncias liberadas por plaquetas e macrófagos, proliferam, migram, depositam matriz extracelular e causam a retração da ferida. A matriz extracelular sintetizada pelos fibroblastos serve como substrato para a migração de macrófagos, células angiogênicas e outros fibroblastos. A maior parte dos fibroblastos do tecido de granulação sofre modificações e passa a expressar o fenótipo de miofibroblasto. Essas células serão responsáveis pela posterior retração do tecido de granulação, o qual permite a aproximação das bordas da lesão, e pela síntese de matriz extracelular.

A última etapa do processo de reparo (remodelagem) é também a mais longa. Como as anteriores é contínua, inicia-se com a retirada de ácido hialurônico e fibronectina ainda durante a formação do tecido de granulação, seguida pela deposição de colágenos (principalmente tipo III, mas também tipos I e V) e outros componentes da matriz extracelular e posteriormente de quantidades crescentes de colágeno tipo I.

A reparação cutânea segue as fases já descritas: com a lesão ocorre o rompimento de vasos sangüíneos e o extravasamento de células sangüíneas, as quais liberarão substâncias quimiotáticas para as células inflamatórias e iniciarão a fase inflamatória propriamente dita, ao fim da qual ocorrerá a formação do tecido de granulação. No caso das lesões cutâneas uma característica importante desta fase é a

reepitelização da lesão através da proliferação de queratinócitos periféricos. A fase seguinte é a de remodelagem da cicatriz com redução da celularidade e rearranjo da matriz extracelular.

Uma lesão pode ainda ser classificada em incisional, onde as bordas da ferida se mantêm em contato, e excisional, onde as bordas se tornam afastadas em consequência da perda de parte dos tecidos da pele. A primeira classificação é denominada cicatrização por primeira intenção e a outra, por segunda intenção. Esta classificação é importante porque durante a cicatrização por segunda intenção, cada processo torna-se mais evidente.

Neste trabalho, o modelo de lesão foi a queimadura de terceiro grau, caracterizando uma cicatrização por segunda intenção.

5. LASER NA REPARAÇÃO CUTÂNEA

A terapia com *laser* em baixa intensidade é usada como terapia alternativa para acelerar feridas desde que Mester e colaboradores reportaram, em 1971, os efeitos benéficos dessa aplicação²². A maioria dos protocolos é desenvolvida empiricamente²³, resultando em doses que variam de poucos a muitos J/cm². O tratamento pode durar poucos minutos para doses baixas ou muito tempo para doses superiores a 30 J/cm², dependendo da potência média do *laser*. Os comprimentos de onda mais usados fazem parte da faixa visível e do infravermelho próximo do espectro eletromagnético.

Estudos investigam a eficiência da irradiação *laser* em uma variedade de condições patológicas em animais, humanos e células. Segundo esses estudos, dependendo da dose, do tempo de exposição, do comprimento de onda, das condições físico e morfológicas dos tecidos, os efeitos da irradiação podem ser estimuladores ou inibitórios²⁴. Clinicamente, a LILT tem sido reportada no tratamento de ulcerações venosas e crônicas, lesões de tecidos moles e na estimulação de cicatrização de feridas crônicas e agudas²⁵.

A bioestimulação *laser* em cicatrização de feridas ocorre durante a fase proliferativa, como consequência do aumento do processo metabólico celular²⁶. Além disso, a radiação *laser* pode estimular células cruciais envolvidas no início do processo de reparação, por isso seu efeito mais pronunciado durante o processo inflamatório^{27, 28, 29}. Quanto às outras fases do processo de reparação, relata-se que a síntese de colágeno pode ser estimulada pela irradiação *laser*³⁰.

5.1. Revisão bibliográfica

Os efeitos terapêuticos da bioestimulação *laser* foram estudados sobre a produção do colágeno no tendão de Aquiles de coelhos³¹. O *laser* utilizado foi de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm), com dose de 1 J/cm² aplicada transcutaneamente durante 14 dias após a tenotomia. O colágeno total nos tendões do grupo tratado foi significativamente maior comparado aos tendões do grupo controle e a solubilidade dos espécimes foi significativamente diferente entre os grupos: foi maior para as extrações com colágeno neutro solúvel em sal (NSC) e colágeno insolúvel (ISC) e menor para colágeno solúvel em pepsina (PSC) no grupo *laser*. Os autores discutiram que a pepsina rompe ligações peptídicas no terminal amino de aminoácidos aromáticos, como triptofano, tirosina e

fenilalanina. No colágeno tipo I, a pepsina atua primeiramente sobre o terminal amino da molécula, ao passo que o terminal carboxila do colágeno é quebrado mais tarde. Assim, o aumento da resistência do colágeno contra a atuação da pepsina fortemente sustenta os achados sobre a alta integridade mecânica dos tendões de Aquiles quando tratados com a terapia *laser* em baixa intensidade. E o colágeno neutro solúvel em sal constituiu-se tanto do colágeno recém sintetizado quanto do produto de degradação do colágeno insolúvel, sugerindo que a razão de modificação do colágeno foi maior no grupo *laser*, ou seja, ocorreu mais rápida síntese de colágeno neste grupo. O mecanismo pelo qual o *laser* facilita a produção de colágeno não está claro. É possível que alterações na regulação gênica ou na modulação de enzimas do metabolismo do colágeno estejam envolvidas.

Um dos primeiros trabalhos sobre cicatrização de úlcera crônica venosa que irradiou as bordas da ferida e não o centro da mesma, foi realizado por Lagan¹¹ e colaboradores. Nesse estudo foi utilizado o *laser* de AsGaAl, $\lambda = 830$ nm, $I = 300$ mW/cm² e $D = 9$ J/cm². Foi constatada retração da área ferida. Nas duas primeiras semanas houve diminuição da dor e até o final do estudo, os níveis de dor flutuaram, chegando a um alívio de 15% no último dia.

Vinte e oito pacientes com feridas diabéticas e isquêmicas nos pés foram tratados com terapia *laser* em baixa intensidade durante 20 sessões. Vinte pontos ao longo das pernas e pés foram irradiados. Todos os pacientes receberam tratamento convencional, além da LILT. Após três meses, o grupo irradiado apresentou melhoras em relação ao grupo que recebeu apenas tratamento convencional³².

Lagan³³ e co-autores também pesquisaram o efeito do *laser* ($\lambda = 830$ nm) em feridas pós cirúrgicas, com $D = 9$ J/cm² e $I = 300$ mW/cm². Os pacientes foram irradiados uma vez por semana até o fechamento da ferida. Os achados não indicaram diferença estatisticamente significante entre os grupos *laser* e controle quanto ao fechamento da ferida e à dor. Foi sugerido que os parâmetros *laser* não foram os mais adequados.

Um estudo placebo foi realizado para investigar a eficiência da terapia *laser* no tratamento de úlceras crônicas venosas quando também tratadas por métodos convencionais. Quinze pacientes com úlceras na perna foram irradiados uma vez por semana, durante quatro semanas, sendo acompanhados até a 8^a ou 12^a semana para verificação da ferida e da dor. Um *laser* de diodo, de comprimento de onda variável entre 600 e 950 nm, foi utilizado com dose 12 J/cm², 523 mW e 5 KHz. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significante entre os grupos tratado e placebo, houve aparente diferença clínica entre o tempo de cicatrização; após irradiação, uma redução

contínua no tamanho das lesões foi evidente no grupo tratado. Quanto à dor, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os autores³⁴ concluíram que o *laser* associado à terapia convencional não promove efeito benéfico evidente.

Ainda sobre terapia alternativa de úlceras, o trabalho de Lucas³⁵ e colaboradores reportou os efeitos da LILT em dezesseis pacientes com úlcera decubitus. Todos eles receberam tratamento padrão, mas somente um grupo, com oito integrantes, recebeu um tratamento adicional a *laser*. A irradiação ocorreu durante seis semanas, ou até o fechamento completo da lesão, cinco vezes por semana. Um *laser* de diodo foi usado com $\lambda = 904$ nm, $f = 830$ Hz, $D = 1$ J/cm², $P_m = 8$ mW e tempo de exposição 125 segundos. A área exposta tinha 30 cm². Não houve diferença estatística entre os grupos *laser* e controle quanto à diminuição da área da lesão. Os autores concluíram que a terapia *laser* em baixa intensidade combinada com tratamento convencional desfavorece o aparecimento do efeito benéfico em relação ao grupo controle.

Para obter evidências sobre o efeito da LILT na cicatrização de feridas, o estudo de Simunovic³⁶ e colaboradores foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, 68 coelhos foram preparados cirurgicamente e duas incisões de 1,5 cm de comprimento foram feitas sobre a pele, na região lombar. O grupo #1 foi controle e os outros dois grupos foram irradiados. O *laser* foi aplicado segundo a técnica de varredura, com dois comprimentos de onda possíveis: AsGa ($\lambda = 904$ nm), $f = 4672$ Hz ou He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm), com dose máxima de 4 J/cm². Não houve diferença entre as duas feridas provocadas no animal; a espessura da epiderme foi maior no grupo exposto com He-Ne; a área da ferida diminuiu nos grupos irradiados e estes apresentaram maior conteúdo de linfócito em relação ao controle. O efeito sistêmico observado em relação à área da ferida foi discutido como consequência do aumento da microcirculação local, o qual faz circular fatores que regulam o tamanho da ferida do lado oposto ao tratado. Na segunda etapa, os 74 pacientes selecionados haviam sofrido injúrias no tecido mole provocadas por movimento brusco ou por sobrecarga devido atividade esportiva. A irradiação ocorreu 48 horas depois da cirurgia, durante 18 dias consecutivos, em contato com a pele, nos pontos de gatilho de dor com o *laser* de AsGaAl ($\lambda = 830$ nm), diâmetro do feixe 5 mm e dose máxima de 10 J/cm². Além disso, um *laser* de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm), com diâmetro do feixe de 2 mm foi acoplado a um *laser* de diodo pulsado, ($\lambda = 904$ nm), $f = 5000$ Hz e dose máxima de 4 J/cm² para ser utilizado durante a técnica de varredura em toda a área lesada, ou em conjunto com o AsGaAl. Os grupos tratados com *laser* tiveram movimentos passivos e ativos cerca

de 35% mais cedo do que os respectivos controles. As vantagens da LILT significativamente aceleraram a cicatrização da ferida e aliviaram a dor, com subsequente restabelecimento da habilidade funcional.

A fim de determinar o efeito da LILT sobre a secreção de fatores de crescimento do endotélio vascular e sobre a proliferação de células endoteliais humanas, culturas de células foram irradiadas com *laser* de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) em doses de 0,10 a 6,3 J/cm². O estudo mostrou que a irradiação *laser* aumenta a produção de fatores de crescimento do endotélio vascular, de fibroblastos e de miócitos cardíacos e estimula o crescimento de células endoteliais em cultura. Segundo os autores³⁷, esses achados podem estabelecer novos métodos para reparação vascular pós-angioplastia.

O objetivo do estudo seguinte foi avaliar clinicamente os efeitos da radiação *laser* de AsGa ($\lambda = 904$ nm), em enxertos autólogos de pele, em malha, com espessura completa, na reparação de feridas carpometacarpianas de cães³⁸. Vinte cães foram separados em dois grupos, nos quais foi criada uma ferida de 7,5 cm² na região carpometacarpiana. Nos animais do grupo I a transposição realizou-se em leito receptor fresco e nos animais do grupo II a enxertia foi em leito receptor contendo tecido de granulação. A região doadora foi a parede costolateral. O tratamento *laser* foi realizado logo após procedimento operatório, com P= 45 mW e D= 4 J/cm² aplicada pontualmente, durante dez dias. Somente o lado esquerdo foi irradiado, sendo o lado direito, controle. Os resultados indicaram diferença significativa em favor dos enxertos tratados com *laser* quando comparados aos enxertos controle, considerando as variáveis exsudação, coloração e edema. Foi concluído que enxertos irradiados exibem uma aderência mais avançada no estágio inicial da enxertia.

Nesse estudo, o propósito foi verificar o efeito da irradiação *laser*, $\lambda = 635$ nm ou $\lambda = 670$ nm sobre células H.Ep2, *in vitro*. Vinte e quatro horas após transplantação das culturas, as células foram irradiadas com 5 mW e doses entre 0,04 e 4,8 x 10⁴ J/m². Para $\lambda = 670$ nm, diferenças significantes na proliferação foram observadas comparando-se com o grupo controle. Embora os resultados não tenham sido significantes para $\lambda = 635$ nm, as células irradiadas também proliferaram mais do que as não irradiadas. Concluiu-se que a irradiação com $\lambda = 670$ nm pode aumentar significativamente a proliferação de células cancerígenas da laringe, no referido intervalo de dose³⁹.

Duas incisões foram criadas no dorso de ratos diabéticos e irradiadas com um *laser* de diodo, $\lambda = 830$ nm, I= 79 mW/cm² e D= 5 J/cm². A terapia ocorreu diariamente,

sendo um grupo irradiado do dia 0 a 4 e outro do dia 3 a 7, pós-criação das incisões. Houve também um grupo não irradiado. Um grupo foi sacrificado no dia 11 e o outro no dia 23 pós-injúria, sendo as feridas submetidas a medidas de força de tensão. Concluiu-se que o *laser* foi eficiente nos dois grupos irradiados, comparando-se com o grupo controle. No entanto, o tratamento de 3 a 7 foi melhor do que o tratamento de 0 a 4. Uma possível explicação é o *laser* ter efeito na síntese do colágeno, a qual ocorre após o quarto dia de injúria²⁸.

Lapina⁴⁰ e colaboradores investigaram o efeito da terapia *laser* em baixa intensidade sobre a cicatrização de feridas de pele em animais do campo. A irradiação foi aplicada em porcos após herniotomia ou castração e em vacas com feridas nas mamas. A recuperação foi observada acompanhando-se por exames sangüíneos, tamanho de edema e estado geral dos animais. Nos porcos foi utilizado um *laser* de diodo, $\lambda = 870$ nm, $P = 0,1$ W e tempo de irradiação entre 2 e 4 minutos durante 4 dias. Nas vacas utilizou-se um *laser* de He-Ne, $\lambda = 630$ nm, $P = 20$ mW e tempo de exposição 10 minutos, durante 8 dias. Cada grupo tratado teve seu respectivo controle não irradiado. A dinâmica positiva dos componentes do sangue nos animais tratados foi maior do que nos animais controle. A extensão da lesão também foi menor nos grupos irradiados. Os resultados demonstraram a ação anti-inflamatória da radiação *laser*.

O efeito da bioestimulação *laser* de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm), em combinação com PolygenTM (PG), uma proteína animal, a qual contém fatores e hormônios de crescimento, foi pesquisado sobre células de ovário de hamster (CHO), pois estudos mostram que esse *laser* em conjunto com fatores e hormônios de crescimento, faz aumentar a proliferação celular. O *laser* foi aplicado com intensidade de $1,25$ mW/cm² e doses de 60 a 600 mJ/cm², entregues durante três dias consecutivos. Houve aumento significativo para o grupo irradiado contendo 6 μ g/ml de PG, quando comparado ao grupo que só recebeu *laser*. Isto sugere que o *laser* de He-Ne ou PG, pode estimular a proliferação celular de CHO e, quando utilizados simultaneamente, o estímulo pode ser ainda maior³.

Três intensidades foram testadas nesse estudo sobre cicatrização de pele de rato não albino. Na primeira etapa, 36 animais foram randomicamente colocados em três grupos. Em todos os grupos, feridas com radiação ionizante foram criadas no dorso, medindo 7x7 mm. Nos grupos 2 e 3, os ratos foram tratados com *laser*, $\lambda = 660$ nm, $D = 0,5$ e $1,5$ J/cm², respectivamente, três vezes por semana. O grupo 1 foi controle. Na segunda

etapa, dois grupos experimentais foram incluídos, sendo o protocolo idêntico à primeira etapa, com exceção da dose do grupo 2, o qual foi tratado com 4 J/cm^2 . O grupo 1 dessa etapa também não foi irradiado. Os resultados demonstraram que o tratamento com 0,5; 1,5 e 4 J/cm^2 não tiveram efeito benéfico significativo sobre o fechamento da lesão⁴¹.

O objetivo desse estudo⁷ foi determinar se os efeitos da aplicação de um *laser* pulsado ($\lambda = 904 \text{ nm}$), $P_{\text{média}} = 35 \text{ mW}$, $D = 1,5 \times 10^3 \text{ J/m}^2$ e $f = 3 \text{ MHz}$, sobre queimaduras na pele de ratos induz mudanças significantes na dinâmica da água, medidas por intermédio da ressonância magnética nuclear (RMN). Sete grupos, GI a GVII, cada um contendo 4 ratos, foram estudados. Os animais dos grupos GI a GVI foram queimados. Os grupos GI, GIII, GV não foram irradiados. Os grupos GII, GIV e GVI foram irradiados após 0 hora; 0 e 24 horas; 0, 24 e 48 horas, respectivamente, pós injúria. Os animais GVII serviram como controle e não foram queimados nem irradiados. Todas as amostras foram monitoradas por RMN. Não foram verificadas diferenças significantes entre 0 e 24 horas nos grupos irradiados, não irradiados ou não queimados. Mas 48 horas após queimadura foi encontrada diferença estatística nos espécimes irradiados comparados aos controles. A dinâmica da água diminuiu significativamente no grupo irradiado 48 horas depois.

A produção de fatores angiogênicos por T-linfócitos foi investigada nesse trabalho, *in vitro*. Células-T humanas foram isoladas do sangue e preparadas em suspensão, com ou sem adição de mitógeno. As suspensões celulares foram irradiadas com *laser* ($\lambda = 820 \text{ nm}$), $f = 5000 \text{ Hz}$, $P_{\text{média}} = 50 \text{ mW}$ e doses de 1,2; 3,6; 6 e $8,4 \text{ J/cm}^2$. Depois de 3 ou 5 dias de incubação, linfócitos supernadantes foram coletados e adicionados em meio de cultura contendo células endoteliais (CE). O efeito da proliferação dessas células endoteliais foi acompanhado por 72 horas. A proliferação das CE aumentou significativamente quando encubadas com o meio exposto a doses de 1,2 e $3,6 \text{ J/cm}^2$. O efeito foi influenciado pela dose de energia utilizada, pela exposição das células-T em ambos mitógeno e *laser* e pela duração da incubação das células-T em cultura⁴².

Uma revisão sobre os efeitos da terapia *laser* em baixa intensidade sobre a cicatrização de feridas em humanos foi realizada por Lucas²⁵ e colaboradores. Foi concluído que não há argumento científico para a aplicação rotineira do *laser* de diodo, $\lambda = 904 \text{ nm}$, sobre a cicatrização de feridas em pacientes com úlceras *decubitus*, úlceras venosas de perna e outras feridas crônicas.

Schindl e co-autores também realizaram uma revisão sobre a terapia *laser* em baixa intensidade, no entanto concluíram que esse tipo de terapia pode ser benéfica em

determinadas indicações e com determinados parâmetros, principalmente se os dados preliminares dos estudos forem confirmados com pesquisas mais controladas⁴³.

Essa revisão bibliográfica deixou claro que a LILT é controversa e que necessita de estudos para que seja otimizada.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Organização do colágeno

Quatro ratos machos e adultos da raça Wistar com aproximadamente 300 g de massa corpórea, obtidos no biotério do IPEN, foram tricotomizados dorsalmente e submetidos à anestesia com éter etílico. Estando anestesiados, foram criadas três queimaduras com N_2 líquido na parte inferior do dorso do rato (figura 6.1), seguindo o método de padronização estabelecido anteriormente⁴⁴.

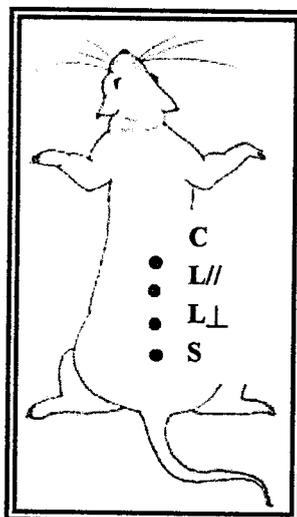


Figura 6.1: Rato com marcação das quatro amostras a serem analisadas. Amostras C (controle); L// (irradiada com polarização alinhada paralelamente à coluna vertebral); L⊥ (irradiada com polarização alinhada perpendicularmente à coluna) e S (sadia).

Com um suporte metálico e cilíndrico, “dedo frio”, foi aplicado N_2 líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) por cinco segundos, duas vezes consecutivas, com intervalo de tempo de cinco minutos entre elas. A aplicação foi repetida por três dias consecutivos, sendo a primeira irradiação com *laser* feita após a última aplicação de N_2 líquido. A área da lesão foi determinada pela área do suporte cilíndrico em contato com a pele do animal, sendo circular com diâmetro $\phi = 0,6\text{ cm}$.

Um *laser* de He-Ne com potência de saída igual a 10 mW, modelo 1300 (UNIPHASE, EUA), $\lambda = 632,8\text{ nm}$ e diâmetro do feixe de 2 mm, foi acoplado a um sistema óptico. O sistema óptico (figura 6.2) foi composto por um polarizador Glan-Thompson modelo 10GT04AR.16 (NEWPORT, EUA), de razão de extinção $<1 \times 10^{-5}$, com

transmissão de aproximadamente 36%, um disco graduado, de modo que o polarizador pudesse ser rotado 90° , uma lente convergente de distância focal $f = 7$ cm, um filtro de densidade neutra aproximadamente igual a 0,04 para $\lambda = 632,8$ nm e uma objetiva modelo SMC 6166358 (PENTAX, Japão) composta de duas lentes, de distância focal $f = 5$ cm e razão 2:1, de modo a obter-se um feixe expandido de 6 mm de diâmetro. A nova potência de saída após o sistema de lentes da objetiva, $P \approx 1,8$ mW, foi medida por intermédio de um detector modelo LM-1 (COHERENT, EUA), devidamente calibrado.

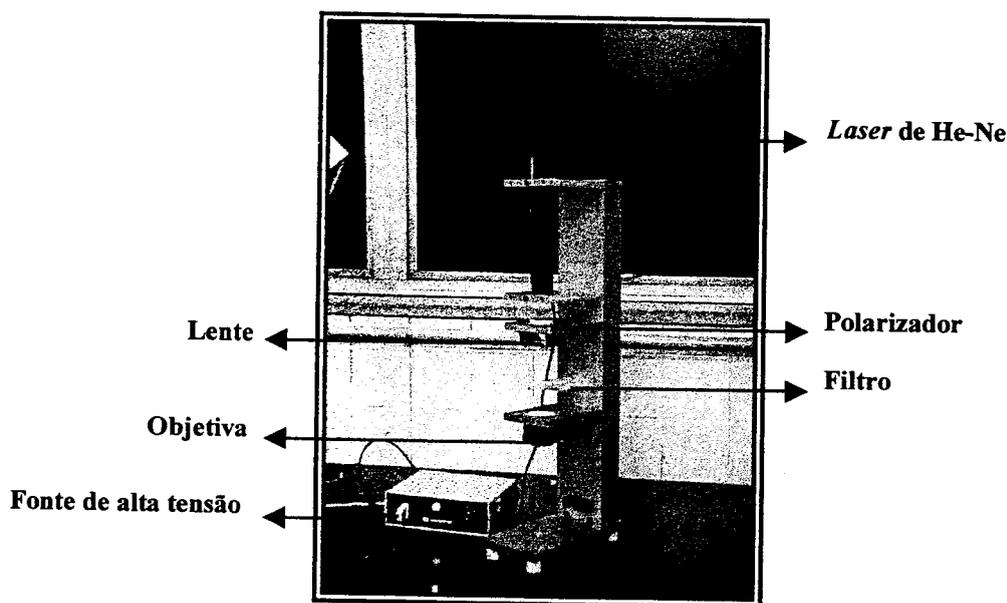


Figura 6.2: Montagem experimental utilizada na irradiação dos animais.

Deste modo, o *laser* foi operado com feixe linearmente polarizado, intensidade 6 mW/cm^2 , tempo de exposição 3 minutos e dose 1 J/cm^2 .

A primeira lesão foi mantida como controle e, portanto, não recebeu irradiação, sendo denominada *C* (controle). A segunda lesão, denominada *L//*, foi irradiada com a polarização do *laser* alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal. A terceira lesão, denominada *L \perp* , foi irradiada com a polarização do *laser* alinhada perpendicularmente à coluna do rato. Uma área sadia e não irradiada, denominada *S*, também foi analisada.

Os animais foram irradiados nos dias 3, 7, 10 e 14. No dia 17 foram sacrificados para obtenção dos cortes histológicos. Após sacrifício, as peles a serem analisadas foram removidas e fixadas em Bouin durante seis horas. As amostras foram então desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol, infiltradas em paraplast e cortadas na espessura de $5 \mu\text{m}$. Todo o procedimento para obtenção dos

cortes histológicos ocorreu no Laboratório de Biologia da Reprodução de Mamíferos, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com a colaboração da Profa. Telma Maria Tenório Zorn. Para que fossem analisadas ao microscópio de polarização, as lâminas assim obtidas foram então desparafinizadas de acordo com a seguinte seqüência: xilol 1, xilol 2, álcool e xilol (1:1), metanol e clorofórmio (1:1), por vinte minutos cada solução, álcool absoluto 70%, 80% e 90%, por dez minutos cada concentração e quatro lavagens com água destilada.

As lâminas dos quatro animais utilizados foram previamente observadas ao microscópio de luz convencional, para análise da qualidade do corte histológico. Em razão dos artefatos de técnica e de fragmentações sofridos pelos cortes, somente um animal foi estudado.

Doze lâminas, do mesmo animal, foram analisadas ao microscópio de polarização: três lâminas para cada amostra *C*, *L//*, *L⊥* e *S*. Cada uma destas lâminas continha dois cortes, portanto, vinte e quatro cortes foram estudados. Em cada corte foram realizadas seis medidas, correspondentes a: centro#1, centro#2, borda#1, borda#2, extremidade#1 e extremidade#2, em relação à lesão, de acordo com a figura 6.3. Desta forma, um total de cento e quarenta e quatro medidas foram realizadas. Na pele sadia não havia lesão, porém o mesmo número de medidas foi realizado ao longo do corte histológico.

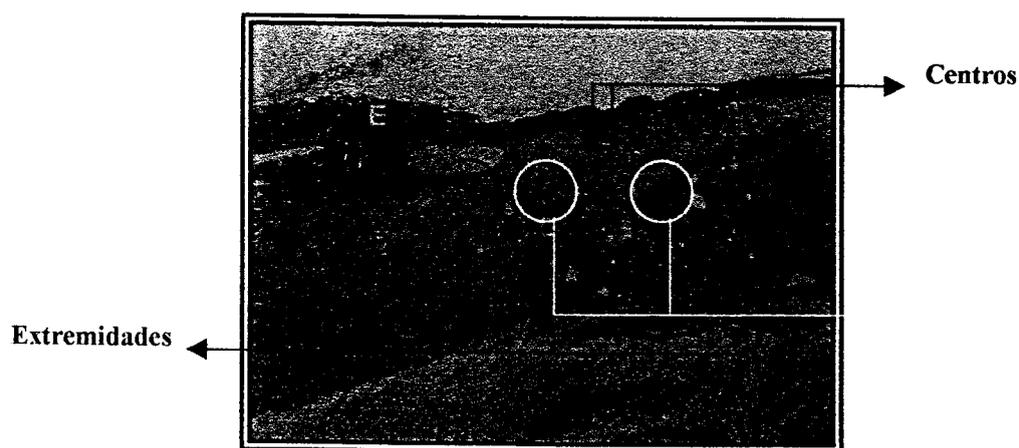


Figura 6.3: Campos analisados ao microscópio de polarização: centros, bordas e extremidades da lesão.

Foi utilizado o microscópio de polarização Zeiss equipado com analisador rotatório e objetiva neofluar, de aumento 160x, livre de tensão interna e com anéis de

ajuste de foco. Esse equipamento foi manipulado no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas, com a colaboração do Prof. Benedicto de Campos Vidal. As medidas ocorreram com o compensador para $\lambda = 550$ nm, cuja resolução foi $\lambda/11,65$, segundo Brace-Koehler. As amostras foram embebidas em água destilada para que a birrefringência intrínseca e a birrefringência de forma fossem consideradas, conforme procedimento padrão do laboratório.

O retardo óptico (R.O.) está diretamente relacionado com a birrefringência do colágeno: quanto maior o retardo óptico, maior a birrefringência dessa proteína e maior sua organização no tecido conjuntivo. O retardo óptico (nm) foi calculado a partir da equação:

$$\text{R.O.} = -47,20 \text{ sen}(2\theta) \quad (6.1)$$

$$\theta = 45^\circ - \beta$$

β : ângulo medido ao microscópio de polarização

-47,20: retardo do compensador (nm)

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste t-Student com nível de significância igual a 1%.

6.2. Coeficiente de atenuação relativo

Cinco ratos machos e adultos da raça Wistar com aproximadamente 300 g de massa corpórea, obtidos no Biotério do IPEN, foram tricotomizados dorsalmente e submetidos à anestesia com Francotar e Rompum (1:1) em doses intraperitoneais de 0,1 ml/100 g. A criação das lesões e as condições de irradiação seguiram a mesma metodologia descrita no item anterior.

A primeira lesão, denominada *L//*, foi irradiada com a polarização do *laser* alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal. A segunda lesão foi mantida como controle e, portanto, não recebeu irradiação, sendo denominada *C*. Uma área sadia e não irradiada, denominada *S*, também foi analisada.

Os animais foram irradiados nos dias 3, 7, 10 e 14. No dia seguinte aos dias 3, 7, 10, 14 e 31 os animais foram sacrificados para obtenção das amostras de pele e para que

o coeficiente de atenuação relativo fosse acompanhado até o final do processo de cicatrização.

Foram extraídas cuidadosamente a pele queimada e irradiada (L//), bem como a pele queimada e não irradiada (C), e a pele sadia (S). Cada um destes fragmentos foi colocado entre duas lâminas de microscópio e um *laser* de He-Ne, potência de saída igual a 15 mW, modelo 1135 (UNIPHASE, EUA), $\lambda = 632,8$ nm e diâmetro do feixe de 0,1 mm, irradiou a lâmina em contato com a epiderme (figura 6.4).

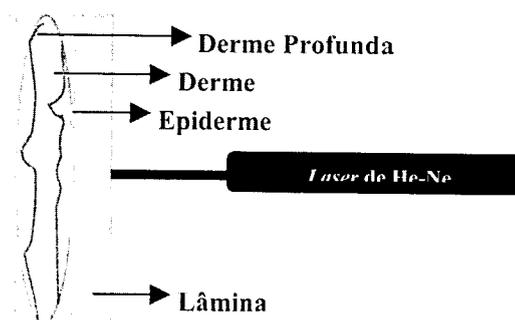


Figura 6.4: Esquema de medição do coeficiente de atenuação.

Uma câmera CCD (*charge-couple device*) Sony, modelo MVC-FD73 Digital Mavica, localizada perpendicularmente ao caminho do feixe fotografou toda a imagem formada pela luz espalhada na pele. Para aumentar a magnificação da câmera, duas lentes foram colocadas entre sua objetiva e as lâminas, resultando em um aumento de 10x. A imagem foi registrada como um arquivo no formato bitmap, com 8 bit em escala de cinza.

A figura abaixo mostra o arranjo experimental desenvolvido.

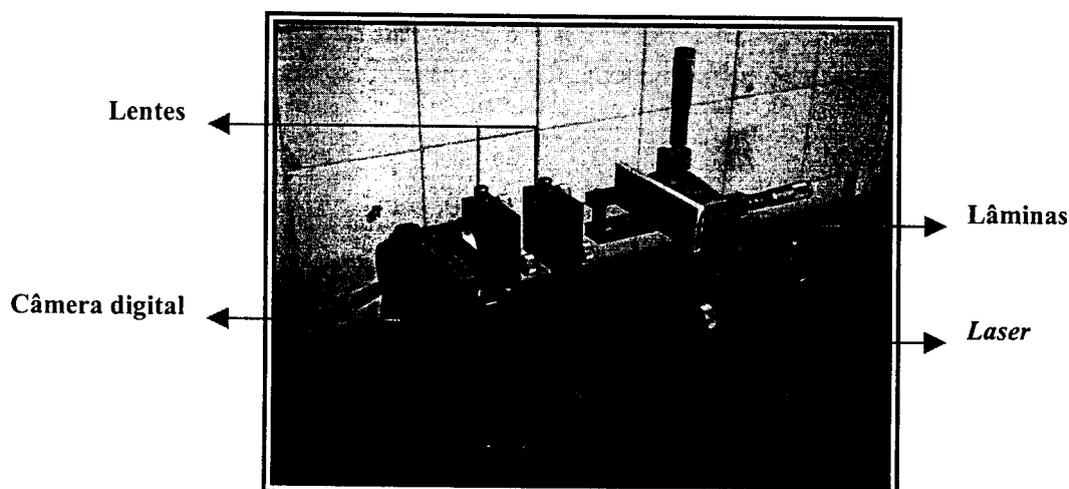


Figura 6.5: Arranjo experimental desenvolvido para execução das medidas da variação espacial de intensidade e distribuição de luz.

Uma imagem monocromática é uma função de intensidade de luz bidimensional $f(x, y)$, onde x e y denotam coordenadas espaciais e o valor de f no ponto (x, y) é proporcional ao brilho (ou nível de cinza) da imagem neste ponto. Para gerar uma imagem digital, $f(x, y)$ deve ser digitalizada ao longo de x e y . Assim é feita uma amostragem de $f(x, y)$ nas direções x e y , gerando uma matriz de $N \times M$ informações, seguida de uma quantização do valor de $f(x, y)$ em L níveis inteiros de cinza. Nesta matriz, cada elemento $p(x, y)$, $x = 0, 1, \dots, M-1$ e $y = 0, 1, \dots, N-1$, é chamado pixel (pixel é uma abreviação de *picture elements*). Diz-se, então, que a imagem tem dimensão M pixels na horizontal (eixo x) e N pixels na vertical (eixo y). O conceito de dimensão de um pixel ao longo do eixo x , ou do eixo y , está relacionado com o espaço físico entre as informações. Cada pixel tem associado um valor $L_{\min} \leq p(x, y) \leq L_{\max}$, onde $L = L_{\max} - L_{\min} + 1$. Neste experimento, $L_{\min} = 0$ e $L_{\max} = 255$, pois a profundidade da imagem utilizada foi 8 bits por pixel⁴⁵. Desse modo, cada pixel pôde assumir valores de intensidade entre 0 e 255.

Como a câmera captura a luz espalhada e esta é proporcional à intensidade de luz local, o modelo de luz observado pela câmera corresponde a um modelo bidimensional de intensidade de luz. Ao longo da direção de propagação do *laser* foi possível extrair a variação da intensidade como função da distância. A variação de $I(z)$, $z = p(x, y)$, foi dada em formato ASCII pelo software de domínio público *ImageJ*, desenvolvido pelo *National Institutes of Health, USA*⁴⁶. A partir desta função, analisou-se o logaritmo de I/I_0 versus a distância. I_0 foi a intensidade máxima do *laser* medida ao atingir o primeiro pixel do tecido biológico. O decaimento foi exponencial, segundo a equação $I(z) = I_0 e^{-\alpha z}$, onde α (mm^{-1}) foi chamado coeficiente de atenuação.

As medidas foram realizadas, em média, uma hora e meia após o sacrifício dos animais, ficando as amostras imersas em solução salina durante esse período. Nas lâminas foi depositado filme fino anti-refletor no comprimento de onda 632,8 nm. A direção de propagação inicial do *laser* foi escolhida para análise.

Dez medidas, com $z=1$ mm, foram realizadas em cada amostra de pele, de acordo com figura 6.6.

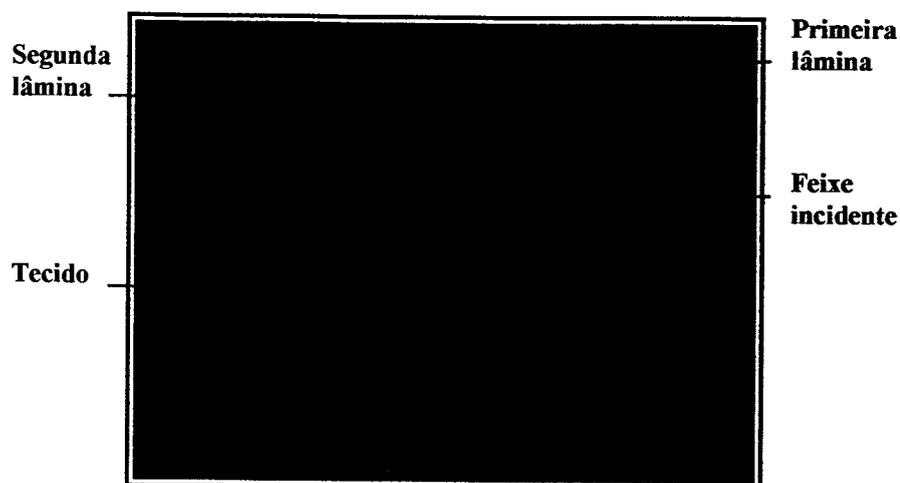


Figura 6.6.: Imagem obtida com a câmera digital: esquema das dez medidas realizadas em cada amostra L//, C e S.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o teste t-Student com nível de significância igual a 1%.

A pesquisa desta dissertação foi realizada de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao International Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), seguindo-se três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

7. RESULTADOS

7.1. Organização do colágeno

Nas tabelas 7.1, 7.3 e 7.5, apresentam-se os valores médios do retardo óptico (nm) dos cortes histológicos, em virtude dos campos analisados, centros, bordas e extremidades. Nas tabelas 7.2, 7.4 e 7.6, são apresentadas as comparações entre os grupos estudados, baseadas no teste estatístico t-Student com nível de significância de 1%. As lâminas sadias não têm lesão, mas foram incluídas nas tabelas para efeito didático e para facilitar as comparações.

Tabela 7.1: Valores da média do retardo óptico (R.O.), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no centro da lesão.

Centro da Lesão			
Lâminas	Média do R.O. (nm)	Desvio Padrão	Espaço Amostral
C	9,78	1,79	12
L//	12,51	1,97	12
L⊥	8,59	1,02	12
S	13,16	1,65	12

Tabela 7.2: Comparações entre os retardos ópticos dos grupos, quando estudados no centro da lesão, por intermédio do teste estatístico t-Student. As diferenças significantes ($p < 0,01$) estão sombreadas.

Teste t-Student para o Centro da Lesão			
	L//	L⊥	S
C	0,00176	0,05752	0,00008
L//		0,000003	0,39007
L⊥			0,00000004

Quando o retardo óptico é medido no centro da lesão, não há diferença estatística entre o grupo controle e grupo irradiado com polarização perpendicular à coluna do animal. Também não há diferença estatística entre o grupo irradiado com polarização paralela à coluna e o grupo sadio. A figura 7.1 resume os valores obtidos para o centro da lesão.

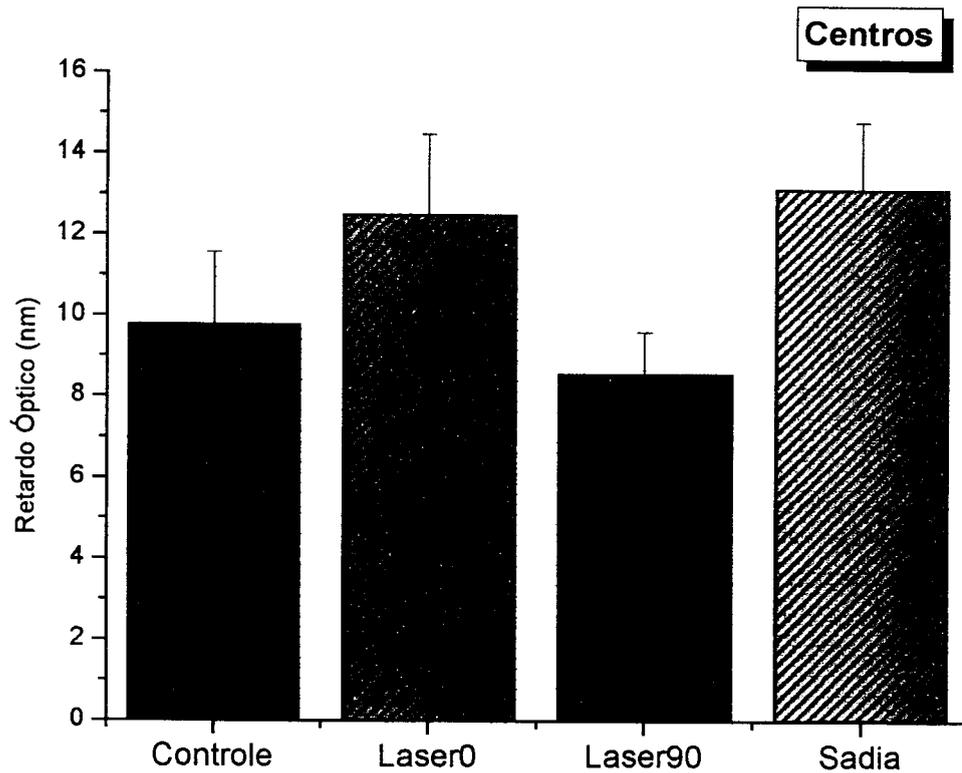


Figura 7.1: Retardo óptico medido no centro da lesão. Laser0= $L//$; Laser90= $L\perp$.

Tabela 7.3: Valores da média do retardo óptico (R.O.), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas nas bordas da lesão.

Bordas da Lesão			
Lâminas	Média	Desvio Padrão	Espaço Amostral
C	10,91	2,81	12
L//	14,59	2,73	12
L⊥	13,61	2,29	12
S	15,5	3,03	12

Tabela 7.4: Comparações entre os retardos ópticos dos grupos, quando estudados nas bordas da lesão, por intermédio do teste estatístico t-Student. As diferenças significantes ($p < 0,01$) estão sombreadas.

Teste t-Student para as Bordas da Lesão			
	L//	L⊥	S
C	0,00364	0,01689	0,0009
L//		0,35394	0,44683
L⊥			0,09948

Quando o retardo óptico é medido nas bordas da lesão, há somente diferença significativa entre os grupos controle e grupo irradiado com polarização paralela à coluna vertebral do animal, e entre os grupos controle e sadio. A figura 7.2 resume os valores obtidos para as bordas da lesão.

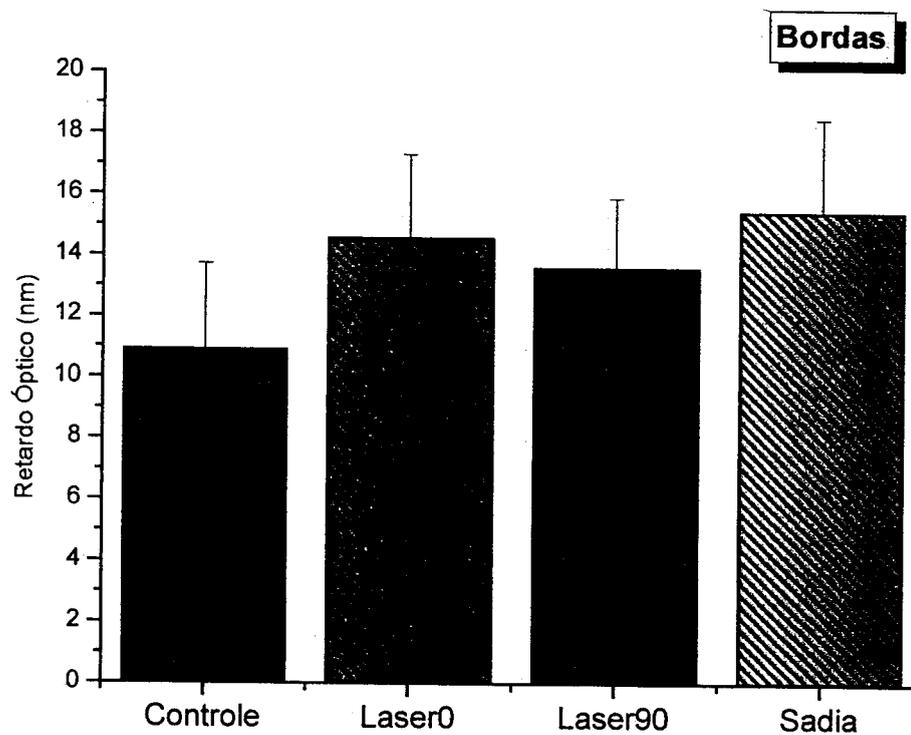


Figura 7.2: Retardo óptico medido nas bordas da lesão. Laser0= L//; Laser90= L⊥.

Tabela 7.5: Valores da média do retardo óptico (R.O.), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas nas extremidades da lesão.

Extremidades da Lesão			
Lâminas	Média	Desvio Padrão	Espaço Amostral
C	13,93	3,50	12
L//	15,18	2,44	12
L⊥	16,90	2,15	12
S	15,16	2,89	12

Tabela 7.6: Comparações entre os retardos ópticos dos grupos, quando estudados nas extremidades da lesão, por intermédio do teste estatístico t-Student. Não há diferenças significantes ($p < 0,01$).

Teste t-Student para as Extremidades da Lesão			
	L//	L⊥	S
C	0,32246	0,02035	0,36079
L//		0,08116	0,9833
L⊥			0,1087

Medindo-se o retardo óptico nas extremidades da lesão, os grupos não apresentam diferenças significantes entre si.

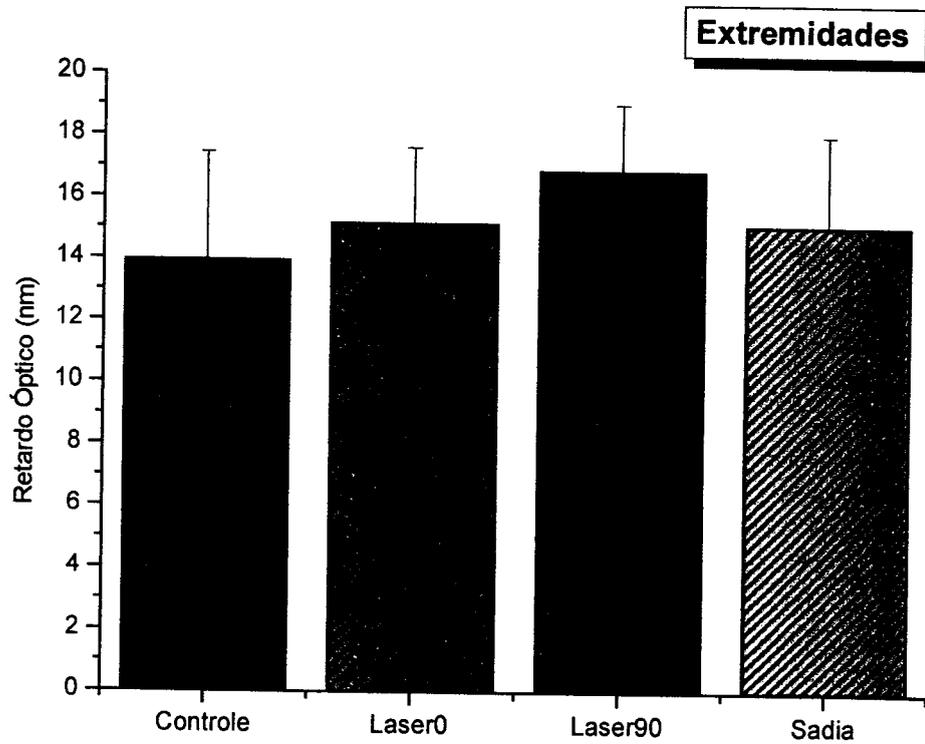


Figura 7.3: Retardo óptico nas extremidades da lesão. Laser0= $L//$; Laser90= $L\perp$.

7.2 Coeficiente de Atenuação Relativo

A primeira característica observada nas imagens obtidas foi o aspecto anisotrópico da luz espalhada em todas as amostras de pele, com exceção das amostras L// e C do terceiro dia de experimento (figura 7.4.a). Neste caso, houve ocorrência de uma distribuição circular de intensidades, indicando que a luz foi isotropicamente espalhada em todas as direções. A figura 7.4.b é a imagem típica obtida para os cortes L// e C nos demais dias de sacrifício. As amostras S, de pele sadia, tiveram sempre o mesmo aspecto anisotrópico mostrado na figura 7.4.a.

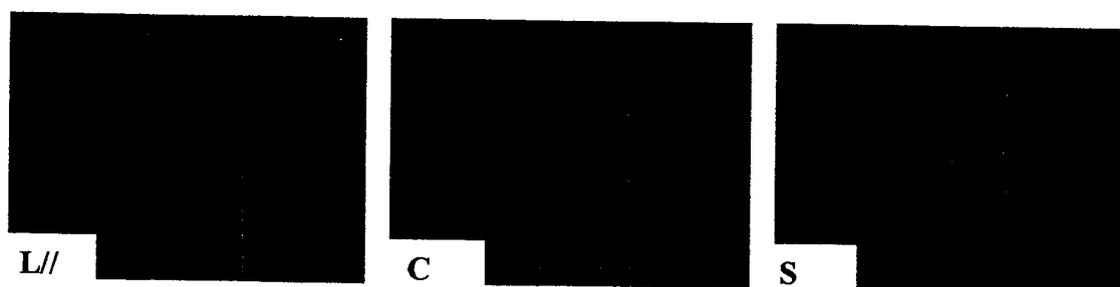


Figura 7.4.a: Terceiro dia de experimento, primeiro dia de irradiação. As setas indicam o formato circular característico do espalhamento isotrópico.

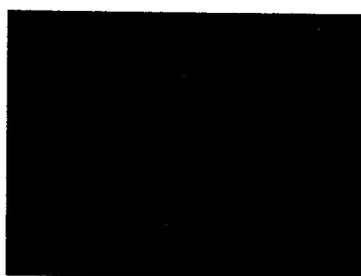


Figura 7.4.b: Imagem típica das amostras L// e C para os dias 7, 10, 14, e 31 de experimento.

O decaimento exponencial, tipicamente obtido em consequência das medidas realizadas, bem como seu logaritmo, são mostrados na figura 7.5.

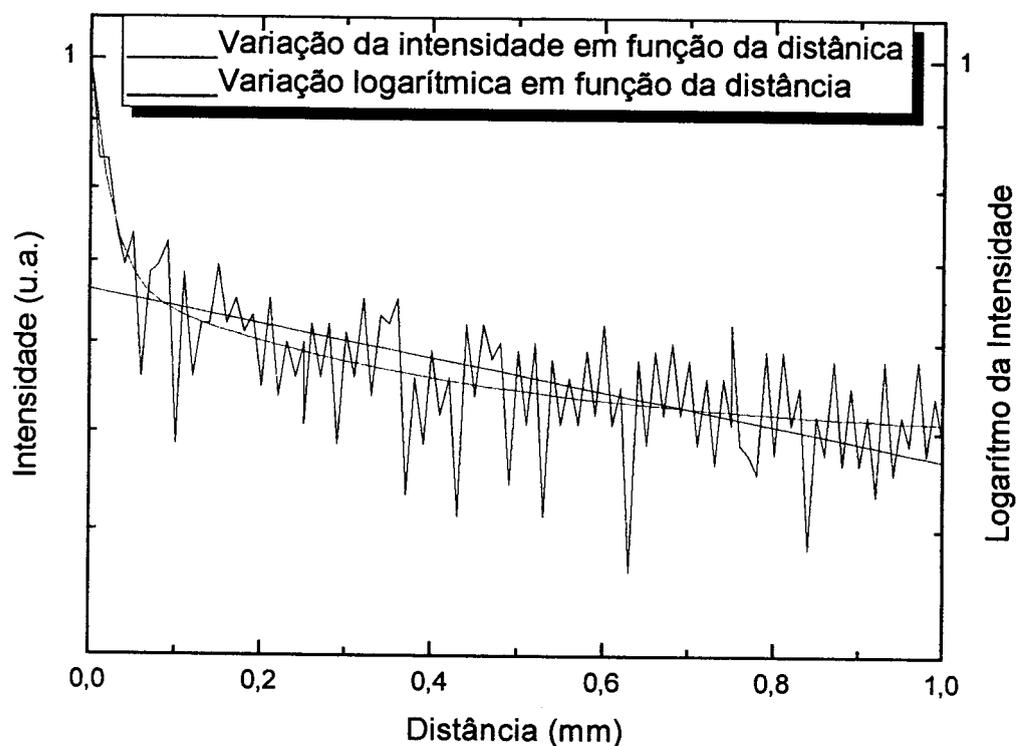


Figura 7.5: Representação do decaimento exponencial da intensidade e do seu logaritmo obtidos em todas as amostras de pele analisadas nos dias 3, 7, 10, 14 e 31.

Nas tabelas 7.7, 7.9, 7.11, 7.13 e 7.15, apresentam-se os valores médios do coeficiente de atenuação (mm^{-1}) das amostras de pele, para cada dia estudado: 3, 7, 10, 14 e 31. Nas tabelas 7.8, 7.10, 7.12, 7.14 e 7.16, são apresentadas as comparações entre os grupos estudados, baseadas no teste estatístico t-Student com nível de significância de 1%.

Tabela 7.7: Valores da média do coeficiente de atenuação α (mm^{-1}), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no terceiro dia pós-criação da queimadura.

Dia 3			
Amostras	Média do α (mm^{-1})	Desvio Padrão	Espaço Amostral
L//	0,19	0,04	10
C	0,12	0,02	10
S	0,08	0,02	10

Tabela 7.8: Comparações entre os coeficientes de atenuação dos grupos, quando estudados no dia 3, por intermédio do teste estatístico t-Student. As diferenças significantes ($p < 0,01$) estão sombreadas.

Teste t-Student para o Dia 3		
	S	C
L//	0,000004	0,0003
S		0,00141

Todos os coeficientes de atenuação são significativamente diferentes neste dia.

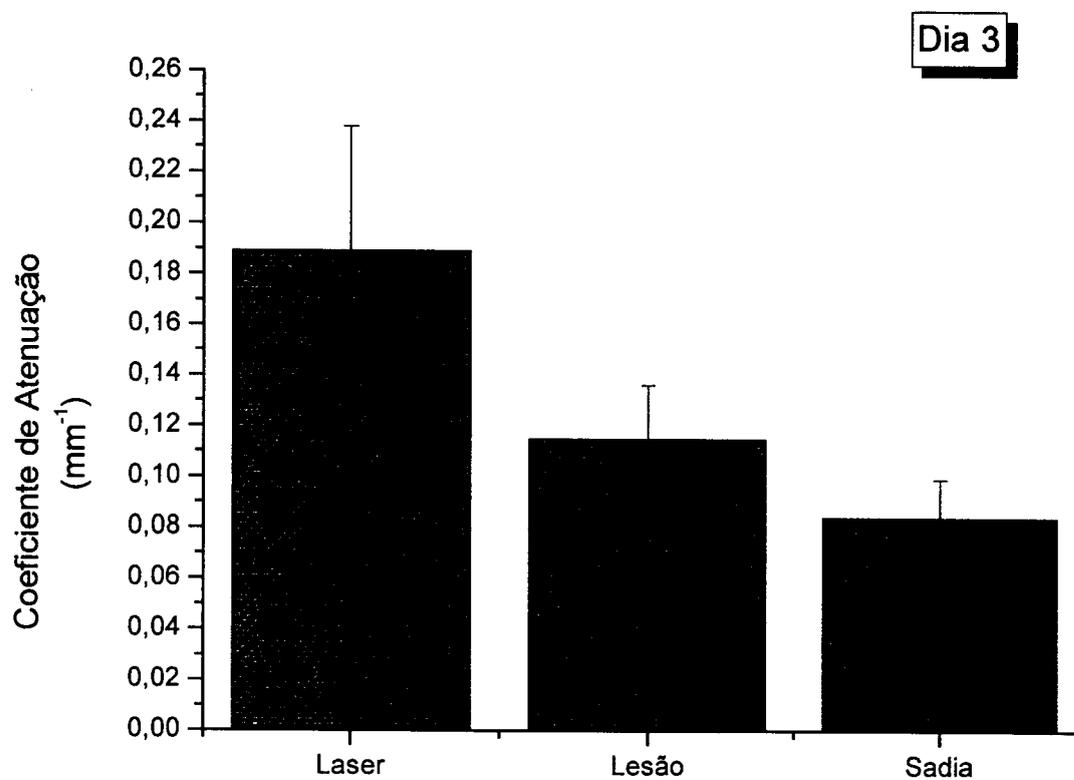


Figura 7.6: Coeficiente de atenuação para as amostras analisadas no terceiro dia pós-criação das queimaduras.

Tabela 7.9: Valores da média do coeficiente de atenuação α (mm^{-1}), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no sétimo dia pós-criação da queimadura.

Dia 7			
Amostras	Média do α (mm^{-1})	Desvio Padrão	Espaço Amostral
L//	0,05	0,01	10
C	0,12	0,01	10
S	0,08	0,03	10

Tabela 7.10: Comparações entre os coeficientes de atenuação dos grupos, quando estudados no dia 7, por intermédio do teste estatístico t-Student. As diferenças significantes ($p < 0,01$) estão sombreadas.

Teste t-Student para o Dia 7		
	S	C
L//	0,00759	5,35697E-11
S		0,00719

Os coeficientes de atenuação também são significativamente diferentes neste dia, para todas as amostras.

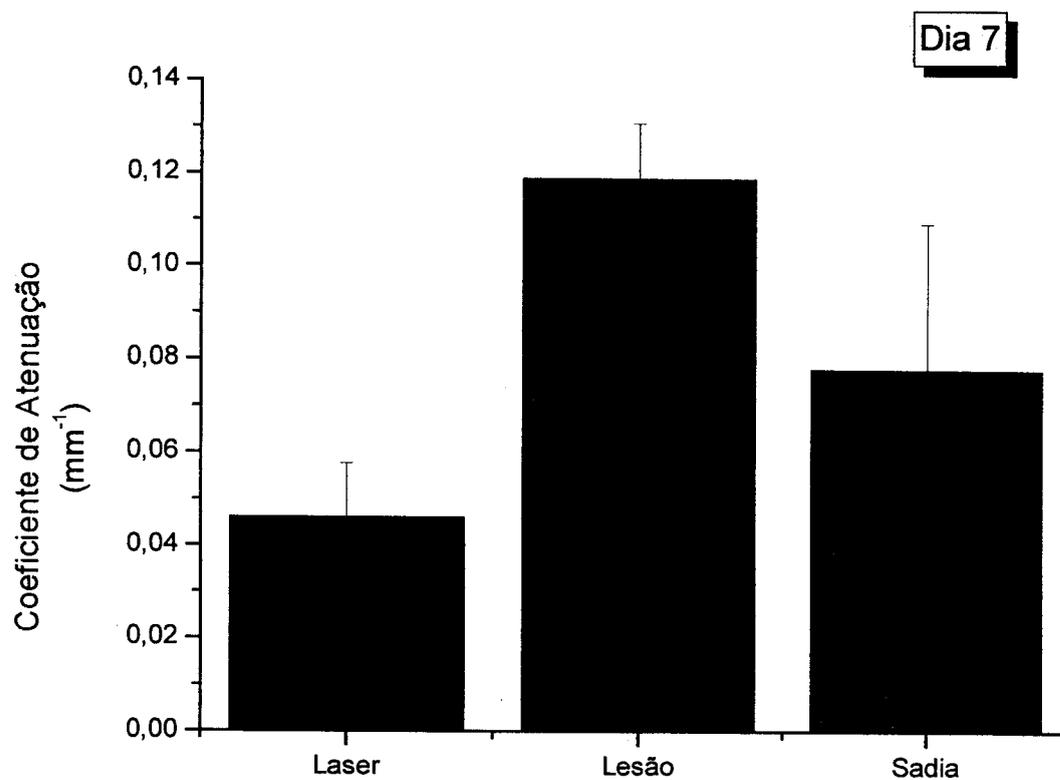


Figura 7.7: Coeficiente de atenuação para as amostras analisadas no sétimo dia pós-criação das queimaduras.

Tabela 7.11: Valores da média do coeficiente de atenuação α (mm^{-1}), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no décimo dia pós-criação da queimadura.

Dia 10			
Amostras	Média do α (mm^{-1})	Desvio Padrão	Espaço Amostral
L//	0,13	0,03	10
C	0,08	0,03	10
S	0,15	0,03	10

Tabela 7.12: Comparações entre os coeficientes de atenuação dos grupos, quando estudados no dia 10, por intermédio do teste estatístico t-Student. As diferenças significantes ($p < 0,01$) estão sombreadas.

Teste t-Student para o Dia 10		
	S	C
L//	0,12663	0,0004
S		0,00005

Apenas na comparação com a amostra controle há diferenças significantes entre os coeficientes de atenuação.

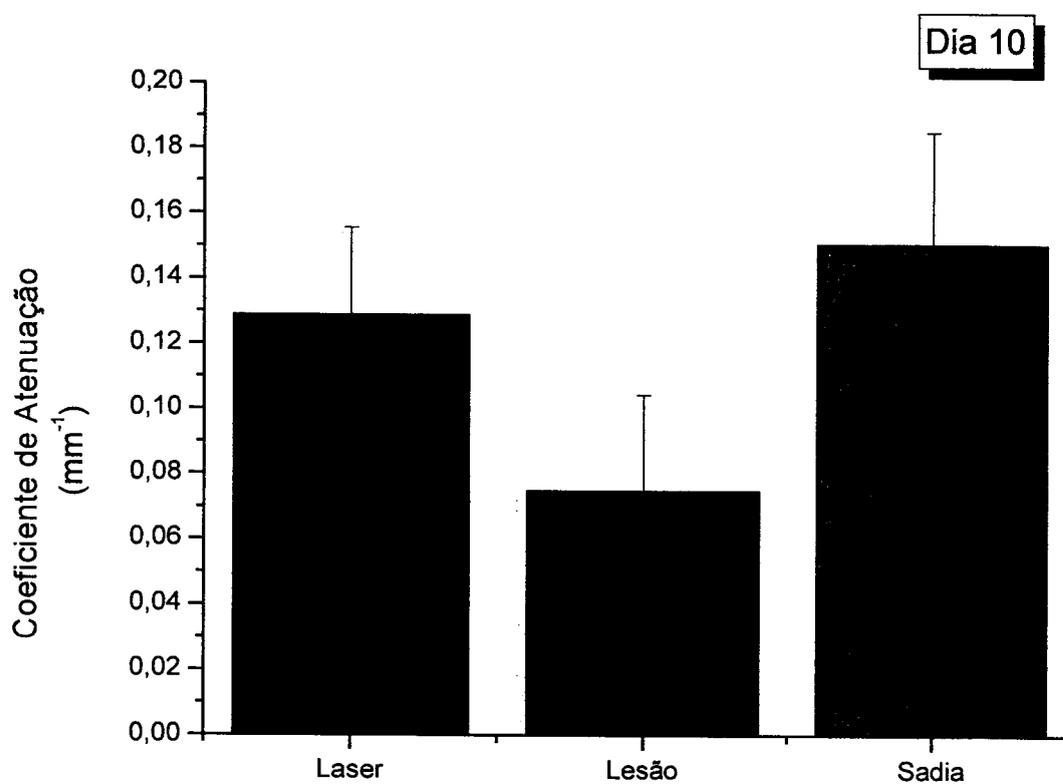


Figura 7.8: Coeficiente de atenuação para as amostras analisadas no décimo dia pós-criação das queimaduras.

Tabela 7.13: Valores da média do coeficiente de atenuação α (mm^{-1}), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no 14º dia pós-criação da queimadura.

Dia 14			
Amostras	Média do α (mm^{-1})	Desvio Padrão	Espaço Amostral
L//	0,08	0,02	10
C	0,08	0,03	10
S	0,09	0,03	10

Tabela 7.14: Comparações entre os coeficientes de atenuação dos grupos, quando estudados no dia 14, por intermédio do teste estatístico t-Student. Não há diferenças significantes.

Teste t-Student para o Dia 14		
	S	C
L//	0,16545	0,87697
S		0,41432

Não há diferenças significantes entre os coeficientes de atenuação neste dia de experimento.

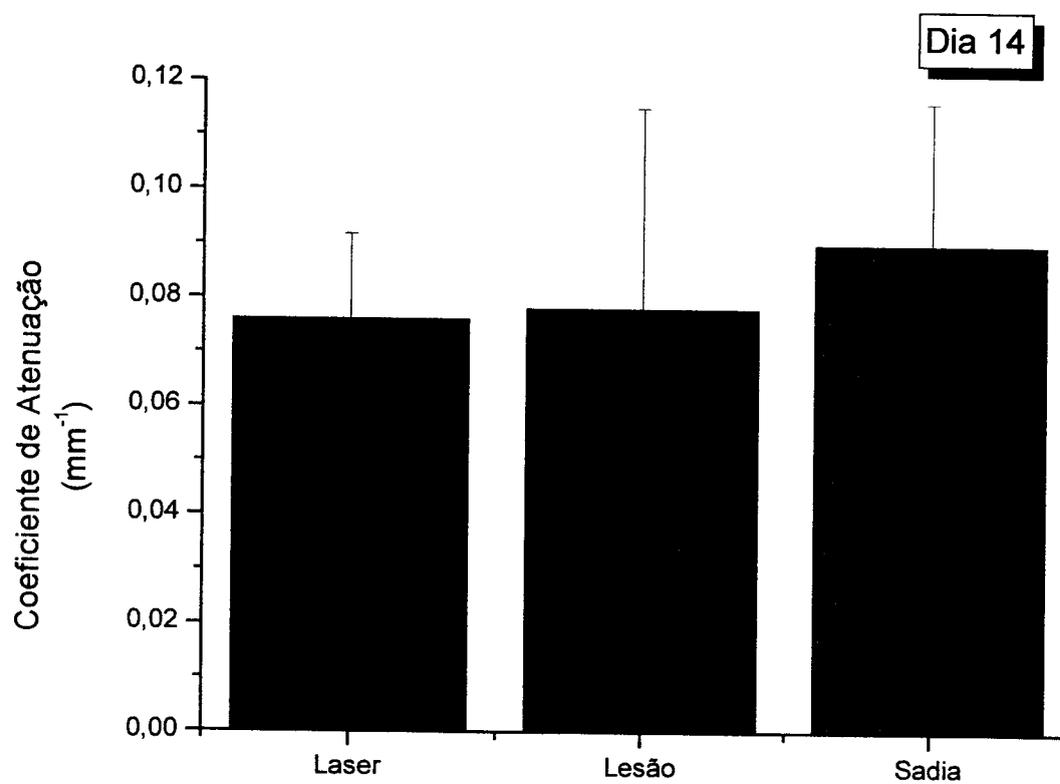


Figura 7.9: Coeficiente de atenuação para as amostras analisadas no 14º dia pós-criação das queimaduras.

Tabela 7.15: Valores da média do coeficiente de atenuação α (mm^{-1}), do seu desvio padrão e do número de medidas realizadas no 31º dia pós-criação da queimadura.

Dia 31			
Amostras	Média do α (mm^{-1})	Desvio Padrão	Espaço Amostral
L//	0,09	0,02	10
C	0,07	0,02	10
S	0,10	0,02	10

Tabela 7.16: Comparações entre os coeficientes de atenuação dos grupos, quando estudados no dia 31, por intermédio do teste estatístico t-Student. Não há diferenças significantes.

Teste t-Student para o Dia 31		
	S	C
L//	0,31261	0,02802
S		0,0135

Neste dia também não há diferenças significantes entre os coeficientes de atenuação.

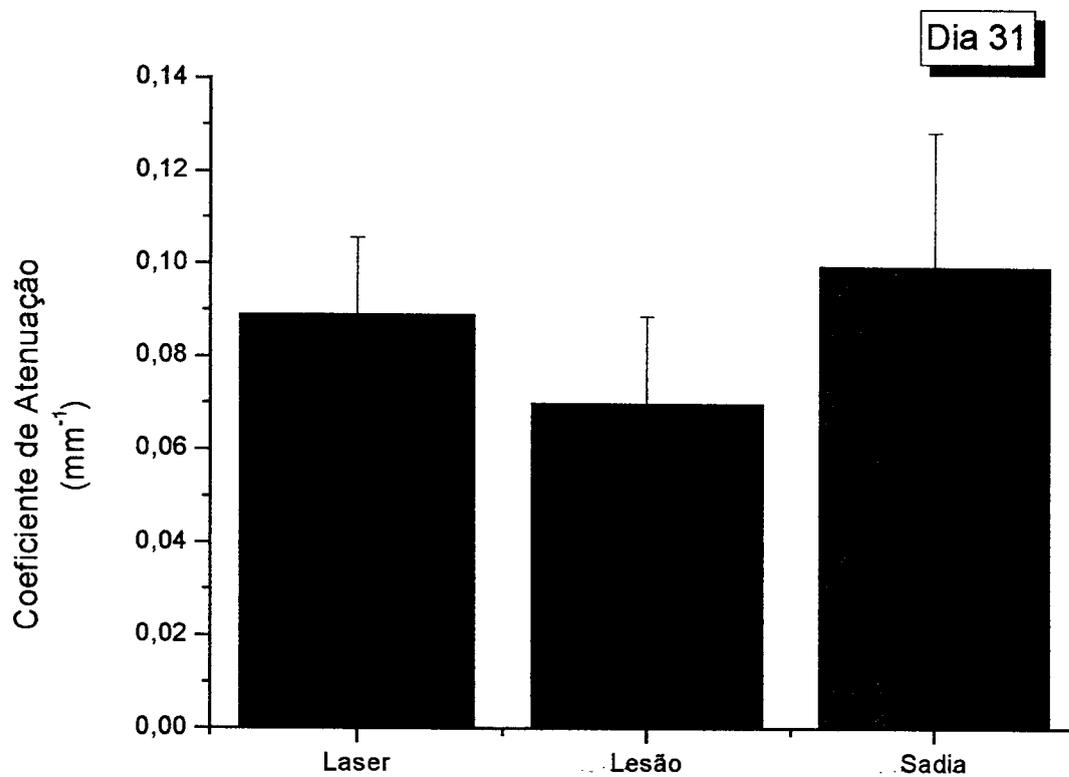


Figura 7.10: Coeficiente de atenuação para as amostras analisadas no 31º dia pós-criação das queimaduras.

Na figura 7.11 compara-se a atenuação sofrida pelo *laser* durante o processo de cicatrização, pelas amostras L// e C em relação às amostras sadias.

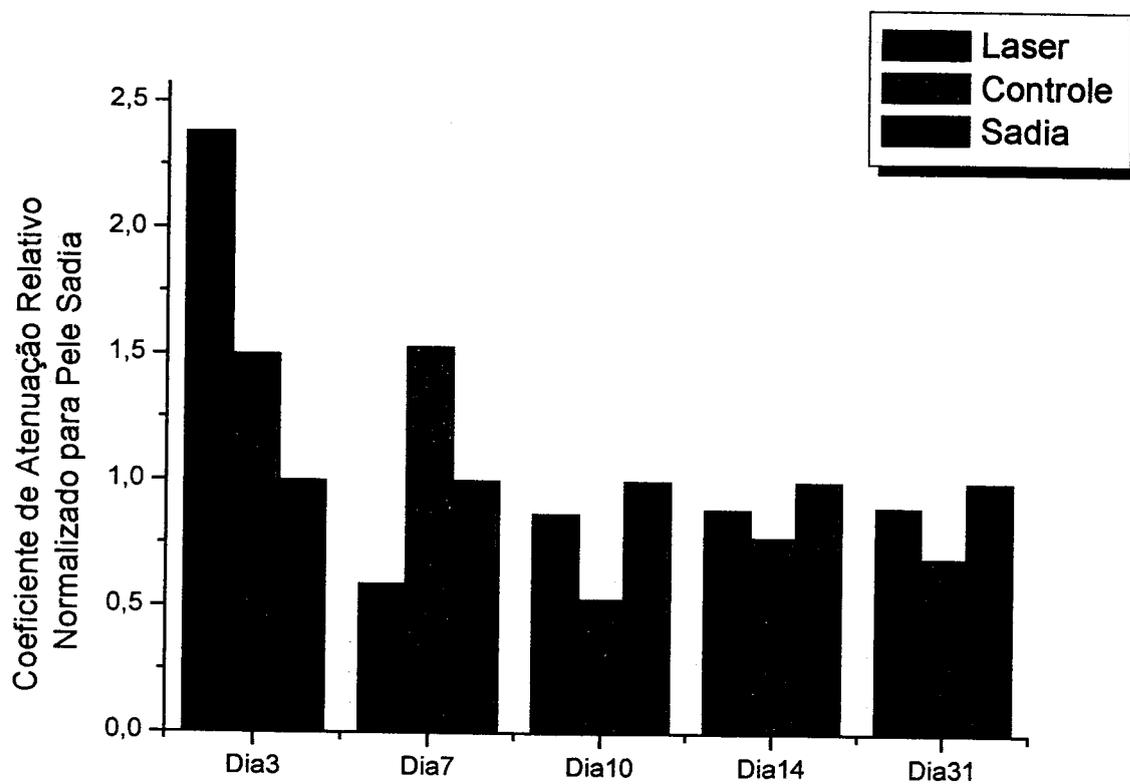


Figura 7.11: Evolução da atenuação normalizada para as amostras sadias nos dias 3, 7, 10, 14 e 31 pós-criação das queimaduras.

8. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que queimaduras irradiadas com *laser* de He-Ne, cuja polarização foi alinhada paralelamente a uma direção referencial no animal, apresentam um estágio de cicatrização mais avançado quando comparado àquelas irradiadas com a polarização perpendicular relativa e às controle não irradiadas, pois fibras colágenas na derme mostraram maior birrefringência, indicando um maior grau de organização. Também, a atenuação da intensidade de luz foi significativamente mais acentuada em amostras de pele queimada (dia 3 pós-criação da queimadura) quando comparada àquela de pele sadia. Além disso, observou-se que o coeficiente de atenuação sofre variações durante o processo cicatricial.

Pickering⁴⁷ e colaboradores diagnosticaram lesões fibróticas utilizando como ferramenta a microscopia de polarização, já que quanto maior é o retardo óptico medido, mais organizado está o tecido, em consequência das fibras colágenas apresentarem-se orientadas em uma direção preferencial. É bem conhecido que o brilho da birrefringência observado ao microscópio de luz polarizada é função do retardo óptico, o qual é diretamente proporcional ao estado de organização de materiais birrefringentes⁴⁸.

Em nosso trabalho, o corte histológico da pele do dorso do rato, no 17º dia pós-injúria, foi dividido em zonas que puderam ser diferenciadas em centro, bordas e extremidades, em relação à lesão. Um corte de pele sadia do mesmo animal também foi analisado, para que a organização do colágeno pudesse ser comparada.

No centro da lesão, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre a pele sadia e a pele irradiada com a polarização alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal, as quais apresentaram os maiores retardos ópticos medidos. Também não houve diferença estatística entre o tecido controle e àquele irradiado com a polarização perpendicular à coluna, os quais apresentaram os menores retardos ópticos medidos. Nas bordas da lesão, houve diferença significativa somente entre os grupos controle e irradiado com polarização paralela e entre os grupos controle e sadio. Com relação às extremidades, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre quaisquer das amostras estudadas, uma vez que as medidas foram realizadas em locais afastados do centro da queimadura.

Em pesquisa realizada por Tang⁴⁹ e colaboradores mostrou-se que, se uma lesão térmica é provocada na pele, o maior dano ocorre no centro da região atingida, e não

na superfície ou nas bordas. O colágeno termicamente desnaturado não exhibe grande birrefringência. Os autores concluem que este achado é consequência do estado randômico adquirido pós-injúria, pois o brilho do colágeno da área que sofre dano térmico é menor em comparação ao brilho do tecido circunvizinho. É bem estabelecido que no início do processo de cicatrização as fibras colágenas encontram-se distribuídas randomicamente na derme, ou seja, não possuem uma direção preferencial⁵⁰.

Nossos resultados sugerem, portanto, que L// está em estágio de cicatrização mais avançado quando comparado às lesões L \perp e C, pois apresentaram maior retardo óptico no décimo sétimo dia do processo de cicatrização, tanto no centro quanto nas bordas da lesão, mostrando um estado organizacional das fibras colágenas na matriz extracelular semelhante àquele encontrado para pele sadia. Esses achados também estão de acordo com o trabalho de Berry⁵¹ e colaboradores, os quais mostraram que o tecido de granulação da ferida de um rato não tratado apresenta birrefringência mínima na terceira semana de cicatrização.

Segundo Yoshioka⁵² e colaboradores, se há aumento da birrefringência elétrica pode-se concluir que o efeito do campo elétrico sobre o colágeno é alinhar as moléculas ao longo da direção do campo, aumentando a polarizabilidade molecular. Ao utilizar, neste trabalho, o campo elétrico do *laser* polarizado paralelamente a uma direção referencial no animal, esse processo descrito por Yoshioka pôde ser otimizado.

Kertesz⁵³ e colaboradores propuseram um modelo físico para explicar o efeito bioestimulante de um feixe de luz polarizado, o qual supõe que a luz linearmente polarizada, tendo um campo eletromagnético unidirecional, age sobre a bicamada lipídica da membrana celular e, portanto, ocasiona mudanças estruturais. Dessa forma, as características superficiais, como distribuição de cargas elétricas e ligações lipídio-proteína, podem ser modificadas. Isso ocorre porque a intensidade do campo elétrico da luz linearmente polarizada muda a conformação da bicamada lipídica e reordena as cabeças polares dos lipídios. A reordenação dos lipídios é considerada análoga à reordenação, já observada, de moléculas de cristal líquido quando irradiadas por luz polarizada. Como no caso das moléculas de cristal, em resposta ao campo unidirecional induzido, as cabeças polares tendem a rotar na direção do campo elétrico. Essa mudança na conformação da bicamada lipídica pode influenciar qualquer processo celular que é conectado à membrana da célula, tal como produção de energia, processo imunológico ou reações enzimáticas.

Estruturas isotrópicas apresentam sempre o mesmo comportamento para determinado fenômeno, independente da direção analisada, ao contrário das estruturas

anisotrópicas. No caso da luz, cristais anisotrópicos apresentam valores distintos de índices de refração em função da direção de propagação da luz ao atravessá-los. O caráter anisotrópico verificado nas amostras de pele pode ser atribuído às fibras colágenas, que são constituídas de tropocolágeno, estruturas agregadas e ligadas com alta ordem molecular, a ponto de se poder afirmar tratar-se de um “estado de agregação com elevado grau de cristalinidade”²¹, muito bem estabelecido e fundamentado pela sua birrefringência, propriedade esta permitida somente para estruturas anisotrópicas.

Analisando-se os resultados obtidos na seção 7.2, no terceiro dia de experimento foi possível verificar o aspecto isotrópico nas amostras irradiadas e controle, em consequência da queimadura de terceiro grau causada, a qual descaracterizou a derme e epiderme e, portanto, fez com que o colágeno deixasse de contribuir com a anisotropia. Nos demais dias de experimento não houve isotropia visível, pois a neoformação de fibras colágenas voltou a contribuir para o espalhamento anisotrópico característico da pele⁵⁴.

Nesse período, observou-se que o coeficiente de atenuação foi significativamente maior para pele queimada em relação à sadia. Esse achado concorda com o trabalho de Melo e colaboradores, os quais demonstraram que o decaimento da intensidade da luz em fígado cirrótico é muito mais acentuado que àquele em fígado sadio. Em nossos resultados, a penetração em pele sadia foi aproximadamente duas vezes maior que em pele queimada. Também, a pele irradiada mostrou diferenças significantes quando comparada à pele sadia e à lesão controle não irradiada. Essa observação pode ser confirmada pela histologia da pele queimada no dia 3 pós-criação da lesão¹⁷: a região lesada é ainda desprovida de epiderme e na derme subjacente observa-se uma variedade de células inflamatórias e restos de células. Os vasos sanguíneos mostram-se dilatados e, em sua maioria, preenchidos com células sanguíneas.

Estudos mostram que a radiação *laser* pode acelerar o processo de cicatrização de feridas atuando na fase inflamatória, reduzindo a duração da inflamação e, conseqüentemente, precipitando o estágio proliferativo de reparo quando o tecido de granulação é produzido. Portanto, é provável que substâncias características do processo de reparação atuem como atenuadoras nos espécimes lesionados, tais como mastócitos, plaquetas, neutrófilos, monócitos, macrófagos e fibroblastos^{27, 29}. Além disso, de acordo com Tuchin⁵⁵, as condições patológicas e as atividades funcionais devem responder diferentemente à luz polarizada. Talvez por esta razão, o grupo irradiado tenha apresentado coeficiente de atenuação maior que o grupo controle não irradiado.

O valor do coeficiente de atenuação, obtido no dia sete pós-criação da queimadura, foi atípico. Provavelmente, artefatos de técnica tenham influenciado as medidas coletadas⁵⁶.

No dia 10 pós-criação da queimadura, o coeficiente de atenuação foi significativamente maior para L// quando comparado àquele da lesão controle, e similar ao encontrado para pele sadia. Segundo Ribeiro¹⁷, dez dias depois da injúria já é possível observar sinais de reparo da epiderme e um tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos ativos. Observou-se também que o processo de reepitelização foi mais rápido nos grupos irradiados quando comparados com o controle não irradiado. Ou seja, nesse período, o processo de inflamação foi menos intenso, contribuindo para que o coeficiente de atenuação diminuísse em relação ao terceiro dia. Porém, o valor medido para o grupo tratado indicou estágio de reparação mais avançado, pois assemelhou-se àquele da pele sadia.

Quatorze ou trinta e um dias pós-queimadura, os valores do coeficiente de atenuação não mostraram diferenças significantes entre quaisquer das amostras investigadas. Confrontando esses resultados com o trabalho de Ribeiro, quatorze dias pós-injúria, amostras controle e L// apresentam-se em estágio de reparação similar, prevalecendo a neoformação do tecido conjuntivo. Nossos achados indicaram que a pele queimada estava cicatrizada, uma vez que assemelhou-se opticamente à pele sadia.

Assim, com o método de imagem desenvolvido, foi possível analisar o decaimento exponencial da intensidade de luz em pele sadia e queimada, conforme a distância percorrida, para determinar, qualitativamente, como a intensidade de luz é atenuada durante o processo cicatricial. De fato, o tecido de granulação de queimaduras possui características únicas e varia em muitos aspectos na comparação com a pele normal, de acordo com Latha⁵⁷. Desta forma, este trabalho sugere que uma das diferenças poderia ser a característica óptica do tecido.

9. CONCLUSÃO

A direção de polarização do campo elétrico afeta o processo cicatricial de queimaduras criadas artificialmente no dorso de ratos, particularmente a organização do colágeno na derme. Feridas irradiadas com o *laser* de He-Ne polarizado linear e paralelamente à coluna vertebral do animal apresentam fibras colágenas mais organizadas do que àquelas irradiadas com *laser* polarizado linear e perpendicularmente ou às controles.

A intensidade da luz em pele queimada é significativamente mais atenuada que em pele sadia. Também, o coeficiente de atenuação sofre modificações durante o processo de reparação tecidual em queimaduras, quando tratadas com o *laser* de He-Ne polarizado ou quando não tratadas.

As diferenças encontradas nas propriedades ópticas durante a cicatrização devem ser consideradas para uma otimização da dosimetria associada à terapia com *lasers* em baixa intensidade. Já que a penetração da luz é menor no tecido sob uma condição patológica quando comparada a tecido sadio, propõe-se que o tratamento comece com doses mais altas, que diminuam gradativamente durante a terapia *laser* em baixa intensidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg. Med.**, v.22, p.212-8, 1998.
- ² SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T.; SCHRADER-REICHARD, U.; BUSCH, M.; SCHAFFER, P.M.; DUHMKE, E.; BAUMGARTNER, R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers Surg. Med.**, v.25, p.263-271, 1999.
- ³ AL-WATBAN, F.A.H.; ANDRES, B.L. Effect of He-Ne laser (632,8 nm) and polygen™ on CHO cells. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.18, n.3, p.145-150, 2000.
- ⁴ KARU, T.I.; PYATIBRAT, L.V.; KALENDU, G.S. Cell attachment modulation by radiation from a pulsed light diode ($\lambda=820$ nm) and various chemicals. **Lasers Surg. Med.**, v.28, p.227-236, 2001.
- ⁵ UTSUNOMIYA, T.A. Histopathological study of the effects of low power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. **J. Endodont.**, v.24, p.187-193, 1998.
- ⁶ OLIVEIRA, N.M.L.; PARIZZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg. Med.**, v.25, p.13-21, 1999.
- ⁷ SANTANA-BLANK, L.A.; RODRIGUEZ-SANTANA, E.; SCOTT-ALGARA, D.; HUNGER, M.; SANTANA-RODRIGUEZ, K.E.; ORELLANA, R. Short-term bioeffects of an infrared pulsed laser device on burned rat skin monitored by transverse relaxation times (NMR). **Lasers Surg. Med.**, v.27, p.411-19, 2000.
- ⁸ SIMUNOVIC, Z.; TROBONJACA, T.; TROBONJACAM, Z.; Treatment of medial and lateral epicondylitis - tennis and golfer's elbow - with low level laser therapy: a multicenter double blind, placebo-controlled clinical study on 324 patients. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, p.145-151, 1998.
- ⁹ NASPITZ, N.; ZECELL, D.M.; FALTIN Jr., K. Avaliação do efeito terapêutico do laser de GaAlAs sobre lesões provocadas por aparelho ortodôntico fixo na mucosa da cavidade oral. **Revista Goiana de Ortodontia**, p.7-13, 2000.

-
- ¹⁰ SCHINDL, M.; KERSCHAN, K.; SCHINDL, A.; SCHÖN, H.; HEINZL, H.; SCHINDL, L. Induction of complete wound healing in recalcitrant ulcers by low-intensity laser irradiation depends on ulcer cause and size. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.15, p.18-21, 1999.
- ¹¹ LAGAN, K.M.; Mc DONOUGH, S.M.; CLEMENTS, B.A.; BAXTER, G.D. A case report of low intensity laser therapy (LILT) in the management of venous ulceration: potential effects of wound debridement upon efficacy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.18, n.1, p.15-22, 2000.
- ¹² De SCHEERDER, I.K.; WANG, K.; KAUL, U.; SINGH, B.; SAHOTA, H.; KEELAN, M.H.; KIPSHIDZE, N.N.; MOSES, J. Intravascular low-power laser irradiation after coronary stenting: long-term follow-up. **Lasers Surg. Med.**, v.28, p.212-15, 2001.
- ¹³ COULTER, A.H. Low-energy laser research in wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.12, p.117-8, 1994.
- ¹⁴ KARU, T. **The science of low-power laser therapy**. Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
- ¹⁵ KOLÁROVÁ, H., DITRICHOVÁ, D. WAGNER, J. Penetration of the *laser* light into the skin in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.24, p.231-235, 1999.
- ¹⁶ MELO, C.A.S.; LIMA, A.L.L.A.; BRASIL, I.R.C.; SILVA, O.C.E.; MAGALHÃES, D.V.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Characterization of light penetration in rat tissues. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.19, p.175-179, 2001.
- ¹⁷ RIBEIRO, M.S. **Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele**. 2000. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ¹⁸ NIEMZ, M.H. **Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications**. Springer, 1996.
- ¹⁹ PRAHL, S.A. **Light transport in tissue**. PhD Thesis, University of Austin, 1990.
- ²⁰ COSTA, A.M.A. **Contribuição ao estudo dos mecanismos envolvidos na reparação tissular: miofibroblastos e matriz extracelular**. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ²¹ VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular**. Livraria Atheneu, 1987.

-
- ²² MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.*, v.122, p.532-5, 1971.
- ²³ LILGE, L.; TIERNEY, K.; NUSSBAUM, E. Low-level laser therapy for wound healing: feasibility of wound dressing transillumination. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.18, n.5, p.235-40, 2000.
- ²⁴ WALKER, M.D.; RUMPF, S.; BAXTER, G.D.; HIRST, D.G.; LOWE, A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.* v.26, p.41-7, 2000, *apud* BASFORD, J.R. Low-intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med.*, v.16, p.331-42, 1995.
- ²⁵ LUCAS, C.; STANBOROUGH, R.W.; FREEMAN, C.L.; De HAAN, R.J. Efficacy of low-level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. *Lasers Med. Sci.*, v.15, p.84-93, 2000.
- ²⁶ DYSON, M. Laser therapy in wound management, the new era. In **THIRD WORLD CONGRESS OF WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY**, May 10-13, 2000, Athens. **Proceedings of THIRD WORLD CONGRESS OF WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY**. Athens: 2000. p. 20.
- ²⁷ SILVEIRA, L.B. **Verificação do comportamento de mastócitos na parede não-mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa intensidade (estudo in anima nobile)**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ²⁸ STADLER, I.; LANZAFAME, R.J.; EVANS, R.; NARAYAN, V.; DAILEY, B.; BUEHNER, N.; NAIM, J.O. 830 nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg. Med.*, v.28, p.220-26, 2001.
- ²⁹ RODRIGUES, M.T.J. **Efeito terapêutico da irradiação com laser de arseneto de gálio alumínio (830nm) em lesões provocadas pelo aparelho ortodôntico fixo na cavidade oral**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ³⁰ SAPERIA, D.; GASSBERG, E.; LYONS, R.F.; ABERGEL, R.P.; BANEUX, P.; CASTEL, J.C.; DWYER, R.; UITTO, J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with Helium-Neon laser. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, v.138, p.1123-8, 1986.
- ³¹ REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. *Lasers Surg. Med.* v.22, p.281-287, 1998.

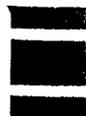
-
- ³² FISZERMAN, R.; MARKMANN, C.A. Effect of low level laser therapy on chronic diabetic foot ulcers. **Diabet.**, v.49, n.5, p.A393, 2000.
- ³³ LAGAN, K.M.; CLEMENTS, B.A.; McDONOUGH, S.; BAXTER, G.D. Low intensity laser therapy (830 nm) in the management of minor postsurgical wounds: a controlled clinical study. **Lasers Surg. Med.**, v.28, p.27-32, 2001.
- ³⁴ LAGAN, K.M.; MCKENNA, T.; WITHEROW, A.; JOHNS, J.; Mc DONOUGH, S.M.; BAXTER, G.D. Low-intensity laser therapy/combined phototherapy in the management of chronic venous ulceration: A placebo-controlled study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.20, n.3, p.109-116, 2002.
- ³⁵ LUCAS, C.; COENEN, C.H.M.; HAAN, R.J. The effect of low level laser therapy (LLLT) on stage III decubitus ulcers (pressure sores); a prospective randomised single blind, multicentre pilot study. **Lasers Med. Sci.**, v.14, p.94-100, 2000.
- ³⁶ SIMUNOVIC, F.M.H.Z.; IVANKOVICH, A.D.; DEPOLO, A. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.18, n.2, p.67-73, 2000.
- ³⁷ KIPSHIDZE, N.; NIKOLAYCHIK, V.; KEELAN, M.H.; SHANKAR, L.R.; KHANNA, A.; KORNOWSKI, R.; LEON, M.; MOSES, J. Low-power helium neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.28, n.4, p.355-364, 2001.
- ³⁸ PAIM, C.B.V.; RAISER, A.G.; CARDOSO, E.; BECK, C. Enxerto autólogo de pele, em malha, com espessura completa, na reparação de feridas carpometacarpianas de cães. Resposta à irradiação laser AsGa. **C. Rural**, v.32, n.3, p.451-457, 2002.
- ³⁹ PINHEIRO, A.L.B.; NASCIMENTO, S.C.; VIEIRA, A.L.D.B.; BRUGNERA, A.; ZANIN, F.A.; ROLIM, A.B.; DA SILVA, P.S. Effects of low-level laser therapy on malignant cells: In vitro study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.20, n.1, p.23-26, 2002.
- ⁴⁰ LAPINA, V.A.; VEREMEY, E.I.; PANCOVETS, E.A. Effect of laser irradiation for healing of the skin-muscle wounds of animal. In *Lases in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems X. Proceedings of SPIE*, v.3907, p.496-503, 2000.
- ⁴¹ WALKER, M.D.; RUMPF, S.; BAXTER, G.D.; HIRST, D.G.; LOWE, A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.41-47, 2000.

- ⁴² AGAIBY, A.D.; GHALI, L.R.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by t-lymphocytes. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.357-363, 2000.
- ⁴³ SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHÖN, H.; SCHINDL, L. Low-intensity laser therapy: a review. **J. Invest. Med.**, v.48, n.5, 2000.
- ⁴⁴ RIBEIRO, M.S. **Estudo teórico-experimental dos efeitos não-térmicos da radiação laser polarizada em tecidos vivos**. 1991. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- ⁴⁵ MATERIAL DIDÁTICO. Professores Alexandre Xavier Falcão e Neucimar Jerônimo Leite. Desenvolvido pelo Instituto de Computação da Universidade Estadual de Campinas. Apresenta texto sobre os fundamentos de processamento de imagem digital. Disponível em: <<http://www.dcc.unicamp.br/~cpg/material-didatico/mo815/9802/curso/index.html>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2002.
- ⁴⁶ ImageJ for Windows, version 1.27z: Imaging processing and analysis in Java. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/features.html>>. Acesso em: 31 de janeiro de 2002.
- ⁴⁷ PICKERING, J.G.; BOUGHNER, D.R. Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis. **Am. J. Pathol.**, v.138, n.5, p.1225-1231, 1991.
- ⁴⁸ VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S.; PIMENTEL, E.R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red aggregates and of their complexes with collagen. **Histochemical Journal**, v.14, p.857-878, 1982.
- ⁴⁹ TANG, J.; ZENG, F.; SAVAGE, H.; HO, P.P.; ALFANO, R.R. Laser irradiative tissue probed in situ by collagen 380 nm fluorescence imaging. **Lasers Surg. Med.** v.27, p.158-164, 2000.
- ⁵⁰ SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LETKOWITZ, R.J. **Bioquímica de Mamíferos**. Guanabara, 1985.
- ⁵¹ BERRY, D.P.; HARDING, K.G.; STANTON, M.R.; JASANI, B.; EHRLICH, H.P. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.102, n.1, July 1998.
- ⁵² YOSHIOKA, K.; O'KONSKI, C.T. Electric properties of macromolecules. IX. Dipole moment, polarizability, and optical anisotropy factor of collagen in solution from electric birefringence. **Biopolymers**, v.4, p.499-507, 1966

-
- ⁵³ KERTESZ, I.; FENYÖ, M.; MESTER, E.; BATHORY, G. Hypothetical physical model for laser biostimulation. **Opt. Laser Tech.**, v.14, p.31-32, 1982.
- ⁵⁴ NICKELL, S.; HERMANN, M.; ESSENPREIST, M.; FARREL, T.J.; KRÄMER, U.; PATTERSON, M.S. Anisotropy of light propagation in human skin. **Phys. Med. Biol.**, v.45, p.2873-2886, 2000.
- ⁵⁵ TUCHIN, V.V. Light scattering study of tissues. **Phys. Uspekhi**, v.40, n.5, p.495-515, 1997.
- ⁵⁶ KULONEN, E.; PIKKARAINEN, J. **Biology of fibroblast**. Academic Press London and New York, 1973, cap. WINKLE Jr., W.V.; HASTINGS, J.C.; BARKER, E.; WOHLAND, W. Role of the fibroblast in controlling rate and extent of repair in wounds of various tissues, p.559-570.
- ⁵⁷ LATHA, B.; RAMAKRISHNAN, M.; JAYARAMAN, V.; BABU, M. Physicochemical properties of extracellular matrix proteins in post-burn human granulation tissue. **Comp. Biochem. Phys. Part B**, v.124, p.241-249, 1999.



M22606



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
[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, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.