Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

MARCELA BORG

**Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em
tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico**

Bauru
2010

MARCELA BORGO

**Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em
tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de mestre em
odontologia.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Bauru
2010

Borgo, Marcela

B644a Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas
em tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico /
Marcela Borgo -- Bauru, 2010.
183p.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação por processos
fotocopiadores ou outros meios eletrônicos.

Autor:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa
em Animais (CEEPA) da FOB - USP

Protocolo nº 012/2008

Data: 12 de agosto de 2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Nascimento	20 de fevereiro de 1982 Lins - SP
Filiação	José Roberto Biazzi Borg Vânia Verenhitch Borg
2000 - 2003	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP).
2004	Aperfeiçoamento em Endodontia pela Sociedade de Promoção Social do Fissurado Lábio Palatal (PROFIS), Bauru-SP.
2004	Aperfeiçoamento em Cirurgia Parendodôntica pela Associação Brasileira de Odontologia (ABO), Bauru-SP.
2004-2006	Especialização em Endodontia pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC-USP), Bauru-SP.

Dedicatória

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu pai, *José Roberto*, meu herói, exemplo de honestidade e perseverança, que se dedicou a construir um lar seguro para mim e para minha irmã, que esteve presente em todas as horas, que vibrou com as nossas vitórias e que sempre deu amor sem esperar recompensa. Pai, eu agradeço por todo o apoio que você nos deu, por tudo que nos ensinou e por toda a felicidade que nos proporcionou. Tenho muito orgulho de você e torço para que seja cada dia mais feliz.

À minha mãe, *Vânia*, pessoa iluminada, que me ensinou a valorizar as pequenas grandezas da vida. Mulher simples, forte, batalhadora, coração em forma de gente, sempre disposta a ajudar quem precisa. Mãe, você fez e faz a diferença na vida de muitas pessoas. Obrigada por me confortar nos momentos difíceis. Que Deus te ilumine e que você conquiste tudo que deseja. Conte comigo sempre.

À minha irmã *Daniella*, que por ter crescido ao meu lado e compartilhado comigo o mesmo lar, as mesmas alegrias e tristezas, muitas vezes é a única pessoa no mundo capaz de entender exatamente o que eu sinto, quem eu sou e o que penso. Obrigada por dividir comigo sua história. Admiro muito sua força, sua inteligência, sua dedicação em tudo que faz e a mulher independente que você se tornou.

Ao *Iago*.

Iago, você pra mim é um presente! Eu atribuo a você muitas das minhas conquistas. Você me ajudou a crescer, me encorajou a aprender coisas novas e sempre acreditou em mim, me mostrando que sou mais capaz do que imaginava. Admiro muito o seu caráter, a sua inteligência excepcional, a sua independência, a maneira como você me faz rir e como deixa tudo mais leve e mais simples. Você é importante para todos à sua volta. Você enriquece e alegra a minha vida. Obrigada pela sua amizade e pelo seu amor.

AMO TODOS VOCÊS!

Agradecimientos

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, *prof. Dr. Clouis Monteiro Bramante*, pela oportunidade de aprender com um dos mestres mais renomados da Endodontia brasileira, a quem admiro muito e tenho como exemplo. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, pela precisão e competência durante a orientação deste trabalho, por ser educado e paciente, por ser tão compreensivo com os atrasos. Muito obrigada por tudo que aprendi com o senhor. Sua simplicidade, dedicação, respeito pelos alunos e seu amor à profissão são lições que guardarei pra sempre!

Aos meus professores de Endodontia, *Dr. Clouis Monteiro Bramante*, *Dr. Ivaldo Gomes de Moraes*, *Dr. Norberti Bernardineli* e *Dr. Roberto Brandão Garcia*. Eu atribuo a vocês, com toda a certeza, minha escolha pela Endodontia. Não apenas pela grande admiração que tenho por vocês como professores e cientistas, mas pela maneira como vocês transformam, junto com a *D. Neide* e com o *Edimauro*, as clínicas de graduação em um ambiente agradável e humano. Eu os admiro pelo amor que vocês têm à profissão, pelo respeito com que tratam alunos e pacientes, pela prontidão em ajudar, por serem tão acessíveis. Os verdadeiros professores comemoram quando seus alunos brilham. Vocês são os verdadeiros professores.

Ao *prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes*, por me tratar sempre com muita consideração, carinho e igualdade desde a graduação.

Aos professores *Dr. Roberto Brandão Garcia* (departamento de Endodontia da FOB-USP) e *Dr. Gerson Francisco de Assis* (departamento de Histologia da FOB-USP), por todos os ensinamentos necessários para a realização das análises microscópicas e interpretação dos resultados deste estudo. Obrigada por serem tão pacientes, atenciosos e prestativos.

Aos funcionários do departamento de Endodontia da FOB-USP, *Cleide Vital Martins, Edimauro de Andrade, Neide Leandro, Patrícia Fernanda Vital Lopes e Suely Regina Bettio*, pelo respeito e pela disposição em ajudar.

À querida *D. Neide*, pelas palavras de carinho nos momentos difíceis, por ser tão doce e acolhedora. D. Neide, você é o coração do departamento de Endodontia. Que Deus te ilumine sempre!

Aos meus colegas do curso de mestrado em Endodontia, *Éricson Janolio de Camargo, Fabiana Gomes Néspoli, Melina Vieira Bortolo, Natasha Siqueira Fidelis, Paulo Leal Medeiros, Rodrigo Ricci Vivan, Ronald Ordinola Zapata e Tatiana Santos Assumpção*, pelo companheirismo, pela troca de conhecimentos, pelo apoio durante as clínicas e seminários e pelos momentos de descontração.

Às amigas *Fabiana, Melina e Natasha*, que me auxiliaram durante a parte cirúrgica da pesquisa. Meninas, poder contar com vocês num momento tão delicado foi muito importante. Saber que vocês estariam prontas pra me ajudar no que fosse preciso me proporcionou calma e confiança. Obrigada pela cautela e pelo interesse que demonstraram durante os procedimentos, sempre verificando para que tudo saísse como planejado. Obrigada também pelos momentos divertidos e pelas conversas sobre a vida! Não me esquecerei da Natasha lendo as notícias dos jornais que usávamos pra forrar as bancadas, da Melina admirando os gestos dos ratinhos e do bom humor da Fabiana.

Aos colegas do curso de doutorado em Endodontia, *Augusto Bodanezi e Carla Renata Sipert*, pelos conselhos que me ajudaram antes e durante o curso de mestrado, e à *Livia Maria Vieira Rodrigues*, pela amizade e pela ajuda nas pesquisas.

À amiga *Paloma Gagliardi Minotti*, pelo incentivo, pelo apoio e pela amizade.

À *Marta da Cunha Lima*, grande amiga e eterna parceira de clínica! Obrigada por todo apoio que me deu desde a graduação, por sua amizade, pelos momentos divertidos e por manter contato mesmo estando longe.

À *Drª. Renata Pardini Hussne* e ao *Dr. Celso Kenji Nishiyama*, por minha formação como especialista no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo, HRAC-USP. Serei eternamente grata pela oportunidade e por tudo que aprendi com vocês. É difícil descrever o quanto cresci pessoal e profissionalmente durante os dois anos de residência. Tenho orgulho da minha formação no Centrinho.

Ao *prof. Dr. Rumio Taga*, por ter permitido a realização da parte laboratorial deste estudo nas instalações do departamento de Histologia da FOB-USP.

A todos os professores, funcionários e alunos do *departamento de Histologia da FOB-USP*, por me receberem de portas abertas em seu local de trabalho e pela confiança em mim depositada, permitindo o acesso ao laboratório à noite e aos fins de semana. Agradeço à *Daniele Santi Ceolin*, à *Patrícia de Sá Montagua Germino* e à *Tânia Mary Cestari* pela imensa e fundamental ajuda durante os procedimentos laboratoriais. Dani, Pati e Tânia, a harmonia e a alegria que vocês proporcionam diariamente ao ambiente de trabalho é admirável e exemplar. Obrigada!

Ao *prof. Dr. Rafael Francisco Lia Mondelli*, por ter cedido prontamente o equipamento de laser utilizado nesta pesquisa.

Ao *prof. Dr. Jesus Carlos Andreo*, por permitir a utilização dos equipamentos de microscopia e fotografia do departamento de anatomia da FOB-USP.

Ao *prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris*, pelo auxílio com a análise estatística deste trabalho.

Ao *Carlos Eduardo Palanch Repeke*, pela confecção de parte das ilustrações deste trabalho, pela gentileza e prontidão em ajudar.

A todos os *professores do curso de mestrado*, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos funcionários da *Secretaria de Pós Graduação* da FOB-USP, pela orientação e colaboração durante todo o curso de mestrado.

Aos funcionários do *setor de Biblioteca e Documentação* da FOB-USP, pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Aos funcionários do *Biotério* da FOB-USP, *Elías Francisco Cresta, Erasmo Gonçalves da Silva, Luiz Carlos da Silva* e *Richard Nelson Guanaes Simões*, pela orientação e atenção durante os procedimentos realizados no Biotério e pelos cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

A Deus, agradeço pelas pessoas maravilhosas que colocou em minha vida e por iluminar meu caminho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À *Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo* (FOB-USP), representada pelo então diretor, *prof. Dr. Luis Fernando Pegoraro*, pelo apoio ao ensino e à pesquisa.

À *Comissão de Pós Graduação* da FOB-USP, representada pela *Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira*, pelo apoio aos alunos.

Ao *setor financeiro* da FOB-USP, pela aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, *CNPq*, pelo suporte financeiro que possibilitou a concretização desse curso.

Ao Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, *PAE*, pelo apoio financeiro.

Resumo

RESUMO

O laser de baixa potência tem sido utilizado após procedimentos cirúrgicos visando acelerar o processo de reparo tecidual. No entanto, embora esse tipo de tratamento ofereça pouco ou nenhum risco à saúde do paciente, sua eficácia ainda é controversa na literatura. Este estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito do laser de baixa potência (100 mW) sobre o processo de reparo de incisões cutâneas em dorso de ratos. Incisões de 2 cm de extensão foram confeccionadas no dorso de cinquenta e seis ratos Wistar. Após a sutura, metade dos animais recebeu laser de baixa potência em 3 pontos de aplicação, um no centro e um em cada extremidade da ferida. Em cada ponto, foi administrada uma dose de 35 J/cm² (laser de InGaAlP, 660 nm, vermelho visível). A outra metade dos animais serviu como controle. Os tecidos incisos foram avaliados microscopicamente, de forma descritiva, em períodos de 6 horas, 2, 7 e 14 dias, levando em consideração o aspecto do revestimento epitelial e do tecido conjuntivo e a magnitude da resposta inflamatória, quando presente. Para os dois primeiros períodos, foi feita também uma avaliação morfométrica, que mensurou a densidade de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e células inflamatórias no tecido conjuntivo. Na análise descritiva, as maiores diferenças foram encontradas no período de 6 horas, seguido pelo de 2 dias. Em 6 horas, o grupo tratado com laser apresentou menor resposta inflamatória que o controle e, em alguns espécimes, foi possível evidenciar início de proliferação das células do epitélio nas bordas da ferida. Em 2 dias, alguns espécimes do grupo controle ainda apresentavam células inflamatórias remanescentes, não evidenciadas no grupo laser. Nesse período, foi possível evidenciar também, em alguns espécimes do grupo laser, proliferação de fibroblastos junto às bordas da ferida. Nos períodos de 7 e 14 dias, não foram encontradas diferenças entre os grupos. Na análise morfométrica, a densidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos foi maior para o grupo laser do que para o grupo controle em ambos os períodos avaliados, com diferença estatisticamente significativa. Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que o laser de baixa potência foi capaz de controlar a resposta inflamatória e estimular o processo de reparo tecidual em feridas cutâneas em dorso de ratos.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas. Terapia a laser de baixa intensidade.

Abstract

ABSTRACT

Evaluation of wound healing process of incisions made in cutaneous tissue of rats and submitted to therapeutic laser

Low-power laser therapy has been used after surgical procedures to improve wound healing. However, although such kind of treatment offers little or no risk to the patient's health, its effectiveness remains controversial. This study was developed to evaluate the effect of low-power laser (100 mW) on the healing of skin incisions in rats. Two centimeters incisions were made on the back of fifty-six Wistar rats. After suturing, half of the animals received low-power laser application on three points, one on center and one on each end of the wound. For each point, a dose of 35 J/cm^2 (InGaAlP laser, 660 nm, visible red) was administered. The other half of the animals served as control. The incised tissues were evaluated microscopically in a descriptive way in periods of 6 hours, 2, 7 and 14 days, considering the aspects of epithelium and connective tissue and the magnitude of inflammatory response, when present. For the first two periods, it was also done a morphometric evaluation, which measured the density of fibroblasts, collagen fibers, blood vessels and inflammatory cells in the connective tissue. In descriptive analysis, the greatest differences were found in the period of 6 hours, followed by the period of 2 days. In 6 hours, the laser-treated group showed less inflammatory response than control and, in some specimens, it was possible to see the beginning of epithelium proliferation on the edges of the wound. In two days, some specimens of the control group still showed remaining inflammatory cells, not observed in the laser group. In this period, it was also possible to see, in some specimens of the laser group, proliferation of fibroblasts along the edges of the wound. In the periods of 7 and 14 days, no differences were found between the groups. In morphometric analysis, density of collagen fibers and blood vessels was higher for the laser group in both evaluated periods, with statistically significant difference. Based on these results, it was concluded that low-power laser was able to control inflammatory response and stimulate tissue repair in skin wounds in rats.

Keywords: Wound healing. Laser therapy, low-level.

Figura 1 - Onda eletromagnética.	62
Figura 2 - Características de uma onda.	64
Figura 3 - Espectro eletromagnético.	65
Figura 4 - Estrutura de um átomo.	67
Figura 5 - Emissão espontânea de radiação.	68
Figura 6 - Diferenças entre o laser e a luz comum.	71
Figura 7 - Interações do laser com o tecido/anteparo.	78
Figura 8 - Anestesia.	105
Figura 9 - Depilação.	105
Figura 10 - Incisão.	106
Figura 11 - Incisões nos quadrantes superior direito e inferior esquerdo do dorso do animal.	106
Figura 12 - Incisão com extensão de 2 cm.	107
Figura 13 - Sutura.	107
Figura 14 - Whitening Lase II (DMC®).	109
Figura 15 - Aplicação do laser no centro da incisão.	109
Figura 16 - Desenho esquemático do experimento.	110
Figura 17 - Remoção do tecido cutâneo envolvendo a área da incisão.	111
Figura 18 - Descolamento do tecido.	111
Figura 19 - Recorte da peça.	112
Figura 20 - Corte representativo do subgrupo C1, objetiva de 20x, HE.	119
Figura 21 - Corte representativo do subgrupo C1, objetiva de 40x, HE.	121
Figura 22 - Corte representativo do subgrupo L1, objetiva de 20x, HE.	123
Figura 23 - Corte representativo do subgrupo L1, objetiva de 40x, HE.	125
Figura 24 - Corte representativo do subgrupo C2, objetiva de 20x, HE.	127
Figura 25 - Corte representativo do subgrupo C2, objetiva de 40x, HE.	129

Figura 26 - Corte representativo do subgrupo L2, objetiva de 20x, HE.	131
Figura 27 - Corte representativo do subgrupo L2, objetiva de 40x, HE.	133
Figura 28 - Corte representativo do subgrupo C3, objetiva de 20x, HE.	135
Figura 29 - Corte representativo do subgrupo C3, objetiva de 40x, HE.	137
Figura 30 - Corte representativo do subgrupo L3, objetiva de 20x, HE.	139
Figura 31 - Corte representativo do subgrupo L3, objetiva de 40x, HE.	141
Figura 32 - Corte representativo do subgrupo C4, objetiva de 20x, HE.	143
Figura 33 - Corte representativo do subgrupo C4, objetiva de 40x, HE.	145
Figura 34 - Corte representativo do subgrupo L4, objetiva de 20x, HE.	147
Figura 35 - Corte representativo do subgrupo L4, objetiva de 40x, HE.	149

GRÁFICOS

Gráfico 1A - Porcentagem média de fibras colágenas e líquido intersticial/substância fundamental amorfa para cada subgrupo.	153
Gráfico 1B - Porcentagem média de fibroblastos, vasos sanguíneos, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, mononucleares macrófagos e células inflamatórias para cada subgrupo.	154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos animais em grupos e subgrupos.	104
Tabela 2 - Porcentagem média de fibras colágenas, líquido intersticial/substância fundamental amorfa, fibroblastos e vasos sanguíneos para cada subgrupo e respectivos valores de desvio padrão.....	151
Tabela 3 - Porcentagem média de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, mononucleares macrófagos e de células inflamatórias para cada subgrupo e respectivos valores de desvio padrão.....	152
Tabela 4 - Níveis de significância obtidos com o teste ANOVA para cada estrutura avaliada na comparação entre grupos, entre períodos e entre grupos e períodos.	155
Tabela 5 - Estruturas com diferenças estatisticamente significantes quanto ao valor de densidade entre os grupos e grupo que apresentou o maior valor.	156
Tabela 6 - Estruturas com diferenças estatisticamente significantes quanto ao valor de densidade entre os períodos e período que apresentou o maior valor.....	156

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: adenosina difosfato

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AsGa: arsenieto de gálio

AsGaAl: arsenieto de gálio e alumínio

ATP: adenosina trifosfato

bFGF: *basic fibroblast growth factor*

CEEPa: Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

cm: centímetro

cm²: centímetro quadrado

CO₂: dióxido de carbono

DE: densidade de energia

DP: densidade de potência

DTM: disfunção temporomandibular

E: energia

Er:YAG: érbio-YAG

et al.: e outros

f: frequência

FDA: *Food and Drug Administration*

GaAlAs: arsenieto de gálio e alumínio

°GL: grau Gay Lussac

Gy: gray

HE: hematoxilina-eosina

HeNe: hélio-neônio

Ho:YAG: hólmio-YAG

Hz: hertz

InGaAlP: fosfeto de índio, gálio e alumínio

J: joule

J/cm²: joules por centímetro quadrado

J/Kg: joules por quilograma

J/s: joules por segundo

LASER: *light amplification by stimulated emission of radiation*

LDH: lactate desidrogenase

LILT: *low intensity laser therapy*

LLLT: *low level laser therapy*

LPLT: *low power laser therapy*

MASER: *microwave amplification by stimulated emission of radiation*

ml: mililitro

mm: milímetro

mW: miliwatt

Nd:YAG: neodímio-YAG

nm: nanômetro

P: potência

TLBI: terapia a laser de baixa intensidade

TLBP: terapia a laser de baixa potência

W: watt

W/cm²: watts por centímetro quadrado

YAG: *yttrium aluminum garnet*

λ : comprimento de onda

μ m: micrômetro

®: marca registrada

%: por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	47
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	53
2.1 LASER	55
2.1.1 Aspectos Históricos.....	55
2.1.2 O Laser na Atualidade	60
2.1.3 Fundamentos Físicos do Laser.....	61
2.1.4 Propriedades da Luz Laser.....	70
2.1.5 Tipos de Laser	72
2.1.5.1 Quanto ao Meio Ativo	72
2.1.5.2 Quanto à Potência.....	74
2.1.6 Dosimetria.....	75
2.1.7 Interação entre o Laser e os Tecidos Biológicos.....	77
2.2 RECONSTRUÇÃO TECIDUAL	79
2.2.1 Pele e Mucosas.....	79
2.2.2 Estrutura da Pele	79
2.2.2.1 Epiderme	80
2.2.2.2 Derme	81
2.2.2.3 Peculiaridades da Pele do Dorso de Ratos.....	82
2.2.3 Regeneração, Reparação, Cicatrização e Fibrose Cicatricial	82
2.2.4 Inflamação e Reparo.....	83
2.2.5 Cicatrização por Primeira Intenção	84
2.3 LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM RECONSTRUÇÃO TECIDUAL	85
3 PROPOSIÇÃO.....	97

4 MATERIAL E MÉTODOS	101
4.1 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	103
4.2 ANIMAIS	103
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS	103
4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	104
4.5 APLICAÇÃO DO LASER	108
4.6 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS	110
4.7 RECORTE DAS PEÇAS	112
4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO	113
4.9 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	113
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	116
5 RESULTADOS	117
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA	119
5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	151
6 DISCUSSÃO	157
6.1 DA METODOLOGIA	159
6.1.1 Utilização do Rato como Modelo Experimental	159
6.1.2 Avaliação de Incisões	160
6.1.3 Extensão das Incisões	161
6.1.4 Períodos de Avaliação	162
6.1.5 Técnica de Aplicação do Laser	163
6.1.6 Outras Considerações	164
6.2 DOS RESULTADOS	164
7 CONCLUSÕES	167
REFERÊNCIAS	171
APÊNDICE	177
ANEXO	181

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Diante de uma intervenção cirúrgica, pacientes e profissionais têm buscado, cada vez mais, não apenas um resultado final satisfatório, mas também um pós-operatório confortável, livre de complicações e relativamente curto. O laser de baixa potência, também conhecido como “laser terapêutico” ou “laser de baixa intensidade”, tem sido utilizado após procedimentos cirúrgicos visando acelerar o processo de reparo dos tecidos e diminuir a dor e o edema pós-operatórios. Muitas vezes ele é utilizado como alternativa à terapia medicamentosa, por ser considerado seguro, não invasivo e por não provocar efeitos colaterais.

A terapia a laser de baixa potência, ou “laserterapia”, não é novidade. Entretanto, ela tem se popularizado devido à comercialização de equipamentos cada vez mais acessíveis em relação ao custo e à metodologia de emprego, como é o caso de aparelhos dotados de menus interativos que fornecem automaticamente a dosagem a ser empregada em função do tipo de tratamento. Hoje não é difícil encontrar esses equipamentos em clínicas médicas, odontológicas, veterinárias e de fisioterapia, mesmo porque, as indicações do laser de baixa potência não se restringem a pós-operatórios de procedimentos cirúrgicos. Ele vem sendo empregado em diversas situações clínicas onde se deseja um efeito analgésico, antiinflamatório e de reparação tecidual.

O laser é um tipo de luz com características particulares. Um feixe de luz branca comum, como o produzido por uma lâmpada incandescente, é composto por ondas de diferentes comprimentos de onda propagando-se de forma caótica, em diversas direções. Já no feixe de luz laser, as ondas emitidas apresentam o mesmo comprimento de onda (monocromaticidade), se propagam sobre trajetórias paralelas (paralelismo) e estão alinhadas entre si, crista com crista e ventre com ventre (coerência). Essas propriedades permitem ao laser fornecer grande quantidade de energia concentrada em pequenos pontos, com alta precisão.

A palavra “LASER” vem do inglês e é a abreviatura da expressão “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”, o que em português significa “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação”. Os fundamentos físicos do laser baseiam-se na “Teoria da Emissão Estimulada de Radiação”, postulada por Einstein em 1917 (KASTLER, 1985; MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001; GENOVESE, 2007). As diferenças entre a luz comum e a luz laser se devem aos fenômenos físicos envolvidos na produção da

luz. Enquanto a luz comum é produzida por emissão espontânea, a luz laser é produzida por emissão estimulada de radiação.

Apesar de Einstein ter publicado sua teoria em 1917, o primeiro equipamento emissor de laser surgiu somente em 1960, construído pelo engenheiro Theodore Maiman nos laboratórios da *Hughes Aircraft Company*, em Los Angeles (MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001; COLUZZI, 2004; SUN; TUNÉR, 2004; GENOVESE, 2007). A partir daí, inúmeras aplicações para o laser foram sendo encontradas em diversas áreas, como no setor de telecomunicações, na construção civil, na indústria e nas ciências da saúde (HECHT, 1999). No final da década de 60, a ação reparadora do laser de baixa potência foi demonstrada pela primeira vez por Endre Mester, na Hungria (TUNÉR; HODE, 1996). Desde então, ela vem sendo estudada.

Hoje, a terapia a laser de baixa potência é método aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) como tratamento clínico para estimular a reparação tecidual (ROCHA-JÚNIOR et al., 2006) e como coadjuvante para o alívio temporário da dor (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009). No entanto, embora esse tipo de tratamento ofereça pouco ou nenhum risco à saúde do paciente (TUNÉR; HODE, 1996), sua eficácia ainda é controversa (WALKER et al., 2000; KREISLER et al., 2003; DAMANTE et al. 2004; ROCHA-JÚNIOR et al., 2006; HENRIQUES et al., 2008). Ao contrário dos lasers de alta potência, que cortam e cauterizam, os efeitos dos lasers de baixa potência sobre os tecidos vivos não são facilmente evidenciáveis, o que dificulta o processo de compreensão dos seus mecanismos de ação. Muitos autores afirmam que o laser de baixa potência pode provocar reações nos tecidos tais como: ativação da produção de adenosina trifosfato (ATP) e aumento do metabolismo celular (BRUGNERA et al. 2003; GENOVESE, 2007; PARKER, 2007), aumento da proliferação fibroblástica (GARCIA et al., 2000; KREISLER et al., 2003; POURZARANDIAN et al., 2005; PARKER, 2007), aceleração da síntese de colágeno (BRUGNERA et al. 2003; PARKER, 2007) e aumento do grau de neovascularização (GARCIA et al., 2000; BRUGNERA et al., 2003). Mas nem sempre os resultados apresentados nos estudos são satisfatórios ou estatisticamente significantes (WALKER et al., 2000; PUGLIESE et al., 2003; DAMANTE et al., 2004).

Outra razão para a ocorrência de controvérsias são as muitas variáveis a serem analisadas numa pesquisa envolvendo laser: o aparelho utilizado, o comprimento de onda, a dosagem, o modo de aplicação, o número de sessões e de aplicações por sessão, o tipo e a profundidade do tecido que se deseja atingir (no caso de estudos *in vivo*), entre outras. Cada uma dessas variáveis é capaz de alterar significativamente os resultados de um experimento, o

que contribui para a ocorrência das controvérsias encontradas na literatura. Também é preciso considerar o constante surgimento de diferentes equipamentos e novas propostas de uso, que precisam ser avaliadas.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito do laser de baixa potência, com comprimento de onda em torno de 660nm (vermelho visível), sobre o processo de reparo de incisões cutâneas em dorso de ratos, empregando uma dose de 35 J/cm² em sessão única.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LASER

2.1.1 Aspectos Históricos

O emprego da luz no tratamento de enfermidades é uma prática muito antiga. A luz do sol era comumente utilizada para fins terapêuticos entre os antigos egípcios, gregos e romanos. Arqueólogos descobriram, no Antigo Egito, salas de cura construídas de tal forma que, quando o sol entrava, seus raios se dividiam nas cores do espectro. Os que vinham se curar passavam por um “diagnóstico da cor”, indo depois para a sala que irradiava a cor prescrita (WILLS, 2002).

Embora os médicos egípcios tenham sido os primeiros a utilizar a terapia solar para a cura, os gregos foram os primeiros a manter registros escritos sobre ela. Heródoto é considerado o pai desse tratamento, chamado pelos gregos de “Helioterapia”. Heliópolis, a cidade grega do sol, era famosa por seus templos de cura, também projetados para decompor a luz do sol nas cores do espectro, cada uma sendo indicada para um problema médico específico, de maneira semelhante aos templos do Antigo Egito (LIBERMAN, 1991; WILLS, 2002). É interessante notar que, além da luz branca, esses povos já faziam uso de diferentes cores do espectro de luz visível separadamente.

A terapia solar em tempos antigos era amplamente baseada em superstições e crenças religiosas (adoração ao sol). As teorias que explicam a natureza da luz só ficaram bem estabelecidas em meados do século XIX (RAMALHO; FERRARO; SOARES, 1996). A partir dessa época, sob esse novo contexto científico, o primeiro a se destacar pelo emprego da luz no tratamento de doenças foi o médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen, em 1895. Observando que a tuberculose da pele (*lupus vulgaris*) era mais comum no inverno, ele deduziu que a luz do sol poderia ter influência sobre ela e passou a utilizar luz artificial para tratar a doença. Pelos trabalhos realizados nessa área e por proporcionar a cura de muitas pessoas, ele recebeu, em 1903, o prêmio “Nobel de Medicina ou Fisiologia”, tornando-se conhecido como o “Pai da Fotobiologia” (WILLS, 2002).

Também em 1903, o médico Auguste Rollier inaugurou, em Leysin, nos Alpes Suíços, o primeiro hospital para tratamento de tuberculose pulmonar e raquitismo por exposição ao

sol (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007). Ele atribuía a ação terapêutica do sol aos raios ultravioletas. Em 1914, Rollier publicou os resultados obtidos com sua terapia em um livro sobre o método, “*La Cure du Soleil*” (A Cura do Sol) (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007).

Em 1904, Bernhard, na Suíça, reportou os efeitos curativos da Helioterapia sobre úlceras cutâneas. Durante a Primeira Guerra Mundial, na Alemanha, no Reino Unido, na França e na Itália, úlceras eram tratadas por exposição ao sol ou a lâmpadas de quartzo. Na Segunda Guerra Mundial, esse tratamento ainda foi muito utilizado. (LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007).

No início da década de 30, nos Estados Unidos, o engenheiro Georgi Sperti, então professor da Universidade de Cincinnati, utilizava lâmpadas ultravioletas para enriquecer leite com vitamina D e matar bactérias. Para obter o efeito desejado, ele aplicava diferentes filtros sobre as lâmpadas, os quais selecionavam um comprimento de onda específico dentro da faixa de radiação ultravioleta (ARMAGNAC, 1931; LIBERMAN, 1991).

Na metade dos anos 30, a radiação ultravioleta e os banhos de sol eram conhecidos como os mais efetivos tratamentos para muitas doenças infecciosas. No entanto, com o advento dos antibióticos (sulfa e penicilina) em 1939, a terapia através da luz caiu em desuso e os interesses científicos se voltaram para a farmacologia (LIBERMAN, 1991; LIM; HÖNIGSMANN; HAWK, 2007). No início da década de 60, entretanto, a luz retomou seu lugar nas pesquisas, sendo considerada uma ferramenta em potencial no tratamento de enfermidades, mas, dessa vez, sob a forma de radiação laser.

Os fundamentos físicos do laser baseiam-se na “Teoria da Emissão Estimulada de Radiação”, postulada por Einstein em 1917. Em dois de seus famosos artigos, publicados em 1916 e 1917, Einstein faz a distinção entre a emissão espontânea e a emissão estimulada de radiação. (KASTLER, 1985; MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001; GENOVESE, 2007). Os primeiros esforços para colocar em prática a teoria da emissão estimulada de radiação ocorreram quase que simultaneamente nos Estados Unidos e na União Soviética. Entretanto, foi o físico norte-americano Charles H. Townes, em 1953, quem desenvolveu o primeiro equipamento com base nessa teoria, o MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, ou Amplificação de Microondas por Emissão Estimulada de Radiação). Townes, que na época era professor do departamento de Física da Universidade de Columbia, utilizou vapor de amônia como meio ativo para produzir um feixe de microondas cujos comprimentos de onda tinham aproximadamente 1.25 cm. (HECHT, 1999; SILFVAST, 2004). Em 1958, Townes e seu cunhado Arthur L. Schawlow,

que havia sido seu aluno de pós-doutorado na Universidade de Columbia e que agora trabalhava como pesquisador para a *Bell Telephone Company*, publicaram um artigo propondo estender os princípios do maser para frequências ópticas do espectro eletromagnético, sugerindo a criação do que eles inicialmente chamaram de *optical maser* (maser óptico) (HECHT, 1999; SILFVAST, 2004; HECHT, 2005). Tinha início a corrida científica pelo desenvolvimento do laser.

Na época, além da Universidade de Columbia e de empresas contratadas pelo Pentágono, grandes corporações norte-americanas, como a *Westinghouse Electric Corporation*, a *International Business Machines Corporation (IBM)*, a *Hughes Aircraft Company*, a *American Optical* e a *Bell Telephone Company* trabalhavam na concepção do laser (HECHT, 1999; HECHT, 2005). Mas foi o engenheiro Theodore Maiman, em 1960, trabalhando para os laboratórios da *Hughes Aircraft*, em Los Angeles, quem construiu o primeiro emissor de laser utilizando um cristal sintético de rubi, (MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001; COLUZZI, 2004; SUN; TUNÉR, 2004; GENOVESE, 2007) material que, de acordo com Arthur Schawlow, não serviria como meio ativo para a construção de um laser. O dispositivo de Maiman cumpria um importante requisito de experimentação científica: a reprodutibilidade. Em poucas semanas, outros físicos apresentaram seus próprios lasers de rubi. Curiosamente, a primeira tentativa de publicação do invento de Maiman foi negada pelo jornal norte-americano *Physical Review Letters*. A publicação foi feita pela revista britânica *Nature* (HECHT, 1999; HECHT, 2005).

Um ano depois da invenção do laser de rubi, foi desenvolvido o primeiro laser a gás, nos laboratórios da *Bell Telephone*, em Nova Jersey, por Javan, Bennett e Harriot, que utilizaram uma mistura de gases hélio e neônio (HeNe). Pouco tempo depois, no mesmo laboratório, Johnson e Nassau construíram o primeiro laser de neodímio. Já o primeiro laser de diodo semiconductor foi apresentado quase simultaneamente, em 1962, pela *General Electric Company (GE)* em Nova York, pela *IBM*, também em Nova York, e pelo *Massachusetts Institute of Technology (MIT)*, uma renomada universidade de Massachusetts. Os três grupos demonstraram lasers semelhantes de diodo de arsenieto de gálio (AsGa). Em 1963, Patel desenvolveu, para a *Bell Telephone Company*, o laser infravermelho de dióxido de carbono (CO₂). Um ano mais tarde, William B. Bridges, da *Hughes Aircraft*, produziu o primeiro laser de argônio. Em 1966, Silfvast, Fowles e Hopkins produziram o primeiro laser azul de hélio-cádmio. No mesmo ano, Sorokin e Lankard, trabalhando para a *IBM*, desenvolveram o primeiro laser líquido utilizando tintura orgânica, enquanto Walter e colaboradores desenvolveram, no *Technical Research Group*, o primeiro laser de vapor de

cobre. Na década de 70, os principais avanços estiveram relacionados ao surgimento do “excimer laser” e do “free-electron laser”. O primeiro dos chamados “excimer lasers” foi desenvolvido com fluoreto de xenônio, por Ewing e Brau, do *Avco-Everett Research Laboratory*, em 1975. No ano seguinte, Madey e colaboradores produziram, na Universidade de Stanford, o primeiro “free-electron laser”, cujo meio ativo é composto por um feixe de elétrons livres. Na década de 80, além dos avanços tecnológicos nos lasers de diodo, destacou-se a criação do primeiro laser emissor de raios X, por Matthews e colaboradores no *Lawrence Livermore Laboratory*, em 1985. (HECHT, 1999; SILFVAST, 2004).

Desde a produção dos primeiros equipamentos em 1960, várias aplicações para o laser foram sendo rapidamente encontradas em diversos setores, como nas telecomunicações, no armamento militar, na construção civil, na indústria em geral e também nas ciências da saúde (HECHT, 1999). Em 1961, no Hospital Presbiteriano de Nova York, realizou-se, com sucesso, o primeiro procedimento cirúrgico utilizando laser, que consistiu na remoção de um pequeno tumor de retina (GENOVESE, 2007). Nesse mesmo ano, o dermatologista e pesquisador da Universidade de Cincinnati, Leon Goldman, passou a utilizar o laser de rubi no tratamento de melanomas, técnica que mais tarde se tornaria popular por remover tatuagens e marcas de nascença sem deixar cicatriz significativa (THE NEW YORK TIMES, 1997). No início, a comunidade médica se concentrou em explorar os efeitos térmicos e ablativos dos lasers de alta potência (BAXTER, 1997). Esse tipo de laser tem poder destrutivo, podendo cortar, vaporizar, coagular e desinfetar tecidos (GENOVESE, 2007). É comumente utilizado em procedimentos cirúrgicos em substituição à lâmina de bisturi quando se deseja obter precisão no corte, hemostasia e evitar infecções.

O interesse a respeito dos possíveis efeitos biológicos dos lasers de baixa potência, hoje considerados por muitos pesquisadores como tendo efeitos terapêuticos (ação analgésica, antiinflamatória e reparadora) (GENOVESE, 2007), teve início apenas no final da década de 60, quando Endre Mester e seu grupo de pesquisadores, em Budapeste, na Hungria, iniciaram experimentos com esse tipo de laser em pele de ratos (TUNÉR; HODE, 1996). A intenção de Mester era avaliar o potencial cancerígeno dos lasers de baixa potência, na época comumente utilizados como luz guia em aparelhos de lasers de alta potência. Em um de seus experimentos, Mester aplicou laser de HeNe em carcinomas de ratos de laboratório. Ao contrário do esperado, o laser não acelerou o crescimento dos carcinomas, mas sim de novos pêlos nas áreas que haviam sido depiladas em função dos testes. Com as pesquisas que se seguiram, Mester e seus colaboradores demonstraram a ação reparadora desse laser sobre feridas induzidas em animais de laboratório (BAXTER, 1997). Entusiasmados com os

resultados, eles decidiram iniciar, pouco tempo depois, testes com laser de HeNe em um pequeno grupo de pacientes que apresentavam feridas crônicas, as quais não respondiam a outros tipos de tratamento. Novamente, os resultados foram satisfatórios.

Com base nos achados de Mester, inúmeros projetos de pesquisa tiveram início em países da antiga União Soviética e na China, onde a laserterapia logo se tornou popular. No final da década de 70 e durante a década de 80, trabalhos publicados nesses países recomendavam a aplicação do laser de baixa potência no tratamento de feridas pós-operatórias, angina pectoris e úlceras estomacais (BAXTER, 1997). Na União Soviética, resultados positivos foram obtidos com a utilização do laser de HeNe para estimular o processo de cicatrização de enxertos em coelhos, no tratamento de queimaduras em pele de ratos e para acelerar o reparo de feridas em mucosa de língua de ratos (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1995). Em 1991, a terapia a laser de baixa potência foi aprovada no Japão por órgãos reguladores de produtos e procedimentos relacionados à saúde como forma de tratamento médico (TUNÉR; HODE, 1996).

Na Europa Ocidental e na América, particularmente nos Estados Unidos, a aceitação desse tipo de tratamento foi limitada no início. Pesquisadores desses países alegavam que as publicações feitas pelos chineses e soviéticos não forneciam especificações adequadas quanto ao tipo de radiação laser utilizada, além de apresentarem um design experimental pobre, especialmente no que diz respeito à ausência de grupos controle (BASFOR, 1995; CONLAN; RAPLEY; COBB, 1995; BAXTER, 1997). Hoje, a FDA permite a comercialização de equipamentos de laser de baixa potência como dispositivos coadjuvantes para o alívio temporário da dor (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009).

Na Odontologia, as primeiras pesquisas com laser foram desenvolvidas em 1963 por Ralph H. Stern e Reidar F. Sognaes, na Universidade da Califórnia. Nessa época, os interesses giravam em torno dos efeitos térmicos do laser de rubi sobre os tecidos duros do dente (esmalte e dentina) e materiais restauradores. Em seus experimentos, eles observaram que o laser de rubi podia causar fissuras no esmalte e carbonizar a dentina. Observaram também que esse laser era capaz de aumentar a resistência do esmalte à penetração de ácido, sugerindo um possível papel preventivo no que diz respeito a cáries (MISERENDINO; PICK, 1995). O primeiro relato de exposição de um dente vital humano ao laser é de 1965, quando o dermatologista Leon Goldman aplicou laser de rubi em um dente do próprio irmão, o cirurgião dentista Bernard. Na ocasião, não houve dor, mas sim um dano superficial à coroa. (MISERENDINO; PICK, 1995; COLUZZI, 2004). Os estudos que se seguiram com laser de rubi não foram promissores, a maioria tendo produzido efeitos adversos aos dentes e

estruturas adjacentes. Os danos observados incluíram grande destruição do tecido pulpar. (MISERENDINO; PICK, 1995). Devido aos resultados desfavoráveis, o laser de rubi foi deixado de lado pela odontologia. Atualmente, ele é muito utilizado na dermatologia. A partir da década de 70, a comunidade odontológica se voltou ao estudo de outros tipos de laser, como o de CO₂ e o de neodímio YAG (Nd:YAG), à procura de melhores resultados na interação com os tecidos duros do dente. No início da década de 80, o laser de CO₂ passou a ser utilizado também na realização de procedimentos cirúrgicos em tecidos moles orais. Em 1989, a FDA aprovou a comercialização do primeiro equipamento de laser de alta potência voltado para a odontologia nos Estados Unidos, um aparelho de Nd:YAG para procedimentos cirúrgicos em tecidos moles (COLUZZI, 2004). Em 1997, a mesma lançou permissão para a comercialização do primeiro sistema a laser para tratamento de cáries, um aparelho de érbio-YAG (Er:YAG) (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2009). Quanto ao laser de baixa potência, este tem sido utilizado por profissionais da odontologia desde o início da década de 90 (POURZARANDIAN et al., 2005).

2.1.2 O Laser na Atualidade

Hoje, o laser pode ser facilmente encontrado no dia-a-dia das pessoas em dispositivos como leitores de códigos de barras, leitores de CDs, impressoras, ponteiras a laser e até mesmo em efeitos de iluminação em shows (BAXTER, 1997). Entre as áreas que hoje merecem destaque pelo emprego do laser estão: a medicina, a odontologia, a fisioterapia e a indústria em geral.

Na indústria, lasers de alta potência, como o de CO₂ e o de Nd:YAG, são empregados em operações de corte, soldagem e tratamento térmico de materiais com maior precisão, rapidez e qualidade (MISERENDINO; PICK, 1995; VALADARES; CHAVES; ALVES, 2005; VASCONCELOS, 2007). A indústria automobilística tem se beneficiado dessa tecnologia em várias fases do processo de fabricação de automóveis, como no corte e na texturização das peças. A indústria aeronáutica vem utilizando, com sucesso, a soldagem a laser para unir componentes da parte estrutural das aeronaves. As soldas feitas a laser possuem alta resistência e apresentam maior qualidade e estabilidade do que a união feita através dos tradicionais rebites (VASCONCELOS, 2007). Indústrias de móveis, roupas e calçados utilizam o corte a laser para obter melhor acabamento do produto e menor desperdício de tempo e material.

Na fisioterapia, o laser de baixa potência tem sido utilizado como coadjuvante no tratamento de artrites, bursites, tendinites, hérnias de disco, mialgias, traumatismos, úlceras crônicas (LIZARELLI; MACIEL, 2008), neurites e paralisias.

Na medicina, lasers de alta potência são utilizados, por exemplo, na fragmentação de cálculos renais e vesiculares (laser de Nd:YAG), na remoção de tatuagens (laser de rubi) e na realização de cirurgias oftalmológicas (excimer laser) (MELLO; MELLO, 2001).

Na odontologia, o laser de alta potência pode ser empregado em procedimentos cirúrgicos para cortar ou excisar tecidos moles. Pode ainda ser utilizado para fazer apicectomias, preparos cavitários, osteotomias, para remover cáries, promover a redução bacteriana em Endodontia e Periodontia, remover smear layer, polimerizar resinas compostas, ativar produtos clareadores e diminuir a sensibilidade dentinária (através do selamento de canalículos) (MELLO; MELLO, 2001). O laser de baixa potência vem sendo indicado em casos de disfunção temporomandibular, alveolite, pericementite, pericoronarite, queilite angular, hipersensibilidade dentinária, parestesia, lesões herpéticas, aftas e em pós-cirúrgicos, por seus possíveis efeitos analgésicos e antiinflamatórios e sua possível capacidade de acelerar a reparação tecidual (BRUGNERA et al., 2003).

2.1.3 Fundamentos Físicos do Laser

Para entender os princípios de funcionamento do laser, bem como o que a expressão “Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação” significa, é preciso primeiramente conhecer alguns conceitos e fenômenos físicos. São eles:

ONDA

No campo da Física, uma onda é uma perturbação que se propaga de uma região para outra de um sistema quando esse sistema é deslocado da sua posição de equilíbrio. São exemplos de fenômenos ondulatórios: as ondas do mar, os terremotos, o som, a luz, os raios x, a transmissão de rádio e televisão, entre outros (YOUNG; FREEDMAN, 2003). Todas as ondas, independentemente do tipo, se originam a partir de algo que está vibrando (HEWITT, 2002). Ondas transmitem energia, mas não transportam matéria de uma região para outra (PERUZZO; CANTO, 1998; HEWITT, 2002).

Dependendo de sua natureza, as ondas podem ser classificadas em **mecânicas** ou **eletromagnéticas**.

ONDA MECÂNICA

É uma perturbação que se propaga através de um “meio material”, sólido, líquido ou gasoso. Um exemplo é uma corda esticada, sob tensão. Quando seguramos uma das extremidades da corda e a agitamos para cima e para baixo, a agitação se propaga através dela em movimentos do mesmo tipo. Nesse caso, a corda representa o meio de propagação. Outro exemplo de onda mecânica é o som, que se propaga em fluidos, como a água e o ar, e em meios sólidos, mas não se propaga no vácuo. Temos ainda as ondas do mar, as ondulações provocadas por uma pedra caindo sobre a água, os terremotos, entre outros. (PERUZZO; CANTO, 1998; YOUNG; FREEDMAN, 2003).

ONDA ELETROMAGNÉTICA

Diferentemente das ondas mecânicas, que se propagam através da oscilação das partículas de um meio, as ondas eletromagnéticas não necessitam de material algum para isso, podendo se propagar no vácuo. Uma onda eletromagnética é formada por um campo elétrico e um campo magnético variáveis (em relação ao tempo) que se sustentam mutuamente (**figura 1**). (HEWITT, 2002; YOUNG; FREEDMAN, 2004). Nesse caso, as grandezas que oscilam são o **campo elétrico** e o **campo magnético** (YOUNG; FREEDMAN, 2004). O comportamento oscilatório desses campos é o que permite classificar como onda a perturbação eletromagnética derivada dos mesmos.

São exemplos de ondas eletromagnéticas: as ondas de transmissão de rádio e televisão, as microondas, a luz, os raios x e os raios gama. (PERUZZO; CANTO, 1998; HEWITT 2002; YOUNG; FREEDMAN, 2004).

Figura 1 - Onda eletromagnética. Fonte: www.physast.uga.edu/~jss/1010/ch5/emwave.jpeg (Department of Physics and Astronomy, University of Georgia). Legendas traduzidas.

CARACTERÍSTICAS DE UMA ONDA

Apesar das diferenças, ondas eletromagnéticas e mecânicas possuem muitas características em comum e são descritas com base na mesma linguagem (YOUNG; FREEDMAN, 2003). Por isso, a “curva senóide¹”, representação gráfica de uma onda (**figura 2**) (HEWITT, 2002), é normalmente utilizada para descrever características comuns entre ambos os tipos de onda, como:

Crista: é o ponto mais alto da onda (**figura 2**) (HEWITT, 2002).

Vale ou Ventre: é o ponto mais baixo da onda (**figura 2**) (HEWITT, 2002).

Comprimento de onda: representado pela letra grega λ (lambda), é a distância horizontal entre duas cristas ou dois ventres consecutivos, ou ainda entre quaisquer duas partes idênticas e sucessivas da onda (**figura 2**) (HEWITT, 2002; YONG; FREEDMAN, 2003; GENOVESE, 2007). As unidades de medida adotadas podem variar do centímetro (cm) ao nanômetro (nm). (HEWITT, 2002; GENOVESE, 2007).

Amplitude: é a distância vertical entre uma crista (ou um vale) e o eixo de equilíbrio da onda, representado, na **figura 2**, pela linha pontilhada que atravessa a onda (HEWITT, 2002). A amplitude está relacionada à magnitude da onda, ou seja, quanto maior a amplitude, mais altos são os índices de energia da onda (GENOVESE, 2007).

Frequência: representada pelo símbolo f , indica o número de oscilações ou ciclos que a onda completa em um determinado tempo. A unidade de medida correspondente é o Hertz (Hz), ou seja, ciclos por segundo (PERUZZO et al., 1998; HEWITT, 2002).

Velocidade: está diretamente relacionada à frequência (f) e ao comprimento de onda (λ) através da seguinte fórmula: $\text{velocidade} = f \times \lambda$. Desse modo, é possível perceber que a frequência é inversamente proporcional ao comprimento de onda, ou seja, quanto maior a

¹ Uma senóide pode ser traçada, por exemplo, por um pêndulo oscilando harmonicamente de um lado para outro sobre uma esteira rolante em movimento contínuo. Se a ponta do pêndulo contiver um dispositivo despejando areia, o desenho formado será o de uma onda senoidal (HEWITT, 2002).

as várias cores que compõem o espectro de luz visível (violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho) formam a luz branca. Através de um prisma, é possível decompor a luz branca nessas diversas cores (COLUZZI, 2004).

É comum descrever, por exemplo, as ondas de rádio pela sua frequência e a luz visível pelo seu comprimento de onda. Mas todas as ondas eletromagnéticas podem ser descritas tanto pela frequência quanto pelo comprimento de onda. Isso porque existe uma relação direta entre essas grandezas, ou seja, uma determinada frequência corresponde a um determinado comprimento de onda (HEWITT, 2002).

A radiação emitida por instrumentos de laser também é radiação eletromagnética. Os aparelhos mais comuns emitem ondas com frequências entre o infravermelho e o ultravioleta.

Figura 3 - Espectro eletromagnético. Fonte: <http://scipp.ucsc.edu/~haber/ph5B/> (Santa Cruz Institute for Particle Physics, University of California). Legendas traduzidas.

PRODUÇÃO DE UMA ONDA ELETROMAGNÉTICA

Uma onda de rádio pode ser produzida bombeando-se energia para uma antena metálica transmissora. Os elétrons livres do metal oscilam ao longo do comprimento da antena, emitindo ondas eletromagnéticas com frequências relativamente baixas (HEWITT, 2002).

No caso da luz comum e do laser, a produção das ondas ocorre, respectivamente, através de emissão espontânea e emissão estimulada de radiação, fenômenos físicos que envolvem a oscilação de elétrons no interior dos átomos (HEWITT, 2002).

FÓTON

É a unidade básica da radiação eletromagnética (COLUZZI, 2004), ou seja, é uma porção de radiação eletromagnética, qualquer que seja sua frequência (ou comprimento de onda). Os fótons são comumente associados com a luz visível, mas toda radiação eletromagnética é quantificada em fótons.

ESTRUTURA DE UM ÁTOMO

No centro de um átomo encontra-se o núcleo, que é formado por prótons e nêutrons². Prótons são partículas positivamente carregadas, enquanto nêutrons não possuem carga elétrica. Circulando ao redor do núcleo, estão os elétrons, com carga negativa³. A distribuição dos elétrons ao redor do núcleo se dá em camadas concêntricas, também chamadas de “níveis de energia” (**figura 4**). Existem até sete camadas e cada uma delas tem capacidade de abrigar um determinado número de elétrons (HEWITT, 2002). Elétrons que ocupam camadas mais distantes do núcleo possuem uma energia potencial elétrica maior do que os que ocupam camadas mais próximas. Quanto mais distante do núcleo é a camada, maior é o estado de energia dos elétrons situados nela. Os elétrons de uma mesma camada possuem a mesma energia potencial (BAGNATO, 2001; HEWITT, 2002).

² A única exceção é a forma mais comum de hidrogênio, que não contém nêutron algum no núcleo (HEWITT, 2002).

³ Um átomo normal é eletricamente neutro, o que significa que ele possui o mesmo número de prótons e elétrons. A carga de um único próton é igual e oposta à carga de um único elétron. O que diferencia um átomo de um elemento do átomo de outro elemento é o número de prótons no núcleo (HEWITT, 2002).

Figura 4 - Estrutura de um átomo.

EMIÇÃO ESPONTÂNEA DE RADIAÇÃO

Quando um elétron é estimulado, absorvendo energia⁴, ele salta para uma camada mais externa (desde que a energia recebida seja suficiente para isso) e o átomo entra em **estado de excitação**. Mas este estado é temporário e o átomo logo volta ao equilíbrio, ou seja, o elétron volta à sua posição original e libera a energia recebida em forma de fóton (onda eletromagnética). Esse processo é chamado de “emissão espontânea de radiação” (BAGNATO, 2001; HEWITT, 2002).

Dependendo da quantidade de energia absorvida, o elétron pode saltar mais de uma camada e, ao retornar ao estado de equilíbrio, emitir um fóton de maior energia (BAGNATO, 2001). A diferença de energia entre a camada para a qual o elétron saltou e sua camada original determina a frequência (ou o comprimento de onda) do fóton que é emitido durante o retorno do elétron (BAGNATO, 2001; HEWITT, 2002).

Cada elemento químico possui seu próprio conjunto característico de níveis de energia e, quando excitado, produz ondas de uma ou mais frequências características (ou uma ou mais

⁴ A fonte dessa energia pode ser, por exemplo, luz, calor, energia elétrica etc. (PERUZZO; CANTO, 1998).

cores características, no caso da luz visível). Por exemplo, átomos de gás neônio, quando excitados por uma corrente elétrica no interior de uma lâmpada, produzem luz vermelha. Outro exemplo são as lâmpadas de vapor de mercúrio, normalmente utilizadas para iluminação pública. A luz emitida por essas lâmpadas é rica em azuis e violetas. O conjunto das frequências emitidas por cada elemento químico quando excitado representa o **espectro de emissão** desse elemento (HEWITT, 2002).

Figura 5 - Emissão espontânea de radiação. Em A, elétron em seu nível de energia habitual. Em B, o elétron salta para um nível de maior energia (mais afastado do núcleo). Em C, o elétron retorna ao seu estado normal, emitindo um fóton. Figura extraída do livro Física Conceitual, de Paul G. Hewitt, 2002, página 514.

EMIÇÃO ESTIMULADA DE RADIAÇÃO

A emissão estimulada ocorre quando um átomo em estado de excitação é estimulado a emitir um fóton antes que isso ocorra de forma espontânea. Nesse caso, o agente estimulador é outro fóton que, ao atingir o átomo excitado, estimula o elétron que havia saltado para um nível de maior energia a retornar à sua posição de equilíbrio, emitindo um fóton. Com isso, dois fótons emergem do sistema: o estimulador, que sai intacto, e o estimulado, que é idêntico ao primeiro, ou seja, ambos apresentam o mesmo comprimento de onda e a mesma direção de propagação, além de terem suas cristas e ventres alinhados entre si (BAGNATO, 2001).

INVERSÃO DE POPULAÇÃO

Um material sofre inversão de população quando, através de um estímulo, a população de átomos em excitação se torna maior que a população de átomos em estado de equilíbrio energético (BAGNATO, 2001).

FUNCIONAMENTO DE UM EQUIPAMENTO DE LASER

Tendo em mente os conceitos discutidos acima, é possível entender como é produzida a luz laser. Um equipamento de laser apresenta três componentes principais: uma **fonte externa de energia**, o **meio ativo** e a **cavidade óptica** (ou **ressonador**), no interior da qual fica contido o meio ativo e em cujas extremidades existem espelhos.

A produção do laser começa com a fonte externa de energia provocando uma inversão de população no meio ativo, ou seja, deixando a maioria dos átomos do meio ativo em estado de excitação⁵. Em seguida, um ou mais átomos retornam espontaneamente ao seu estado de equilíbrio, emitindo fótons. Esses fótons perturbam outros átomos excitados, provocando a emissão estimulada de fótons idênticos a eles. De todos esses fótons, aqueles que se propagam no sentido do eixo principal do equipamento são refletidos pelos espelhos e jogados novamente para o sistema, provocando a emissão estimulada de mais fótons e assim por diante. Como só existem espelhos nas extremidades, apenas a luz que se propaga ao longo do eixo principal do equipamento é que vai sofrer reflexão. Em um dos espelhos existe uma abertura que permite que parte da luz produzida saia, formando o feixe de laser (BAGNATO, 2001). A emissão do laser pode ser contínua ou pulsada. Quando a fonte externa de energia excita os átomos de forma contínua, a emissão também é contínua. Quando excita os átomos de forma intermitente, a emissão é pulsada (MELLO; MELLO, 2001).

O comprimento de onda do laser é determinado pelo material que compõe o meio ativo (BRUGNERA et al., 2003). Para que o aparelho produza um certo comprimento de onda, é preciso selecionar um meio ativo cujos átomos apresentem camadas com diferenças de energia equivalentes ao comprimento de onda desejado, por onde transitarão os elétrons. (BAGNATO, 2001).

Os fenômenos de emissão espontânea e emissão estimulada de radiação representam a base que diferencia a luz comum da luz laser. A luz comum é produzida por emissão

⁵ Um material é considerado um bom meio ativo quando, entre outras coisas, seus átomos conseguem permanecer um tempo relativamente longo em estado de excitação (BAGNATO, 2001).

espontânea, enquanto a luz laser é produzida por emissão estimulada de radiação. A monocromaticidade, a direcionalidade e a coerência da luz laser, propriedades que serão discutidas a seguir, resultam do processo de emissão estimulada, já que, nesse processo, os fótons emitidos apresentam as mesmas características.

2.1.4 Propriedades da Luz Laser

As principais propriedades da luz laser que a diferenciam da luz comum são: monocromaticidade, coerência e colimação.

Monocromaticidade: “monocromático” é aquele que apresenta “uma só cor”. Uma das principais diferenças entre a luz comum e a luz produzida por um aparelho de laser reside no quão monocromático é o feixe. Segundo os físicos Young e Freedman (2004), a luz monocromática, ou luz com um único comprimento de onda, é uma idealização inatingível. Quando, num experimento, se usa a expressão “luz monocromática com comprimento de onda de, por exemplo, 550 nm”, na verdade isso significa que o feixe em questão abrange uma faixa estreita de comprimentos de onda em torno de 550 nm. A luz emitida em um aparelho de laser é muito mais próxima do monocromático do que qualquer luz obtida por outra fonte. Por exemplo, a luz vermelha obtida por uma lâmpada de gás neônio é menos monocromática que a luz laser vermelha. (YOUNG; FREEDMAN, 2004). A importância dessa propriedade reside no fato de que, em um determinado tecido, tanto a profundidade de penetração quanto a capacidade de absorção do laser estão diretamente relacionadas ao comprimento de onda emitido (MELLO; MELLO, 2001).

Colimação ou Direcionalidade: essa propriedade refere-se à direcionalidade do feixe de luz laser. Na luz comum, as ondas se propagam em várias direções, ou seja, o feixe é divergente. Isso faz com que a intensidade da luz diminua conforme se afasta da fonte. Já no caso do laser, as ondas se propagam de forma paralela entre si. A dispersão é mínima, evitando que o feixe perca intensidade conforme se propaga no espaço. Além disso, o feixe é bem estreito, o que permite a concentração da energia emitida (GENOVESE 2007, BAGNATO, 2001).

Coerência: as ondas emitidas por um laser são ditas coerentes por estarem sincronizadas no tempo e no espaço. Ou seja, elas não apenas possuem o mesmo comprimento de onda e a mesma direção de propagação, como também se encontram alinhadas entre si, crista com crista e vale com vale. Ondas em fase podem somar energia (GENOVESE 2007). Isso acontece quando duas ondas idênticas e em fase ocupam o mesmo espaço ao mesmo tempo. Nesse caso, seus efeitos individuais se somam e é produzida uma onda com a mesma frequência, porém com o dobro da amplitude. Esse fenômeno é explicado pelo princípio da superposição, válido para qualquer tipo de onda (HEWITT, 2002).

A figura 6 ilustra as principais diferenças entre a luz produzida por um equipamento de laser e a luz comum produzida por uma lâmpada incandescente (luz policromática) ou por uma lâmpada de luz monocromática.

Figura 6: Diferenças entre o laser e a luz comum. Em A, lâmpada incandescente comum emitindo ondas de vários comprimentos de onda (luz policromática) em diversas direções. Em B, lâmpada de luz monocromática emitindo ondas com comprimentos de onda próximos e em diversas direções. Em C, aparelho de laser emitindo ondas com comprimentos de onda muito próximos, na mesma direção e com as cristas e ventres alinhados entre si.

2.1.5 Tipos de Laser

Os lasers podem ser classificados, entre outros parâmetros, quanto ao meio ativo que produz a radiação e quanto à potência.

2.1.5.1 Quanto ao Meio Ativo

Em relação ao meio que produz a radiação, os lasers podem ser classificados em: sólidos, gasosos, líquidos ou semicondutores.

a) Laser Sólido: seu meio ativo é constituído de um material sólido, como é o caso do laser de rubi (GENOVESE 2007). Em alguns lasers sólidos, o meio ativo é composto por íons de certos elementos químicos, como o neodímio, o érbio e o holmio, suspensos em um cristal sintético de ítrio e alumínio chamado de cristal YAG (*yttrium aluminum garnet*, ou granada de ítrio e alumínio), pertencente ao grupo das granadas. O cristal YAG serve de hospedeiro para os íons produtores de radiação laser (MISERENDINO; PICK, 1995; WINTNER; STRASSL, 2006; GENOVESE 2007). Entre os mais utilizados estão: o laser de Nd:YAG (neodímio:YAG), o de Er:YAG (érbio:YAG) e o de Ho:YAG (hólmio:YAG) (GENOVESE 2007).

b) Laser Gasoso: é o tipo de laser mais comumente utilizado na odontologia e na medicina. São exemplos: o laser de CO₂, o de HeNe, o de argônio, o de criptônio e o Excimer Laser (GENOVESE 2007).

c) Laser Líquido: seu meio ativo é composto por corantes orgânicos, como a rodamina ou a cumarina. São os chamados “Dye Lasers” (Lasers de Corante). (GENOVESE 2007; MELLO; MELLO, 2001).

d) Laser Semicondutor ou Laser de Diodo: é aquele cuja fonte de radiação é um LED. A palavra LED é a sigla para a expressão *Light Emitting Diode*, que significa Diodo Emissor de Luz. O LED é um tipo de diodo semicondutor que emite luz (MISERENDINO; PICK, 1995).

Um diodo semiconductor é um dispositivo eletrônico composto pela união de duas placas de materiais semicondutores, sendo que uma delas é o pólo positivo (placa P) e a outra, o pólo negativo (placa N) de um circuito (MISERENDINO; PICK, 1995) que permite a passagem de corrente elétrica em um único sentido.

Semicondutores são materiais que podem se comportar algumas vezes como isolantes e algumas vezes como condutores de corrente elétrica. Certos materiais não são bons condutores em sua forma cristalina pura, mas tornam-se excelentes condutores quando impurezas são adicionadas a ele, retirando ou inserindo elétrons em sua estrutura cristalina. (HEWITT, 2002). Por exemplo, o arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl) puro é um pobre condutor de corrente elétrica. Ao passar por um processo de adição de impurezas (átomos de outro material), ele tem seu equilíbrio alterado pela adição de elétrons livres ou pela remoção de elétrons do mesmo, o que o torna um melhor condutor elétrico. O pólo negativo de um diodo é composto de um semiconductor com elétrons extras (livres). O pólo positivo é composto por um semiconductor onde faltam elétrons.

Aplicando-se uma voltagem negativa no pólo negativo, e uma voltagem positiva no pólo positivo, os elétrons livres se movimentam, estabelecendo-se uma corrente elétrica (MISERENDINO; PICK, 1995). Um diodo pode produzir luz devido à movimentação dos elétrons livres. Quando um átomo carregado positivamente (no pólo positivo) “resgata” um elétron livre, há liberação energia em forma de fóton (YOUNG, 1998).

A luz emitida por um LED situa-se dentro de uma faixa relativamente estreita de comprimentos de onda no espectro eletromagnético. Os LEDs mais comuns emitem luz vermelha visível, mas existem aqueles capazes de emitir luz amarela, verde ou infravermelha. (TUNÉR; HODE, 1996). Um laser de diodo é obtido adicionando-se superfícies refletoras em ambas as extremidades da união de semicondutores em um LED, estabelecendo-se com isso uma cavidade ressonante (MISERENDINO; PICK, 1995). Desta forma, é possível obter um feixe de luz muito mais monocromática e coerente, ou seja, um feixe de luz laser.

Como exemplos de lasers de diodo temos: o laser de AsGa (arsenieto de gálio), o de AsGaAl (arsenieto de gálio e alumínio) e o de InGaAlP (fosfeto de índio, gálio e alumínio).

2.1.5.2 Quanto à Potência

De acordo com a potência, os lasers podem ser classificados em:

a) Lasers de Alta Potência: elevam a temperatura local e possuem poder destrutivo. Podem cortar, vaporizar, coagular e desinfetar tecidos (GENOVESE, 2007). Também são chamados de “lasers de alta intensidade” ou “lasers cirúrgicos”. Os lasers de rubi, cristal YAG, CO₂, argônio e o excimer são exemplos de lasers de alta potência (MELLO; MELLO, 2001).

Na odontologia, os lasers de CO₂, Nd:YAG e Er:YAG podem ser utilizados em substituição à lâmina de bisturi em procedimentos cirúrgicos de tecidos moles, como frenectomias, ulotomias, gengivoplastias e excisão de tumores e hiperplasias. Os lasers de Nd:YAG, Er:YAG e argônio são indicados para desinfecção em Endodontia e Periodontia. O laser de argônio é especialmente utilizado na polimerização de resinas compostas e na ativação de produtos clareadores. Para a realização de preparos cavitários, condicionamento de esmalte e dentina, remoção de smear layer, osteotomias e apicectomias, o mais indicado é o laser de Er:YAG. Já para o tratamento de hipersensibilidade dentinária (através do selamento de canalículos), o aparelho normalmente utilizado é o de Nd:YAG. Equipamentos de Er:YAG e Nd:YAG podem também ser empregados na remoção de tecido cariado (MELLO; MELLO, 2001).

b) Lasers de Baixa Potência: não produzem calor significativo nem possuem poder destrutivo. São conhecidos por suas propriedades analgésicas, antiinflamatórias e regeneradoras. Também são denominados “lasers de baixa intensidade” ou “lasers terapêuticos”. Os principais exemplos são o laser de hélio-neônio (HeNe) e os lasers semicondutores de arsenieto de gálio e alumínio (AsGaAl), de arsenieto de gálio (AsGa) e de fosfeto de índio, gálio e alumínio (InGaAlP). (MELLO; MELLO, 2001; GENOVESE, 2007).

Os comprimentos de onda empregados situam-se entre o vermelho e o infravermelho. Comprimentos de onda na faixa do vermelho são indicados principalmente para estimular o processo de reparo de tecidos moles e promover efeito antiinflamatório nos tecidos musculares. Já os comprimentos de onda na faixa do infravermelho são mais utilizados sobre o processo de reparo de tecidos duros e neurais, no controle da dor e na drenagem sobre os linfonodos (LIZARELLI; MACIEL, 2008).

Inicialmente, o laser de baixa potência era tido como “bioestimulador”, um reflexo dos primeiros resultados encontrados nos testes biológicos feitos com esse tipo de laser, entre eles a aceleração do reparo de feridas. No entanto, esse termo passou a ser substituído por “biomodulação”, já que se acredita que esse laser possa tanto estimular quanto inibir a atividade celular (BASFOR, 1995).

Em literatura de língua inglesa, os autores geralmente se referem a esse tipo de laser utilizando termos como *low power laser* ou *therapeutic laser*. Quanto à terapia que emprega esse tipo de laser, são utilizados termos como *low level laser therapy* (LLLT), *low intensity laser therapy* (LILT) ou *low power laser therapy* (LPLT).

Na Odontologia, a terapia a laser de baixa potência é indicada, por exemplo, em casos de queilite angular, aftas, lesões herpéticas, alveolites e em pós-cirúrgicos por promover analgesia, diminuir a inflamação e para acelerar a reparação tecidual. Em pacientes com hipersensibilidade dentinária, além dos efeitos analgésicos e antiinflamatórios, o laser de baixa potência é empregado para estimular a produção de dentina terciária. Essa terapia também vem sendo aplicada para aliviar os sintomas associados à disfunção temporomandibular, acelerar a formação óssea após a colocação de implantes e estimular a reparação nervosa em casos de parestesia e paralisia facial de Bell. Nos quadros de gengivite e periodontite, o laser de baixa é utilizado para controlar a dor, diminuir a inflamação e incrementar a microcirculação sanguínea. Ele tem sido empregado ainda para aliviar a dor e o edema em casos de pericementite e pericoronarite (BRUGNERA et al., 2003).

2.1.6 Dosimetria

Para que se possa determinar a dose de radiação laser que será utilizada em um tratamento, é preciso conhecer os seguintes parâmetros:

Energia (E): é a capacidade de efetuar trabalho. É quantificada em joules (J). (GENOVESE, 2007).

Potência (P): é a grandeza que indica a quantidade de energia depositada por unidade de tempo. É medida em watts (W). (GENOVESE, 2007). Um watt é o mesmo que 1 joule por segundo (1 J/s).

Densidade de energia (DE): é a grandeza que relaciona a quantidade total de energia aplicada com a área irradiada. É expressa em J/cm². De acordo com a fórmula abaixo, é possível perceber que a densidade de energia é inversamente proporcional à área e diretamente proporcional à quantidade de energia aplicada. Ou seja, quanto maior a área, menor é o valor da densidade de energia e vice-versa (GENOVESE, 2007).

$$\text{Densidade de Energia} = \frac{\text{energia (joules)}}{\text{área (cm}^2\text{)}}$$

O parâmetro densidade de energia é normalmente utilizado para expressar a dose de energia recomendada em função do tipo de tratamento (BRUGNERA et al., 2003). O cálculo da DE é feito com base na área da secção transversal do feixe laser (MELLO; MELLO, 2001). No entanto, os primeiros protocolos que regiam o cálculo da DE consideravam que um feixe de laser se distribuía de maneira uniforme através do tecido abrangendo uma área de 1 cm², e que essa deveria ser a área considerada para calcular a DE. Mas essa metodologia foi aos poucos sendo abandonada, visto que é difícil estabelecer com precisão uma área de alcance para um feixe de radiação que incide sobre um tecido biológico devido à complexidade e heterogeneidade desse tecido. Os novos protocolos passaram então a utilizar a área da secção transversal do feixe laser para o cálculo da DE. Como essa área é cerca de 20 vezes menor que 1 cm², as doses recomendadas para terapia a laser de baixa potência passaram de 1 a 4 J/ cm² para 25 a 140 J/cm² (ALMEIDA LOPES; MASSINI).

É importante ressaltar que a mudança não interfere em nada na quantidade final de energia depositada sobre o tecido. Os valores das novas tabelas de dosagem são maiores, mas a energia recebida pelo tecido é a mesma (ALMEIDA LOPES; MASSINI). Isso ocorre porque a quantidade de energia emitida por um aparelho em um determinado tempo não depende do tamanho do feixe. Esse conceito pode ser explicado tomando-se como base dois aparelhos com a mesma potência, que emitem a mesma quantidade de energia em mesmo intervalo de tempo. Se esses aparelhos tiverem feixes com secção transversal diferente, o valor da densidade de energia será maior para o aparelho com a menor secção, mas a quantidade final de energia emitida será a mesma para ambos. O menor feixe concentra a energia. No caso dos novos protocolos, o que mudou não foi a área da secção transversal das ponteiros dos aparelhos, mas o raciocínio é análogo.

Densidade de potência (DP): indica a relação entre a potência e a área irradiada, ou seja, a quantidade de energia por tempo que é aplicada em uma determinada área. É expressa em W/cm^2 (MELLO; MELLO, 2001).

2.1.7 Interação entre o Laser e os Tecidos Biológicos

Assim como qualquer radiação eletromagnética incidindo sobre um anteparo, o laser que incide sobre um tecido pode sofrer reflexão, absorção, difusão ou transmissão (**figura 5**).

Reflexão: ocorre quando a radiação é refletida pela superfície, sem que ocorra penetração ou interação da mesma com o tecido (MISERENDINO; PICK, 1995). Secreção salivar e secreção sebácea apresentam certo grau de reflexão, podendo dificultar a penetração do laser no tecido (BRUGNERA et al., 2003).

Transmissão: ocorre quando o feixe atravessa o tecido sem interagir com o mesmo, ou seja, sem provocar nenhum efeito (MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001). Em algumas situações, pode ocorrer transmissão de um tecido para outro até que a radiação alcance um tecido com afinidade para absorvê-la (MELLO; MELLO, 2001).

Absorção: ocorre quando componentes teciduais, tais como moléculas de água ou substâncias cromóforas, como a melanina e a hemoglobina, absorvem a radiação. Nesse caso, existe uma transferência de energia para o tecido (MISERENDINO; PICK, 1995; GENOVESE, 2007).

Difusão: ocorre quando a radiação penetra o tecido e é dissipada sem produzir efeitos significantes (MISERENDINO; PICK, 1995).

Esses quatro fenômenos em geral ocorrem simultaneamente quando se trata de um feixe de laser incidindo sobre um tecido biológico, o que pode ser atribuído à falta de homogeneidade desse tipo de tecido. Tecidos biológicos são sistemas complexos, compostos por uma grande variedade de fluidos e elementos celulares, cada um com diferentes propriedades ópticas (MISERENDINO; PICK, 1995). A taxa de ocorrência de cada um desses

fenômenos é determinada basicamente por dois fatores: a **composição do tecido** e o **comprimento de onda** emitido pelo laser (MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001). O comprimento de onda é o que determina a profundidade de penetração da radiação e o tipo de tecido que irá absorvê-la (ROCHA, 2004). A radiação absorvida é aquela que produzirá efeitos no tecido (MISERENDINO; PICK, 1995; GENOVESE, 2007).

Figura 7 - Interações do laser com o tecido/anteparo.

A capacidade de um tecido em absorver a radiação laser está intimamente relacionada ao comprimento de onda. No entanto, os resultados da interação da energia absorvida com o tecido dependem de diversos outros fatores, entre eles: a potência do laser, a quantidade de energia aplicada, o modo de aplicação (emissão contínua ou pulsada, aplicação pontual ou por varredura, por contato ou não), o tempo de exposição e a presença ou não de sistema de refrigeração (MISERENDINO; PICK, 1995; MELLO; MELLO, 2001).

Os efeitos resultantes da absorção da radiação laser pelos tecidos serão comentados na seção 2.3 (Laser de Baixa Potência em Reconstrução Tecidual).

2.2 RECONSTRUÇÃO TECIDUAL

2.2.1 Pele e Mucosas

O presente estudo teve início com a intenção de verificar a influência do laser de baixa potência no processo de reparo de incisões cirúrgicas em mucosa oral. Devido às semelhanças estruturais existentes entre pele e mucosas, e pela maior facilidade de manipulação e controle do experimento, decidiu-se pela confecção e avaliação de incisões cutâneas em dorso de ratos.

Tanto a pele quanto as mucosas são formadas por epitélio ancorado em tecido conjuntivo. **Epitélios** são tecidos formados por células justapostas, com pouca substância extracelular entre elas, e não contêm vasos sanguíneos. Já os **tecidos conjuntivos** caracterizam-se pela abundância de material extracelular rico em fibras. No caso da pele e das mucosas, o epitélio encontra-se apoiado em tecido conjuntivo propriamente dito (fibroso), vascularizado, de onde retira seus nutrientes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Tanto a pele quanto a mucosa oral possuem epitélio do tipo estratificado pavimentoso. As principais diferenças residem na queratinização ou não do epitélio e nos anexos presentes (que podem variar de acordo com a espécie animal e a região do organismo). Nos mamíferos em geral, a pele possui epitélio queratinizado e pode haver presença de pêlos, unhas, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias. Já na mucosa oral, os anexos presentes são as glândulas salivares. Nas bochechas e no palato, o epitélio é do tipo não-queratinizado, enquanto que, na gengiva inserida, ele é queratinizado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

2.2.2 Estrutura da Pele de Mamíferos

A estrutura da pele será discutida com maior profundidade para facilitar o entendimento do processo de reparo das incisões cutâneas avaliadas neste estudo.

Em geral, a estrutura da pele é similar para todos os mamíferos (MONTEIRO-RIVIERE, 2006). A pele é constituída basicamente por duas camadas: **epiderme** e **derme**. A epiderme, mais superficial, é formada por tecido epitelial, enquanto a derme, por tecido conjuntivo. A **hipoderme**, também conhecida como **tecido subcutâneo**, é formada por tecido conjuntivo e localiza-se logo abaixo da derme, mas não é parte constituinte da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

EPIDERME → *Tecido Epitelial* }
DERME → *Tecido Conjuntivo* } **Pele**
HIPODERME → *Tecido Conjuntivo*

A pele desempenha diversos papéis no organismo. Ela o protege contra a perda de água, o atrito e contra a invasão de microorganismos e corpos estranhos. Através de suas terminações nervosas sensoriais, responsáveis pelo tato, pela sensação de prurido e pela percepção de dor e temperatura, a pele exerce comunicação constante com o ambiente. Por meio de vasos sanguíneos e glândulas sudoríparas, ela também auxilia na regulação da temperatura corporal. Outra importante função da pele é a função excretora, desempenhada por suas glândulas sudoríparas, que eliminam resíduos do metabolismo (catabólitos). (BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Por fim, a ação dos raios ultravioletas na pele transforma o 7-deidrocolecalfiferol em vitamina D₃, importante na regulação dos níveis de cálcio no organismo (BANKS, 1992).

2.2.2.1 Epiderme

O epitélio que constitui a epiderme é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado. Estratificado porque apresenta várias camadas de células, e pavimentoso porque a camada mais superficial é composta por células achatadas. Quanto mais próximas da superfície, mais achatadas são as células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O número de camadas celulares que compõem a epiderme varia de acordo com a região do corpo (DELLMANN; BROWN, 1982; BANKS, 1992; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; BACHA; BACHA, 2003). Em sua maior complexidade, a epiderme apresenta 5 camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal é a mais profunda, ou seja, mais próxima da derme. Também é conhecida como “camada germinativa”, já que possui intensa atividade mitótica e é responsável pela constante renovação da epiderme. É uma camada única de células cubóides ou prismáticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; BACHA; BACHA, 2003). A camada córnea é a mais superficial, constituída por células mortas, achatadas e sem núcleo, com o citoplasma repleto de queratina. As outras camadas são intermediárias. À medida que a célula se diferencia, a quantidade de queratina em seu citoplasma aumenta e ela avança para a superfície (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Nas regiões onde há uma densa camada protetora de pêlos, a epiderme é delgada e mais simples (DELLMANN; BROWN, 1982; BACHA; BACHA, 2003). A camada lúcida só está presente em regiões onde a pele é espessa e desprovida de pêlos, como nos coxins plantares (DELLMANN; BROWN, 1982; BANKS, 1992; BACHA; BACHA, 2003).

Na epiderme, além das células epiteliais comuns, encontram-se dois outros tipos de células: os melanócitos e as células de Langerhans. Os **melanócitos**, geralmente permeados entre as células da camada basal e da camada espinhosa, sintetizam um pigmento chamado melanina, que protege a pele dos raios ultravioletas. Através de seus prolongamentos citoplasmáticos, os melanócitos injetam a melanina nas células basais e espinhosas. No interior do melanócito existe uma enzima, a tirosinase, que participa do processo de síntese da melanina. Nos animais albinos, não há produção de melanina por falha de atividade tirosinásica. Já as **células de Langerhans** são células apresentadoras de antígenos e fazem parte do sistema imunitário. Originárias de células precursoras formadas na medula óssea e trazidas pelo sangue, elas se encontram distribuídas por toda epiderme, mas são mais frequentes na camada espinhosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Folículos pilosos, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias são anexos da epiderme que se invaginam na derme e na hipoderme (BANKS, 1992; BACHA; BACHA, 2003).

2.2.2.2 Derme

A derme é formada por tecido conjuntivo propriamente dito, ou seja, não especializado. Esse tecido é constituído basicamente por **células, matriz extracelular e fibras**.

O componente celular mais abundante é a célula responsável pela síntese de fibras e de proteínas estruturais que formam a matriz extracelular. Essa célula é chamada de **fibroblasto** quando se encontra em plena atividade sintetizadora e de **fibrócito** quando entra em estado de repouso. O fibroblasto tem prolongamentos citoplasmáticos irregulares. Seu núcleo é grande, claro e ovóide. O fibrócito é menor, fusiforme e com menos prolongamentos citoplasmáticos. Seu núcleo é menor e mais escuro. Frente a uma lesão, durante o processo de reparo tecidual, o fibrócito pode reassumir a forma de fibroblasto, voltando a sintetizar fibras e componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No processo de reconstrução tecidual, também é possível encontrar o **miofibroblasto**. Essa célula tem a morfologia de um fibroblasto, mas contém maior quantidade de actina e

miosina, apresentando características funcionais intermediárias entre um fibroblasto e uma célula muscular lisa. O miofibroblasto auxilia no processo de contração das feridas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Além dos fibroblastos, é possível encontrar outros tipos de célula no tecido conjuntivo, como macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e linfócitos). (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A porção extracelular do tecido conjuntivo é formada por **fibras** e pela **matriz extracelular** (ou substância fundamental), um gel viscoso onde existe um arcabouço de macromoléculas ligando fibras e células. As fibras podem ser colágenas ou elásticas. No entanto, em cortes histológicos corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), as fibras elásticas dificilmente são visualizadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

2.2.2.3 Peculiaridades da Pele do Dorso de Ratos

A pele do dorso de ratos é densamente coberta por pêlos. A epiderme é delgada e apresenta 4 camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (DELLMANN; BROWN, 1982; KRINKE, 2000). Ao redor dos folículos pilosos, encontram-se as glândulas sebáceas. Não há presença de glândulas sudoríparas (nos ratos, essas glândulas estão presentes apenas nos coxins plantares). (KRINKE, 2000). Nos ratos albinos, apesar de haver a presença de melanócitos, não há produção de melanina (TUCKER, 1997).

2.2.3 Regeneração, Reparação, Cicatrização e Fibrose Cicatricial

Alguns autores fazem a seguinte distinção entre os termos “reparação”, “regeneração”, “cicatrização” e “fibrose cicatricial”:

Reparação: ocorre sempre às custas de tecido de granulação. É o mecanismo de reconstrução próprio dos tecidos conjuntivos, que são vascularizados e estão sujeitos à inflamação e à formação de tecido de granulação. A reparação ocorre tanto em tecido conjuntivo propriamente dito (fibroso) quanto em tecido conjuntivo especializado, como é o caso do tecido ósseo (CONSOLARO, 2009).

Regeneração: é o mecanismo de reconstrução próprio dos tecidos sem natureza conjuntiva, como epitélios glandulares e de revestimento, órgãos viscerais, músculos e nervos

periféricos. Ocorre através da proliferação direta do remanescente tecidual, por proliferação das células desse tecido, sem formação de tecido de granulação (CONSOLARO, 2009).

Cicatrização: o termo refere-se ao surgimento de marcas, sinais. Tanto a regeneração quanto a reparação podem deixar cicatrizes. No epitélio que forma a epiderme, por exemplo, pode não ocorrer a regeneração de melanócitos e folículos pilosos, deixando cicatriz na pele (CONSOLARO, 2009).

Fibrose Cicatricial: ocorre quando, após grandes lesões em tecidos especializados, parte do espaço é preenchida por tecido conjuntivo fibroso durante o processo de reconstrução tecidual. Isso ocorre porque tecidos especializados, como os tecidos viscerais, se recompõem mais lentamente. Como o organismo não tolera espaços vazios, o tecido conjuntivo fibroso adjacente forma tecido de granulação e acaba preenchendo o espaço. Num fígado relativamente sadio, quando ocorrem lesões, os hepatócitos se proliferam repondo as células perdidas através de regeneração. Num fígado doente, os hepatócitos podem perder a capacidade de proliferação e a restauração do espaço ocorre às custas de tecido de granulação proveniente do estroma⁶, formando áreas de fibrose cicatricial (CONSOLARO, 2009).

No caso da reconstrução tecidual após uma ferida de pele, ocorrerá tanto reparação quanto regeneração. A epiderme e os nervos periféricos sofrem regeneração, enquanto a derme sofre reparação a partir da formação de tecido de granulação (CONSOLARO, 2009).

No entanto, a maioria dos autores não faz essa distinção. Muitos utilizam os termos “reparação”, “regeneração” e “cicatrização” como sinônimos. Neste texto, os termos utilizados estarão de acordo com os respectivos autores no momento da citação de seus trabalhos.

2.2.4 Inflamação e Reparo

A resposta inflamatória é uma reação de defesa que ocorre em tecido conjuntivo vascularizado frente a uma agressão, seja ela de natureza física, química ou microbiana. O

⁶ Estroma é o tecido de sustentação de um órgão, enquanto parênquima é o conjunto de células responsáveis pelas funções típicas do órgão. No fígado, o tecido conjuntivo constitui o estroma e os hepatócitos constituem o parênquima {**Junqueira e Carneiro, 1999**}.

papel da inflamação não se restringe a combater o agente lesivo. Ela também desencadeia uma série de reações que promovem a **reparação tecidual**. O processo de reparo começa já nas fases iniciais da inflamação. Entretanto, a inflamação pode produzir efeitos indesejáveis, como dor, inchaço e perda de função local. Em algumas ocasiões, como em reações de hipersensibilidade, ela pode ser altamente destrutiva. As drogas e os tratamentos antiinflamatórios, como é o caso da terapia a laser de baixa potência, foram desenvolvidos para modular a reação inflamatória, controlando seus efeitos nocivos e ressaltando seus efeitos benéficos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

2.2.5 Cicatrização por Primeira Intenção

O processo de reparo de feridas não-infectadas, cujas bordas encontram-se coaptadas, é denominado “*união primária*” ou “*cicatrização por primeira intenção*”. Um exemplo é a cicatrização que ocorre em incisões cirúrgicas limpas cujas bordas foram unidas através de suturas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A seguir, será descrita a cicatrização por primeira intenção de uma incisão cutânea, como as que foram confeccionadas neste trabalho.

Logo após a incisão, o estreito espaço existente entre as bordas da ferida é preenchido por sangue coagulado, rico em fibrina e células sanguíneas. Na superfície da pele, o coágulo em contato com o ar sofre desidratação e forma a chamada crosta.

Em 24 horas: neutrófilos (vindos do próprio tecido conjuntivo ou diretamente da circulação sanguínea) chegam às margens da incisão e então se deslocam para o interior do coágulo. As células epiteliais da camada basal próximas às bordas da ferida entram em atividade mitótica e causam um espessamento do epitélio na região onde o tecido foi seccionado.

Entre 24 e 48 horas: projeções de células da camada basal crescem e se fundem na linha média abaixo da crosta, formando uma camada epitelial contínua, porém fina. À medida que essas células migram em direção à borda adjacente, depositam componentes da membrana basal⁷ pelo caminho.

⁷ Na superfície de contato com a derme, as células da camada basal secretam a chamada **lâmina basal**, uma estrutura composta principalmente por colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas. Na pele e em algumas outras regiões do organismo é possível observar, entre a derme e a lâmina basal, um acúmulo de fibras reticulares e proteínas. Juntas, a lâmina basal e essa estrutura formam a **membrana basal**. Nos epitélios frequentemente sujeitos a atrito, como é o caso da pele, a membrana basal se fixa ao conjuntivo subjacente por meio de fibrilas de colágeno, chamadas fibrilas de ancoragem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Em 72 horas: a maior parte dos neutrófilos é substituída por macrófagos. O tecido de granulação invade progressivamente o espaço deixado pelo corte. As células basais continuam se proliferando e a camada epidérmica já se encontra mais espessa.

Até o 5º dia: o tecido de granulação preenche completamente o espaço deixado pela incisão. O grau de neovascularização é alto. A epiderme já apresenta espessura normal, com sua superfície queratinizada devido à diferenciação das células mais superficiais. O colágeno é abundante e começa a formar pontes entre as bordas da ferida.

Durante a 2ª semana: os fibroblastos se proliferam e produzem colágeno continuamente. O edema e o número de células inflamatórias diminuem consideravelmente. A quantidade de vasos sanguíneos também diminui. Associados, o acúmulo de colágeno e a diminuição da vascularização causam o empalidecimento da região.

Em 30 dias: não há mais infiltrado inflamatório e a epiderme encontra-se normal. No entanto, pode levar vários meses para que o tecido recupere sua força elástica. Além disso, os anexos epidérmicos que eventualmente existiam no tecido que foi lesado não se regeneram. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os eventos teciduais e os períodos descritos acima referem-se ao processo de cicatrização por primeira intenção em seres humanos. Autores de textos de patologia voltados à medicina veterinária fazem descrições muito semelhantes para o grupo dos mamíferos, sem distinção entre as espécies (BANKS, 1992). Todavia, a ocorrência de algumas variações, especialmente em relação aos períodos de tempo, já é esperada quando se trata de fenômenos biológicos envolvendo diferentes espécies.

2.3 LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM RECONSTRUÇÃO TECIDUAL

A radiação absorvida pelo tecido é aquela que produz efeitos no mesmo. (MISERENDINO; PICK, 1995; GENOVESE, 2007). A resposta do tecido a essa radiação não depende apenas do comprimento de onda. Ela é altamente influenciada pela densidade de potência e pelo tempo de exposição (MISERENDINO; PICK, 1995).

Os efeitos provocados pelos lasers de alta potência nos tecidos são bem conhecidos e fundamentados na literatura. São chamados de **efeitos fototérmicos**, já que a energia do laser é absorvida em forma de calor. Os efeitos variam de eritemas a queimaduras, dependendo do grau de elevação da temperatura local. Os lasers de alta potência têm capacidade de coagular

o conteúdo protéico e vaporizar o conteúdo hídrico celular. Por isso são utilizados para cortar ou remover tecidos, promover hemostasia e matar microorganismos (GENOVESE, 2007).

Já os efeitos produzidos pelos lasers de baixa potência são motivo de controvérsias na literatura (WALKER et al., 2000; KREISLER et al., 2003; DAMANTE et al. 2004; ROCHA-JÚNIOR et al., 2006; HENRIQUES et al., 2008). Pouco se sabe sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na ação desse laser (KREISLER et al., 2003; SAWASAKI et al., 2009). Segundo Miserendino e Pick (1995), esses efeitos, chamados de **efeitos fotoquímicos**, acontecem em nível molecular e envolvem o aumento do metabolismo celular. Segundo os autores, ao penetrar no tecido, a luz laser de baixa potência pode ser absorvida pelo citocromo, uma molécula fotossensível presente na mitocôndria. Os citocromos são responsáveis por transformar adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), fornecendo energia para a célula. Quando o citocromo absorve a energia do laser, a produção de ATP aumenta e, com isso, aumenta também o metabolismo celular. A capacidade do laser em atingir as moléculas fotossensíveis depende do espectro de absorção dessas moléculas, ou seja, dos comprimentos de onda que elas absorvem. Um exemplo comum de reação fotoquímica naturalmente induzida é a fotossíntese, onde fótons são absorvidos pela clorofila, uma substância fotossensível presente nas plantas. Durante a fotossíntese, a energia luminosa é utilizada para a produção de ATP (MISERENDINO; PICK, 1995).

Dentre os fenômenos decorrentes do aumento do metabolismo celular citados pelos autores estão: **aumento da proliferação de fibroblastos e células endoteliais** durante o processo de reparo tecidual; **ativação de células T supressoras**, as quais inibem os linfócitos B de produzirem anticorpos (menos anticorpos significam menor resposta inflamatória); **restauração da normalidade das bombas de sódio**, cuja função é manter um potencial negativo nas membranas neuronais (com a inflamação, esse potencial fica alterado e a transmissão da dor aumenta). Outros autores citam ainda: **aumento da produção de fibras colágenas** (BRUGNERA et al. 2003; PARKER, 2007), **da proliferação de macrófagos, linfócitos e células epiteliais** (PARKER, 2007), **da transformação de fibroblastos em miofibroblastos** (PARKER, 2007) e **da degranulação de mastócitos**, o que favorece a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular através da liberação de histamina (GENOVESE, 2007; SAWASAKI, 2009)

Muitos autores afirmam que o laser de baixa potência pode provocar essas reações nos tecidos. No entanto, em alguns estudos, os resultados apresentados não são satisfatórios ou estatisticamente significantes (WALKER et al., 2000; PUGLIESE et al., 2003; DAMANTE et al., 2004).

Os trabalhos descritos a seguir representam uma visão geral da literatura existente sobre a ação do laser de baixa potência em reparo tecidual. Os trabalhos reunidos mostram os diferentes modelos experimentais utilizados e as divergências nos resultados.

Frente às inúmeras controvérsias encontradas na literatura em torno da real eficácia da terapia a laser de baixa potência, Walsh (1997) conduziu um estudo de revisão onde procurou selecionar os trabalhos dotados de uma metodologia bem estruturada e controlada. Quanto aos efeitos dessa terapia sobre a cicatrização de feridas em tecido moles, o autor encontrou um consenso entre os estudos: baixas doses (por ex.: 2 J/cm²) são estimulatórias, enquanto altas doses (por ex.: 16 J/cm²) são inibitórias. As principais mudanças relatadas nas feridas tratadas com laser de baixa potência foram: aumento do tecido de granulação, epitelização precoce, aumento da proliferação de fibroblastos e da síntese de matriz extracelular e aumento da neovascularização. Os melhores resultados se deram com aplicações diárias do laser. Aplicações em dias alternados trouxeram menos benefícios. Além disso, aplicações pré-operatórias não influenciaram significativamente no processo de reparo. De acordo com os achados de Walsh, o laser de baixa potência atua na proliferação dos fibroblastos estimulando a produção do fator de crescimento bFGF (*basic fibroblast growth factor*), um polipeptídeo multifuncional que age na proliferação e na diferenciação dos fibroblastos. Outro efeito do laser de baixa potência citado pelo autor, o qual pode influenciar no processo de cicatrização de feridas, é o estímulo à transformação de fibroblastos em miofibroblastos, que auxiliam no processo de contração das feridas. A maturação e a locomoção dos fibroblastos também são influenciadas pela terapia a laser de baixa potência. Além disso, o autor encontrou evidências de que o laser de baixa potência pode agir aumentando a atividade fagocitária dos macrófagos durante a fase inicial do processo de cicatrização (nas primeiras 6 horas após o trauma).

Garcia et al., em 2000, analisaram, histologicamente, a influência do número de aplicações de laser de baixa potência (equipamento Cavity D1 UP, Space Laser, AsGa, 904 nm, emissão infravermelha) sobre o processo de reparo de feridas de extração dentária em ratos. Foram utilizados 64 animais. O procedimento cirúrgico consistiu na extração do incisivo superior direito e sutura das bordas da ferida com fio de seda 4-0. Após a cirurgia, os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o número de aplicações do laser: **Grupo 1 (Controle)**: nenhuma aplicação; **Grupo 2**: uma aplicação imediatamente após a cirurgia; **Grupo 3**: duas aplicações, imediatamente e 24 horas após a cirurgia; e **Grupo 4**: três aplicações, imediatamente, 24 e 48 horas após o ato cirúrgico. Cada aplicação durou 3 minutos e totalizou 0.36 J/cm² de energia. Decorridos 3, 7, 14 e 21 dias do ato cirúrgico, 4 animais de cada grupo foram mortos. A porção da maxila correspondente ao alvéolo e tecidos

adjacentes foi removida e preparada para análise microscópica descritiva. Os resultados mostraram que as feridas tratadas com laser apresentaram organização mais rápida do coágulo sanguíneo, aumento da proliferação fibroblástica e vascular, formação óssea precoce e intensa e fechamento mais rápido das bordas epiteliais da ferida em relação ao grupo controle. Os grupos que receberam mais de uma aplicação de laser demonstraram processo de reparação alveolar mais acelerado, com maiores evidências no grupo 4, que recebeu três aplicações. Os eventos biológicos mostraram-se mais evidentes nos períodos iniciais de 3 e 7 dias. Não houve efeitos indesejáveis nos grupos tratados com laser.

No mesmo ano, Walker et al. investigaram a capacidade do laser de AsGaAl (660 nm, 15 mW de potência, pulsátil) em acelerar o fechamento de feridas cutâneas em camundongos submetidos a uma dose prejudicial de raios X. O estudo foi realizado em duas fases. Na primeira fase, foram utilizados 36 animais. Após depilação dorsal, uma área de 4 cm² de pele foi exposta a 20 Gy (Gray = J/Kg) de raios X em cada animal. Para isso, os animais foram protegidos com um dispositivo de chumbo fenestrado que permitia a passagem da radiação somente na área desejada. Os limites dessa área foram demarcados permanentemente através de tatuagens. Passadas 72 horas, um fragmento de pele com 7 mm de largura por 7 mm de comprimento foi excisionado a partir da área previamente exposta aos raios X. Feito isso, os animais foram distribuídos em 3 grupos, da seguinte maneira: **Grupo 1)** controle, nenhum tratamento com laser; **Grupo 2)** tratamento com dose de 0,5 J/cm² de laser de baixa potência; **Grupo 3)** tratamento com 1,5 J/cm² de laser de baixa potência. O tratamento com laser nos grupo 2 e 3 ocorreu 1 vez por semana, durante 3 semanas. As feridas de todos os grupos foram fotografadas três vezes por semana junto a uma escala de medida. As áreas das feridas foram calculadas com o auxílio de um software de análise de imagens (Fenestra v2.1). Na segunda fase, foram utilizados 24 animais divididos em 2 grupos: controle e tratado com 4 J/cm² de laser. Os procedimentos experimentais que antecederam o tratamento com laser foram os mesmos da primeira fase (exposição aos raios X e excisão do fragmento de pele). As áreas das feridas também foram mensuradas da mesma forma. Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao tamanho das feridas entre os grupos tratados com laser e o grupo controle na fase 1. Nas medições feitas entre 2 e 7 dias, as feridas do grupo controle apresentavam menor área (o que indica um estágio de reparo mais avançado) do que as dos grupos tratados com laser, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Na fase 2, também não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao fechamento das feridas entre o grupo controle e o grupo teste em nenhum momento. Portanto, o laser de baixa

potência não acelerou o processo de reparo de feridas cutâneas em camundongos sob os parâmetros avaliados neste estudo.

De acordo com Pugliese et al., em 2003, o efeito da terapia a laser de baixa potência sobre o processo de cicatrização de feridas pode ser avaliado medindo-se a produção de elementos da matriz extracelular por células irradiadas durante este processo. Sendo assim, desenvolveram um estudo para avaliar o efeito do laser de AsGaAI (Dentoflex, Brasil, 670 nm, 9 mW de potência) sobre a produção de fibras colágenas e elásticas por células irradiadas em comparação com células não irradiadas. Para tal, foram utilizados 72 ratos Wistar divididos em 3 grupos: **Grupo Controle**, nenhuma aplicação de laser; **Grupo I**, uma aplicação de 4 J/cm² de energia e **Grupo II**, uma aplicação de 8 J/cm² de energia. O procedimento cirúrgico consistiu na confecção de uma ferida aberta de 8 mm de diâmetro no dorso de cada animal com o auxílio de um instrumento do tipo *punch* para biópsia. A aplicação do laser foi feita por contato, em sessão única, imediatamente após o ato cirúrgico. Quatro animais de cada grupo foram mortos nos períodos de 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias após o ato cirúrgico. Os cortes histológicos obtidos a partir dos fragmentos de pele correspondentes às margens da área lesada foram corados com hematoxilina-eosina, sítius vermelho (para evidenciar fibras colágenas) e orceína (para fibras elásticas). A presença de fibras foi analisada por meio de escores (ausente, suave, moderada ou marcante). Os autores observaram uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas nos grupos submetidos ao laser, especialmente nos tratados com a dosagem de 4 J/cm². No entanto, os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em 2003, Kreisler et al. avaliaram o potencial estimulatório do laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos provenientes de ligamento periodontal humano e cultivados *in vitro*. No total, foram avaliadas 220 culturas, divididas igualmente em dois grandes grupos: teste (tratado com laser) e controle. As culturas do grupo teste foram irradiadas com laser de diodo de AsGaAI com comprimento de onda de 809 nm e 10 mW de potência. A ponteira do aparelho foi mantida a uma distância de 9 mm das culturas e o feixe de laser foi emitido de forma contínua. Os parâmetros variáveis foram o tempo de exposição (75, 150 e 300 segundos) e o número de aplicações (1 a 3 aplicações, com intervalo de tempo de 24 horas entre elas). As culturas do grupo controle foram tratadas igualmente às do grupo teste, exceto pelo fato de não receberem radiação laser. Em função do tempo de exposição, a densidade de energia recebida foi de 1.96, 3.92 e 7.84 J/cm², respectivamente. A taxa de proliferação de todas as culturas foi medida 24, 48 e 72 horas após o período de testes. O método de avaliação utilizou um indicador de atividade metabólica (Alamar Blue[®] Assay) que muda de cor

conforme detecta reações químicas relacionadas ao crescimento celular. Os resultados obtidos revelaram um crescimento consideravelmente maior nas culturas irradiadas do que nas culturas do grupo controle, independentemente do tempo de exposição e do número de aplicações. As diferentes doses de energia tiveram efeitos similares sobre as culturas.

Damante et al. (2004) desenvolveram um estudo para avaliar a capacidade do laser de baixa potência em acelerar o processo de cicatrização após gengivoplastias em seres humanos. Dezesseis pacientes com hiperplasia gengival inflamatória na região de canino a canino (arcada inferior ou superior) foram submetidos a gengivoplastia. Após a cirurgia, o laser foi aplicado de forma pontual nas áreas de mucosa queratinizada correspondentes aos dentes 11, 12 e 13 ou 41, 42 e 43, totalizando 3 pontos de aplicação. A densidade de energia fornecida foi de 4 J/cm^2 por ponto de aplicação a cada 48 horas durante uma semana (laser de diodo de AsGaAl, 670 nm, 15 mW de potência). Ao todo, foram feitas 4 sessões de aplicações. O lado esquerdo não foi irradiado e serviu como controle. Aos 7, 14, 21 e 60 dias de pós-operatório, foram realizadas biópsias incisionais em ambos os lados (teste e controle). Para cada período, 4 pacientes foram submetidos à biópsia. Fragmentos de tecido com aproximadamente 3 mm de altura e 2 mm de largura, removidos da região da papila gengival entre o canino e o incisivo lateral de cada lado, foram processados para a confecção de lâminas histológicas. Os resultados foram obtidos através de análise descritiva e morfométrica. A análise morfométrica consistiu na mensuração da espessura do epitélio, da densidade de volume de cada uma das suas camadas e da relação entre o comprimento da superfície externa (luminal) e da superfície interna (basal) do mesmo (o aumento da superfície basal indica maior grau de maturação do epitélio, traduzido pelo aumento do tamanho das cristas epiteliais). Para isso, foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de 40 vezes de aumento conectado a uma câmera fotográfica e a um computador dotado de um software especializado (Kontron KS300). Também foi determinado o volume dos núcleos das células das camadas basal e espinhosa. Esses valores foram calculados a partir da mensuração do diâmetro de 30 núcleos inteiros de cada tipo celular por espécime. Posteriormente, a densidade de volume dos núcleos, ou seja, a fração de volume que os núcleos ocupam em relação às células, foi calculada através do método de contagem de pontos em um retículo de integração. O valor da densidade foi conseguido dividindo-se o número de pontos coincidentes com núcleos pelo número total de pontos (coincidentes com núcleos e citoplasma). No tecido conjuntivo, foi determinada a densidade de volume das fibras colágenas e dos vasos sanguíneos através do sistema de contagem de pontos em um retículo de integração. O valor da densidade foi conseguido dividindo-se o número de pontos coincidentes com as estruturas em questão com o número total de pontos.

Foi feita ainda a contagem do número de fibroblastos e células inflamatórias por mm² de tecido. Todos os parâmetros quantificados morfometricamente foram submetidos a análise estatística, a qual não revelou diferenças significantes entre os espécimes do grupos teste e do grupo controle. Analisando os cortes histológicos, os autores também não observaram diferenças em relação à maturação da mucosa gengival entre os grupos, concluindo que o laser não acelerou o processo de reparo.

Para entender o efeito do laser de baixa potência sobre o processo de reparo de feridas, Pourzarandian et al. (2005) realizaram um estudo *in vitro* onde fibroblastos provenientes de tecido gengival humano foram expostos a esse tipo de radiação. Trinta e seis placas de cultura foram divididas em 5 grupos da seguinte forma: **grupo 1**, controle, sem aplicação de laser (9 placas); **grupo 2**, aplicação de 1.68 J/cm² (6 placas); **grupo 3**, aplicação de 2.35 J/cm² (6 placas); **grupo 4**, aplicação de 3.37 J/cm² (9 placas); **grupo 5**, aplicação de 5 J/cm² (6 placas). Foi utilizado um equipamento de Er:YAG operando em baixa potência, com comprimento de onda de 2940 nm, no modo de emissão pulsátil (ER-M1 HOYA, Continuum Corp, Tokyo, Japan). A peça de mão do aparelho foi posicionada a uma distância de 15 cm das placas de cultura para irradiar uma área equivalente a 35 mm. Passadas 24 horas da aplicação do laser, 3 placas de cada grupo foram submetidas à mensuração do nível de LDH (lactato desidrogenase) e da viabilidade dos fibroblastos. Outras 3 placas de cada grupo foram utilizadas para medir a viabilidade dos fibroblastos 72 horas após a aplicação do laser. A viabilidade dos fibroblastos foi determinada medindo-se a capacidade das células em eliminar o corante azul de tripan ao qual foram submetidas. Após a coloração, as células viáveis e não-viáveis (azuis) foram analisadas em microscópio e contadas, estabelecendo-se uma relação percentual entre elas. Maiores quantidades de células viáveis significam maior crescimento celular. A mensuração do nível de LDH foi feita para indicar o grau de morte celular. As análises não revelaram diferença estatisticamente significativa na taxa de crescimento celular entre as culturas irradiadas e as do grupo controle no período de 24 horas. No período de 72 horas, a taxa de proliferação foi maior nos grupos 2, 3 e 4 que no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa. No grupo 5 não houve crescimento celular, o número de células diminuiu. Os melhores resultados foram obtidos com 3.37 J/cm². O nível de LDH (medido 24 horas após a irradiação com laser) foi menor nos grupos 2, 3 e 4 que no grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Já no grupo 5, o nível foi maior que no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa. Por fim, 3 placas do grupo controle e 3 do grupo 4, que apresentou os melhores resultados, foram preparadas para análise em microscópio óptico e microscópio de transmissão eletrônica. As análises foram feitas

imediatamente, 24 e 72 horas após a aplicação do laser. A análise imediata feita no microscópio óptico revelou que, no grupo 4, as células se apresentavam arredondadas e irregulares, enquanto no grupo controle as células estavam alongadas, com o típico formato de fibroblasto. A análise feita no microscópio eletrônico de transmissão foi compatível com os achados da microscopia óptica para o grupo controle. No grupo 4, essa análise permitiu constatar que o laser não causou danos à membrana celular. No período de 24 horas, as análises não revelaram diferenças marcantes entre os grupos. A microscopia óptica mostrou células alongadas em ambos os grupos. A microscopia eletrônica mostrou que as células se encontravam enfileiradas e próximas umas das outras. No período de 72 horas, as células do grupo controle tinham formato alongado, enquanto as células irradiadas eram mais irregulares (microscopia óptica). Com a microscopia eletrônica, foi possível notar que as células do grupo tratado com laser se apresentavam metabolicamente mais ativas que as do grupo controle, com complexos de Golgi mais desenvolvidos e maior número de mitocôndrias. De acordo com os autores, os resultados sugerem que o laser de baixa potência pode auxiliar no processo de reparo de feridas estimulando a proliferação de fibroblastos.

Rocha-Júnior et al., em 2006, estudaram o comportamento de feridas cutâneas submetidas a tratamento com laser de baixa potência. Doze ratos Wistar foram divididos em dois grupos: controle e tratado com laser (teste). Com auxílio de um *punch* de 10 mm de diâmetro, foi feita a remoção de um fragmento circular de tecido cutâneo do dorso dos animais. No grupo teste, foram feitas três aplicações de laser de diodo de AsGa (infravermelho, 870 nm, pulsátil, 15 mW de potência, equipamento Twin Laser, MM Optics®), sendo a primeira imediatamente após o ato cirúrgico, a segunda 48 horas e a terceira 7 dias após o mesmo. As aplicações foram feitas pelo método de varredura e duraram 15 segundos cada uma. Em cada aplicação a dose recebida foi de 3.8 J/cm². Decorridos 10 dias do ato cirúrgico, os animais foram sacrificados e as porções de tecido referentes às lesões foram coletadas para a confecção de lâminas histológicas. A avaliação se deu através de análise histológica descritiva e morfométrica. Para a análise morfométrica, foram capturadas imagens de quatro campos microscópicos aleatórios em cada lâmina histológica. As imagens foram submetidas à contagem do número total de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Além disso, o diâmetro das áreas ulceradas das lesões foi mensurado com auxílio de marcação digital. De acordo com as observações dos autores, os animais do grupo controle apresentaram discreta proliferação epitelial junto às bordas da ferida e presença de ampla área de ulceração com material fibrino-necrótico cobrindo o tecido de granulação. Já nos animais do grupo tratado com laser, a epiderme se apresentava íntegra, revestindo um tecido de

granulação bem desenvolvido e organizado, rico em fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida. A análise morfológica revelou redução estatisticamente significativa do diâmetro das áreas ulceradas e da quantidade de células inflamatórias no grupo tratado com laser em relação ao grupo controle. Já o número de fibroblastos e vasos sanguíneos foi maior nos animais submetidos ao laser do que nos do grupo controle, também com diferença estatisticamente significativa. Baseando-se nos resultados obtidos, os autores concluem que a terapia a laser de baixa potência é capaz de auxiliar no processo de cicatrização de feridas acelerando a proliferação tecidual, aumentando a vascularização local e induzindo a formação de um tecido de granulação mais organizado.

Bossini desenvolveu, em 2007, um estudo com o objetivo de verificar a influência de diferentes doses de laser de baixa potência sobre a viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Neste trabalho, foram utilizados 100 animais. No dorso de cada um deles, foi confeccionado um retalho retangular de 10 cm de comprimento por 4 cm de largura, tendo como base o lado mais próximo ao crânio. Os retalhos foram descolados a partir da fáscia profunda dos músculos, incluindo a fáscia superficial, o panículo carnosos e a pele. Antes do reposicionamento do tecido, uma barreira plástica foi colocada sobre o leito da ferida para impedir a revascularização do retalho a partir desse leito. O retalho foi então reposicionado e suturado. O laser foi aplicado pela técnica pontual, por contato, em 24 pontos distribuídos em uma área incluindo o retalho e uma porção de tecido ao redor do mesmo. Foi mantida uma distância de 2 cm entre os pontos e de 1 cm entre os mesmos e as margens do retalho. Para a aplicação do laser, os animais foram divididos em 5 grupos de acordo com a dose de radiação recebida. **Grupo 1:** Controle, nenhuma dose. **Grupo 2)** 3 J/cm² durante 6 segundos, totalizando 0,18 J de energia por ponto de aplicação. **Grupo 3)** 6 J/cm² de energia durante 12 segundos, fornecendo 0,36 J de energia para cada ponto de aplicação. **Grupo 4)** 12 J/cm² durante 24 segundos, fornecendo 0,72 J de energia por ponto. **Grupo 5)** 24 J/cm² durante 48 segundos, o que totalizou 1,44 J de energia para cada ponto. As aplicações foram feitas imediatamente após a cirurgia e nos 4 dias subsequentes, sendo uma sessão por dia. Nos animais do grupo controle, o procedimento foi simulado, sempre com o aparelho desligado. Foi utilizado um laser de diodo de InGaAlP (Laserpulse®, Ibramed, Brasil), emitindo radiação com comprimento de onda de 670 nm e 30 mW de potência. Sete dias após o ato cirúrgico, moldes de papel vegetal com as mesmas dimensões do retalho foram posicionados sobre o dorso dos animais e o limite entre o tecido viável e o necrosado foi demarcado. Feito isso, o papel foi recortado e os pedaços correspondentes ao tecido saudável e ao necrosado foram pesados em uma balança de alta precisão para determinar a porcentagem de cada um. Todos

os grupos irradiados com laser apresentaram menor porcentagem de necrose que o grupo controle, com diferença estatisticamente significativa. Esses valores foram crescentes a partir do grupo 5, que apresentou o menor valor. Após a mensuração da área de necrose, 10 animais de cada grupo foram selecionados aleatoriamente para a coleta de amostras de tecido com 2 cm de largura e comprimento equivalente a todo o tecido viável a partir da base do retalho acrescido de 1 cm de tecido necrosado. Foram confeccionadas lâminas histológicas cobrindo toda a extensão dessas amostras. Em microscópio óptico com aumento de 40 vezes, foi feita a contagem do número de vasos sanguíneos presentes nos cortes. Nos grupos tratados com laser, o número de vasos sanguíneos foi maior que no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa. Testes estatísticos mostraram a existência de uma correlação negativa entre a porcentagem de necrose e o número de vasos sanguíneos, ou seja, quanto menor a necrose, maior a quantidade de vasos sanguíneos. Os autores concluem, portanto, que o laser de baixa potência é eficaz no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos em ratos.

Para Sawasaki et al. (2009), a degranulação de mastócitos é um importante passo no processo de cicatrização de feridas, já que esse processo se inicia com uma reação inflamatória aguda, caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, e que a histamina, um mediador inflamatório com ação vasodilatadora, é liberada pelos mastócitos nessa ocasião. Para avaliar os efeitos da terapia a laser de baixa potência sobre a degranulação de mastócitos em tecidos orais humanos, os autores selecionaram oito pacientes com *Epulis fissuratum* (hiperplasia inflamatória fibrosa induzida pelo uso de dentadura). Cada paciente teve sua lesão dividida em duas metades. A primeira metade foi removida cirurgicamente sem qualquer tipo de tratamento prévio. A segunda metade foi irradiada com laser de AsGaAl (comprimento de onda de 670 nm, dose de 8 J/cm²) imediatamente antes da remoção cirúrgica. Os espécimes foram analisados histologicamente. O número de mastócitos foi semelhante no grupo controle e no grupo irradiado. O número de mastócitos degranulados, evidenciados com coloração Giemsa, foi significativamente maior no grupo irradiado.

Vasilenko et al. (2010), desenvolveram um estudo para avaliar a influência do laser de baixa potência em diferentes comprimentos de onda e densidades de potência sobre a resistência à tração de feridas cutâneas em ratos. O estudo contou com 5 grupos de 8 animais cada. **Grupo 1)** Controle, não irradiado; **Grupo 2)** tratado com laser de 635 nm de comprimento de onda e 4 mW/cm² de densidade de potência; **Grupo 3)** tratado com laser de 635 nm e 15 mW/cm²; **Grupo 4)** tratado com laser de 670 nm e 4 mW/cm²; **Grupo 5)** tratado com laser de 670 nm e 15 mW/cm². No dorso de cada animal, foi confeccionada uma incisão de 4 cm de comprimento. Logo em seguida, as bordas da ferida foram reaproximadas com

sutura contínua. Os grupos 2, 3, 4 e 5 foram tratados com laser diariamente durante uma semana sob os parâmetros descritos acima. O equipamento empregado (Maestro[®] CCM, Czech Republic) possui um diodo de AsGaAl emissor de laser com 635 nm e um diodo de InGaAlP emissor de laser com 670 nm de comprimento de onda. A área da secção transversal do feixe é de aproximadamente 1 cm². Cada lesão recebeu 4 pontos de aplicação por sessão. Para todos os grupo tratados, a dose de radiação fornecida foi de 5 J/cm² por ponto de aplicação (modo contínuo). Nesse caso, o tempo de aplicação foi maior para os grupos de menor densidade de potência. A ponteira do equipamento foi mantida a uma distância de 15 cm da ferida. O aparelho utilizado para medir a resistência das feridas à tração foi idealizado pelos próprios autores e é dotado de um braço horizontal que tenciona um dos lados do espécime enquanto o lado oposto se encontra fixado em um medidor de força. O braço móvel é conectado a um motor de movimento contínuo de alta precisão. Com o auxílio deste aparelho, foi mensurada a força necessária para a ruptura do tecido em todos os espécimes. A resistência à tração foi calculada dividindo-se o valor da força máxima suportada pela área do tecido. Os menores valores de resistência foram encontrados para o grupo controle. Os maiores valores foram obtidos com os grupos 3 (635/15) e 4 (670/4), com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Nos grupos irradiados com 635 nm (2 e 3), os melhores resultados foram obtidos com 15 mW de densidade de potência. Nos grupos irradiados com 670 nm (4 e 5), os melhores resultados foram encontrados com 4 mW de densidade de potência. Da mesma forma, nos grupos irradiados com 4 mW de densidade de potência (2 e 4), os maiores valores de força foram observados com 670 nm. Nos grupos tratados com 15 mW de densidade de potência (3 e 5), os maiores valores foram conseguidos com 635 nm. Em todas essas comparações, houve diferença estatisticamente significativa. Portanto, os resultados demonstraram a existência de uma relação inversa entre o comprimento de onda e a densidade de potência nos parâmetros estudados. Os autores concluíram que o laser de baixa potência é capaz de acelerar o processo de reparo de feridas, e que os melhores resultados são conseguidos combinando-se maiores densidades de potência com menores comprimentos de onda e vice-versa.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar microscopicamente o efeito da terapia a laser de baixa potência sobre a evolução do processo de reparo de incisões cutâneas feitas na região dorsal de ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

O projeto de pesquisa referente a este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, e aprovado pela mesma em 12 de agosto de 2008 (Protocolo nº 012/2008). (Anexo A).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 56 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinicus*) provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, com idade aproximada de dois meses, machos e pesando entre 200 e 250 gramas. Os mesmos foram mantidos no próprio biotério em ambiente com temperatura controlada, iluminação artificial e exaustores de ar. Foram distribuídos em gaiolas plásticas contendo no máximo 5 animais, onde receberam ração apropriada e água à vontade.

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grandes grupos: Controle e Laser. Cada grupo foi subdividido de acordo com os seguintes períodos de avaliação: 6 horas, 2, 7 e 14 dias após o ato cirúrgico. No total, foram formados oito subgrupos com sete animais cada, nomeados da seguinte maneira: **C1)** controle 6 horas, **L1)** laser 6 horas, **C2)** controle 2 dias, **L2)** laser 2 dias, **C3)** controle 7 dias, **L3)** laser 7 dias, **C4)** controle 14 dias e **L4)** laser 14 dias (**tabela 1**).

Tabela 1 - Distribuição dos animais em grupos e subgrupos.

	PERÍODOS			
	6 horas	2 dias	7 dias	14 dias
GRUPO CONTROLE (28 ratos)	Subgrupo C1 (7 ratos)	Subgrupo C2 (7 ratos)	Subgrupo C3 (7 ratos)	Subgrupo C4 (7 ratos)
GRUPO LASER (28 ratos)	Subgrupo L1 (7 ratos)	Subgrupo L2 (7 ratos)	Subgrupo L3 (7 ratos)	Subgrupo L4 (7 ratos)

4.4 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Inicialmente, os animais foram anestesiados com injeção de solução de cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Vetbrands)⁸ e cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Vetbrands)⁹ a 1:1 na face externa da coxa (**figura 8**). A solução foi aplicada na proporção de 0,1 ml para cada 100 gramas de peso do animal. Em seguida, foi feita a depilação dos quadrantes superior direito e inferior esquerdo da região dorsal utilizando lâmina de barbear *Azul Aço Inox* (Gillette[®]) (**figura 9**). Após anti-sepsia com álcool 70 °GL, foi feita, no centro de cada quadrante, uma incisão com lâmina de bisturi nº 15 (Free-Bac[®]) numa extensão de 2 cm até atingir a região subcutânea em profundidade (**figuras 10 a 12**). Por fim, cada incisão foi suturada com 2 pontos confeccionados com fio de seda *Ethicon* 4-0 (Johnson & Johnson[®]) de modo a dividi-la, virtualmente, em 3 partes aproximadamente iguais (**figura 13**). Não houve reutilização da lâmina de barbear, da lâmina de bisturi ou do fio de sutura. Todas as incisões foram realizadas pelo mesmo operador. Após a sutura, os animais do grupo Laser receberam aplicação de laser de baixa potência em ambas as incisões.

As incisões avaliadas neste trabalho foram as dos quadrantes superiores direitos dos animais. As incisões dos quadrantes inferiores foram confeccionadas no intuito de servirem como reserva.

⁸ Anestésico.

⁹ Sedativo, analgésico e relaxante muscular.

Figura 8 - Anestesia.

Figura 9 - Depilação. Quadrante superior direito.

Figura 10 - Incisão. Quadrante superior direito.

Figura 11 - Incisões nos quadrantes superior direito e inferior esquerdo do dorso do animal.

Figura 12 - Incisão com extensão de 2 cm.

Figura 13 - Sutura.

4.5 APLICAÇÃO DO LASER

O aparelho utilizado foi o *Whitening Lase II*¹⁰ (DMC[®] Equipamentos Ltda., São Carlos - SP) (**figura 14**). Esse aparelho apresenta duas funções disponíveis: clareamento e laserterapia. Na função clareamento, ele emite luz LED azul (470 nm) e luz laser infravermelha (AsGaAl, 808 nm) com 0,2 W de potência. Na função laserterapia, o equipamento pode emitir luz laser vermelha (InGaAlP, 660 nm) ou infravermelha (AsGaAl, 808 nm). A ponteira destinada à laserterapia é dotada de duas sondas de fibra óptica de 0,6 mm de diâmetro cada.

Para a função laserterapia, o menu de operações dispõe de dois modos, normal e assistido. No modo normal, o operador seleciona o tipo de laser (vermelho ou infravermelho), a potência (que pode variar de 30 a 100 mW para ambos os lasers), o modo de aplicação (contínuo ou pulsado) e a dosagem (que pode variar de 10 a 999 J/cm²). No modo assistido, o equipamento disponibiliza uma lista de patologias e situações clínicas com dosagens pré-programadas. Para cada item da lista, o sistema indica um valor mínimo e um valor máximo de dosagem. Ao selecionar um número dentro deste intervalo, o tempo de exposição é fornecido automaticamente.

Neste experimento, a função laserterapia foi empregada no modo assistido para *pós-operatório de tecido mole*. Para esta situação, o aparelho indica um intervalo de 25 a 45 J/cm². Foi escolhida uma dosagem intermediária de 35 J/cm² (calculada com base na área da secção transversal do feixe). Com essa programação, o equipamento emite luz laser vermelha (InGaAlP) com comprimento de onda centrado em 660 nm e potência de 100 mW. Cada aplicação dura 9 segundos e o laser é emitido de forma contínua. Numa mesma incisão, foram feitas 3 aplicações, uma ao centro e uma em cada extremidade, de maneira a manter uma distância de aproximadamente 1 cm entre elas, como recomenda o fabricante (**figuras 15 e 16**). A ponteira do aparelho foi posicionada perpendicularmente ao tecido, o mais próximo possível do mesmo, sem, no entanto, tocá-lo. Foi feita uma única sessão de aplicações.

¹⁰Registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária): 80030810011.

Figura 14 - Whitening Lase II (DMC®). A ponteira da esquerda é destinada à laserterapia, enquanto a da direita, ao clareamento.

Figura 15 - Aplicação do laser no centro da incisão.

Figura 16 - Desenho esquemático do experimento. A linha central representa a incisão, os círculos vermelhos indicam os 3 pontos de aplicação do laser e cada “X” indica um ponto de sutura.

4.6 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Decorridos os períodos de avaliação, os animais dos respectivos subgrupos foram novamente anestesiados com solução de cloridrato de ketamina e cloridrato xilazina a 1:1 na face externa da coxa e então mortos com sobre-dose da mesma solução diretamente no coração. Após nova depilação, o tecido correspondente à área da incisão (incluindo parte da pele adjacente às bordas da ferida e todo o tecido cicatricial em profundidade) (**figuras 17 e 18**) foi removido e armazenado em frasco devidamente identificado contendo formalina a 10% durante 7 dias. Após a fixação dos tecidos por ação do formol, as peças foram recortadas e submetidas a processamento histotécnico para obtenção de lâminas microscópicas de acordo com o protocolo do departamento de Histologia da FOB-USP.

Figura 17 - Remoção do tecido cutâneo envolvendo a área da incisão. Animal do subgrupo C4.

Figura 18 - Descolamento do tecido.

4.7 RECORTE DAS PEÇAS

A fim de padronizar a área que seria tomada para a obtenção dos cortes histológicos, desprezou-se uma das extremidades da incisão. Entende-se por extremidade, nesse caso, a área que vai do início da incisão até o ponto de sutura mais próximo, incluindo o mesmo. A partir desse ponto foram obtidos os cortes histológicos (**figura 19**). Nos períodos de 7 e 14 dias, quando não havia mais sinal dos pontos de sutura, a porção eleita para a confecção das lâminas foi a porção central.

Figura 19 - Recorte da peça. A área hachurada corresponde à porção que foi desprezada.

4.8 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

Depois de recortadas, as peças foram lavadas em água corrente durante 24 horas e então armazenadas em álcool 70 °GL por mais 24 horas. Feito isso, as mesmas foram desidratadas em álcool absoluto (3 banhos em 24 horas) e depois diafanizadas em xilol (3 banhos de 1 hora cada). Em seguida, foram mergulhadas em Histosec^{®11} (Merck KGaA, Germany) derretido por 4 horas, sendo que, após a primeira hora, o Histosec[®] foi substituído por novo. As peças foram então incluídas em blocos de Histosec[®] para serem cortadas em micrótomo Jung RM2045 (Leica[®]) numa espessura de 5 micrômetros. Os blocos foram posicionados no micrótomo de modo que o tecido fosse cortado transversalmente em relação à incisão. Os cortes obtidos foram depositados em banho-maria e “pinçados” com lâmina de vidro para microscópio. Por fim, as lâminas foram coradas pelo método HE (hematoxilina-eosina) e montadas com as lamínulas.

Para cada espécime foram confeccionadas 3 lâminas contendo 5 cortes cada uma. A cada lâmina confeccionada, 10 cortes foram desprezados, totalizando uma distância de 50 micrômetros entre duas lâminas consecutivas. Entre o primeiro corte de uma lâmina e o primeiro corte da lâmina seguinte, a distância é de 70 micrômetros.

4.9 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica foi feita de forma qualitativa por meio de análise descritiva e de forma quantitativa por meio de análise morfométrica.

4.9.1 Análise Descritiva

Para cada subgrupo foi feita uma descrição histológica qualitativa, obtida após o estudo cuidadoso de todos os cortes histológicos em microscópio óptico Olympus CHS (Olympus Optical Co. LTD., Japan) com objetivas de 4, 10, 40 e 100 vezes de aumento e oculares de 10 vezes. Entre os principais eventos microscópicos avaliados estão: a resposta

¹¹ Meio de inclusão para histologia composto por parafina de elevada pureza enriquecida com polímeros.

inflamatória, a reestruturação epitelial, a proliferação fibroblástica e o grau de neovascularização.

Para cada subgrupo, foi selecionado um corte representativo, apresentado nos resultados. Os cortes representativos foram fotomicrografados em microscópio óptico Olympus BX50 (Olympus Optical Co. LTD., Japan) acoplado a uma câmera fotográfica digital Olympus DP71 e a um computador contendo o software DP Controller versão 2002-2006 (Olympus Optical Co. LTD., Japan). A descrição de cada subgrupo representa uma visão geral dos eventos microscópicos ocorridos no tecido cutâneo (epiderme e derme) de todos os espécimes do mesmo.

4.9.2 Análise Morfométrica

A análise morfométrica foi realizada apenas nos dois primeiros períodos experimentais, ou seja, 6 horas e 2 dias. Nesses períodos, o tecido incisado, visto microscopicamente, apresentou duas configurações básicas: bordas bem colapsadas ou bordas com certo grau de afastamento. Macroscopicamente (durante o ato cirúrgico), não foi possível notar tal afastamento. No entanto, como nesses períodos a formação de tecido de granulação era ausente, a avaliação foi conduzida no tecido correspondente às bordas da incisão. O espaço presente entre as mesmas (preenchido por coágulo, mas na maioria das vezes visualizado microscopicamente como espaço vazio) não foi considerado, o que permitiu a padronização necessária para uma avaliação do tipo morfométrica.

Nos períodos de 7 e 14 dias, ocorreram basicamente três configurações: presença de tecido neoformado atravessando a derme, com aspecto de um cordão espesso, presença de tecido neoformado espesso junto ao epitélio, diminuindo em direção à hipoderme ou vice-versa, e presença de um fino cordão de tecido neoformado, muitas vezes imperceptível próximo à hipoderme. Todavia, não foi possível saber se a espessura do tecido neoformado correspondia ao espaço existente entre as bordas da ferida nos períodos experimentais iniciais, ou se estava relacionada ao estágio do processo de reparo atingido pelo tecido. Por isso, esses períodos foram analisados somente de forma descritiva.

A avaliação morfométrica nos subgrupos de 6 horas e 2 dias foi feita pelo sistema de contagem de pontos. Para isso, utilizou-se um microscópio óptico Olympus modelo BX50F4 (Olympus Optical Co. LTD., Japan), com objetiva de imersão de 100 vezes e uma ocular de

10 vezes dotada de um retículo de integração de 121 pontos simetricamente distribuídos numa área quadrangular. Os cortes histológicos e o retículo eram visualizados de maneira superposta. As estruturas coincidentes com os pontos eram computadas com o auxílio de um contador digital modelo CCS-02 (Kacil Indústria e Comércio LTDA., Brasil). Nesse aparelho, a contagem é reiniciada a cada 100 pontos. Por isso, uma linha e uma coluna do retículo eram desprezadas para que a contagem somasse 100 pontos, conforme a capacidade do contador. A leitura foi feita ao longo das bordas da incisão na camada correspondente à derme. As estruturas histológicas quantificadas foram agrupadas da seguinte maneira:

- fibras colágenas
- fibroblastos
- líquido intersticial ou substância fundamental amorfa
- polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos
- mononucleares macrófagos
- vasos sanguíneos
- outras células inflamatórias
- artefatos de técnica e outras estruturas (pêlos, glândulas sebáceas, células adiposas)

A contagem dos elementos celulares ocorreu independentemente do ponto coincidir com o núcleo ou com o citoplasma. No caso dos fibroblastos, na maior parte das vezes apenas o núcleo era visualizado, mas em algumas ocasiões o citoplasma também se mostrou evidente.

Mononucleares macrófagos e polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos foram contabilizados separadamente com o intuito de verificar o caráter agudo ou crônico da reação inflamatória, quando presente.

A reação inflamatória como um todo foi quantificada somando-se os valores referentes aos macrófagos, neutrófilos e eosinófilos aos valores obtidos para “outras células inflamatórias”, como linfócitos e mastócitos, que foram contadas separadamente. Nos resultados, não serão apresentados os valores referentes às “outras células inflamatórias”, e sim ao total de células inflamatórias.

Para cada espécime, foram avaliados 3 cortes, sendo um de cada lâmina. Não houve necessidade de casualização de campos. Toda a área correspondente às bordas da incisão ao longo da derme foi avaliada. O número de campos por corte histológico variou, portanto, de acordo com a espessura da derme.

Os dados obtidos foram tabulados, estabelecendo-se relações percentuais comparativas. Esses dados foram submetidos à análise estatística.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software “Statistica 5.1” (StatSoft Inc., USA). Os cálculos foram feitos a partir das médias dos valores obtidos para cada estrutura, por subgrupo. Para a comparação entre grupos e entre períodos foi utilizada a análise de variância a dois critérios (ANOVA). O mesmo teste foi empregado para verificar a existência de correlação entre os parâmetros “grupo” e “período”. O nível de significância adotado foi de 5 % (0,05).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

SUBGRUPO C1 - CONTROLE 6 HORAS

A análise microscópica do segmento cutâneo exibe, na superfície da incisão, material de aspecto eosinofílico compatível com fibrina, correspondente à formação de uma crosta. Nas bordas da referida incisão, o revestimento epitelial apresenta características de normalidade e, na derme, há discreto infiltrado inflamatório do tipo neutrofílico (figuras 20 e 21).

Figura 20 - Corte representativo do subgrupo C1, objetiva de 20x, HE.

- ← Incisão
- ★ Crosta
- ★ Borda Epitelial Invaginada com Aspecto de Normalidade
- ▲ Epitélio com Aspecto de Normalidade
- ▲ Infiltrado Inflamatório

Figura 21 - Corte representativo do subgrupo C1, objetiva de 40x, HE.

- ← Incisão
- ★ Crosta
- ★ Borda Epitelial Invaginada com Aspecto de Normalidade
- ★ Células do Tipo Neutrofílicas

SUBGRUPO L1 - LASER 6 HORAS

A microscopia dos espécimes representativos deste grupo revela, na porção superficial da incisão, massa amorfa de aspecto eosinofílico compatível com fibrina, caracterizando uma crosta. O tecido epitelial apresenta aspecto de normalidade e, nas porções profundas da incisão, as bordas estão preservadas, apresentando células neutrofílicas esparsas (**figuras 22 e 23**).

Figura 22 - Corte representativo do subgrupo L1, objetiva de 20x, HE.

- ← Incisão
- ★ Crosta
- ↑ Borda Preservada
- ▲ Epitélio com Aspecto de Normalidade

Figura 23 - Corte representativo do subgrupo L1, objetiva de 40x, HE.

- ← Incisão
- ★ Crosta
- ⇩ Borda Preservada
- ⇧ Célula do Tipo Neutrofílica

SUBGRUPO C2 - CONTROLE 2 DIAS

Na porção superficial da incisão há material eosinofílico correspondente à crosta, incluindo restos celulares. O revestimento epitelial nas bordas da incisão apresenta-se com aspecto de normalidade, evidenciando, em alguns espécimes, espessamento com discretos prolongamentos hiperplásicos. O tecido dérmico, nas bordas da incisão, exibe aspecto de normalidade, com seus anexos e células compatíveis com macrófagos esparsos (**figuras 24 e 25**).

Figura 24 - Corte representativo do subgrupo C2, objetiva de 20x, HE.

- ← Incisão
- ★ Crosta
- ↑ Borda com Aspecto de Normalidade
- Epitélio Espessado e Hiperplásico

Figura 25 - Corte representativo do subgrupo C2, objetiva de 40x, HE.

- ← Incisão
- ↑ Borda com Aspecto de Normalidade
- ▤ Prolongamento Epitelial Hiperplásico

SUBGRUPO L2 – LASER 2 DIAS

No local da incisão, o tecido epitelial apresenta-se moderadamente espessado e a derme, nas bordas da incisão, exibe aspecto de normalidade, sem reação inflamatória (**figuras 26 e 27**).

Figura 26 - Corte representativo do subgrupo L2, objetiva de 20x, HE.

- ← Incisão
- ↑ Borda com Aspecto de Normalidade
- ↑ Epitélio Espessado

Figura 27 - Corte representativo do subgrupo L2, objetiva de 40x, HE.

- ← Incisão
- ↑ Borda com Aspecto de Normalidade
- ↑ Epitélio Espessado

SUBGRUPO C3 – CONTROLE 7 DIAS

Nos espécimes examinados, o revestimento epitelial se mostra contínuo e, na área correspondente à incisão, apresenta-se discretamente espessado. A derme subjacente exibe tecido neoformado maduro em processo de organização, rico em células fibroblásticas e com discreta presença de vasos sanguíneos (**figuras 28 e 29**).

Figura 28 - Corte representativo do subgrupo C3, objetiva de 20x, HE.

- ✚ Tecido Neoformado
- ↑ Epitélio Espessado

Figura 29 - Corte representativo do Subgrupo C3, objetiva de 40x, HE.

- Célula Fibroblástica
- Epitélio Espessado
- Vaso Sanguíneo Neoformado

SUBGRUPO L3 – LASER 7 DIAS

O epitélio apresenta-se contínuo e discretamente espessado. A derme, na região da incisão, exibe tecido neoformado maduro em adiantado processo de organização, rico em células fibroblásticas e com presença discreta de vasos sanguíneos (**figuras 30 e 31**).

Figura 30 - Corte representativo do subgrupo L3, objetiva de 20x, HE.

- ⊕ Tecido Neoformado
- ↑ Epitélio Espessado

Figura 31 - Corte representativo do subgrupo L3, objetiva de 40x, HE.

- Célula Fibroblástica
- Epitélio Espessado
- Vaso Sanguíneo Neoformado

SUBGRUPO C4 – CONTROLE 14 DIAS

Nos espécimes representativos deste subgrupo, o epitélio de revestimento apresenta-se com características de normalidade. O tecido dérmico está estruturado, exibindo, na área incisada, tecido neoformado maduro em adiantado processo de organização, rico em células fibroblásticas e com esparsos vasos sanguíneos (**figuras 32 e 33**).

Figura 32 - Corte representativo do subgrupo C4, objetiva de 20 vezes, HE.

- ❖ Tecido Neoformado
- ▲ Epitélio com Aspecto de Normalidade

Figura 33 - Corte representativo do subgrupo C4, objetiva de 40x, HE.

- Célula Fibroblástica
- Epitélio com Aspecto de Normalidade
- Vaso Sanguíneo Neoformado

SUBGRUPO L4 – LASER 14 DIAS

A microscopia demonstra, na porção superficial da região do corte, epitélio de revestimento com aspecto de normalidade. Na área incisada da estrutura dérmica, observa-se tecido conjuntivo neorformado maduro e em organização, com acentuada população de células fibroblásticas e alguns vasos sanguíneos (**figuras 34 e 35**).

Figura 34 - Corte representativo do subgrupo L4, objetiva de 20x, HE.

- ✚ Tecido Neoformado
- ▲ Epitélio com Aspecto de Normalidade

Figura 35 - Corte representativo do subgrupo L4, objetiva de 40x, HE.

- Célula Fibroblástica
- Epitélio com Aspecto de Normalidade
- Vaso Sanguíneo Neoformado

5.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As tabelas 2 e 3 apresentam as porcentagens médias e os respectivos valores de desvio padrão obtidos para cada estrutura avaliada nos diferentes subgrupos. A porcentagem média representa a ocorrência de cada estrutura em relação ao todo nos campos de leitura. O desvio padrão mede a variabilidade da amostra e é apresentado na forma de intervalo de confiança.

O critério “células inflamatórias” refere-se a todas as células inflamatórias contadas, incluindo neutrófilos, eosinófilos e macrófagos.

Tabela 2 - Porcentagem média de fibras colágenas, líquido intersticial/substância fundamental amorfa, fibroblastos e vasos sanguíneos para cada subgrupo e respectivos valores de desvio padrão.

	FIBRAS COLÁGENAS	LÍQ/SUB	FIBROBLASTOS	VASOS SANGUÍNEOS
C1	70,13 ($\pm 3,86$)	26,36 ($\pm 3,86$)	1,63 ($\pm 0,53$)	0,60 ($\pm 0,35$)
L1	75,19 ($\pm 2,44$)	20,51 ($\pm 3,06$)	1,88 ($\pm 0,53$)	0,92 ($\pm 0,38$)
C2	76,22 ($\pm 3,42$)	19,85 ($\pm 2,74$)	3,15 ($\pm 0,91$)	0,49 ($\pm 0,52$)
L2	78,04 ($\pm 1,96$)	18,11 ($\pm 2,35$)	2,63 ($\pm 0,69$)	0,88 ($\pm 0,44$)

LÍQ/SUB = Líquido intersticial ou substância fundamental amorfa.

C1 = Subgrupo controle 6 horas

L1 = Subgrupo laser 6 horas

C2 = subgrupo controle 2 dias

L2 = subgrupo laser 2 dias

Tabela 3 - Porcentagem média de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, mononucleares macrófagos e de células inflamatórias para cada subgrupo e respectivos valores de desvio padrão.

	N/E	MACRÓFAGOS	CELS. INFLS.
C1	0,90 ($\pm 0,44$)	0,09 ($\pm 0,14$)	1,27 ($\pm 0,57$)
L1	1,06 ($\pm 0,66$)	0,04 ($\pm 0,05$)	1,51 ($\pm 0,84$)
C2	0,18 ($\pm 0,13$)	0,05 ($\pm 0,11$)	0,29 ($\pm 0,25$)
L2	0,22 ($\pm 0,09$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,33 ($\pm 0,17$)

N/E = neutrófilos e eosinófilos.

CÉLS. INFLS. = células inflamatórias.

C1 = Subgrupo controle 6 horas

L1 = Subgrupo laser 6 horas

C2 = subgrupo controle 2 dias

L2 = subgrupo laser 2 dias

Os gráficos 1 e 2 ilustram as porcentagens médias obtidas para cada estrutura avaliada nos diferentes subgrupos.

Gráfico 1 - Porcentagem média de fibras colágenas e líquido intersticial/substância fundamental amorfa para cada subgrupo.

Gráfico 2 - Porcentagem média de fibroblastos, vasos sanguíneos, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, mononucleares macrófagos e células inflamatórias para cada subgrupo.

C1 = Subgrupo controle 6 horas
 L1 = Subgrupo laser 6 horas
 C2 = subgrupo controle 2 dias
 L2 = subgrupo laser 2 dias

N/E = neutrófilos e eosinófilos.
 CÉLS. INFLS. = células inflamatórias.
 LÍQ/SUB = Líquido intersticial ou
 substância fundamental amorfa.

A tabela 4 apresenta os níveis de significância obtidos para cada estrutura avaliada através da análise de variância a dois critérios (ANOVA) na comparação entre os grupos laser e controle em ambos os períodos (C1 com L1 e C2 com L2), entre os períodos dentro de cada grupo (C1 com C2 e L1 com L2) e entre grupos e períodos. A **comparação entre grupos e períodos** verifica se as diferenças encontradas entre os grupos variam significativamente em função do período de avaliação.

Tabela 4 - Níveis de significância obtidos com o teste ANOVA para cada estrutura avaliada na comparação entre grupos, entre períodos e entre grupos e períodos.

	Fibras Colágenas	LÍQ/SUB	Fibroblastos	Vasos	N/E	Macrófagos	Céls. Infls.
Entre Grupos	0,006*	0,003*	0,593	0,038*	0,524	0,170	0,501
Entre Períodos	0,001*	0,001*	0,000*	0,645	0,000*	0,274	0,000*
Entre Grupos e Períodos	0,169	0,088	0,154	0,816	0,661	0,938	0,630

LÍQ/SUB = Líquido intersticial ou substância fundamental amorfa.

N/E = neutrófilos e eosinófilos.

CÉLS. INFLS. = células inflamatórias.

*Estatisticamente significativa.

Na **comparação entre os grupos** laser e controle, houve diferença estatisticamente significativa em relação à densidade de *fibras colágenas*, *líquido intersticial/substância fundamental amorfa* e *vasos sanguíneos* para ambos os períodos (comparação entre L1 e C1 e entre L2 e C2). A densidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos foi maior, enquanto a de líquido intersticial/substância fundamental amorfa foi menor para o grupo tratado com laser do que para o grupo controle (**tabela 5**). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à densidade de fibroblastos, de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, de mononucleares macrófagos e do número total de células inflamatórias entre os grupos.

Na **comparação entre os períodos** dentro de cada grupo (comparação entre L1 e L2 e entre C1 e C2), houve diferença estatisticamente significativa em relação à densidade de *fibras colágenas*, *líquido intersticial/substância fundamental amorfa*, *fibroblastos*, *polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos* e do *total de células inflamatórias*. Tanto para o grupo controle quanto para o tratado com laser, o número de fibras colágenas e fibroblastos aumentou entre 6 horas e 2 dias. Já a quantidade de líquido intersticial/substância fundamental

amorfa, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos e o número total de células inflamatórias diminuiu entre 6 horas e 2 dias (**tabela 6**). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao número de mononucleares macrófagos entre os períodos, para ambos os grupos.

A **comparação entre grupos e períodos** não revelou diferenças estatisticamente significantes, ou seja, as diferenças encontradas entre os grupos laser e controle ocorreram independentemente do período avaliado.

Tabela 5 - Estruturas com diferenças estatisticamente significantes quanto ao valor de densidade entre os grupos e grupo que apresentou o maior valor. Comparação entre os grupos laser e controle para ambos os períodos.

Estruturas	Grupo com Maior Densidade
<i>Fibras colágenas</i>	Laser
<i>Líqu/Sub</i>	Controle
<i>Vasos Sanguíneos</i>	Laser

Líqu/Sub = Líquido intersticial ou substância fundamental amorfa.

Tabela 6 - Estruturas com diferenças estatisticamente significantes quanto ao valor de densidade entre os períodos e período que apresentou o maior valor. Comparação entre os períodos de 6 horas e 2 dias dentro de cada grupo.

Estruturas	Período com Maior Densidade
<i>Fibras Colágenas</i>	2 dias
<i>Líqu/Sub</i>	6 horas
<i>Fibroblastos</i>	2 dias
<i>Neutrófilos e Eosinófilos</i>	6 horas
<i>Células Inflamatórias</i>	6 horas

Líqu/Sub = Líquido intersticial ou substância fundamental amorfa.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

6.1.1 Utilização do Rato como Modelo Experimental

Certos animais, como coelhos, ratos e preás, apresentam o chamado **panículo carnosos** (*panniculus carnosus*) (KASHYAP et al. 1995; WINYARD; WILLOUGHBY, 2003), uma camada de tecido muscular estriado esquelético, de movimento voluntário, que separa a hipoderme (panículo adiposo) do resto do corpo (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003; MCGRATH; EADY; POPE, 2004). A ação desse músculo pode ser observada, por exemplo, quando o animal o contrai para se livrar de insetos que pousam em sua pele. No homem, o panículo carnosos está presente apenas de forma vestigial (platisma e músculos da mímica).

Alguns autores contestam a utilização do rato como modelo experimental para avaliação do processo de reparo de feridas cutâneas devido à presença do panículo carnosos. Segundo esses autores, este músculo pode contribuir significativamente no processo de fechamento da ferida (MURRAY, 2003; MOLNAR, 2007).

No entanto, ratos são os animais mais utilizados em pesquisas envolvendo reparo tecidual (KASHYAP et al. 1995; WINYARD; WILLOUGHBY, 2003). São animais de baixo custo, fácil manipulação e manutenção, apresentam baixo risco de morte à anestesia e geralmente estão disponíveis em grande número (WALKER et al. 2000). De acordo com Winyard e Willoughby (2003), o processo de reparo de feridas incisionais acontece de forma muito semelhante em roedores e seres humanos. Segundo os autores, as diferenças entre as espécies quanto ao grau de contração da ferida se tornam mais evidentes em feridas do tipo excisionais. Ainda assim, os mesmos indicam a utilização de roedores em experimentos que avaliam o processo de reparo de feridas excisionais pelas mesmas vantagens descritas acima.

Além disso, ainda que o panículo carnosos acelere o reparo da ferida, ele não é considerado uma variável quando se utiliza um grupo controle com animais da mesma espécie, que também apresentam tal estrutura. A função do grupo controle é justamente permitir o estudo de uma variável por vez. Neste trabalho, o fator testado, ou seja, a variável capaz de interferir nos resultados, foi o laser de baixa potência.

6.1.2 Avaliação de Incisões

Segundo Winyard e Willoughby (2003), os designs experimentais mais utilizados na avaliação de terapias desenvolvidas para incrementar o processo de reparo tecidual são as feridas incisionais e excisionais confeccionadas em dorso de ratos. Queimaduras e retalhos cutâneos também são muito utilizados.

No caso da terapia a laser de baixa potência, a maioria dos estudos encontrados na literatura avalia culturas de células *in vitro*, feridas excisionais em tecido cutâneo (remoção de fragmentos de pele) e feridas de extração dentária. Também são encontrados estudos analisando a viabilidade de retalhos cutâneos e o reparo após cirurgias intra-orais, como gengivoplastias. São poucos os trabalhos que utilizam incisões cutâneas simples para avaliar o efeito do laser de baixa potência sobre o processo de reparo. No entanto, de acordo com Kumar, Abbas e Fausto (2005), o exemplo menos complicado de reparo de feridas é a cicatrização de uma incisão cirúrgica limpa não-infectada, aproximada por suturas.

Culturas de células *in vitro* geralmente mostram resultados favoráveis para a terapia a laser de baixa potência (KREISLER et al., 2003; POURZARANDIAN et al., 2005; SAWASAKI et al., 2009). Mas esses resultados são sugestivos, não podendo ser extrapolados para situações *in vivo*. Feridas de extração dentária ou incisões intra-orais estão sujeitas a injúrias adicionais provocadas pelo próprio animal, especialmente durante a alimentação. Essas injúrias podem ocorrer de forma distinta entre os animais, interferindo no experimento. A utilização de lados diferentes da boca do animal como controle e teste não soluciona completamente o problema, já que a interferência pode ocorrer de forma distinta também entre os lados. No caso dos estudos em seres humanos, as dificuldades estão na elaboração de um design experimental livre de qualquer prejuízo para o paciente, na padronização das amostras e no controle do experimento.

Em razão de tudo o que foi discutido anteriormente, decidiu-se pela avaliação de incisões cutâneas em dorso de ratos neste trabalho. No entanto, durante a execução do estudo, foram encontradas dificuldades para a realização da análise morfométrica nos períodos de 7 e 14 dias, já que, mesmo aproximando as bordas da ferida com suturas, essa aproximação não ocorreu de forma homogênea, como foi possível evidenciar durante a análise microscópica dos espécimes referentes aos períodos de 6 horas e 2 dias, onde ainda não havia presença de tecido neoformado entre as bordas. Dessa forma, não foi possível saber se a espessura do tecido neoformado nos períodos subsequentes correspondia ao espaço existente entre as

bordas da ferida nos períodos experimentais iniciais, ou se estava relacionada ao estágio do processo de reparo atingido pelo tecido. Em alguns espécimes, nos períodos de 7 e 14 dias, a espessura do tecido neoformado não era suficiente para preencher por completo a área correspondente ao retículo de integração. Nesses casos, a contagem de pontos seria feita sobre áreas de tecido neoformado, rico em fibroblastos, e maduro, rico em fibras. Como a espessura do tecido neoformado afetaria diretamente o resultado da análise morfométrica, e como não foi possível determinar se a mesma estava relacionada ao afastamento das bordas ou ao próprio processo de reparo, a análise morfométrica foi conduzida apenas nos períodos de 6 horas e 2 dias.

6.1.3 Extensão das Incisões

No caso da aplicação do laser pelo método pontual, o manual do fabricante do equipamento utilizado neste estudo recomenda um distanciamento de cerca de 1 cm entre os pontos de aplicação (ALMEIDA LOPES; MASSINI), indicando um alcance equivalente a uma área com raio de aproximadamente 5 mm. A manutenção dessa distância auxilia na cobertura de toda a extensão da ferida pelo laser e evita que a intersecção de aplicações diferentes numa mesma área provoque sobredosagem local.

Levando em consideração que áreas com pontos de sutura, os quais aumentam a complexidade inflamatória da região, e áreas muito próximas às extremidades da incisão devem ser evitadas durante a análise, uma incisão de apenas 1 cm seria insuficiente para o experimento. Em incisões de 1 cm, considerando que o laser seja aplicado centralmente, a confecção de um único ponto de sutura coincidiria com o ponto de aplicação do laser, o que não seria o ideal. Já a confecção de mais de um ponto, além de dispensável, geraria traumatismo adicional em quase toda a extensão da ferida, deixando poucas áreas livres para a leitura. Outra possibilidade seria a aplicação do laser em dois pontos, um em cada extremidade da incisão, de forma que os mesmos não coincidisse com o ponto de sutura. No entanto, mesmo mantendo a distância recomendada de 1 cm, não há garantias de que o laser se espalhe de forma homogênea pelos tecidos (ALMEIDA LOPES; MASSINI), de modo que áreas distantes dos pontos de aplicação, onde pode haver falha ou excesso de absorção do laser, devem ser evitadas nas análises. Nesse caso, também não haveria áreas suficientes para a leitura, já que as áreas próximas aos pontos de aplicação coincidiriam com as extremidades

da incisão. Winyard e Willoughby (2003) recomendam, para estudos que avaliam o processo de reparo de feridas incisionais, a confecção de incisões de 1 cm sem pontos de sutura. Entretanto, diferenças no grau de afastamento das bordas entre os animais dificultariam a análise por falta de padronização do experimento.

Dadas as restrições apresentadas acima, optou-se por fazer incisões de 2 cm. Incisões mais extensas, além de gerarem maior desconforto ao animal, seriam desnecessárias, já que os cortes para a leitura no microscópio são da ordem de micrômetros.

O estudo piloto mostrou que, para uma incisão de 2 cm, um ponto de sutura seria insuficiente. Foram feitos, então, 2 pontos de sutura dispostos de forma a dividir a incisão em 3 segmentos aproximadamente iguais. Para que os pontos de aplicação do laser não se aproximassem dos pontos de sutura, foram feitas 3 aplicações, uma no centro e uma em cada extremidade da incisão (**figura 16**).

A fim de evitar as extremidades e as suturas, e de padronizar a área que seria analisada microscopicamente, desprezou-se, no momento de recorte das peças, um dos 3 segmentos citados acima, ou melhor, a área que vai de uma das extremidades da incisão até o ponto de sutura mais próximo, incluindo esse ponto, a partir de onde foram retiradas as fatias de tecido no micrótomo (**figura 19**). Sendo assim, a região de maior interesse na peça foi a central. Apesar disso, as aplicações de laser nas extremidades da incisão se justificaram por promoverem um reparo mais homogêneo ao longo de toda a ferida. Quando não havia mais sinal dos pontos de sutura, nos períodos de 7 e 14 dias, a porção eleita para a confecção das lâminas foi a porção central da incisão, coincidindo com a região avaliada nos períodos anteriores.

6.1.4 Períodos de Avaliação

Winyard e Willoughby (2003) recomendam, para a avaliação da resposta inflamatória e do processo de reparo de feridas em ratos, períodos que vão de 1 hora a 14 dias após a cirurgia. Segundo os autores, conforme os parâmetros a serem avaliados, podem ser utilizados períodos de 1, 6, 12, 24 e 48 horas e 3, 5, 7, 10 e 14 dias. Para a avaliação da reconstrução epitelial e da revascularização, os mesmos recomendam períodos de 1 hora a 7 dias após o ato cirúrgico.

Na literatura, existe uma grande variação quanto aos períodos de avaliação. No entanto, os designs experimentais e os parâmetros avaliados também variam, de modo que a comparação entre os períodos nos estudos é difícil de ser estabelecida.

Neste estudo, foram feitas avaliações em períodos de 6 horas a 14 dias. O período de 6 horas foi adotado com o objetivo de avaliar a resposta imediata do tecido lesado ao laser de baixa potência, especialmente a resposta inflamatória. O período de 2 dias foi escolhido com o intuito de analisar as diferenças quanto à proliferação epitelial e quanto à permanência de resposta inflamatória entre os grupos. Nos períodos de 7 e 14 dias, o principal objetivo foi o de avaliar a ocorrência de diferenças quanto à organização do tecido neoformado entre os grupos.

6.1.5 Técnica de Aplicação do Laser

Apesar de recomendada pelo fabricante, a técnica de aplicação por contato não foi utilizada neste estudo por conta da impossibilidade de esterilização da ponteira do equipamento ou mesmo de desinfecção com produtos químicos apropriados, os quais poderiam danificá-la. Este fato, associado à tentativa de aproximar o experimento à realidade clínica, levou à escolha de uma técnica de aplicação a uma distância de aproximadamente 3 mm da ferida. O emprego de um anteparo entre o aparelho e a ferida foi desconsiderado, já que, mesmo utilizando um anteparo fino e translúcido, poderia haver interferência na transmissão do raio laser.

Além disso, alguns autores encontraram resultados favoráveis com a aplicação do laser mesmo mantendo uma distância considerável entre a ponteira do equipamento e o tecido (VASILENKO, 2010). Isso provavelmente se deve à direcionalidade do feixe, que proporciona mínima dispersão e manutenção da intensidade do laser conforme se afasta da fonte.

6.1.6 Outras Considerações

Para este trabalho, foram utilizados animais padronizados quanto ao gênero, idade e peso corporal, evitando assim que diferenças nesses parâmetros funcionassem como variáveis, alterando os resultados.

Para a confecção das incisões, foram eleitas áreas no dorso que não coincidisse com a coluna vertebral, onde haveria maior possibilidade de reabertura dos cortes pela tensão exercida durante a movimentação do animal.

A utilização de lados diferentes do mesmo animal como teste e controle foi descartada para evitar qualquer influência que a aplicação do laser pudesse exercer sobre o lado controle, por espalhamento, mesmo mantendo uma distância considerável entre as incisões.

6.2 DOS RESULTADOS

Na análise descritiva, as maiores diferenças entre os grupos Laser e Controle foram observadas no período de 6 horas, seguido pelo de 2 dias. Em 6 horas, o revestimento epitelial de ambos os grupos apresentou aspecto de normalidade nas bordas da ferida, no entanto, em alguns espécimes do grupo Laser, foi possível identificar um discreto espessamento do mesmo, indicando início de atividade proliferativa. Enquanto nos espécimes do grupo Laser o segmento dérmico apresentou aspecto de normalidade, com apenas algumas células inflamatórias esparsas, nos do grupo Controle, a derme exibiu infiltrado inflamatório de caráter leve. Em 2 dias, o tecido dérmico apresentou aspecto de normalidade em ambos os grupos. Entretanto, em alguns espécimes do grupo Controle, foi possível verificar a presença de células inflamatórias remanescentes. Além disso, alguns espécimes do grupo Laser apresentaram, nas bordas da ferida, regiões com maior concentração de fibroblastos, indicando atividade proliferativa e início da formação de tecido de granulação. Considerando os dados descritos acima, entende-se que o laser foi capaz de acelerar o processo de reparo tecidual nos períodos de 6 horas e 2 dias, controlando a resposta inflamatória e estimulando a atividade proliferativa das células no local da lesão. Nos períodos de 7 e 14 dias, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Na análise morfométrica, o grupo Laser apresentou maior densidade de fibras colágenas e vasos sanguíneos e menor densidade de líquido intersticial/substância

fundamental amorfa que o grupo Controle em ambos os períodos avaliados, com diferença estatisticamente significativa. A maior densidade de fibras colágenas no grupo Laser em relação ao Controle no período de 6 horas pode ser explicada como um efeito da diminuição da resposta inflamatória induzida pelo laser e observada na análise descritiva. A exsudação plasmática inflamatória traduz-se em aumento da densidade de líquido intersticial/substância fundamental amorfa ou diminuição da densidade de fibras por campo no sistema de contagem de pontos. A densidade de fibras colágenas é complementar à de líquido intersticial/substância fundamental amorfa, de modo que, na comparação entre dois grupos, quando um deles apresenta maior densidade de fibras, está implícito que o mesmo apresenta também menor densidade de líquido intersticial/substância fundamental amorfa. Portanto, uma maior densidade de fibras colágenas em um grupo pode significar tanto aumento da produção de fibras quanto diminuição da resposta inflamatória. Num período curto, como o de 6 horas, a segunda hipótese é a mais provável.

Já no período de 2 dias, é possível que a maior densidade de fibras colágenas no grupo Laser seja resultado tanto da diminuição da resposta inflamatória quanto do aumento da produção de fibras. Esta idéia está de acordo com os achados da análise descritiva, que demonstrou, em alguns espécimes do grupo Laser, maior número de fibroblastos junto às bordas da ferida e ausência de resposta inflamatória, enquanto que, no grupo Controle, foram observadas células inflamatórias remanescentes.

A maior densidade de vasos sanguíneos no grupo Laser em relação ao Controle pode ser explicada, em ambos os períodos, pelo aumento da atividade proliferativa dos angioblastos, que pode ser visualizada já nas primeiras horas após a lesão (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003), especialmente sob o efeito de um estímulo, nesse caso o laser de baixa potência.

Na comparação entre os períodos dentro de cada grupo, a densidade de fibras colágenas e fibroblastos aumentou entre 6 horas e 2 dias, enquanto a de líquido intersticial/substância fundamental amorfa, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos e de células inflamatórias (como um todo) diminuiu em ambos os grupos, com diferença estatisticamente significativa. O aumento da densidade de fibroblastos e fibras colágenas entre os períodos pode estar relacionado à diminuição da densidade de líquido intersticial/substância fundamental amorfa (diminuição da resposta inflamatória) ou ao aumento da atividade proliferativa e secretora dos fibroblastos. A diminuição da densidade de células inflamatórias demonstra que resposta inflamatória diminuiu para ambos os grupos entre 6 horas e 2 dias.

Os resultados encontrados neste estudo, demonstrando a capacidade do laser em controlar a resposta inflamatória, aumentar a proliferação celular e estimular o processo de reparo tecidual, corroboram com os encontrados por outros autores (GARCIA et al., 2000; KREISLER et al., 2003; POURZARANDIAN et al., 2005; ROCHA-JÚNIOR et al., 2006; BOSSINI, 2007; VASILENKO et al., 2010). As controvérsias encontradas na literatura devem-se, provavelmente, aos diversos parâmetros empregados para a aplicação do laser e aos diferentes critérios de avaliação adotados.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando a metodologia empregada neste experimento, foi possível concluir que:

Perante a Análise Descritiva

- O laser foi capaz de estimular o processo de reparo tecidual nos períodos iniciais de 6 horas e 2 dias.
- As maiores diferenças entre os grupos foram encontradas no período de 6 horas.
- Nos períodos de 7 e 14 dias, os grupos mostraram comportamento semelhante em relação ao processo de reparo.

Perante a Análise Morfométrica

- O laser foi capaz de estimular o processo de reparo nos períodos avaliados de 6 horas e 2 dias, corroborando com o achados da análise descritiva.
 - As diferenças encontradas entre os grupos ocorreram independentemente do período avaliado.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Almeida Lopes L, Massini R Júnior. Sistema de clareamento dental e laserterapia: Whitening Lase II: manual do usuário. DMC Equipamentos.

Armagnac AP. Finds way to tune rays of ultra violet. *Popular Science*. 1931;118(4):42-3 e 132-33.

Bacha WJ Júnior, Bacha LM. Atlas colorido de histologia veterinária. 2. ed. Editora Roca; 2003.

Bagnato VS. Os fundamentos da luz laser. *Física na Escola*. 2001;2(2):4-9.

Banks WJ. Histologia veterinária aplicada. 2. ed. Editora Monole; 1992.

Basford JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical toll. *Lasers Surg Med*. 1995;16(4):331-42.

Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. New York: Churchill Livingstone; 1997.

Bossini PS. Laser de baixa intensidade (670nm) na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos [dissertação na internet]. São Carlos (SP): Universidade de São Paulo; 2007 [acesso em 2009 jun 30]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-07082007-110337/>.

Brugnera A Júnior, Santos AECG, Bologna ED, Ladalardo TCCGP. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. São Paulo: Editora Santos; 2003.

Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am*. 2004;48(4):751-70.

Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *J Clin Periodontol*. 1996;23(5):492-6.

Damante CA, Gregghi SL, Sant'Ana AC, Passanezi E, Taga R. Histomorphometric study of the healing of human oral mucosa after gingivoplasty and low-level laser therapy. *Lasers Surg Med*. 2004;35(5):377-84.

Dellmann HD, Brown EM. Histologia veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Food and Drug Administration. Laser facts [texto na internet]. FDA U.S. Food and Drug Administration. 2009 jun 5. [acesso em 2009 jun 30]. Disponível em: <http://www.fda.gov/Radiation-EmittingProducts/ResourcesforYouRadiationEmittingProducts/Consumers/ucm142607.htm#3>.

Garcia VG, Theodoro LH, Colman LS, Fonseca RG, Okamoto T. Influência do número de aplicações de raio laser de bioestimulação sobre a reparação de feridas de extração dentária. Estudo histológico em ratos. *Rev Fac Odontol Lins.* 2000;12(1 e 2):29-37.

Genovese WJ. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia. São Paulo: Editora Santos; 2007.

Hecht J. Beam: the race to make the laser. Oxford University Press; 2005.

Hecht J. The laser guidebook. 2nd ed. New York: McGraw Hill Professional; 1999.

Henriques ACG, Maia AMA, Cimões R, Castro JFL. A laserterapia na odontologia: propriedades, indicações e aspectos atuais. *Odontologia Clín Científ.* 2008;7(3):197-200.

Hewitt PG. Física conceitual. 9. ed. Porto Alegre: Bookman; 2002.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Kashyap A, Beezhold D, Wiseman J, Beck WC. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. *Am Surg.* 1995;61(6):486-91.

Kastler A. Birth of the maser and laser. *Nature.* 1985;316:307-9.

Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2003;30(4):353-8.

Krinke GJ. The laboratory rat. Academic Press; 2000.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Liberman J. Light: medicine of the future: how we can use it to heal ourselves now. Bear and Company; 1991.

Lim HW, Hönigsmann H, Hawk JLM. Photodermatology. CRC Press; 2007

Lizarelli RFZ, Maciel V. Fototerapia de baixa intensidade em odontologia e fisioterapia. In: Bagnato VS. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2008. p. 185-210.

McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and organization of human skin. In: Tony B, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. Rook's textbook of dermatology. 7th ed. Blackwell Publishing; 2004. p. 3.1-3.84.

- Mello JB, Mello GPS. Laser em odontologia. São Paulo: Editora Santos; 2001.
- Miserendino LJ, Pick RM. Lasers in dentistry. Quintessence Books; 1995.
- Molnar JA. Nutrition and wound healing. CRC Press; 2007.
- Monteiro-Riviere NA. Integument. In: Eurell JA, Frappier BL. Dellman's textbook of veterinary histology. 6th ed. Blackwell Publishing; 2006. p. 320-49.
- Murray JD. Mathematical biology II: spatial models and biomedical applications. 3rd ed. Springer; 2003.
- Parker S. Low-level laser use in dentistry. Br Dent J. 2007;202(3):131-8.
- Peruzzo FM, Canto EL do. Química na abordagem do cotidiano. 2. ed. São Paulo: Moderna; 1998.
- Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. J Periodontol. 2005;76(2):187-93.
- Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras. 2003;17(4):307-13.
- Ramalho F Júnior, Ferraro NG, Soares PAT. Fundamentos da física: termologia, óptica geométrica e ondas. 6. ed. São Paulo: Editora Moderna; 1996.
- Revista Pesquisa Fapesp [periódico na internet]. 2007 [acesso em 2009 jun 30]. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=3204&bd=1&pg=1&lg=>.
- Rocha AM Júnior, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. An Bras Dermatol. 2006;81(2):150-6.
- Sawasaki I, Geraldo-Martins VR, Ribeiro MS, Marques MM. Effect of low-intensity laser therapy on mast cell degranulation in human oral mucosa. Lasers Med Sci. 2009;24(1):113-6.
- Silfvast WT. Laser Fundamentals. 2nd ed. New York: Cambridge; 2004.
- Sun G, Tunér J. Low-level laser therapy in dentistry. Dent Clin North Am. 2004;48(4):1061-76.
- The New York Times. Leon Goldman, 91, a research leader in laser treatment [jornal na internet]. The New York Times. 1997 dec 7. [acesso em 2009 jun 30]. Disponível em: <http://www.nytimes.com/1997/12/07/us/leon-goldman-91-a-research-leader-in-laser-treatment.html?pagewanted=1>.
-

Tucker MJ. Diseases of the wistar rats. Taylor and Francis; 1997.

Tunér J, Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Grängesberg: Prima Books; 1996.

Valadares EC, Chaves A, Alves EG. Aplicações da física quântica: do transistor à nanotecnologia. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005.

Vasconcelos Y. Laser nas fábricas: luz guiada por fibra óptica impulsiona uso industrial.

Vasilenko T, Slezák M, Kovác I, Bottková Z, Jakubco J, Kostelníková M, et al. The effect of equal daily dose achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 and 670 nm wound tensile strength in rats: a short report. *Photomed Laser Surg.* 2010;28(2):281-3.

Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med.* 2000;26(1):41-7.

Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J.* 1997;42(4):247-54.

Wills P. Manual da cura pela cor. Editora Pensamento; 2002.

Wintner E, Strassl M. Basic information on lasers. In: Moritz A. Oral laser application. Berlin: Quintessence; 2006. p. 1-55.

Winyard PG, Willoughby DA. Inflammation protocols. Humana Press; 2003.

Young HD, Freedman RA. Sears e Zemansky física II: termodinâmica e ondas. 10. ed. São Paulo: Addison Wesley; 2003.

Young HD, Freedman RA. Sears e Zemansky física III: eletromagnetismo. São Paulo: Addison Wesley; 2004.

Young M. Óptica e lasers. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1998.

Apêndice

APÊNDICE

APÊNDICE A - Porcentagens médias das estruturas por espécime.

GRUPO	TEMPO	ESPÉCIME	FIBRA	FIBRO BLASTO	LÍQ_SUB	N_E	M	VASO	Outras Céls. Infls.	Total de Céls. Infls.
Laser	6 horas	1	80,081	1,785	15,284	1,255	0,000	1,251	0,344	1,599
Laser	6 horas	2	73,963	1,407	23,593	0,519	0,000	0,519	0,000	0,519
Laser	6 horas	3	75,392	1,323	20,317	1,433	0,085	0,708	0,742	2,259
Laser	6 horas	4	74,556	2,395	20,307	0,365	0,124	1,623	0,630	1,119
Laser	6 horas	5	75,859	2,071	19,947	0,905	0,000	0,856	0,362	1,267
Laser	6 horas	6	72,273	1,455	24,727	0,682	0,045	0,682	0,136	0,864
Laser	6 horas	7	74,205	2,689	19,383	2,279	0,036	0,786	0,622	2,937
Laser	2 dias	1	80,278	3,418	15,476	0,185	0,000	0,598	0,045	0,230
Laser	2 dias	2	76,455	3,091	19,409	0,136	0,000	0,818	0,091	0,227
Laser	2 dias	3	78,249	3,464	17,271	0,289	0,000	0,691	0,036	0,324
Laser	2 dias	4	78,560	2,501	16,712	0,188	0,000	1,814	0,225	0,413
Laser	2 dias	5	79,490	2,109	17,410	0,322	0,000	0,490	0,179	0,500
Laser	2 dias	6	74,489	1,793	22,718	0,086	0,000	0,913	0,000	0,086
Laser	2 dias	7	78,786	2,058	17,769	0,300	0,000	0,838	0,249	0,549
Controle	6 horas	1	62,902	1,577	34,085	0,253	0,075	0,704	0,403	0,731
Controle	6 horas	2	68,645	1,668	26,608	1,507	0,067	1,175	0,330	1,904
Controle	6 horas	3	68,129	0,879	28,303	1,223	0,390	0,469	0,608	2,221
Controle	6 horas	4	71,984	1,498	24,792	0,653	0,043	0,874	0,154	0,851
Controle	6 horas	5	72,949	2,042	24,018	0,686	0,038	0,113	0,153	0,877
Controle	6 horas	6	72,333	2,524	23,524	1,238	0,000	0,381	0,000	1,238
Controle	6 horas	7	73,977	1,255	23,186	0,712	0,000	0,480	0,390	1,101
Controle	2 dias	1	75,537	3,738	20,490	0,046	0,000	0,189	0,000	0,046
Controle	2 dias	2	74,558	3,788	21,214	0,221	0,000	0,132	0,088	0,309
Controle	2 dias	3	79,442	1,804	18,576	0,000	0,000	0,178	0,000	0,000
Controle	2 dias	4	72,303	3,968	22,819	0,273	0,061	0,456	0,121	0,455
Controle	2 dias	5	72,807	3,622	22,858	0,112	0,000	0,601	0,000	0,112
Controle	2 dias	6	81,530	1,930	15,866	0,338	0,000	0,236	0,100	0,439
Controle	2 dias	7	77,336	3,223	17,136	0,299	0,301	1,610	0,095	0,695

LÍQ_SUB = Líquido intersticial ou substância fundamental amorfa

N_E = neutrófilos e eosinófilos

Céls. Infls. = Células inflamatórias

Anexo

ANEXO

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), aprovando o projeto de pesquisa.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 012/2008

Bauru 12 de agosto de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "**Avaliação do processo de reparo de incisões realizadas em tecido cutâneo de ratos e submetidas a laser terapêutico**", de autoria de Marcela Borgo, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito "*ad referendum*" desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante
Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários