



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE
NA REPARAÇÃO EM MUCOSA BUCAL DE RATOS**

SILVIA CRISTINA TASSINARI

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

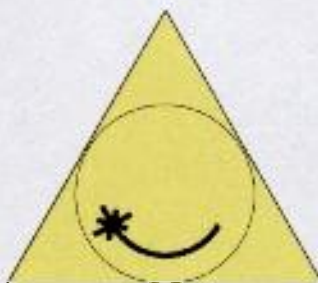
Orientador:
Prof. Dr. Edison Puig Maldonado

Co-orientadora:
Profa. Dra. Ilíria Salomão Feist

**São Paulo
2005**

.2-002:





Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
IPEN - FOU SP

ESTUDO DOS EFEITOS DO LASER EM BAIXA INTENSIDADE NA REPARAÇÃO EM MUCOSA BUCAL DE RATOS

SILVIA CRISTINA TASSINARI



Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para Grau
de Mestre Profissional em
Lasers em Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Edison
Puig Maldonado
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ilíria
Salomão Feist



São Paulo

2005

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai e Professor Dr. **Eduardo Tassinari Neto**, que dedicou sua vida aos Filhos e a Odontologia, meu exemplo de Honestidade, Disciplina e Fé.

Ao meu irmão Dr. **Eduardo Henrique Tassinari** (*in memoriam*) que ao meu lado certamente participa, a seu modo, desse momento especial da minha vida.

A minha pequena **Stella**, presente de **Deus** na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. **Edison Puig Maldonado**, pela atenção paciência e confiança.

A minha Co.Orientadora Profa. Dra. **Iliria Salomão Feist**, pela dedicação e seu dom de ensinar.

A querida Profa. Dra. **Martha Simões Ribeiro**, pelo amparo e doçura que me acolheu em todos os momentos, contribuindo para a realização deste trabalho.

Ao Prof.Dr. **Giorgio de Michelli**, pelo carinho e atenção.

A amiga **Paula Farini**, que não mediu esforços para me ajudar na realização das fotos.

A Senhora **Nanci do Nascimento**, responsável pelo Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, que gentilmente cedeu os animais.

A Senhora **Maria Neide Ferreira Mascarenhas**, técnica do Biotério do IPEN, pela prestatividade que me recebeu.

Ao Dr. **Mauricio Marques de Oliveira**, Veterinário responsável do Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes, pela atenção e orientação junto ao Comitê de Ética e Manipulação e Experimentos em Animais.

Ao Prof. Dr. **Carlos Mateus Rotta**, pelo incentivo à pesquisa, e sua disponibilidade da realização do piloto no departamento de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes.

A Profa. **Ingrid Perone S. Gil**, Histologista responsável pelo Departamento de Histologia da Universidade de Mogi das Cruzes.

Ao Prof. Dr. **Benedito Dias Lemos**, por dispor as dependências do Laboratório de Anatomia-Histologia da Universidade Braz Cubas para confecção das lâminas.

Ao Prof. Dr. **Camillo Morea**, pela confiança e apoio na disciplina de Periodontia da Universidade Brás Cubaz.

Ao Prof. Dr. **Roberto da Silva Pires**, pela amizade e respeito.

A técnica **Isabel Manuel** do Laboratório de Anatomia-Histologia da Universidade Braz Cubas para confecção das lâminas.

Ao Prof. Dr. **Moacyr Domingues Novelli**, pelo auxílio na leitura das lâminas no Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

A Sra. **Dalva Ribeiro Mendes de Oliveira**, por sua paciência, colaboração e convivência.

A Dra. **Carmen Nomura**, pelo direcionamento, incentivo e respeito.

Ao amigo Dr. **Gilson Cardoso**, pela sua sabedoria, carinho e respeito.

Aos meus irmãos, **Luiz Fernando, Ana Lucia e Cláudio Roberto** por me apoiarem em todos os momentos.

A Sra. **Maria Helena Oliveira da Silva**, pela dedicação e carinho.

A querida **Geralda Rosaria da Silva**, minha segunda mãe, e agora me ajuda na criação da minha filha.

A minha Mãe **Irene Uliana**, que através de suas preces me manteve protegida nas estradas.

A **Deus**, que me guarda todos os dias nas Palmas de Suas Mãos.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive”.

Do Poema 'Para Ser Grande' de Ricardo Reis

Fernando Pessoa.

RESUMO

O uso do *laser* em baixa intensidade tem se expandido dentro das especialidades da odontologia, aplicado como terapia coadjuvante nos procedimentos odontológicos. Resultados de vários trabalhos experimentais têm indicado a possibilidade dessa terapia produzir efeitos benéficos sobre alguns tipos de lesões em tecidos moles, tais como: analgesia, biomodulação e ação antiinflamatória. Vários estudos procuram descrever a interação *laser*-tecido nesses casos, bem como os mecanismos de ação desenvolvidos para que estes processos sejam verificados. A proposta deste trabalho foi a de avaliar, através da observação por microscopia óptica, os efeitos do laser em baixa intensidade na reparação tecidual de feridas criadas em mucosa oral de ratos. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos contendo 10 animais em cada grupo, denominados de grupo "0 hora", "3 dias", "7 dias" e "14 dias", de acordo com a data de eutanásia dos animais. As feridas efetuadas no lado direito do animal não receberam tratamento (controle), e as no lado esquerdo foram irradiadas com *laser* em baixa intensidade. Utilizou-se um laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs), com comprimento de onda $\lambda = 630\text{nm}$, de forma "homogênea", com intensidade de $60\text{mW}/\text{cm}^2$, por 25 segundos. De acordo com os períodos dos grupos experimentais, as amostras foram removidas e processadas histologicamente. Observou-se que houve um incremento de polimorfonucleares nas amostras do grupo "3 dias" que sofreram irradiação com *laser* em baixa intensidade. Nas amostras do grupo "14 dias" irradiadas com *laser*, houve um aumento no número de fibras colágenas e de vasos neoformados quando comparado com o controle. Os fenômenos histológicos observados nas amostras irradiadas contribuem para o entendimento dos mecanismos de ação do *laser* sobre feridas, que levariam a uma melhora na qualidade da reparação tecidual.

Palavras chave: *Laser* de baixa intensidade; Reparação; Cicatrização.

Effect of low-level laser therapy on oral rat mucosa repair

SUMMARY

The use of low-intensity lasers in dentistry areas has grown, applied as a supporting therapy in dentistry procedures. Several experimental results have indicated the possibility of this kind of laser therapy produce beneficial effects on some soft-tissue lesions, such as analgesia, biomodulation and anti-inflammatory action. Several studies aimed to describe the laser-tissue interaction in those cases, as well as the mechanisms that leads to those processes. The present work proposal was to evaluate, by optical microscopy observation, the low-intensity laser effects on tissue repairing of wounds created in oral mucosa of rats. The study used forty rats divided in 4 groups, with 10 rats each, which were denominated as "hour 0", "day 3", "day 7" and "day 14", relative to the time of sample removal. The wounds created in the right side of each animal's mouth did not receive any treatment (control), and those created in the left side were irradiated with laser at low intensity. For this procedure, a GaAlAs diode laser with wavelength $\lambda = 630\text{nm}$ was used, at intensity of $60\text{mW}/\text{cm}^2$, applied for 25 seconds. Following group definitions and time of tissue removal, the samples were submitted to histological process. It was observed an increment of polymorph nuclear cells in the irradiated samples from "day 3". In the irradiated samples from "day 14", it was observed a number increase of fibroblast and neoformed vessels when compared with the control. The observed results in the irradiated samples, verified by histological analysis, contribute to the understanding of laser action effects on wounds, which usually lead to an increase of healing speed.

Keywords: Low-intensity laser; Wound Repairing; Wound Healing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 <i>Laser</i> e suas propriedades	
3.2 <i>Laser</i> e sua interação com o tecido	
3.3 Reparação tecidual	
3.4 <i>Laser</i> e reparação tecidual	
3.4.1 Resultados positivas para terapia com <i>laser</i> em baixa intensidade	
3.4.2. Resultados negativas para terapia com <i>laser</i> em baixa intensidade	
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Animais de experimentação	
4.2 Características da fonte de luz	
4.3 Procedimento experimental	
4.4 Ato cirúrgico	
4.5 Irradiação <i>laser</i>	
4.6 Remoção das amostras	
4.7 Confecção do material histológico	
4.8 Análise	
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Análise morfológica	
5.2 Análise quantitativa	
5.2.1 Vasos	
5.2.2 Fibroblastos	
5.2.3 Polimorfonucleares.	
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÕES.....	43
8 APÊNDICE.....	44
9 REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização inicia-se após a inflamação. O organismo busca substituir os tecidos que foram destruídos na área da lesão, reconstruindo a sua morfologia no maior nível possível de funcionamento (PARIZOTTO, 1998).

O *laser* em baixa intensidade vem sendo utilizado no tratamento de patologias na área médica desde 1971, quando MESTER iniciou seus estudos sobre a ação do *laser* na aceleração da cicatrização de tecidos lesados.

A indicação do uso do *laser* em baixa intensidade está direcionada para aquelas situações clínicas onde se procura acelerar o processo de cicatrização, podendo proporcionar efeitos analgésicos, antiinflamatórios e biomoduladores, ou seja, assume um papel modulador das funções celulares (MEDRADO et al., 2003; RIBEIRO, 2000; RODRIGUES, 2001; TRELLES, RIGAU, VELEZ, 2000).

Estudos em humanos mostraram a diminuição da sintomatologia dolorosa, além de uma aceleração no processo de cicatrização, quando se utiliza terapia com auxílio de *laser* em baixa intensidade sobre feridas na mucosa oral (AMORIM, 2001; REZENDE, 2001).

A possível aceleração da cicatrização pós-cirúrgica proporcionada pelo uso do *laser* em baixa intensidade, segundo Garcia, 1992; Ribeiro, 2000; Simunovic, 2000, pode ser útil em periodontia e está relacionada com certos efeitos tais como de estimulação do crescimento celular (tecido conjuntivo, tendinoso, ósseo); regeneração celular (maior em células nervosas); efeito antiinflamatório (reduz a habilidade dos linfócitos reagirem aos estímulos antigênicos); redução de edema e

revascularização (maior regeneração de vasos linfáticos e veias), e redução de fibrose na formação tissular após injúrias ao tecidos.

Na dificuldade de estudarmos em um único modelo experimental todos os fenômenos que ocorrem desde o início da lesão até o final da reparação, autores estudaram os efeitos do *laser* em baixa intensidade em diferentes fases do processo de reparação, concluindo que a passagem mais rápida pela fase inflamatória aguda, antecipando a entrada na fase da maturação do tecido de granulação, resultaria numa aceleração da cicatrização nas amostras irradiadas (DYSON, 2000; EL SAYED, DYSON, 1996).

Apesar dos trabalhos que utilizaram a terapia com *laser* em baixa intensidade mostrarem uma melhora no processo cicatricial, ainda faltam estudos que possam evidenciar de maneira mais clara seu mecanismo de ação.

Com a intenção de oferecer ao paciente um maior conforto no período pós-operatório, utilizando *laser* em baixa intensidade como auxiliar em procedimentos cirúrgicos periodontais, desenvolvemos nosso estudo em ratos como modelo experimental para que houvesse a possibilidade de observarmos histologicamente os fenômenos ocorridos durante o processo de cicatrização tecidual por segunda intenção.

2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da terapia com *laser* em baixa intensidade em feridas produzidas na mucosa oral de ratos, através da observação histológica por meio de microscopia óptica de luz, da morfologia e quantidade de fibroblastos, polimorfonucleares e vasos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Descritos na literatura, existem vários tipos de *laser* classificados de acordo com seu comprimento de onda e aplicações. Procuramos salientar os trabalhos que utilizaram a terapia com *laser* em baixa intensidade utilizando os que apresentam comprimento de onda (λ) na faixa do vermelho ao infravermelho próximo do espectro eletromagnético ($\lambda=630$ a 900nm , aproximadamente).

3.1 *laser* e suas propriedades

A terapia com *laser* em baixa intensidade é ainda relativamente recente. Os dados resultantes das pesquisas até então realizadas, são discordantes, gerando conflitos devido à falta de um protocolo comum de pesquisa e adoção de modelos e métodos passíveis de serem reproduzidos (RIBEIRO, ZECELL, 2004).

A partir do desenvolvimento do *laser* em 1960, houve um interesse por parte da comunidade científica, a fim de investigar essa tecnologia e suas possíveis aplicações nas áreas da Biologia, Medicina e Odontologia. O entendimento das interações da luz *laser* com os tecidos biológicos parte dos mesmos princípios básicos da interação da luz com a matéria em geral, ou seja, a radiação pode ser refletida, transmitida, absorvida e/ou espalhada. A luz *laser*, por outro lado, tem características próprias, tais como alta monocromaticidade e coerência temporal e espacial (que leva a conhecida capacidade de colimação desta luz). A

monocromaticidade vem do fato dos sistemas *lasers* emitirem luz em uma banda estreita de frequências. A coerência temporal indica que as diferentes ondas mantêm relação fixa entre as respectivas fases, no tempo. A coerência espacial é dependente da geometria do sistema *laser*, que em geral origina um feixe com relação também fixa entre as fases espaciais das ondas. As características de coerência são, na maioria dos *lasers*, muito maiores que em fontes tradicionais de luz. (GUTKECHT, EDUARDO, 2004; RIBEIRO, ZECELL 2004).

3.2 *laser* e sua interação com o tecido

Os tecidos biológicos são descritos como meios absorvedores opticamente não homogêneos, com índice de refração mais alto que o do ar.

Assim, na interface ar-biotecido, uma parte da radiação é refletida, e a outra parte penetra no tecido.

A exposição de um corpo à radiação *laser* em baixa intensidade, com uma densidade de potência de alguns mW/cm^2 , minimiza a possibilidade da manifestação de efeitos térmicos, já que a intensidade utilizada é baixa o bastante para que a temperatura não ultrapasse $37,5^\circ\text{C}$ (RIBEIRO, ZECELL 2004). Os efeitos obtidos são então descritos como fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos.

Neste caso, a absorção nos tecidos ocorre pelos cromóforos naturais, tais como o grupo heme da hemoglobina, melanina e citocromos da cadeia respiratória nas mitocôndrias. Enquanto penetra no tecido, o feixe *laser* diverge e é atenuado devido a múltiplos espalhamentos e à absorção. O espalhamento

resulta das diferenças entre os índices de refração das heterogeneidades do meio, correspondendo às diferenças físicas e anatômicas.

A distribuição espacial e a intensidade da luz espalhada dependem do tamanho e do formato destas microestruturas para cada comprimento de onda e da diferença entre o índice de refração do meio e dessas heterogeneidades.

Quando um fóton se propaga no meio, ele pode colidir com uma partícula ou uma microestrutura, cujo índice de refração é diferente do meio de propagação e, neste caso, ele muda sua direção de propagação inicial (RIBEIRO, 2000).

No intervalo de comprimentos de onda mais curtos do espectro visível, profundidade de penetração no tecido varia de 0,5mm a 2,5mm. Neste caso há absorção e espalhamento, sem que nenhuma prevaleça. A profundidade de penetração aumenta para cerca de 8 a 10mm no intervalo de $\lambda=600\text{nm}$ a 1.500nm , sendo que nesta faixa o espalhamento predomina em relação à absorção (RIBEIRO, 2000).

Acredita-se que o ponto mais relevante na interação laser-tecido seja uma alteração do estado redox celular: uma variação buscando oxidação é associada com estimulação da vitalidade celular e uma variação buscando redução é ligada à inibição. Células com pH mais baixo que o normal, onde o estado redox é alterado na direção reduzida, são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora de luz do que aquelas com os respectivos parâmetros sendo ótimos ou próximos ao ótimo. Esta circunstância explica as possíveis variações nas magnitudes observadas com os efeitos do *laser* em baixa intensidade em células normais e alteradas. O mecanismo de regulação redox proposto pode ser uma explicação fundamental para alguns efeitos clínicos da radiação, por exemplo, os

resultados positivos alcançados no tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambos caracterizados por acidose e hipóxia (RIBEIRO, ZECELL, 2004; KARU, 2000).

Para Karu 1989, a luz visível (vermelha) produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo celular, conduzindo a transdução do sinal a outras partes da célula conferindo uma fotorresposta (biomodulação).

Segundo Smith, a radiação infravermelha inicia seus eventos através dos canais de cálcio, localizados na membrana celular, gerando um campo energético (efeitos fotofísicos) conduzindo a mesma resposta final efetuada pela radiação vermelha.

3.3 Reparação tecidual

A cicatrização das feridas ocorre como um fenômeno complexo e ordenado, que envolve vários processos bem orquestrados, incluindo regeneração de células, síntese de proteínas da matriz extracelular, remodelamento do tecido conjuntivo e colagenização e aquisição de resistência da ferida. São de fundamental importância o papel dos fatores de crescimento na produção de migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais, na formação do tecido conjuntivo e no crescimento de novos vasos. Igualmente importantes na cicatrização das feridas são as influências de interações entre as células e a matriz extracelular sobre os mesmos processos de migração, proliferação e diferenciação celular. A incisão causa morte de um número limitado

de células epiteliais e células do tecido conjuntivo, bem como ruptura da continuidade da lâmina basal epitelial. Quando há aproximação dos bordos da ferida por suturas cirúrgicas, esta união é denominada de cicatrização por primeira intenção. Quando há perda extensa de células e tecidos, como ocorre em ulceração inflamatória e feridas superficiais, uma grande falha tecidual deve ser preenchida e a regeneração das células epiteliais não pode reconstituir completamente a arquitetura original. O tecido de granulação abundante cresce da borda para completar o reparo, caracterizando a união secundária ou cicatrização por segunda intenção (ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMMAR, V., 1998).

3.4 *laser* e reparação tecidual

3.4.1 Respostas positivas para terapia com *laser* em baixa intensidade

Para se entender os mecanismos de ação dos efeitos produzidos pela terapia com *laser* em baixa intensidade em reparação tecidual, autores descreveram certos eventos celulares que podem ocorrer durante este processo. Aumento da população e degranulação de mastócitos, proliferação de queratinócitos e angiogênese são alguns dos efeitos estudados e descritos na literatura (SAYED, DYSON, 1996; DYSON, 2000).

Os trabalhos na literatura surgiram com o intuito de aprofundar as investigações sobre os efeitos biológicos dessa terapêutica, avaliando os efeitos

antiálgico, bioestimulante e antiedematoso no tratamento de: gengivite ulcerosa, carcinomas, lesões periapicais, periodontite, nevralgia do trigêmeo.

Evidenciaram, também, um aumento do metabolismo e conseqüentemente melhora no processo de reparação (BENEDICENTI, LUPPI, 1983; BENEDICENTI, MARTINO, 1983; SMITH, 1991; KARU, 1995).

A radiação deve ser absorvida para produzir uma mudança física e/ou química que resulte em uma resposta biológica. Essa resposta dependerá da dose ótima de radiação em um determinado comprimento de onda para produzir o efeito (RIBEIRO, ZECELL, 2004).

O espectro de absorção de um sistema biológico mostrará quais os comprimentos de onda da radiação serão absorvidos e, portanto, têm a chance de produzir um efeito (RIBEIRO, ZECELL, 2004).

Autores que estudaram *in vitro* os efeitos da fotobiomodulação mostraram que o espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos em humanos (células que sintetizam o colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas estruturais), possuem várias bandas de absorção, entre elas, uma centrada em $\lambda=630\text{nm}$ (BRUEGEL, BAR, 1992).

A utilização do *laser* em baixa intensidade pode produzir efeitos em outras partes do organismo, à distância, provocando um efeito sistêmico (MESTER, 1999, MESTER et al, 2000; ROCKIND 1989).

Uma possível razão para o efeito sistêmico é o de que as células que sofreram irradiação produzam substâncias que se espalham e circulam pelos vasos sanguíneos e pelo sistema linfático (BHAGWANANI, BHATIA, SHARMA, 1996).

É importante adequar o tipo de *laser* para cada tratamento. A literatura sugere que o *laser* de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$) é a melhor opção para herpes, regeneração nervosa e cicatrização de feridas abertas; o *laser* de GaAs ($\lambda=904\text{nm}$) seria a melhor escolha para tratamentos de dor pós-operatória e inchaço; o *laser* de GaAlAs ($\lambda=790\text{nm}$ ou 830nm) pode ser uma boa opção para tratamento de tendinites e úlceras crônicas (BHAGWANANI, BHATIA, SHARMA, 1996; ZYRYANOV et al., 1996; TUNER, HODE, 1998).

Estudos realizados com células em cultura, identificaram que a terapia com *laser* foi satisfatória quando comparada ao controle, observando-se uma redução inflamatória, indução no aumento de colágeno e proliferação de miofibroblastos (KARU, 2000; PEREIRA et al., 2003; MEDRADO, et al., 2003).

Nestes estudos, concluiu-se que com doses "pequenas" não há efeito terapêutico, e com doses "altas", o efeito é inibido.

A polarização da radiação *laser*, por outro lado, pode ser um importante fator na aceleração da reparação de queimaduras de pele e o grau de polarização é mais preservado em tecidos com uma condição patológica (como uma queimadura), como uma queimadura, quando comparado a tecido sadio (RIBEIRO et al., 2004).

Os resultados obtidos demonstraram que a direção de polarização do campo elétrico, uma vez que é alinhada paralelamente a uma "direção preferencial" no animal, afeta o processo cicatricial, particularmente a formação do tecido conjuntivo na derme, constituindo um importante fator para a aceleração da cicatrização de lesões inflamatórias. Os fenômenos como melhor organização das moléculas de colágeno, aumento do diâmetro das fibras, formação de feixes mais

esessos e melhor direcionalidade foram algumas das evidências que apontam para uma atuação positiva do *laser* sobre o colágeno (RIBEIRO, 2000; RIBEIRO et al., 2004; PARIZOTTO, 1998).

Estudos sobre a Intensidade ($I=P/A$) demonstraram que os efeitos da terapia com *laser* estão na dependência do comprimento de onda e da intensidade limiar da luz, onde a irradiação total e a densidade de energia necessária para a bioestimulação são inter-relacionada dentro de uma mesma equação. A intensidade necessária para estimulação deve ultrapassar a intensidade limiar (SOMMER et al., 2001)

Vários autores demonstraram a aceleração da cicatrização, após a terapia com *laser* em baixa intensidade. Braekt et al. 1991 demonstraram esses efeitos em palato de cão; Amorim 2000 e Rodrigues 2001 em gengiva e mucosa oral de humanos.

Nesta aceleração da reparação tecidual, observa-se uma passagem mais rápida pela fase da inflamação aguda, entrando-se antecipadamente na fase de maturação do tecido de granulação antecipadamente (DYSON, 2000).

Os efeitos da terapia laser dependem de forma crucial do tempo de irradiação e da intensidade da luz, que deve ser maior que um certo valor de limiar.

Intensidades mais baixas que a ideal não resultam em efeitos bioestimuladores, mesmo prolongando-se o tempo de irradiação. (SOMMER et al., 2001).

Ao produto da intensidade da luz e o tempo total de irradiação costuma-se denominar densidade de energia aplicada (ou fluência total). Muitas pesquisas tem sido realizadas para se obter valores ótimos dos parâmetros (intensidade,

tempo) nas áreas de cicatrização reparação óssea e diminuição da sintomatologia dolorosa. Em diversos trabalhos, a análise estatística comparativa dos resultados tem indicado que além da aceleração do processo de reparação, houve diminuição da sintomatologia dolorosa, sugerindo assim a utilização desta técnica pela simplicidade de seu uso e eficiência dos resultados (JANAS, JANAS, 2001; RODRIGUES, 2001; SAWAZAKI, 2001, RESENDE, 2001; AMORIM, 2001; GARCIA, 1992; SOUSA, 2001; TRELLES, RIGAU, VELEZ, 2000).

3.4.2 Respostas negativas para terapia com *laser* em baixa intensidade.

Alguns trabalhos observaram resultados não conclusivos e, muitas vezes, conflitantes ou inconsistentes, relatando na sua maioria casos clínicos ou observacionais (TUNER, HODE, 1998; RIBEIRO, ZECELL, 2004).

Pesquisas realizadas com cultura de células investigaram os efeitos do *laser* em baixa intensidade na proliferação de fibroblastos gengivais humanos. Os resultados foram evidentes quanto à proliferação, mas a duração deste incremento celular foi limitada (KREISLER, 2002).

Trabalhos realizados em ratos, tanto em mucosas quanto em dorso, tiveram seus resultados comparativos sem diferença estatística entre o grupo controle e lesões que receberam *laser* em baixa intensidade como parte do tratamento (CARUSO et al., 1990; HALL et al., 1994; KREISLER et al., 2002). Estes estudos demonstraram que não houve diferença estatística que justificasse a utilização de *laser* em baixa intensidade como parte do tratamento de feridas cicatriciais devido

à ausência de efeito sobre a contração dos feridas e reação inflamatória gengival (BRAEKT et al., 1991; RYDEN et al., 1994).

Ryden et al., 1994 observaram os efeitos do *laser* em baixa intensidade (infravermelho 904nm) em gengivite induzida em um grupo de 10 estudantes, que permaneceram 28 dias sem higiene oral. Nos dias 21 e 24 a margem gengival dos incisivos mandibulares foi irradiada por 4 minutos, resultando 1J como energia total. Como controle foi observada a mesma região da margem gengival dos incisivos superiores com formação de placa e sangramento gengival. A reação gengival era avaliada através de fotografias ("stereofotographic method") sobre as quais se calculava o aumento do número de vasos da região experimental, logo após a exposição à irradiação *laser* ou a área controle. Como resultado, não houve diferença estatística entre os dois sítios, sugerindo assim, que a terapia com *laser* em baixa intensidade não teve influência sobre a reação inflamatória gengival.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus Norvegicus, albinus, Wistar*), com massa corpórea variando entre 350g e 450g, machos, sadios e em condições de serem utilizados para o experimento proposto. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Pesquisas Energética e Nuclear, IPEN, e, o estudo foi submetido e obteve sua aprovação do Comitê de Ética e Manipulação e Experimentação em Animais (CEMEA), em acordo com a legislação do Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA). (APÊNDICE-A)

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

4.2 Características da fonte de luz

TWIN *laser* MM OPTICS LTDA (Figura 4.1),

Laser: CW (emissão contínua),

Meio ativo: semicondutor (Arseneto de Gálio Alumínio),

Comprimento de onda: 630nm (Vermelho),

Ponta de aplicação metálica onde estão colocados uma lente, e uma janela de vidro óptico para colimação do feixe *laser*.

Angulação da ponteira: 50°,

Área do feixe *laser* de saída: 4.0mm²; Classe IIIb.

Potência máxima: 40mW

Potência utilizada: 30mW

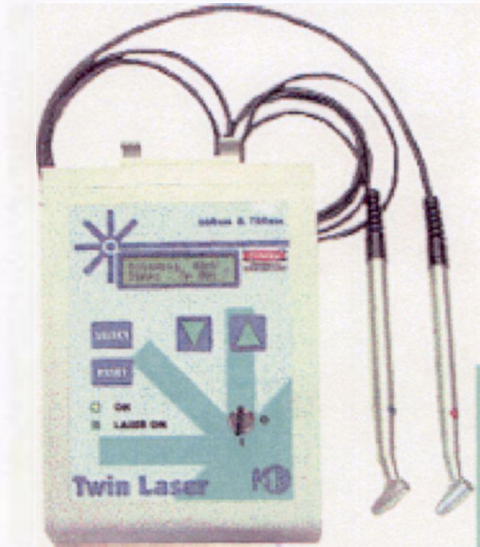


Fig. 4.1: Aparelho de *laser* em baixa intensidade utilizado no experimento

4.3 Procedimento experimental

A assepsia no local da punção foi realizada com uma gaze estéril embebida em uma solução de álcool hidratado a 70%. A inoculação do anestésico, na região intraperitoneal, foi realizada com uma seringa descartável tipo “Luer”. Os animais foram anestesiados via intramuscular com Zoletil® (Zolepam Tiletamina) 0,2ml/100g. Os 40 ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo “0 hora”, Grupo “03 dias”, Grupo “07 dias”, e Grupo “14 dias”, contendo 10 animais em cada grupo, representando seus respectivos períodos de eutanásia, após o experimento.



Fig. 4.2: contenção do animal na prancha de madeira após a anestesia

Cada animal foi mantido em uma prancha de contenção, em decúbito dorsal, e liberado imediatamente após o experimento realizado (Figura 4.2).

4.4 Ato cirúrgico:

Criada as condições de trabalho, foram removidos dois fragmentos circulares da mucosa oral na altura do molar superior, paralelamente ao plano oclusal, direita e esquerda de cada animal, com auxílio de um “punch” de 3.0mm de diâmetro e fixado para 2.0mm de profundidade. Como referência, foi considerada a comissura labial no sentido antero-posterior (Figura 4.3).

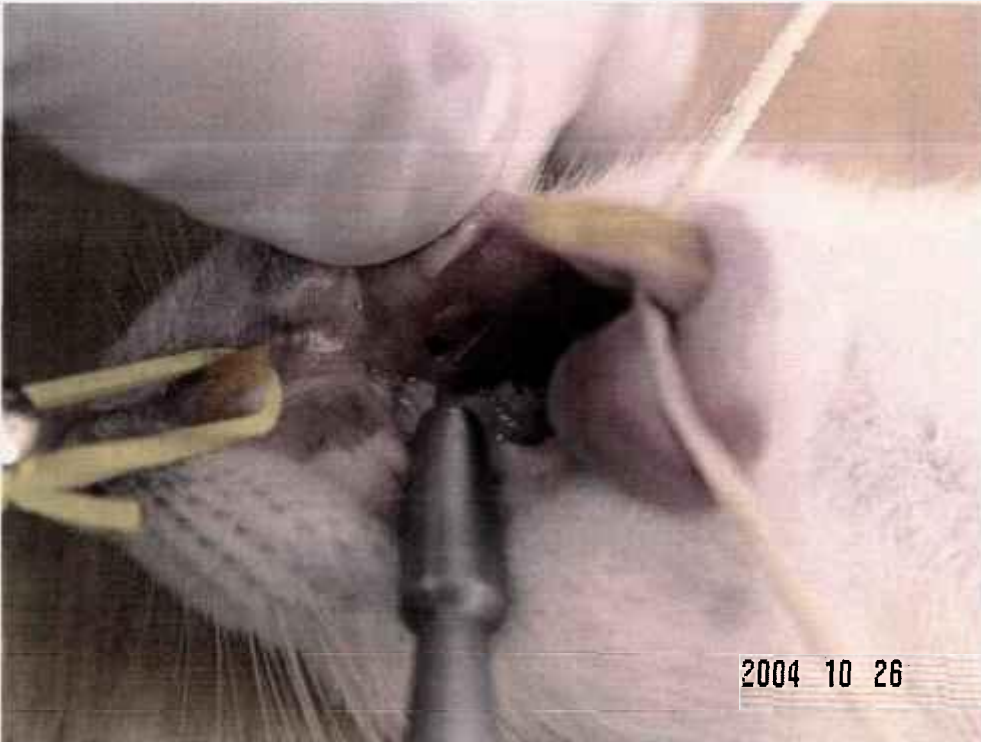


Fig. 4.3: ferida cirúrgica na mucosa oral, realizada com um “punch”

4.5 Irradiação *laser*.

Após a retirada dos fragmentos, somente o lado esquerdo foi irradiado, de forma homogênea (Figura 4.3), por 25 segundos ($T=25$ s), e uma distância de aproximadamente 10mm entre a terminação da ponta de irradiação e o tecido, o que corresponde a uma área do feixe de $0,5\text{cm}^2$ ($A=0,5\text{cm}^2$), conforme a figura 4.4. A área das lesões por sua vez é de 0.07cm^2 .

A potência do laser foi ajustada para 30mW. A intensidade *laser* utilizada foi portanto de $I=P/A= 60\text{mW}/\text{cm}^2$ e $D= I.T= 1,5\text{J}/\text{cm}^2$.

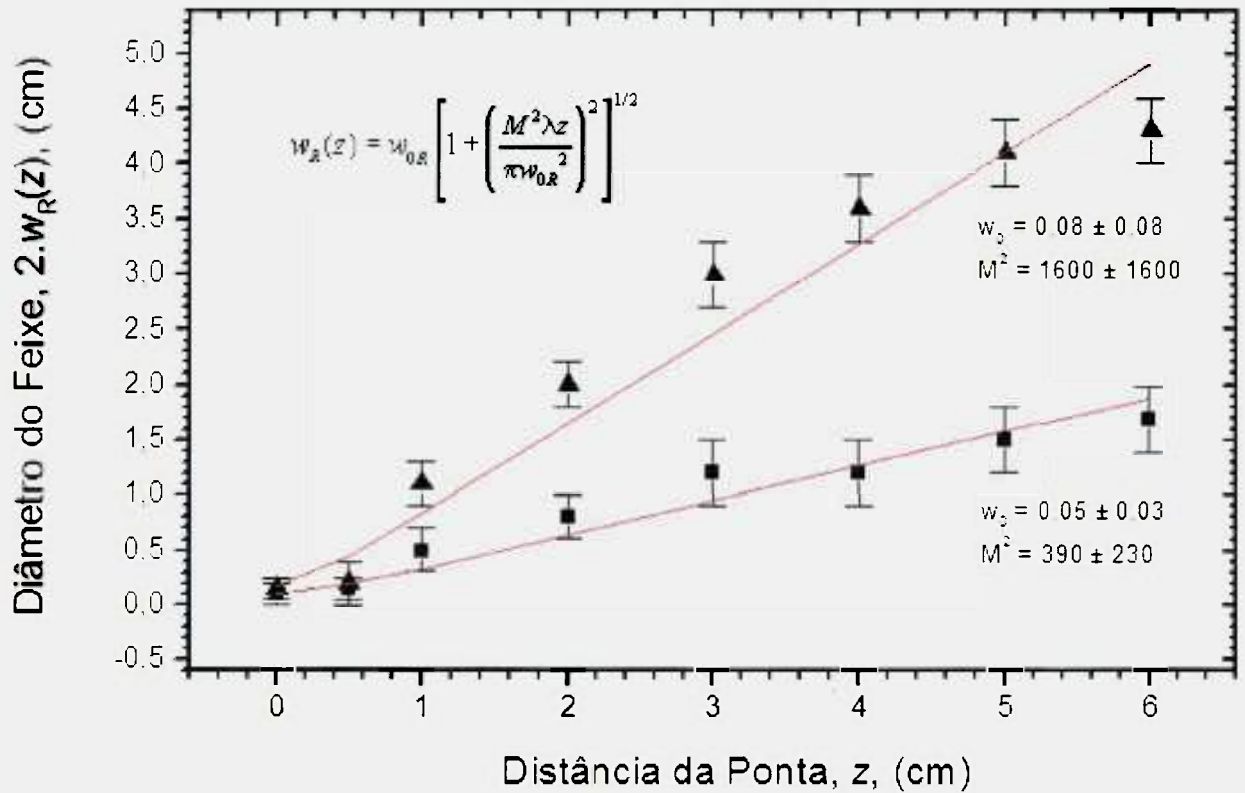


Fig. 4.4: Gráfico representando o cálculo da intensidade para a distância de 10mm da saída do feixe laser até a ferida, forma homogeneia de irradiação.

A ponta ativa do aparelho *laser* foi protegida com filme PVC, e a potência de saída do feixe *laser* foi aferida com auxilio de um medidor de potência *laser*.



Fig. 4.5: irradiação do feixe *laser* em baixa intensidade

4.6 Remoção das amostras

Seguindo a cronologia dos grupos, as amostras foram retiradas por meio de uma biópsia com margem de segurança depois da sedação dos animais, e após a retirada dos dois fragmentos, os animais sofreram eutanásia em câmara de CO₂.

As amostras foram devidamente armazenadas em solução de formol tamponado a 10%, individualmente, em coletor universal, e levadas para serem processadas histologicamente (Figura 4.6).

4.7 Confeção e análise do material histológico

Toda a biópsia foi incluída em parafina, orientada de forma a permitir cortes longitudinais, abrangendo toda a extensão da lesão em profundidade, semi-seriados com 6.0 μ m de espessura. Os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina.

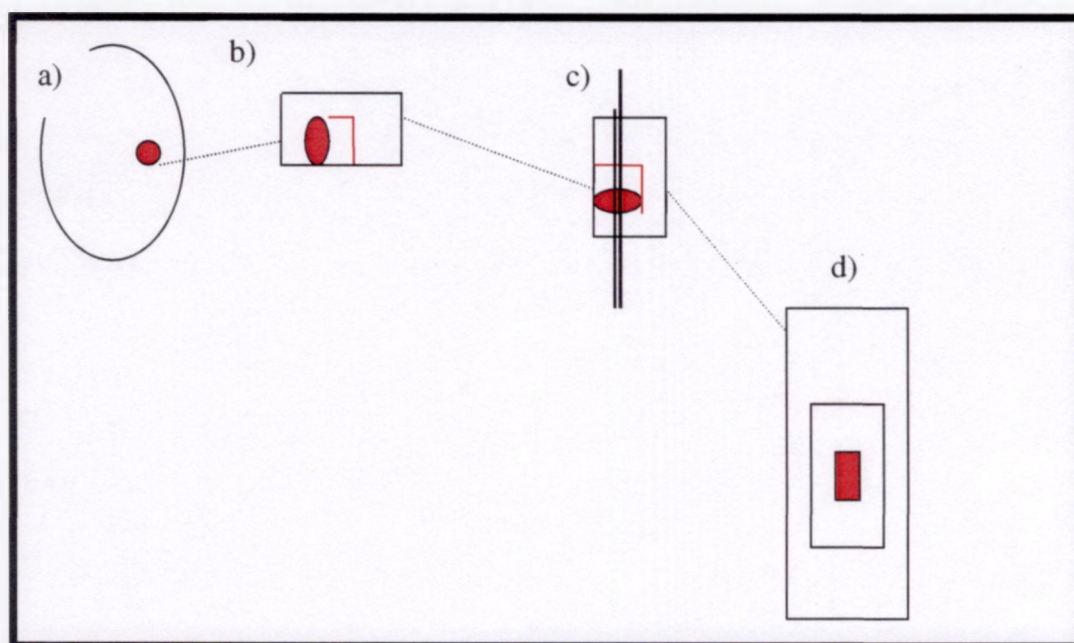


Fig. 4.6 Esquema representativo da confecção das lâminas: a) fragmento removido da mucosa oral do rato; b) inclusão em parafina; c) cortes semi-seriados de 6.0 μ m realizados pelo micrótomo; d) lâmina pronta para ser observada através do microscópio óptico.

4.8 Análise histológica

A análise histológica, morfológica (semi-quantitativa), e quantitativa. Foram estabelecidos os seguintes parâmetros de magnificância de 200x e 400x para análise morfológica do: infiltrado de polimorfonucleares (infiltrado inflamatório), vasos e fibras colágenas. Foram selecionadas, aleatoriamente, 10 lâminas de

cada grupo e de cada período do experimento, através da observação com auxílio do microscópio óptico de luz, do departamento de Patologia da Universidade de Mogi das Cruzes, realizada pela histologista responsável pelo Departamento.

A análise quantitativa foi realizada na magnificância de 400x, através do programa computadorizado denominado "Image Lab" com 640x480 pixels, desenvolvido pelo Prof. Dr. Moacyr Domingos Novelli, do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Para esta análise foram selecionadas, aleatoriamente, quatro amostras de cada grupo e de cada período do experimento. As comparações entre os grupos experimentais foram feitas separadamente para cada medida, primeiramente de forma descritiva, através de gráficos e tabelas e depois verificando se as diferenças observadas são ou não significativas. Para tal foi acompanhado um total de 16 ratos. Para testar se existe diferença significativa entre os grupos em cada um dos momentos, utilizou-se um *teste t-pareado*, o qual leva em consideração que o mesmo rato foi o seu controle.

Para testar se existe diferença significativa entre os momentos, utilizou-se um *teste t-Student* para comparar as médias.

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológica :

Os números da Tabela 5.1 representam a intensidade (leve, moderada ou intensa) dos eventos histológicos observados em cada momento do experimento: presença de polimorfonucleares, vasos e fibras colágenas.

Esses eventos estão representados nas figuras 5.1 a 5.6.

Tabela 5.1- Intensidade do aparecimento de polimorfonucleares, fibras colágenas e vasos em cada momento , para cada grupo experimental.

Grupos	0 hora	0 hora	03 dias	03 dias	07 dias	07 dias	14 dias	14 dias
Laser e Controle	L	C	L	C	L	C	L	C
Vasos	1	1	1	1	1	1	3	2
Fibras colágenas	1	1	1	1	1	1	3	2
Polimorfo Nucleares	1	1	3	1	1	1	1	1

1= leve, 2= moderado, 3= intenso, L= laser, C= controle. A tabela acima descreve a intensidade dos fenômenos ocorridos no decorrer do experimento.

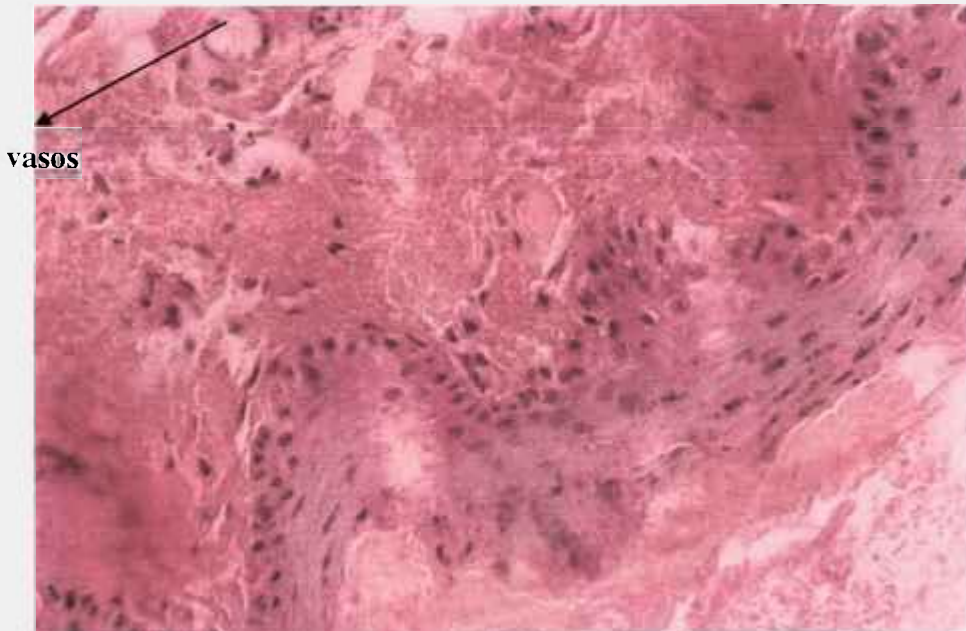


Fig. 5.1 Grupo "0 hora" - controle (aumento de 400x) Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.

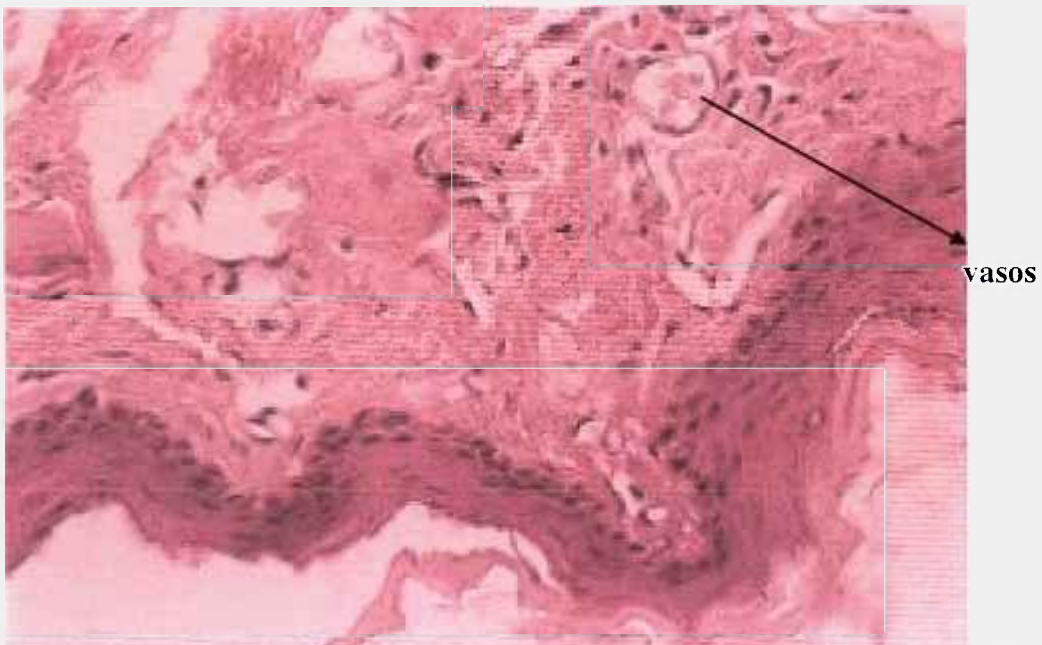


Fig. 5.2 Grupo "0 hora" - laser (aumento de 400x) Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.



Fig. 5.3 Grupo "03 dias"- controle (aumento de 200x), área delimitada mostrando os polimorfonucleares. Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.



Fig. 5.4 Grupo "03 dias" - laser (aumento de 200x)Fig. 10: *laser*. Grupo "03 dias" (200x), área delimitada mostrando os polimorfonucleares. Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.

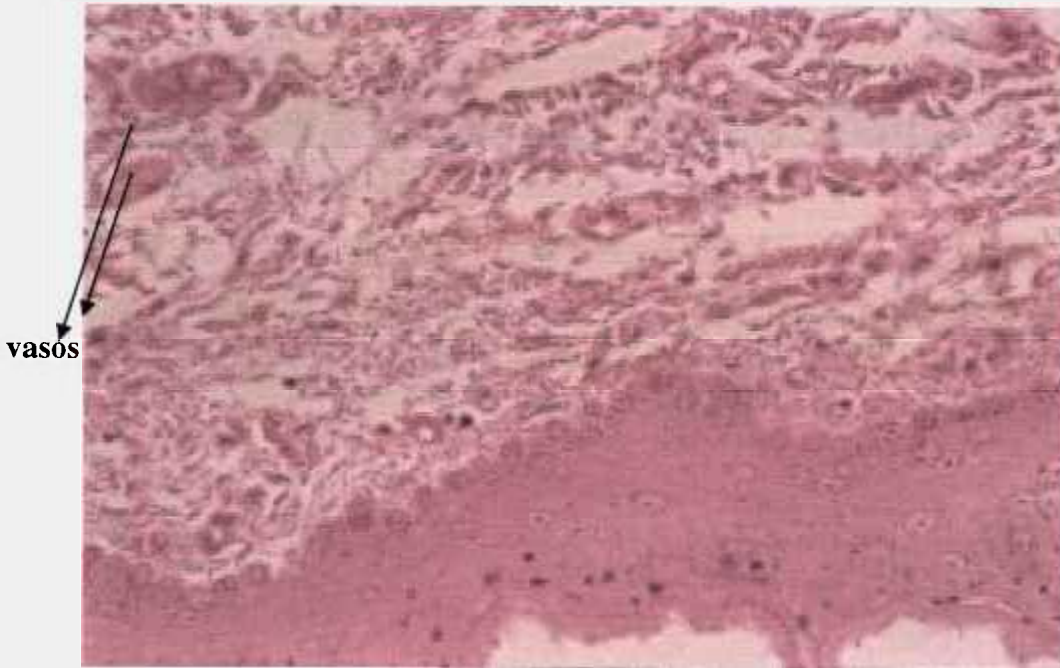


Fig. 5.5 Grupo "14 dias" - controle (aumento de 400x) Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.

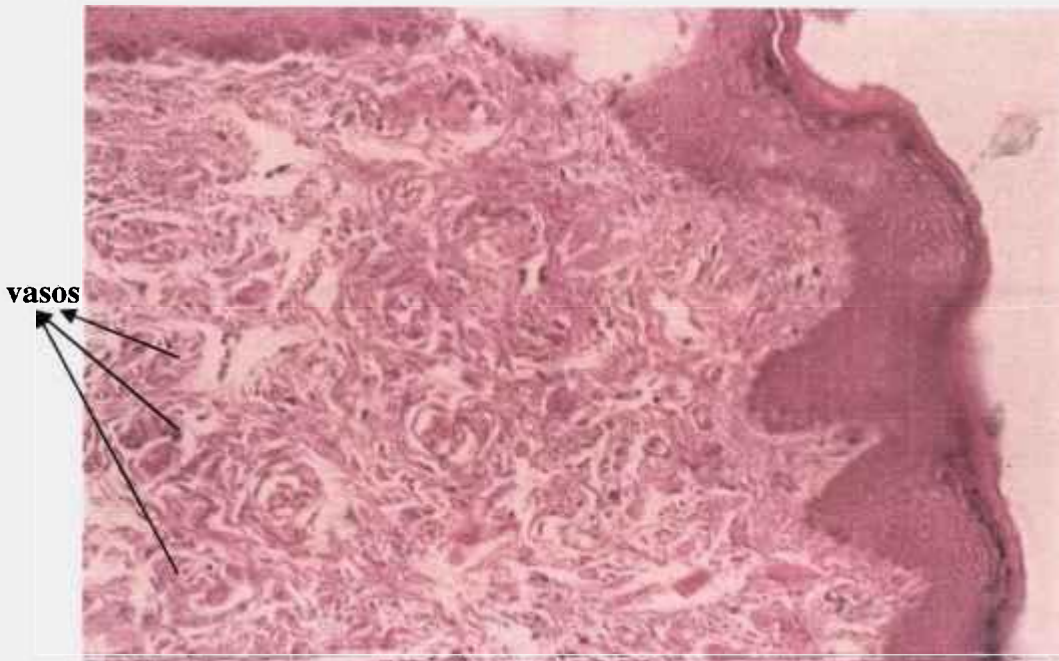


Fig. 5.6 Grupo "14 dias" - laser (aumento de 400x) Tecido conjuntivo da mucosa jugal na cavidade bucal de rato.

Descrição das amostras histológicas:

Figura 5.1 (0 hora-controle)

Tecido conjuntivo com morfologia normal contendo fibras colágenas, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibrocitos.

Figura 5.2 (0 hora-laser)

Tecido conjuntivo com morfologia normal contendo fibras colágenas, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibrocitos.

Figura 5.3 (03 dias-controle)

Tecido conjuntivo com discreto infiltrado de polimorfonucleares.

Figura 5.4 (03 dias-laser)

Tecido conjuntivo com aumento significativo de infiltrado de polimorfonucleares.

Figura 5.5 (14 dias-controle)

Tecido conjuntivo com discreto aumento de fibras colágenas e vasos sanguíneos.

Figura 5.6 (14 dias-laser)

Tecido conjuntivo com aumento significativo de fibras colágenas e vasos sanguíneos.

5.2 Análise quantitativa:

5.2.1 Vasos

Através do Gráfico representado na figura 5.7, observou-se que nos momentos 0 hora, 3 dias e 7 dias, a diferença entre as médias dos dois grupos é quase nenhuma, mas no 14^a dia o grupo *laser* apresenta um valor médio bem mais alto. Quando comparado entre o grupo “0 hora” e “14 dias”, vemos que a variação do Controle foi pequena, aumentando em 1 ponto a média (de 5,75 para 6,75), enquanto que para o grupo *laser* o aumento da média foi de 8 pontos (de 5,25 para 13,25). Observou-se no dia 7 uma variabilidade maior nos dois grupos e no dia 14 o grupo controle com uma variabilidade maior que o *Laser*.

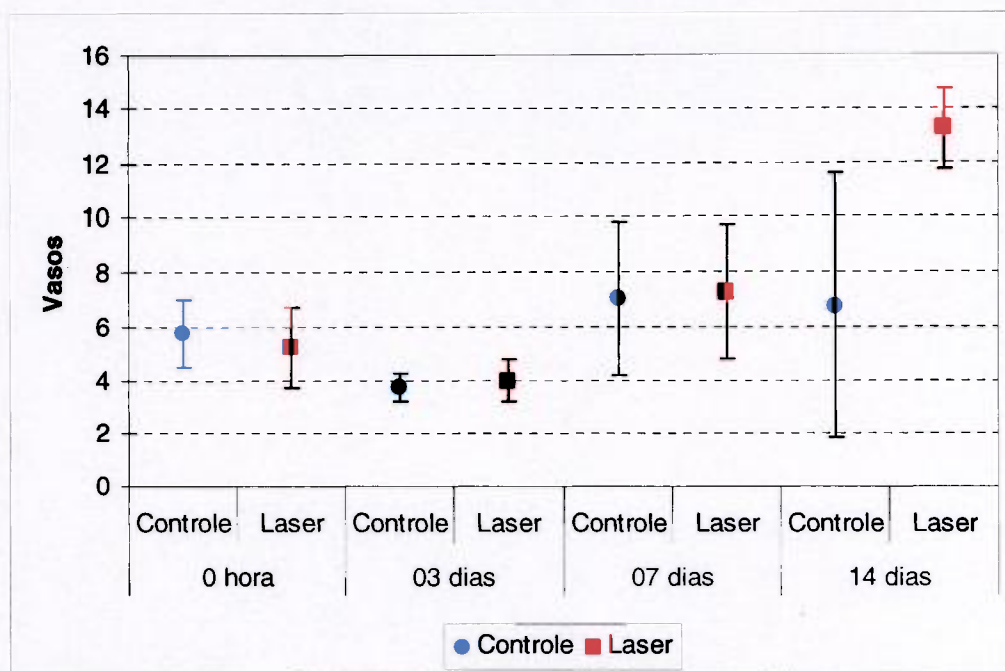


Fig. 5.7 Gráfico demonstrando as médias e desvios padrão para cada momento/grupo experimental. Os dados numéricos estão na tabela I (APÊNDICE -C).

Em nenhum dos momentos encontramos diferença significativa entre o grupo *Laser* e Controle, nem mesmo para o dia 14 podemos afirmar que a diferença é significativa. Para o grupo Controle não tivemos diferença significativa entre o momento 0 hora e 14 dias, mas para o grupo *Laser* a diferença entre os dois momentos foi significativa.

5.2.2 Fibroblastos

Foi observado que a diferença entre as médias dos dois grupos é pequena, e comparando entre o momento “0 hora” e “14 dias” (figura 5.8), vemos que a variação dos dois grupos foi relativamente próxima, com o Controle diminuindo em 11,25 ponto a média (de 26,00 para 14,75), enquanto que para o grupo *Laser* diminuiu em 12,25 pontos (de 24,00 para 11,75). Verificou-se que no dia 14 uma variabilidade menor nos dois grupos.

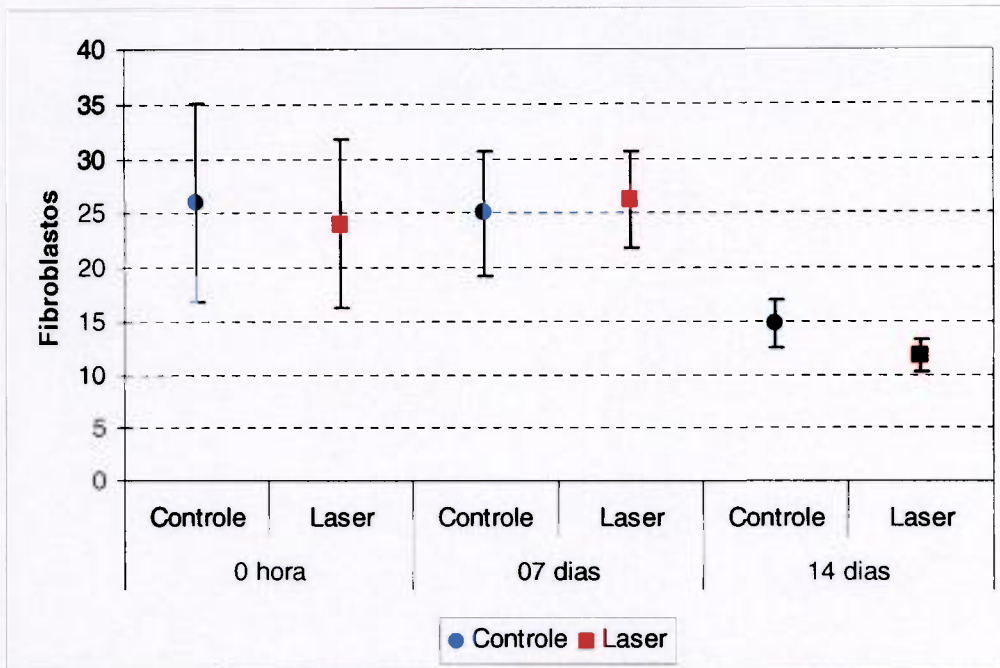


Fig. 5.8 Gráfico demonstrando as médias e desvios padrão para cada momento/grupo experimental. Os dados numéricos estão na tabela I (APÊNDICE -D).

Através do *teste t-pareado* e do *teste t-Student* observou-se que em nenhum dos momentos encontramos diferença significativa entre o grupo *laser* e Controle, e entre o momento 0 hora e 14 dias, mas para o grupo laser a diferença entre os dois momentos foi significativa.

Para o grupo *Laser* a diferença entre os dois momentos foi significativa.

5.2.3 Polimorfonucleares

Observou-se que a diferença entre as médias dos dois grupos é extremamente grande e a variabilidade deles são parecidas (figura 5.9).

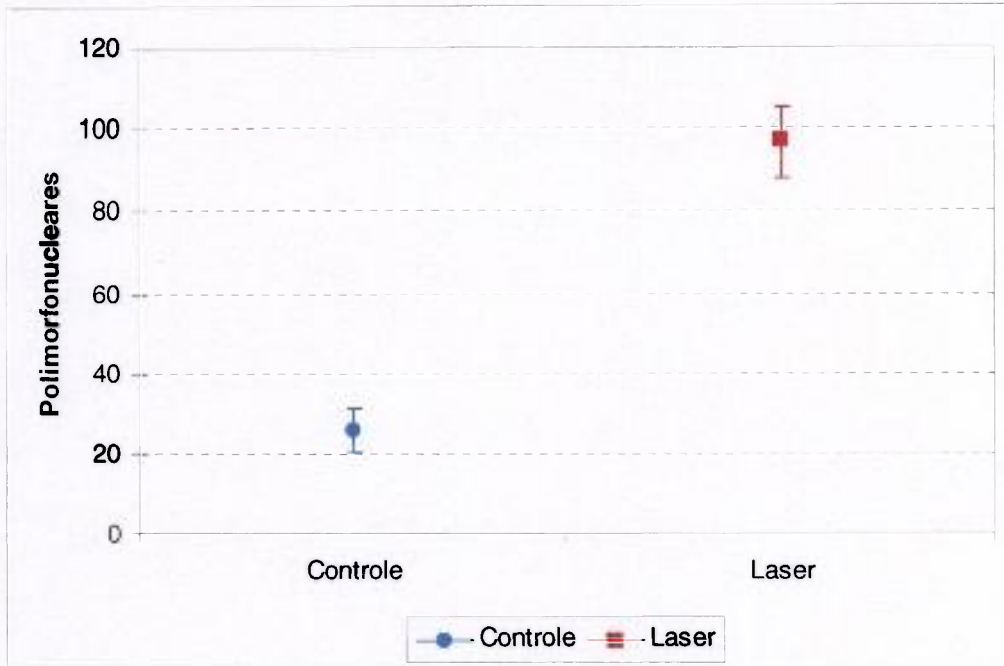


Fig. 5.9 Gráfico demonstrando as medias e desvios padrão para cada momento/grupo experimental. Os dados numéricos estão na tabela I (APÊNDICE -E).

Aplicando o *teste t-pareado* obtivemos os níveis descritivos de 0,0007, pelo qual concluímos que as medias dos dois grupos são significativamente diferentes.

6 DISCUSSÃO

Segundo Robbins, Cotran, Kumar, 1998 e Wikejo et al., 1991, os fenômenos ocorridos durante a reparação tecidual, tanto em humanos quanto em ratos se assemelham. Procuramos desenvolver nosso modelo experimental de acordo com os momentos característicos quando esses fenômenos se manifestam, (tempos de retirada das amostras para serem analisadas), observando uma semelhança com resultados histológicos da reparação tecidual descrito pelos autores. De acordo com este conhecimento da seqüência de fenômenos histológicos que ocorrem na reparação tecidual (em humanos e em ratos), após a incisão o espaço é preenchido imediatamente com sangue coagulado. Por volta do terceiro dia, neutrófilos começam a ser substituído por macrófagos, e por volta do sétimo dia, inicia-se a formação de novos vasos.

Durante o período da segunda semana, há um acúmulo contínuo de colágeno e conseqüentemente queda do número de células como fibroblastos, que são as células precursoras das fibras colágenas.

Em nossos estudos foram observados um aumento de polimorfonucleares (células de defesa) no terceiro dia, com um incremento maior estatisticamente significativo para o grupo *Laser*. Esse fenômeno poderia ser interpretado como uma resposta tecidual frente a uma agressão (irradiação *laser*), ou um incremento maior do número de células devido a bioestimulação provocada pela irradiação *laser*, favorecendo a aceleração da reparação.

Sabemos através dos estudos de Kert, Rose, 1989, que são necessários valores de Intensidade superiores a 500mW/cm^2 para a ocorrência de dano celular ao tecido irradiado. A Intensidade utilizada em nosso trabalho foi a de aproximadamente $I=50\text{mW/cm}^2$, em acordo com a Intensidade utilizada por Resende, 2000, que obteve resultados positivos com *laser* em baixa intensidade em reparação tecidual efetuadas em dorso de ratos, muito aquém daquela Intensidade mínima necessária para causar um dano celular.

Não estão esclarecidos os efeitos sistêmicos provocados pela terapia com *laser* em baixa intensidade, como descrevem Rockind et al., 1989; Mester, A., Mester, E., Mester, A., 2000, e em acordo com Ghamasari et al., 1997; Bisht et al., 1994; Ribeiro et al., 2004. Estes autores desenvolveram seus estudos utilizando o mesmo animal como controle em cicatrização com *laser* em baixa intensidade, apresentando resultados positivos estatisticamente significantes. Em nosso experimento o mesmo animal foi utilizado como controle.

A escolha dos parâmetros é fundamental para a obtenção de um bom resultado com *laser* em baixa intensidade, sendo os mais significativos a escolha do comprimento de onda do laser, densidade de energia (dose ou fluência total) e a densidade de potência (intensidade), utilizada. O número de tratamentos e as características ópticas do tecido a ser tratado são também fatores relevantes (RIBEIRO; ZECELL, 2004). Uma possível escolha ótima de parâmetros para desencadear a bioestimulação neste tipo de experimento de reparação tecidual, conforme descrito por diversos autores, envolve a utilização de densidade de energia na faixa de 1.3J/cm^2 até 5J/cm^2 , e Intensidade de aproximadamente 50mW/cm^2 . Estes valores referem-se a experimentos em feridas cicatrizadas por

segunda intenção, irradiadas com laser em baixa intensidade, obtendo uma resposta tecidual favorável (REZENDE, 2000; LUBART et al., 1993; SOMMER et al. 2001; PARIZOTTO,1998; MEDRADO et al., 2004).

Em nosso experimento, a intensidade *laser* utilizada foi 60mW/cm², e a dose total densidade de energia foi 1,5J/cm², em semelhança aos parâmetros utilizados pelos autores citados.

Em acordo com alguns autores, nosso trabalho teve como comprimento de onda na faixa do vermelho-visível do espectro eletromagnético (KARU, 2000; MEDRADO et al., 2004; RIBEIRO et al, 2004; PARIZOTTO, 1998). Estudos sobre o espectro de absorção de células como os fibroblastos, que tem por função sintetizarem colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas,(BREUGEL; BAR, 1992), observaram que estas células possuem varias bandas de absorção, situadas no comprimento de onda de $\lambda=630\text{nm}$ o mesmo utilizado em nosso experimento.

Schindl et al., 1999, verificaram um aumento do número de vasos formados em úlceras na pele irradiadas com *laser* em baixa intensidade. Observamos em nosso experimento um aumento da angiogênese no grupo *Laser* no decorrer do período experimental (14 dias).

Um aumento de polimorfonucleares também foi observado no grupo *Laser* para o terceiro dia.

As fibras colágenas tiveram um aumento considerável no 14^o dia para o grupo *Laser*, baseado e nossa observação da análise morfológica por microscopia óptica.

Quando há perda extensa de células e tecidos, como ocorre em ulceração inflamatória, e feridas superficiais, uma grande falha tecidual deve ser preenchida. A regeneração das células epiteliais não pode reconstituir completamente a arquitetura original. O tecido de granulação abundante cresce da borda para completar o reparo, caracterizando a união secundária ou cicatrização por segunda intenção, como as efetuadas em nosso modelo experimental. O aspecto que mais claramente diferencia a cicatrização primária da secundária é o fenômeno de contração da ferida, que ocorre em extensas feridas superficiais. A contração foi atribuída, ao menos em parte, à presença de miofibroblastos que são fibroblastos alterados que possuem vários dos aspectos ultra-estruturais e funcionais das células musculares lisas contráteis (ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 1998).

7 CONCLUSÃO

Observou-se que houve um incremento de polimorfonucleares nas amostras do grupo “3 dias” que sofreram irradiação com *laser* em baixa intensidade. Nas amostras do grupo “14 dias” irradiadas com *laser*, houve um aumento no número de fibras colágenas e de vasos neoformados quando comparado com o controle.

Os fenômenos histológicos ocorridos nas amostras irradiadas podem ajudar a esclarecer alguns dos mecanismos de ação do *laser* sobre feridas, que levariam a uma melhora na qualidade da reparação tecidual.

8 APÊNDICE

APÊNDICE-A: Aprovação do Comitê de Ética de Manipulação e Experimentos em Animais CEMEA.

Mogi das Cruzes, 13 de Janeiro de 2004

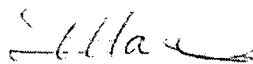
À Dra
Sílvia Cristina Tassinari

PARECER

A CEMEA/UMC, delibera que o projeto intitulado: “CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS EFEITOS DA LASERTERAPIA EM BAIXA INTENSIDADE NAS FERIDAS GENGIVAIS *IN VIVO*”, da Dra. SILVIA CRISTINA TASSINARI, sob orientação da Prof. Dr. EDSON PUIG MALDONATO, foi APROVADO.

O presente trabalho apresenta um delineamento experimental claro quanto aos sujeitos experimentais e seus grupos, obedecendo os princípios éticos que regem a utilização de animais em experimentação.

CONCLUSÃO: APROVADO.



Dr. Maurício Marques de Oliveira
Presidente CEMEA/UMC

APÊNDICE-B: Tabela 2: descrição dos parâmetros observados de polimorfonucleares, vasos e fibroblastos.

GRUPOS	VASOS	FIBROBLASTOS	POLIMORFONUCLEARES
0 hora C	06	16	
0 hora C	04	26	
0 hora C	07	24	
0 hora C	06	38	
0 hora L	04	18	
0 hora L	06	24	
0 hora L	04	19	
0 hora L	07	35	
03 dias C	04		23
03 dias C	04		25
03 dias C	03		22
03 dias C	04		34
03 dias L	05		108
03 dias L	04		95
03 dias L	03		87
03 dias L	04		98
07 dias C	11	17	
07 dias C	05	30	
07 dias C	07	28	
07 dias C	05	25	
07 dias L	10	29	
07 dias L	08	31	
07 dias L	07	23	
07 dias L	04	22	
14 dias C	04	16	
14 dias C	04	17	
14 dias C	05	14	
14 dias C	14	12	
14 dias L	12	13	
14 dias L	14	11	
14 dias L	15	10	
14 dias L	12	13	

APÊNDICE-C: Gráfico da quantidade de Vasos

Momento	Tratamento	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
0 hora	Controle	5,75	6	1,258	4	7
	Laser	5,25	5	1,5	4	7
	Diferença	0,5	0,5	2,38	-2	3
03 dias	Controle	3,75	4	0,5	3	4
	Laser	4	4	0,816	3	5
	Diferença	-0,25	0	0,5	-1	0
07 dias	Controle	7	6	2,83	5	11
	Laser	7,25	7,5	2,5	4	10
	Diferença	-0,25	0,5	1,893	-3	1
14 dias	Controle	6,75	4,5	4,86	4	14
	Laser	13,25	13	1,5	12	15
	Diferença	-6,5	-9	5,74	-10	2

APÊNDICE-D: Gráfico da quantidade de fibroblastos

Momento	Tratamento	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
0 hora	Controle	26	25	9,09	16	38
	Laser	24	21,5	7,79	18	35
	Diferença	2	2,5	2,94	-2	5
07 dias	Controle	25	26,5	5,72	17	30
	Laser	26,25	26	4,43	22	31
	Diferença	-1,25	1	7,59	-12	5
14 dias	Controle	14,75	15	2,22	12	17
	Laser	11,75	12	1,5	10	13
	Diferença	3	3,5	2,94	-1	6

APÊNDICE-E: Gráfico da quantidade de Polimorfonucleares

Momento	Tratamento	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
03 dias	Controle	26	24	5,48	22	34
	Laser	97	96,5	8,68	87	108
	Diferença	-71	-67,5	9,7	-85	-64

9 REFERÊNCIAS *

AMORIM, J. C. F. (2001). **Reparação gengival após a técnica de gengivectomia e aplicação de laser em baixa intensidade. Avaliação clínica e biométrica em humanos.** Dissertação para obtenção do título de Mestre Profissional na área de lasers em Odontologia - IPEN/FOUSP. São Paulo.

BENEDICENTI, A.; LUPI, L. (1983) **La Valutazione com Método Radioimmunológico Del Livello di Beta Endorfine nel Liquor Prima e Dopo Irradiazione di Luce laser 904nm.** Nella Nevralgia Trigeminalle. Atlante di laserterapia II edizione. Pp. 31-34. Gênova, Itália.

BENEDICENTI, A.; MARTINO, A. (1983) **La Valutazione Dell'incremento di ATP in Linfociti Sottoposti a Biostimolazione com Luce laser 904 nm. Infrared.** Atlante di laserterapia II edizione. Pp. 51-70. Gênova, Itália.

BHAGWANANI, N.S.; BATHIA, G.C.; SHARMA, N.1996. Low level nitrogen laser therapy in pulmonary tuberculosis. **Journal Of Clinical laser Medicine & Surgery.** 14:23-25.

BISHT, D.; GUPTA, S.C.; MISRA, V.; MITAL, V.P.; SHARMA, P. 1994. Effects of low-intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.** 100:43-46.

BRAEKT, M. M. H.; ALPHEN, F. A. M.; JAGTMAN, A. M. K.; MALTHA, J. C. (1991) Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Journal Of Clinical laser Medicine & Surgery.** 11: 462-470.

CARUSO, F.; GUIDA, L.; GAETA, G. M.; IUIRIO, G.; CHIEFFI BACCARI, G.(1990) Il laser in parodontologia: approccio teórico-sperimentale. Nota III-Studio sperimentale sugli effetti dei lasers He-Ne (638nm) e infrarosso diodico (904nm) sulla mucosa gengivale di ratto. **Arch. Stomatologico,** Vol.31, pp 277-289.

DYSON, M. 2000. Laser therapy in wound management, the new era. **Proceedings of Third World Congress for laser Therapy.** P.20.

EL SAYED, S.O.; DYSON, M. 1996. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Journal Of Clinical laser Medicine & Surgery.** 19:433-437.

* De acordo com "Vancouver Style"

GARCIA, V. G. (1992). **Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do raio *laser*. Estudos clínicos, biométricos e histológicos em ratos.** Tese apresentada na Faculdade de Odontologia "Campus" de Araçatuba da Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – título de Livre –Docente, Departamento de Diagnóstico e Cirurgia (disciplina de Periodontia).

GHAMSARI, S.M.; TAGUCHI, K.; ABE, N.; ACORDA, J.A.; SATO, M.; YAMADA, H. 1987. Evaluation of low level *laser* therapy on primary healing of experimentally induced full thick-ness teat wound in cattle. **Veter. Sur.** , 26:114-120.

GUTKNECHT, N; EDUARDO, C. P. (2004) **Propriedades da luz *laser*.** A Odontologia e o *laser*, edt. Quintessence, pp: 30 a 31.

HALL, GUNNAR; ANNEROTH, G.; SCHENNINGS, T.; ZETTERQVIST, L.; RYDÉN, H. (1994) Effect of low level energy *laser* irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed Dent J.** pp 29-33.

HANS, H.F.I.Van Breugel, BAR, D. 1992 Power Density and Exposure Time of He-Ne *laser* Irradiation Are More Important Than Total Energy Dose in Photo-Biomodulation of Human Fibroblasts in Vitro. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery.** 12:528-537.

JANAS, G. G.; JANAS, A. (2001). Conservative closure of antro-oral communication stimulated with *laser* light. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery.** Vol. 19, num. 4, pp 181-184.

KARU, T. (1995) Interactions of monochromatic visible light and near infrared radiation with cells: currently discussed mechanisms. In *laser* Tissue Interactions VI, S.L. Jacques and A. Katzir, eds., **Proc. SPIE** v.2391, p. 576-586. appud RIBEIRO, M. S. **Interação da Radiação *laser* Linearmente Polarizada de Baixa Intensidade com Tecidos Vivos: Efeitos na Aceleração de Cicatrização Tissular em Lesões de Pele.** Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais. IPEN 2000.

KARU, T. (2000) **Mechanisms of low-power *laser* light action on cellular level.** In: SIMUNOVIC, Z. *Lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date Clinical Application of Low-Energy Level *laser* Therapy- LLLT*, Cap. 10. Rijeka- Croácia, Vitagraf, 2000. pp. 227-242.

KREISLER, M.; CRISTOFFERS, A.; AL-HAJ, H.; WILLERSHAUSEN, B.; HOEDT B. (2002) Low level 809nm diode *laser* induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery.** 30: 365-369.

MEDRADO, A. R. A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. A. R.; ANDRADE, Z. A. (2003) Influence of low level *laser* therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery**. 32: 239-244.

MESTER, E.; SPIRI, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of *laser* rays on wound healing. **Am. J. Surg.**, 122: 532-535, 1971.

MESTER, A.; MESTER, E.; MESTER, A. **Open wound healing- bed sores, ulcers cruris, burns- with systemic effects of LLLT**. In: SIMUNOVIC, Z. *Lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date Clinical Application of Low-Energy Level *laser* Therapy- LLLT*, Cap. 10. Rijeka- Croácia, Vitagraf, 2000. pp. 227-242.

MESTER, E. A *laser* sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orv. Hetilap**. 107: 1012, 1996, apud ALMEIDA-LOPES, L. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com *laser* de baixa potência**. Dissertação de Mestrado, Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999.

PARIZOTTO, N. (1998). **Ação do *laser* de He-Ne sobre o processo de reparo tecidual: Um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica, e espectroscopia por infravermelho**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da UNICAMP como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

PEREIRA, A. N.; EDUARDO, C. P.; MATSON, E.; MARQUES, M. (2002), Effect of low-power *laser* irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery**., 31: 263-267.

REZENDE, S. B. (2001). **Ação do diodo *laser* emitindo em 830 nm, sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas: estudo biométrico e histológico em ratos**. Dissertação para obtenção do título de Mestre Profissional na área de *lasers* em Odontologia - IPEN/FOUSP. São Paulo.

RIBEIRO, M. S. **Interação da Radiação *laser* Linearmente Polarizado de Baixa Intensidade com Tecidos Vivos: Efeitos na Aceleração de Cicatrização Tissular em Lesões de Pele**. Tese de Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais. IPEN 2000.

RIBEIRO, M. S.; SILVA, D. F. T.; ARAÚJO, C. E. N.; LIVEIRA, S. F.; PELEGRINI, C. M. R. ; ZORN, T. M. T. ; ZECELL, D. M. (2004) Effects of Low-Intensity Polarized Visible *laser* Radiation on Skin Burns: A Light Microscopy Study. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery**. Vol.22 Pp.59-66.

RIBEIRO, M. S; ZECEL, D. M. (2004) ***Laser* em baixa intensidade**. A Odontologia e o *laser*, ed. Quintessence, pp: 217.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Reparo: Crescimento Celular, Regeneração e Cicatrização de Feridas**. Patologia Básica, ed. Guanabara Koogan, cap.3, p.40-50.

RODRIGUES, M. T. J. (2001). **Efeito terapêutico da irradiação com laser arseneto de gálio alumínio (λ 830nm) em lesões provocadas pelo aparelho ortodôntico fixo na cavidade oral**. Dissertação para obtenção do título de Mestre Profissional na área de *lasers* em Odontologia - IPEN/FOUSP. São Paulo.

ROSCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES D.G. 1986 Systemic effects of low-power *laser* irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wound burns. **Journal Of Clinical Laser Medicine & Surgery**. 9:174-182.

RYDÉN, H.; PERSSON, L.; PREBER, H.; BERGSTROM, J. (1994) Effect of low level energy *laser* irradiation on gingival inflammation. **Swed Dent J**. 18: 35-41.

SAWAZAKI, I. (2001). **Estudo comparativo da radiação laser em baixa intensidade sobre mastócitos de hiperplasias fibras inflamatórias coradas ou não por azul de toluidina**. Dissertação para obtenção do título de Mestre Profissional na área de *lasers* em Odontologia - IPEN/FOUSP. São Paulo.

SHINDL, A.; SHINDL, M.; SHINDL, L.; JUREKA, W.; HONIGSMANN, H.; BREIER, F. 1999. Increased dermal angiogenesis after low-intensity *laser* therapy for a chronic ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 40:481-484.

SIMUNOVIC, Z. 2000 **The healing of post-operative wounds with LLT**. SIMUNOVIC, Z. *lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date Clinical Application of Low-Energy Level Laser Therapy- LLLT*, Cap. 10. Rijeka-Croácia, Vitagraf, 2000. pp. 227-242.

SMITH, K. (1991) The photobiological basis of low level *laser* radiation therapy. **Laser Ther.**, 3:19-24.

SOMMER, A. P.; PINHEIRO, A. L. B.; MESTER, A. R.; FRANKE, R. P. ; WHELAN, H. T. (2001). Biostimulatory windows in low-intensity *laser* activation: *lasers*, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal Of Clinical Laser Medicine & Surgery**, Vol 19, pp. 29-33.

SOUZA, G. R. (2001). **Reparação óssea de lesões periapicais tratadas ou não com laser em baixa intensidade (904nm) (Estudo radiográfico em humanos)**. Dissertação para obtenção do título de Mestre Profissional na área de *lasers* em Odontologia - IPEN/FOUSP. São Paulo.

TRELLES, M.A.; RIGAU, J.; VELEZ, M. LLLT 2000 **In vivo effects on mast cells**. SIMUNOVIC, Z. *lasers in Medicine and Dentistry: Basic Science and Up-to-Date*

Clinical Application of Low-Energy Level *laser* Therapy- LLLT, Cap. 10. Rijeka-Croácia, Vitagraf, 2000. pp. 227-242.

TUNER, J.; HODE, L. (1998) It's All in the Parameters: A Critical Analysis of Some Well- Known Negatives Studies on Low – Level *laser* Therapy. **Journal Of Clinical *laser* Medicine & Surgery**. 16:245-248.

ZYRINOV, B.N.; EVTUSHENKO, V.A.; EVTUSHENKO, G.S.; SOLDATOV, A.N.; MUSABAEVA, L.I.; UDALYI, I.F.; TARASENKO, T.I.; CHERDYNTSEVA, N.V.; VUSIK, M.V.; POPORICH, V.A.; PETRAKOVA, V.S.; DIKOVICH, V.A. 1996. Copper-vapor low-intensity *laser* therapy. In: *laser* used in oncology: CIS Select Papers. A.V. Ivanov, M.A. Kazaryan, eds., **Proc. SPIE** 2728: 100-107.