



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER LINEARMENTE
POLARIZADA DE BAIXA INTENSIDADE COM TECIDOS
VIVOS: EFEITOS NA ACELERAÇÃO DE CICATRIZAÇÃO
TISSULAR EM LESÕES DE PELE**

MARTHA SIMÕES RIBEIRO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Dra. Denise Maria Zezell

**São Paulo
2000**

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

**INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER LINEARMENTE POLARIZADA
DE BAIXA INTENSIDADE COM TECIDOS VIVOS: EFEITOS NA
ACELERAÇÃO DE CICATRIZAÇÃO TISSULAR EM LESÕES DE
PELE.**

MARTHA SIMÕES RIBEIRO



Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora:
Dra. Denise Maria Zzell

SÃO PAULO

2000

*Ao Cláudio, ao Lucas e ao Saulo,
meus amores, minha inspiração, minha vida.*

*Aos meus pais, Maria Luiza (in memoriam) e Messias,
que sempre se sentiram orgulhosos do
caminho que escolhi.*

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Denise Maria Zezell**, minha orientadora e grande amiga, pela orientação, amizade, discussões e constante presença em todas as fases da minha carreira acadêmica;

À **Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn**, por ter aceitado ser colaboradora neste trabalho, pelo muito que aprendi de Histologia e pela pessoa maravilhosa que é;

Ao **Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo**, por suas sugestões preciosas para o engrandecimento deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola**, por ter me apresentado a este mundo fascinante das aplicações do laser nas ciências da vida;

Aos **Profs. Drs. Nilson Dias Vieira Jr. e Sônia Licia Baldocchi**, que propiciaram a minha vinda para o Centro de Lasers e Aplicações;

Aos **Profs. Drs. Paulo Abrahamson e Sérgio Ferreira de Oliveira**, do Laboratório de Biologia da Reprodução-ICB/USP, por se terem deixado envolver com os lasers;

Ao **BSc. Demerval Leônidas Rodrigues**, gerente do Departamento de Radioproteção Ocupacional, por ter consentido que eu continuasse a trabalhar com as radiações não-ionizantes;

Às **minhas irmãs Márcia**, pelas constantes aulas de Medicina; **Marisa**, por ter sempre me ajudado a concatenar trabalho-família; **Marily**, pelas gostosas aulas de Inglês e, principalmente, por todo carinho, companheirismo e cumplicidade, compartilhados durante todos esses anos;

À **Daniela**, um anjo que surgiu no laboratório, por estar sempre presente, compartilhando todas as fases deste trabalho, principalmente os momentos de caos experimental;

Ao **Carlinhos**, por ter me ajudado com a análise dos resultados da microscopia eletrônica e pelo muito que aprendi com a sua maravilhosa pessoa;

Ao **meu amigo Anderson**, do Centro de Lasers e Aplicações, por ter aceitado colaborar em algumas fases deste trabalho, deixando-se envolver, principalmente, pelos efeitos da polarização;

Ao **meu amigo Puig**, pelas proveitosas discussões;

Aos meus amigos do Laboratório de Aplicações de Lasers em Ciências da Vida: **Cláudia, Heloísa, Marcelo, Paulo, Patrícia, Ricardo e Tarso**, em especial à **Andréa, Luciano, Sandro e Walter**, pelo carinho, companheirismo e constantes "quebra-galhos";

Aos pesquisadores do Centro de Lasers e Aplicações: **Armando, Diva, Gessé, Laércio, Lúcia, Lília, Martha, Spero e Wagner** e em especial a **Izilda, Landulfo, Luizinho e Ricardo**, por me receberem no CLA com carinho e amizade;

Aos meus amigos e colegas do Centro de Lasers e Aplicações: **Aninha, Sr. Apolinário, Sr. Braga, Carmen, Edna, Edu, Elza, José Roberto, Marcão, Manuel, Paulinho, Solange, Tort, Valdir**, por todo carinho e amizade;

Aos meus amigos do Departamento de Radioproteção Ocupacional: **Amaro, Carlos, Celso, Christovam, Cristina, Fábio, Feijó, Malvina, Matias, Sérgio e Yasko**, pelo carinho e amizade;

À **Ana Lúcia** e em especial à **Cleusa**, do Laboratório de Biologia da Reprodução-ICB/USP, por serem pessoas magníficas, que sempre de "bom astral" tiveram toda paciência com uma física que queria entender histologia;

À **Luciana Almeida-Lopes e Maurício de Maio**, por algumas das belas figuras que constam neste trabalho;

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução-ICB/USP: **Alessandro, Domingues, Fabiano, Fernanda, Guilherme, Karin, Maurício**, pelo carinho com que sempre me trataram e por estarem sempre por perto, principalmente na hora do sacrifício dos animais;

Às secretárias da Pós-Graduação do IPEN, **Aninha, Eliana e Verinha**, pelas constantes informações;

Aos meus amigos da FOUSP: **Andréa, Edgar, Edu, Patrícia, Silvia e Scheila**, pelo carinho e amizade;

Ao **IPEN-CNEN/SP**, por toda a infra-estrutura utilizada na execução deste trabalho;

A **FAPESP, CNPq e RHAE**, pelo suporte financeiro parcial na execução deste trabalho;

E por último, mas acima de tudo, agradeço a **DEUS**, porque apesar de nem sempre compreendermos os seus desígnios, acreditamos em toda a sua sabedoria...

A todos vocês, muito obrigada!

Esta tese é dedicada à minha mãe querida, onde quer que ela esteja...

“É bom sentir saudade. Significa que há amor em nossos corações, o sentimento supremo que empresta significado à nossa existência. Quando amamos de verdade, com aquele afeto puro e despojado que tem nas mãos o exemplo maior, sentimo-nos fortes e resolutos, dispostos a enfrentar o mundo. E talvez Deus tenha inventado a ilusão da morte para que superemos a tendência milenar de aprisionar o amor em círculos fechados de egoísmo familiar, ensinando-nos a cultivá-lo em plenitude, no esforço da fraternidade, do trabalho em favor do semelhante, que certamente nos conduzirá a realizações mais nobres...”

Richard Simonetti

Com todo o Amor que há em meu coração,

Saudades eternas...

Beijos, muitos beijos no coração...

Esta tese é dedicada à minha mãe querida, onde quer que ela esteja...

“É bom sentir saudade. Significa que há amor em nossos corações, o sentimento supremo que empresta significado à nossa existência. Quando amamos de verdade, com aquele afeto puro e despojado que tem nas mãos o exemplo maior, sentimo-nos fortes e resolutos, dispostos a enfrentar o mundo. E talvez Deus tenha inventado a ilusão da morte para que superemos a tendência milenar de aprisionar o amor em círculos fechados de egoísmo familiar, ensinando-nos a cultivá-lo em plenitude, no esforço da fraternidade, do trabalho em favor do semelhante, que certamente nos conduzirá a realizações mais nobres...”

Richard Simonetti

Com todo o Amor que há em meu coração,

Saudades eternas...

Beijos, muitos beijos no coração...

Fico cada vez mais velho,
mas nunca acabo de aprender.

(Sólon)

INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO LASER LINEARMENTE POLARIZADA DE BAIXA INTENSIDADE COM TECIDOS VIVOS: EFEITOS NA ACELERAÇÃO DE CICATRIZAÇÃO TISSULAR EM LESÕES DE PELE.

Martha Simões Ribeiro

RESUMO

De acordo com as equações de Maxwell para as propriedades ópticas de superfícies, a eficiência na deposição de energia que ocorre numa interface microscopicamente rugosa irradiada com luz laser é dependente do tipo de polarização do campo elétrico. Considerando-se um feixe linearmente polarizado, esta eficiência na deposição de energia depende dos parâmetros da rugosidade para o caso de luz p-polarizada e independe de tais parâmetros, para luz s-polarizada. Neste trabalho, investigou-se o efeito da luz laser de He-Ne de baixa intensidade linearmente polarizada no processo de cicatrização tissular de lesões de pele. A polarização linear do laser foi alinhada paralela e perpendicularmente à uma direção referencial no animal, tal como o eixo da coluna vertebral. As lesões consistiram em queimaduras com N_2 líquido de $\phi = 6\text{mm}$ criadas na parte inferior do dorso de animais de experimentação. Foram feitas quatro irradiações nos dias 3, 7, 10 e 14 pós-criação da ferida, na dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$. As lesões controle não foram irradiadas. O modelo teórico consistiu em descrever a propagação da luz linearmente polarizada no tecido utilizando a teoria de transporte. O grau de polarização foi medido em amostras de pele sadia e sob condição patológica. Verificou-se que a polarização linear é mantida nas camadas superficiais da pele e que ela pode ser mais preservada na pele lesada, quando comparada à pele sadia. A análise do processo cicatricial foi realizada através da microscopia de luz, da microscopia eletrônica de transmissão e da técnica radioautográfica. Os resultados obtidos indicaram que o processo de reparação de lesões de pele irradiadas por luz laser de He-Ne é influenciado pela direção de polarização.

**INTERACTION OF LOW-INTENSITY LINEARLY POLARIZED LASER
RADIATION WITH LIVING TISSUES: EFFECTS ON TISSULAR
ACCELERATION OF SKIN WOUND HEALING**

Martha Simões Ribeiro

ABSTRACT

According to the Maxwell's equations to optical properties of surfaces, the energy deposition efficiency in a microroughness interface depends on the electrical field polarization component. Considering a linearly polarized beam, this efficiency will depend on the roughness parameters to p-polarized light and it will not depend on such parameters to s-polarized light. In this work it was investigated the effects of low-intensity, linearly polarized He-Ne laser beam on skin wounds healing, considering two orthogonal directions of polarization. We have considered a preferential axis as the animals' spinal column and we aligned the linear laser polarization first parallel, then perpendicular to this direction. Burns about 6 mm in diameter were created with liquid N₂ on the back of the animals and the lesions were irradiated on days 3, 7, 10 and 14 post-wounding, D= 1,0 J/cm². Control lesions were not irradiated. The theoretical model consisted in describing linearly polarized light propagation in biological tissues using transport theory. The degree of polarization was measured in normal and pathological skin samples. It was verified that linearly polarized light can survive in the superficial layers of skin and it can be more preserved in skin under pathological condition when compared with health skin. The analysis of skin wound healing process has demonstrated that the relative direction of the laser polarization plays an important role on the wound healing process by light microscopy, transmission electron microscopy and radioautography.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Apresentação do trabalho	4
2. O LASER	5
2.1. Introdução	5
2.2. Princípios Físicos	6
2.2.1. Meio ativo.....	6
2.2.2. Bombeamento.....	7
2.2.2.1. Mecanismos de bombeamento	8
2.2.3. Cavityde ressonante	9
2.3. Propriedades da luz laser	10
2.3.1. Coerência.....	10
2.3.1.1. Coerência espacial.....	10
2.3.1.2. Coerência temporal	11
2.3.2. Monocromaticidade.....	12
2.3.3. Direcionalidade e colimação	13
2.4. Modos de funcionamento	14
2.4.1. Emissão contínua.....	14
2.4.2. Emissão pulsada.....	14
2.5. Propagação da luz laser	15
2.6. Polarização.....	17
2.7. Laser de He-Ne	19

	Página
3. TERAPIA COM LASERS DE BAIXA INTENSIDADE	21
3.1. Introdução	21
3.2. Mecanismos	21
3.3. Parâmetros associados	22
3.3.1. Comprimento de onda.....	22
3.3.2. Potência do laser	23
3.3.3. Densidade de potência (intensidade).....	23
3.3.4. Densidade de energia (dose ou fluência).....	26
3.3.5. Cálculo do tempo de tratamento	26
3.4. Efeitos colaterais e contra-indicações	27
3.5. Efeitos sistêmicos relacionados.....	28
4. A PELE	29
4.1. Epiderme	29
4.2. Derme.....	30
4.2.1. O tecido conjuntivo da derme.....	31
4.2.1.1. As células do tecido conjuntivo	31
4.2.1.2. A matriz extracelular.....	34
4.2.1.3. Colágeno como elemento da matriz extracelular	35
4.2.1.4. Síntese de colágeno.....	37
4.3. Hipoderme	39
5. O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TISSULAR	40
5.1. Introdução	40
5.2. Queimaduras	40
5.3. Cicatrização.....	43
5.3.1. Cicatrização por segunda intenção	45
5.3.1.1. Inflamação.....	45
5.3.1.2. Formação do tecido de granulação.....	46
5.3.1.3. Remodelagem do tecido	48

	Página
6. REVISÃO DA LITERATURA	50
6.1. Laser na cicatrização.....	50
6.1.1. Estudos em funções celulares (efeitos <i>in vitro</i>).....	51
6.1.2. Estudos em animais (efeitos <i>in vivo</i>).....	60
6.1.3. Estudos em humanos (ensaios <i>in anima nobile</i>).....	69
6.2. Outras aplicações do laser.....	72
6.2.1. Acupuntura.....	72
6.2.2. Analgesia.....	72
6.2.3. Odontologia.....	74
6.2.4. Oncologia.....	74
6.2.5. Pneumologia.....	75
6.2.6. Virologia.....	75
6.3. Mecanismos propostos.....	75
7. A ÓPTICA DA PELE NORMAL	79
8. PROPAGAÇÃO DA LUZ NO TECIDO	84
8.1. Teoria.....	84
8.2. Grau de polarização linear em amostras de pele.....	96
9. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	108
9.1. Microscopia de luz.....	108
9.1.1. Resultados.....	109
9.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....	119
9.2.1. Resultados.....	120
9.2.1.1. Ativação celular.....	121
9.2.1.2. Matriz extracelular.....	122
9.3. Radioautografia.....	130
9.3.1. Resultados.....	135

	Página
10. DISCUSSÃO.....	137
11. CONCLUSÃO.....	146
APÊNDICE 1: Lista de Abreviaturas.....	147
APÊNDICE 2: Lista de Figuras.....	154
APÊNDICE 3: Lista de Gráficos.....	159
APÊNDICE 4: Lista de Tabelas.....	160
APÊNDICE 5: Formalismo Matemático.....	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	162

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos biomédicos da radiação coerente têm interessado à comunidade científica desde o desenvolvimento do laser em 1960. Atualmente, a radiação laser tem sido amplamente empregada nas Ciências da Vida. A utilização do laser em Biologia, Medicina e Odontologia baseia-se em uma grande variedade de fenômenos associados à interação da luz coerente com tecidos biológicos e células. A radiação laser pode ser refletida, transmitida, absorvida e espalhada por um sistema biológico. Cada um destes processos depende das micro e macroestruturas do meio em investigação.

Na medicina e odontologia, as aplicações do laser mais estudadas são aquelas determinadas pelos efeitos térmicos (quando a energia absorvida se transforma subseqüentemente em calor), devido à possibilidade de emissão de altas potências para coagular, vaporizar ou ablacionar tecidos biológicos. Em cirurgia, por exemplo, a radiação laser aplicada com uma potência de algumas dezenas de watts equivale a um "bisturi a luz", permitindo operações seguras, com menor risco de sangramento e boas condições de esterilização. A intensa ação térmica dada pela radiação laser auxilia a destruir tumores em oncologia, bem como realiza a fotocoagulação de vasos. Os lasers mais utilizados para estas finalidades são os de CO₂ e Nd:YAG.

Sabe-se hoje em dia, que a exposição de um corpo ou tecido à radiação laser de baixa intensidade, com uma densidade de potência de alguns mW/cm², exclui a possibilidade da manifestação dos efeitos térmicos. Esta terapia com lasers emitindo baixas intensidades é responsável pelos efeitos não-térmicos (efeitos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos), constituindo-se num tratamento a laser no qual a intensidade utilizada é baixa o bastante para que a temperatura do tecido tratado não ultrapasse 37,5°C. A ação fotoquímica de tal radiação é usada para tratamento de hiperbilirrubinemia e psoríase, para o tratamento fotodinâmico de tumores, analgesia e para acelerar a cicatrização de feridas, queimaduras, úlceras e processos inflamatórios de origem variada. Os principais lasers utilizados para efeitos não-térmicos são os de He-Ne, GaAlAs e GaAs.

Os lasers de baixa intensidade foram introduzidos como modalidade terapêutica na década de 60, devido às baixas densidades de energia utilizadas e comprimentos de onda capazes de penetrar no tecido. Desde então, encontram-se relatados na literatura vários experimentos com animais^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14}, bem como ensaios em humanos^{15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25}. Além disso, vários estudos são descritos sobre os efeitos destes tipos de lasers em funções celulares, buscando entender os mecanismos de interação da luz com as células^{26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42}. Entretanto, a relação exposição-resposta ainda não foi esclarecida e os mecanismos básicos responsáveis pelos efeitos observados no intervalo de doses terapêuticas não são completamente entendidos. Sabe-se, contudo, que os valores de energia conseguidos com esta terapia produzem mudanças mínimas e insignificantes no gradiente de temperatura. O aquecimento induzido por esta terapia está no intervalo de 0,1 a 0,5°C^{35,43}.

Através de trabalho de mestrado realizado no IPEN em colaboração com a UNICAMP, mostrou-se teórica e experimentalmente que lesões criadas artificialmente na pele de ratos, quando irradiadas com luz laser polarizada, apresentaram aceleração no processo cicatricial⁴⁴. Nesse estudo ficou comprovado que a coerência do laser também é fator importante, pois lesões irradiadas com luz coerente não-polarizada cicatrizaram mais rápido quando comparadas às lesões irradiadas com luz não-coerente polarizada. A tabela 1 resume os resultados macroscópicos observados por Ribeiro. O modelo desenvolvido com equacionamento teórico das propriedades ópticas de superfícies, obtido através das relações de Maxwell macroscópicas, propôs que há uma deposição espacial inhomogênea de energia em superfícies com microrrugosidades iluminadas com laser e a eficiência desta deposição vai depender de como o campo elétrico é polarizado. No caso de um feixe linearmente polarizado em incidência oblíqua, tal eficiência é dependente de certos parâmetros da rugosidade para luz p-polarizada (componente da radiação paralela ao plano de incidência) ou independente de tais parâmetros para luz s-polarizada (componente da radiação perpendicular ao plano de incidência). No entanto, para esse estudo, a direção de polarização do feixe foi estabelecida aleatoriamente.

Tabela 1.1: Resultados macroscópicos obtidos no trabalho de Ribeiro⁴⁴.

Lesão	Resultado
Controle	Não-cicatrizada
Luz coerente e polarizada	Completamente cicatrizada
Luz coerente e não-polarizada	Parcialmente cicatrizada
Luz não-coerente e polarizada	Não cicatrizada
Luz não-coerente e não-polarizada	Não-cicatrizada

Avanços recentes com o objetivo de descrever a transferência da energia laser em tecidos biológicos são baseados na teoria de transporte. O uso desta teoria é preferível para o estudo da propagação de fótons em meios túrbidos, ao invés das aproximações analíticas usando-se as equações de Maxwell, devido à inhomogeneidade do tecido biológico⁴⁵.

O estudo dos efeitos da terapia com lasers de baixa intensidade tem recebido um impulso direcionado às causas do fenômeno. Os processos de cicatrização tissular, por exemplo, embora já estudados largamente sob os mais variados prismas, reúnem tantos pontos obscuros que é prioritária toda pesquisa orientada na sua melhor compreensão, estimulação e modelação. Logo, quaisquer contribuições teórico-experimentais nesta linha de pesquisa são de fundamental importância, não só para aprofundar o conhecimento básico dos fenômenos envolvidos, mas também para dar segurança científica aos usuários deste tipo de terapia por laser.

1.1. Objetivos

- Descrever teoricamente a propagação da luz polarizada na pele, mostrando que os fótons, mesmo sofrendo um grande número de colisões dentro do tecido, podem conservar seus estados de polarização inicial até uma determinada profundidade e assim, contribuir positivamente no processo de cicatrização tecidual.

- Criar condições experimentais para estudo da preservação da luz linearmente polarizada em amostras de pele sadia e patológica.
- Verificar os efeitos da radiação laser de He-Ne linearmente polarizada na aceleração da cicatrização tecidual de lesões de pele produzidas em animais de laboratório, com o campo incidente linearmente polarizado na vertical ou horizontal, em relação a uma direção preferencial no animal.
- Avaliar por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão a morfologia e o estado funcional de fibroblastos, as células mais estimuladas no processo cicatricial, responsáveis pela síntese de colágeno, a proteína que forma as fibras colágenas do tecido conjuntivo, bem como avaliar a morfologia dos constituintes do tecido, células e matriz extracelular.
- Quantificar a proteína colágeno pela técnica radioautográfica.

1.2. Apresentação do trabalho

Para abordar a descrição deste tema interdisciplinar complexo, são apresentados dois capítulos básicos sobre lasers e sobre a anatomia da pele, que não têm a intenção de detalhar e exaurir os tópicos, mas sim, destacar os aspectos mais relevantes para a compreensão dos resultados obtidos. No segundo capítulo, descreve-se o laser e suas principais características, importantes no entendimento da interação dessa radiação com os tecidos vivos. O terceiro capítulo refere-se à terapia com lasers de baixa intensidade, um tipo de terapia com laser ainda muito polêmica. O quarto capítulo apresenta a pele e seus principais constituintes. No capítulo cinco, é discutido o processo de cicatrização de lesões. No sexto capítulo, é feita uma revisão da literatura sobre os efeitos do laser de baixa intensidade em células, em animais e humanos, bem como apresenta os mecanismos propostos para os bons resultados obtidos clinicamente com esta terapia. O capítulo sete apresenta a óptica da pele normal humana. O capítulo oito descreve a propagação da luz polarizada em meios túrbidos, apresentando um modelo teórico para o cálculo da despolarização da luz no tecido, bem como um método experimental para investigação dos fenômenos de polarização envolvidos na pele sadia e sob condições patológicas. Os demais capítulos do trabalho são divididos entre a apresentação do procedimento experimental e a discussão dos resultados obtidos.

2. O LASER

2.1. Introdução

Durante muito tempo, o sol foi a única fonte de luz intensa. Foram necessários vários séculos de evolução da ciência e estudos sobre os mecanismos de interação entre luz e matéria, para que a partir das considerações de Einstein⁴⁶ fosse obtida uma forma de amplificação da luz, denominada laser. O postulado de Einstein parte do pressuposto de que a emissão de luz por um átomo pode ser estimulada pela própria radiação incidente, o que constitui a emissão estimulada.

O desenvolvimento do laser é um magnífico exemplo da sinergia entre especialistas de áreas muito diversas. Especialistas em óptica, como Alfred Perot e Charles Fabry, em 1896, demonstraram a utilização, em espectroscopia, de uma cavidade essencial para a construção dos lasers. O desenvolvimento do radar na última guerra mundial permitiu o domínio da interação radiação-matéria no âmbito relacionado à frequência por especialistas em microondas⁴⁷.

No início da década de cinquenta, surgiu um dispositivo que foi chamado MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*—amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação), um amplificador de microondas com ruído extremamente baixo, devido aos esforços de vários cientistas. Entre os mais destacados estavam Charles Hard Townes da Universidade de Colúmbia, EUA; Alexandr Mikhailovich Prokhorov e Nikolai Gennadievich Basov, da URSS. Em 1964, os três receberam o Prêmio Nobel de Física por seu trabalho⁴⁸.

Em 1958, Schawlow e Townes⁴⁹, propuseram estender os princípios do MASER para as regiões do infravermelho e visível do espectro eletromagnético.

Em julho de 1960, Theodore H. Maiman⁵⁰, do *Hughes Research Laboratories*, EUA, anunciou a primeira operação com êxito de um "maser

óptico", com emissão estimulada na faixa visível do espectro, $\lambda = 694\text{nm}$, a partir da excitação de um cristal de rubi através de uma lâmpada flash fotográfica. Surgiu então o LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*—amplificação da luz por emissão estimulada de radiação), certamente um dos grandes acontecimentos na história da ciência.

2.2. Princípios físicos

Para que a maioria dos lasers possa operar, devem ser satisfeitas três condições fundamentais, isto é, três elementos são simultaneamente necessários. Os elementos constituintes de um laser são:

- meio ativo ou meio amplificador;
- mecanismo de excitação ou bombeamento;
- ressonador ou cavidade ressonante (onde se encontram um espelho totalmente refletor e um espelho parcialmente refletor, por onde o feixe laser se propaga para fora da cavidade).

2.2.1. Meio ativo

O meio ativo, base atômica ou molecular do sistema, é um meio que possui níveis de energia excitáveis e capaz de armazenar a energia recebida do exterior. Este meio ativo pode se apresentar em forma sólida, líquida ou gasosa.

Nos lasers com meio ativo sólido ocorre a excitação dos átomos introduzidos em uma matriz hospedeira sólida de cristal ou de vidro. Entre os cristais, estão os óxidos safira (Al_2O_3) e granadas (por exemplo, $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, YAG; $\text{Gd}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$, GGG), e os fluoretos, dos quais podem-se destacar o LiYF_4 (YLF), LiSrAlF_6 (LiSAF) e LiCaAlF_6 (LiCAF). Entre os vidros mais comuns encontram-se os vidros fluorindatos. Como exemplo de lasers de estado sólido, estão os lasers de rubi, hólmio, neodímio, érbio, alexandrita, entre outros.

Dentre os lasers com meio ativo líquido, encontram-se os lasers de corante (*dye lasers*), onde um corante orgânico (rodamina ou coumarina) é diluído em um solvente líquido (etanol ou acetona).

O meio ativo gasoso, por sua vez, constitui a maior parte dos lasers, tendo em comum a excitação através de descargas elétricas. Como exemplo destes lasers, têm-se os lasers de CO₂, hélio-neônio, argônio, criptônio etc.

Há também os lasers de semicondutor, ou lasers de diodo, que utilizam junções semicondutoras do tipo p-n como meio laser ativo. Apesar da emissão estimulada ser um ponto de contato que os aproxima de todos os outros lasers, os princípios dos lasers de semicondutor diferem profundamente dos princípios dos outros lasers. A característica básica que os distingue está em que os elétrons que participam da emissão laser podem deslocar-se livremente em uma vasta zona do semicondutor e, conseqüentemente, dependem do potencial periódico espacial da rede cristalina do material semicondutor. Os lasers de semicondutor são considerados distintos dos lasers de estado sólido típicos, já que o meio ativo é um cristal dopado de dimensões muito pequenas (tipicamente 1μm x 10μm x 200μm)⁵¹. Exemplos destes lasers são os lasers de GaAs, GaAsAl, InGaAs etc.

2.2.2. Bombeamento

No equilíbrio térmico, o nível 1 é mais povoado que o nível 2 e a absorção irá predominar sobre a emissão estimulada. Para se obter a inversão de população em um dado meio ativo, é necessário que o número de átomos que povoam o nível 2 seja, no mínimo, igual ao número de átomos que ocupam o nível 1.

Em um laser de três níveis, os átomos que forem excitados do nível 1 para o nível 3 decaem rapidamente para o nível 2, quando, então, ocorrerá a inversão de população entre os níveis 2 e 1 (figura 2.1 (a)). Já para lasers de quatro níveis, os átomos excitados do nível 0 para o nível 3 podem decair rapidamente para o nível 2, e a inversão de população pode ser obtida entre os níveis 2 e 1. Uma vez

iniciada a oscilação neste tipo de laser, os átomos serão transferidos para o nível 1, por causa da emissão estimulada (figura 2.1 (b)). No caso de um laser de emissão contínua é necessário um sistema de quatro níveis, de forma que a transição do nível 1 para o nível 0 seja muito rápida.

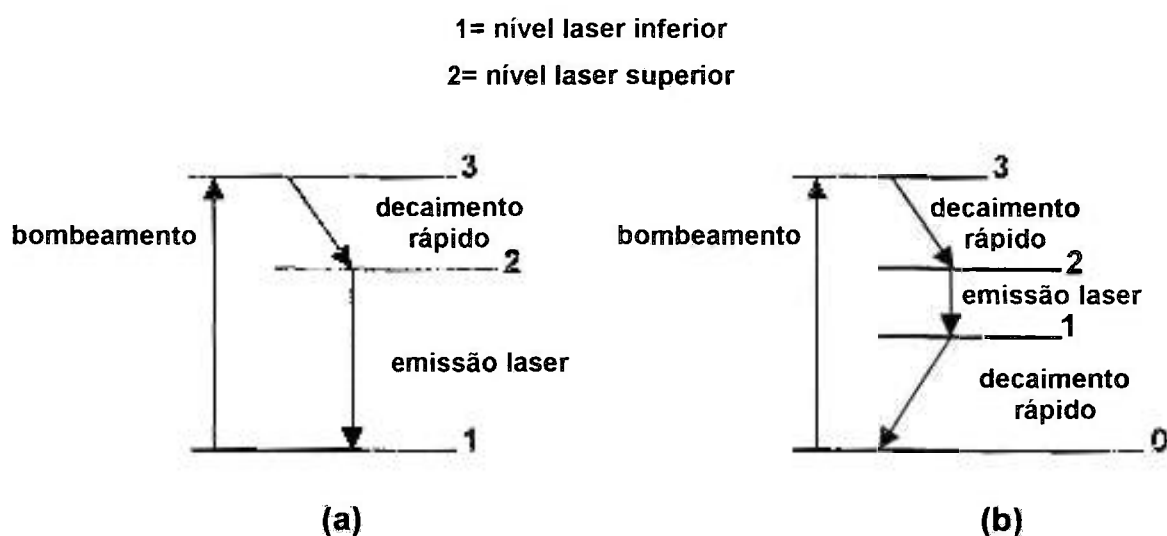


Figura 2.1: Esquemas para lasers de (a) três níveis e (b) quatro níveis⁴⁷.

2.2.2.1. Mecanismos de bombeamento

A excitação do meio ativo pode ocorrer através de diversos mecanismos de bombeamento, onde se pode incluir até mesmo um outro laser como fonte externa de excitação. Conforme o tipo de meio ativo considerado, um determinado tipo de bombeamento é necessário.

O bombeamento óptico ocorre através de uma lâmpada *flash*, lâmpada de arco ou um outro laser. Os lasers de isolante dopados (como o rubi, neodímio, érbio e hólmio) e os lasers de corante, funcionam através deste tipo de bombeamento.

O bombeamento eletrônico abrange as descargas elétricas e os feixes de elétrons, sendo um método utilizado essencialmente nos lasers gasosos. Em seu trajeto entre dois eletrodos (cátodo e ânodo), os elétrons do plasma acelerados

por um campo elétrico efetuam colisões com os átomos do meio ativo, transferindo energia cinética para estes, que são levados a estados excitados.

Um outro mecanismo de excitação do meio ativo é o bombeamento químico, isto é, reações químicas vão formar moléculas diretamente em seus estados excitados, com posterior emissão de radiação laser.

O bombeamento por injeção de portadores é um método muito eficaz utilizado nos lasers de semicondutor, aplicado às junções p-n: injetam-se portadores minoritários nas regiões de tipo n e p, passando-se uma corrente elétrica no diodo

Também podem ser utilizados outros métodos de bombeamento, como por partículas pesadas, por radiação ionizante etc

2.2.3. Cavityde ressonante

O meio ativo está localizado em uma cavidade óptica ressonante, ou ressonador óptico, que se constitui de dois espelhos refletivos paralelos, colocados frente a frente. Tais refletivos enviam a onda eletromagnética em múltiplas passagens de ida e volta no meio ativo, amplificando o campo eletromagnético na cavidade. Um dos espelhos, sendo semitransparente ou apresentando um orifício, permite que haja o acoplamento óptico em direção ao exterior.

O comprimento do interferômetro de Fabry-Pérot (ressonador na ausência do meio ativo) permite que as interferências entre as ondas que se propagam seja construtiva. Os espelhos de Fabry-Pérot formam, assim, uma cavidade ressonante para tal comprimento de onda. Em um laser em funcionamento, os átomos são excitados sob a influência de um bombeamento. A emissão espontânea ocorre em todas as direções, inclusive seguindo o sentido óptico do ressonador. Através de múltiplas reflexões entre os espelhos, essa radiação amplifica-se por emissão estimulada a cada passagem no meio ativo. A figura 2.2 mostra o esquema básico de um laser.

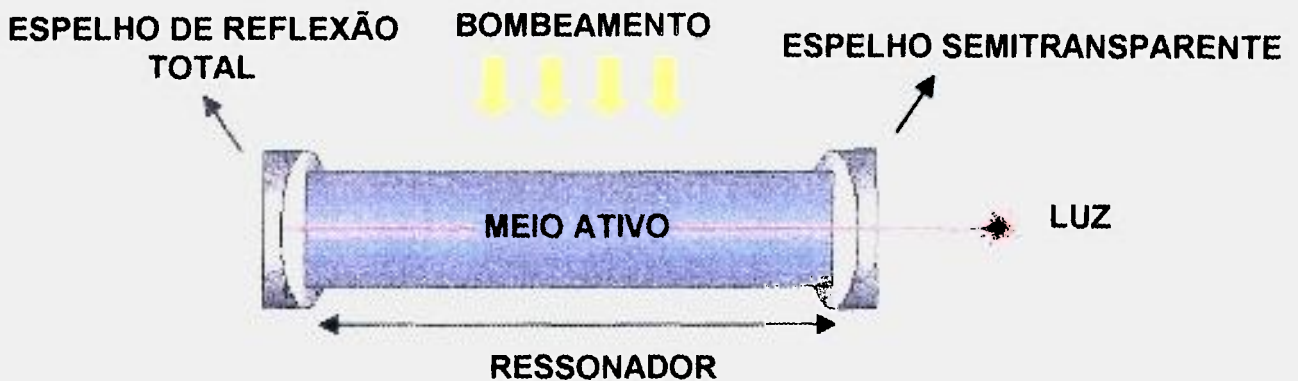


Figura 2.2: Elementos fundamentais constituintes de um laser.

2.3. Propriedades da luz laser

A luz de um laser apresenta características particulares que a diferem das demais fontes luminosas.

2.3.1. Coerência

Uma das propriedades mais importantes da radiação laser é sua coerência, que se expressa simultaneamente pela coerência temporal (dada por sua característica de monocromaticidade) e pela coerência espacial (presença de uma frente de onda unifásica).

2.3.1.1. Coerência espacial

A superfície emissora de um laser é constituída por um espelho semi-refletor que forma uma das extremidades da cavidade ressonante. Devido ao princípio de emissão estimulada, associada à presença de uma cavidade ressonante, a emissão por esta superfície vai ocorrer em uma mesma fase. A propriedade de vibração em fase, em todos os pontos dessa superfície, denomina-se coerência espacial.

2.3.1.2. Coerência temporal

Esta propriedade é caracterizada pelo fato da radiação emitida de um dado ponto da fonte laser, em um dado momento, interferir com a radiação laser emitida do mesmo ponto, num momento posterior, ambos os feixes incidindo num ponto coincidente. O intervalo de tempo dentro do qual a interferência pode ser obtida é denominado "tempo de coerência". Do tempo de coerência, pode-se definir o comprimento de coerência de um feixe laser, que descreve o comprimento espacial do trem de onda, isto é, o comprimento dentro do qual fenômenos de interferência podem ocorrer.

O comprimento de coerência das fontes de luz clássicas não ultrapassam a ordem de grandeza de milímetros. Em um laser de emissão contínua, o tempo de coerência é tão longo quanto no caso de um laser de emissão pulsada. Valores típicos do tempo de coerência em lasers CW estão no intervalo de 10^{-7} s – 10^{-2} s, correspondendo a comprimentos de coerência de 30m a $3 \cdot 10^6$ m, respectivamente.

A emissão coerente permite que se obtenha enormes concentrações de energia por unidade de superfície, possibilitando uma ação muito pontual e intensa sobre a matéria. Por esta razão, o laser pode ser utilizado em uma série de aplicações, como em solda, usinagem, nas áreas biomédicas etc.

Em uma fonte de luz térmica comum, como uma lâmpada incandescente, os átomos irradiam independentemente, produzindo ondas espacialmente e temporalmente incoerentes, com vários comprimentos de onda.

A coerência, portanto, ocorre quando se têm ondas de mesmo comprimento e em fase, isto é, as ondas caminham de forma similar no espaço e no tempo, como um exército marchando com movimentos sincronizados. Tal característica não ocorre com a luz comum, onde diversas ondas são emitidas, cada qual com seu comprimento de onda e frequência característicos, de forma a viajar no espaço e tempo incoerentemente, como um grupo de indivíduos andando de forma aleatória.

2.3.2. Monocromaticidade

Nenhuma fonte de luz, incluindo o laser, é capaz de produzir uma luz monocromática absoluta, no entanto, o laser se aproxima muito desse ideal.

O bombeamento dos átomos do meio ativo do laser os leva para o estado excitado. Com o predomínio destes átomos neste estado, o sistema pode ser estimulado a produzir uma cascata de fótons, todos com um único comprimento de onda, sendo esta cascata produzida pelo decaimento dos átomos em nível decrescente de energia. Além disso, uma vez que o arranjo dos dois espelhos forma uma cavidade ressonante, a oscilação só pode ocorrer nas frequências de ressonância desta cavidade.

A monocromaticidade é caracterizada por esta emissão de fótons, todos com o mesmo comprimento de onda e, portanto, com uma única cor. A tabela 2.1 mostra os comprimentos de onda para alguns tipos de laser.

Tabela 2.1: Principais comprimentos de onda de emissão de alguns lasers.

Laser	Cor	λ (nm)
Ar ⁺	Azul	488,0
	Verde	514,5
He-Ne	Verde	594,5
	Vermelho	632,8
Kr ⁺	Verde	530,9
	Amarelo	568,2
	Vermelho	647,1
Rubi	Vermelho	694,3
GaAsAl	Infravermelho	790
		830
GaAs	Infravermelho	904
Nd:YAG	Infravermelho	1064
CO ₂	Infravermelho	10600

A luz proveniente de filamentos incandescentes ou lâmpadas, por sua vez, é constituída de uma mistura de vários comprimentos de onda, o que pode ser visualizado através de sua incidência em um prisma.

2.3.3. Direcionalidade e colimação

Os espelhos presentes na cavidade ressonante apresentam alta refletividade, fazendo com que as ondas reflitam muitas vezes ao longo do eixo entre eles. Funcionam como colimadores da onda, isto é, a luz emergente se apresentará paralela, com pequena divergência a uma distância relativa. A luz de uma lanterna ou de uma lâmpada, por sua vez, não é colimada, ocorrendo, então, divergência.

A luz laser, por ser altamente colimada, dá lugar a numerosas aplicações, como a sinalização de uma direção no espaço para alinhar elementos, transmissão de energia luminosa à distância etc. A figura 2.3 resume as propriedades de uma fonte de luz laser e de uma fonte de luz comum.

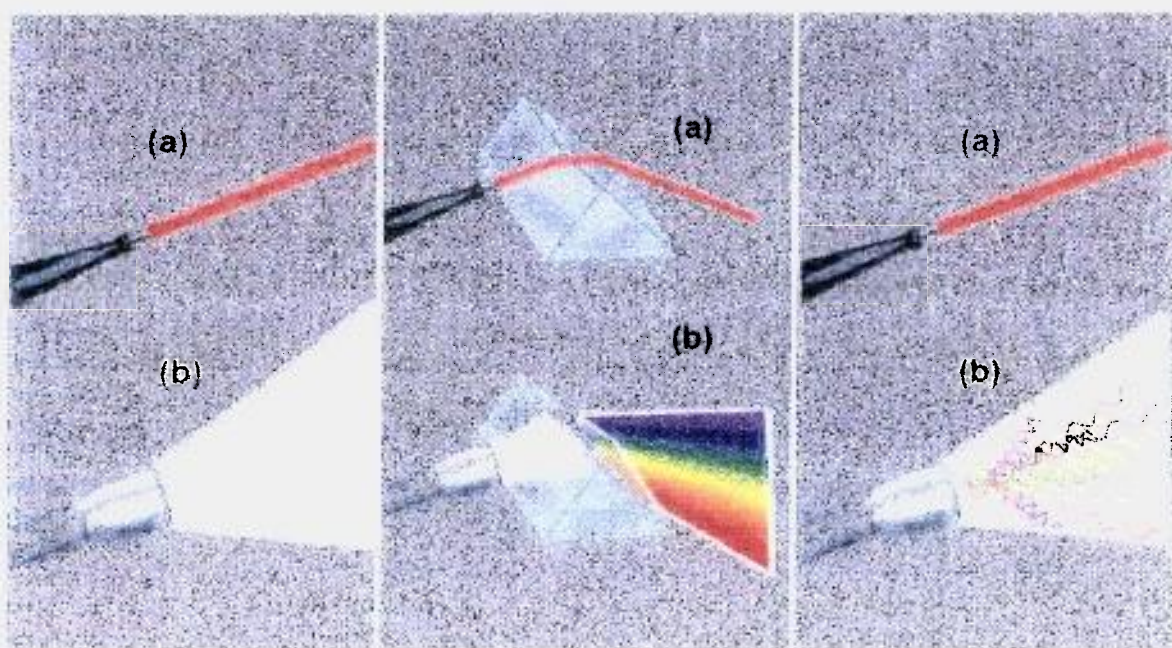


Figura 2.3: Características de (a) uma fonte de luz laser e (b) uma fonte de luz comum⁶².

2.4. Modos de funcionamento

Um sistema laser pode operar em regime contínuo (CW) ou pulsado (PW).

2.4.1. Emissão contínua

A emissão contínua pode ser monitorada através da sua potência e em alguns equipamentos comerciais pode ser interrompida, de forma a alternar sua emissão entre os modos ligado e desligado, conforme mostra a figura 2.4.

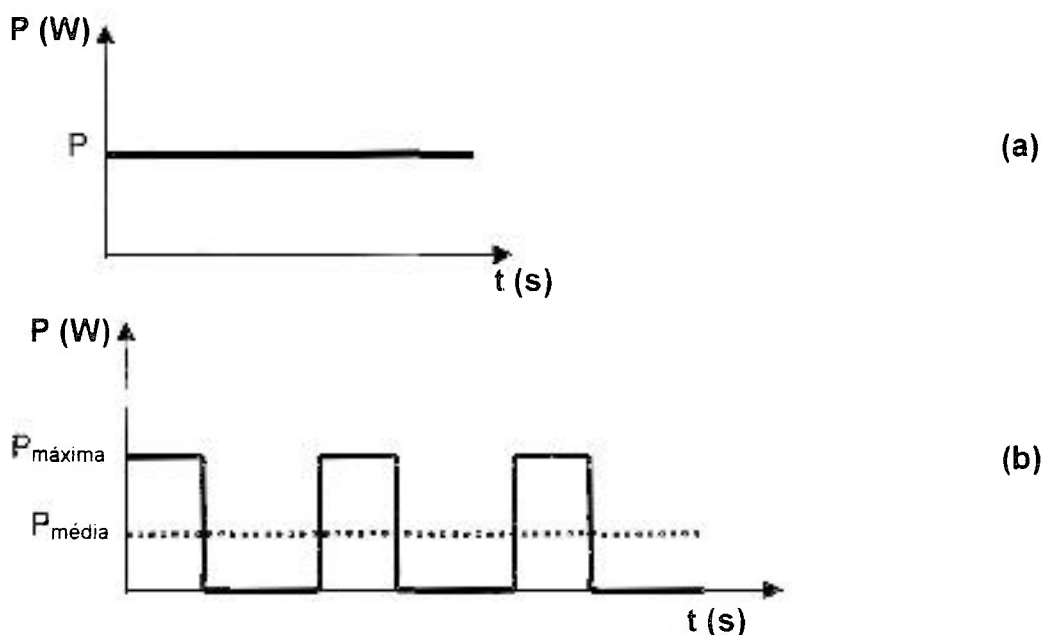


Figura 2.4: Modo de emissão de (a) um feixe laser contínuo e (b) um feixe laser contínuo interrompido.

2.4.2. Emissão pulsada

Quase todos os lasers podem funcionar em regime pulsado. Este regime de funcionamento é dirigido pelo modo de bombeamento e depende da duração média dos pulsos e sua frequência. Também pode-se obter emissão pulsada a partir de lasers CW, como por exemplo para o laser de Ar^+ . A taxa de repetição está ligada à capacidade do meio amplificador de retornar ao equilíbrio térmico

entre dois pulsos. Lasers pulsados (*free-running mode*) têm uma largura temporal da ordem de microssegundos a milissegundos.

Lasers operando em regime de chaveamento-Q emitem pulsos mais curtos, da ordem de nanossegundos até submicrossegundos. A técnica de chaveamento-Q, também chamada de *Q-Switching*, permite produzir oscilações laser muito intensas (milhões de watts) e muito rápidas, dando origem a pulsos gigantes.

Os lasers que emitem pulsos curtos e ultracurtos, da ordem de femtossegundos e picossegundos, operam em regimes de travamento de modos ou modos acoplados (*mode locking*). Podem ser monitorados através de sua energia de emissão por pulso ou sua potência média. O perfil temporal de um laser operando em regime pulsado é mostrado na figura 2.5.

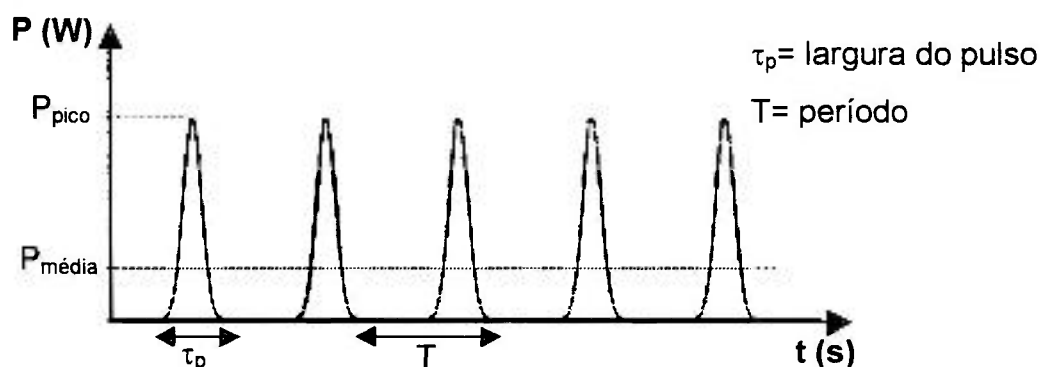


Figura 2.5: Perfil temporal de um laser de emissão pulsada.

2.5- Propagação da luz laser

A potência de um laser é medida em watt, porém, de suma importância para suas diferentes aplicações, é a densidade de potência. A densidade de potência, ou intensidade, de um feixe laser é a potência de saída distribuída numa certa área e geralmente é medida em W/m^2 ou mW/cm^2 . É o parâmetro de controle mais importante para um resultado efetivo da aplicação de um laser. O diâmetro desta região de incidência do feixe depende de uma série de variáveis, como a distância focal das lentes utilizadas, o modo de emissão e o comprimento

de onda do laser. Quanto menor a distância focal das lentes, menor a área irradiada e, portanto, maior a sua intensidade.

O modo de emissão se refere à distribuição de valores da potência sobre a área incidente. Denomina-se modo transversal a distribuição estável do feixe laser em um plano perpendicular ao eixo da cavidade. Isto significa que a amplitude e a fase da onda permanecem inalteradas em uma secção transversal da cavidade após a propagação entre os dois espelhos.

As configurações espaciais do campo eletromagnético denominam-se Modos Eletromagnéticos Transversais, TEM_{mnq} , onde os índices m e n enumeram os zeros da distribuição espacial segundo dois eixos ortogonais de coordenadas em uma secção transversal, e q é o índice do modo longitudinal associado.

O modo TEM_{00q} , chamado simplesmente de TEM_{00} , em qualquer que seja a distribuição considerada ($m=n=0$), é axialmente simétrico. Neste modo, chamado fundamental, o feixe normalmente tem um perfil gaussiano com uma distribuição de valores de potências entre um máximo (no centro geométrico do feixe) e valores decrescentes à medida que se afasta do centro. Com este modo de emissão, pode-se produzir o menor diâmetro focalizado de incidência da luz laser.

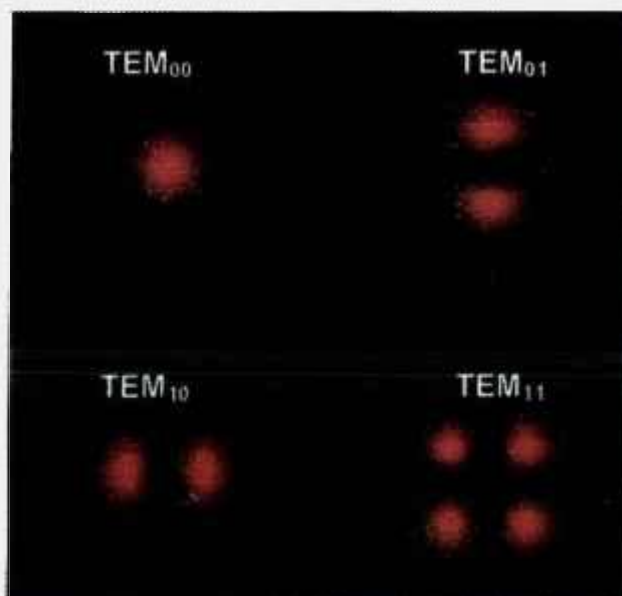


Figura 2.6: Padrões de intensidade para alguns modos TEM⁶³.

Quando a energia não é distribuída desta maneira, tem-se a emissão em modos de ordem superior ou uma distribuição multimodos, com a presença simultânea de vários modos (figura 2:6). Um exemplo de modo de ordem superior, o TEM_{01} , exige uma região de ausência de radiação laser no centro do feixe. O efeito cirúrgico da utilização de um laser com emissão de modos desta natureza será análogo ao de uma faca cega, no caso do efeito desejado ser o corte, embora ainda haja suficiente energia para outros tipos de procedimentos, como no caso de ruptura de membranas em oftalmologia. Desta forma, a estrutura do modo é importante para determinar a melhor aplicabilidade do laser nas diversas atividades.

2.6. Polarização

A luz proveniente de um laser ou de uma outra fonte pode ser polarizada ou não-polarizada. Pode ainda ser parcialmente polarizada. Quando a fonte de luz é polarizada, as ondas têm seu campo elétrico orientado no plano numa direção preferencial.



Figura 2.7: Modelo para obtenção de luz plano-polarizada⁵⁴.

A luz polarizada pode ser conseguida através de filtros polaróides, prismas ou outros componentes ópticos. Um modelo é apresentado na figura 2.7. Muitos lasers e outras fontes de luz não são equipados com meios polarizadores e, conseqüentemente, emitem luz não-polarizada.

Quando a polarização é obtida por reflexão de uma superfície material, há um ângulo particular de incidência, chamado ângulo de polarização ou ângulo de Brewster, no qual o coeficiente de reflexão para a componente paralela da luz ao plano de incidência é zero. No ângulo de polarização, essa componente é completamente refratada e, portanto, o feixe transmitido é parcialmente polarizado. Isso significa que o feixe refletido da superfície, embora de baixa intensidade, é linearmente polarizado com seu plano de polarização perpendicular ao plano de incidência. Alguns lasers são equipados com janelas de Brewster e, por isso, emitem luz linearmente polarizada.

Existem recursos que provocam modificações nos planos de polarização da luz e promovem formas complexas de polarização, como as circulares ou elípticas. A figura 2.8 mostra o padrão instantâneo e o padrão seccional de um feixe de luz polarizado. O padrão instantâneo esquematiza como o feixe de luz apareceria em uma fotografia instantânea obtida com uma câmera fotográfica, agindo extremamente rápido. O padrão seccional corresponde a uma fotografia obtida com uma câmera colocada em uma posição transversal ao feixe, isto é, situada sobre a linha do feixe e dirigida em linha reta à fonte de luz. Ambos os tipos de padrões estão em sentido fictício, já que não é possível fotografar as ondas de luz como elas são, mas estes são bem aceitos para representá-los.

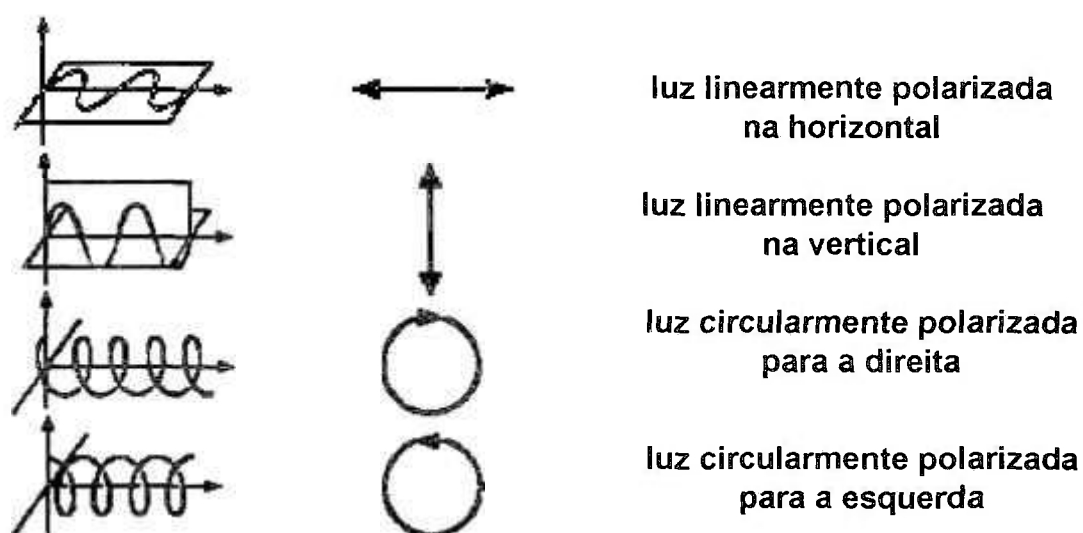


Figura 2.8: Padrão instantâneo (à esquerda) e seccional (à direita) de um feixe de luz polarizado⁵⁵.

2.7. Laser de Hélio-Neônio

Em 1961, Javan, Bennett Jr. e Herriot publicaram a primeira operação com êxito de um laser gasoso de He-Ne, em regime de emissão contínua, com $\lambda = 1152,3\text{nm}^{56}$. O laser de hélio-neônio moderno é certamente o laser mais popular, cujo meio ativo é composto por gás nobre. A luz laser é obtida através da transição do átomo de neônio, enquanto que o hélio é adicionado à mistura gasosa para propiciar o processo de bombeamento do meio ativo (figura 2.9).

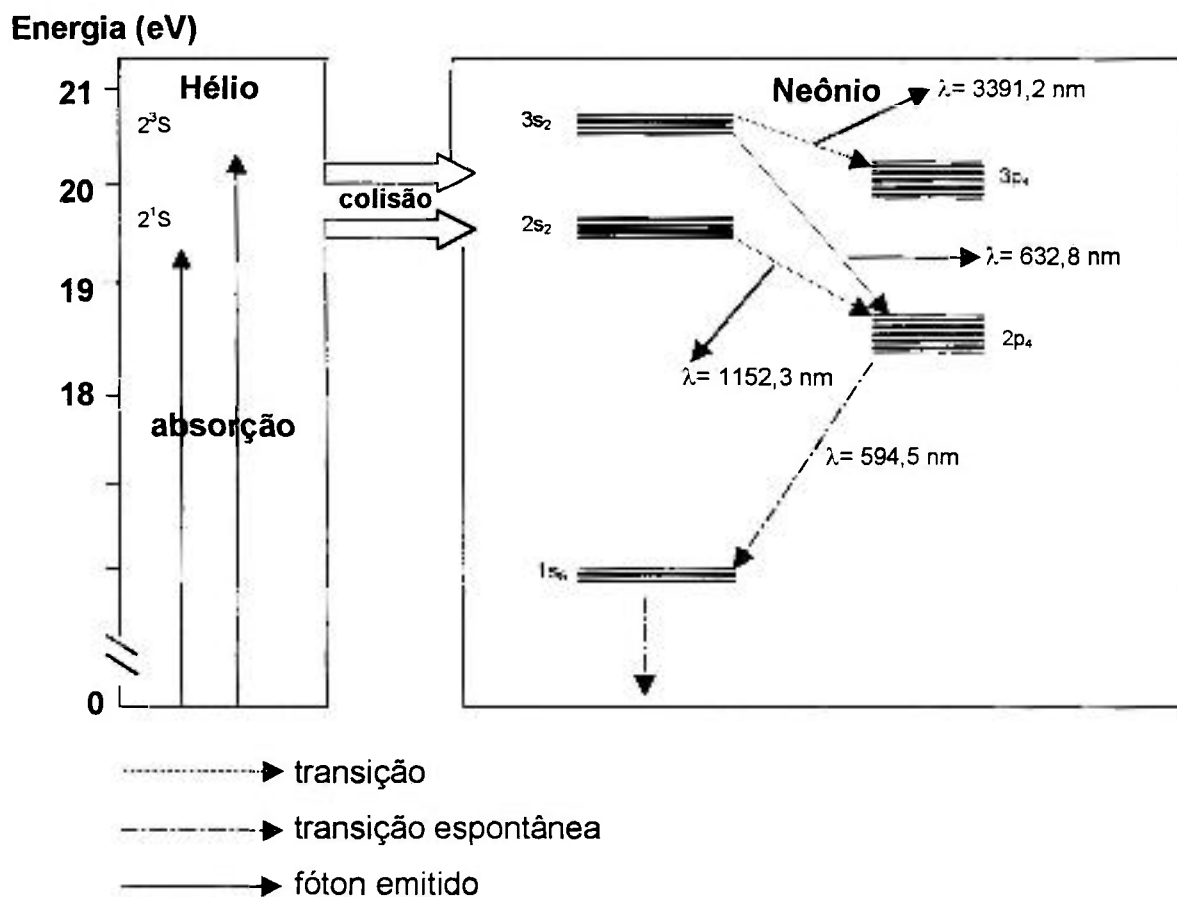


Figura 2.9: Níveis de energia do laser de He-Ne⁴⁸.

O laser de He-Ne emite fótons de vários comprimentos de onda, sendo o mais intenso em $\lambda = 632,8\text{nm}$ (vermelho), emissão contínua. É amplamente utilizado para aplicações onde um laser de baixa intensidade é necessário, como para alinhamento, metrologia e holografia. Neste comprimento de onda, o laser de He-Ne foi demonstrado pela primeira vez por White e Rigden em 1962⁵⁷.

O laser de He-Ne, assim como qualquer outra fonte de luz com $\lambda = 632,8\text{nm}$, na região vermelha do espectro eletromagnético, tem efeito cirúrgico pouco significativo devido ao fato de sua absorção pela água ou sangue ser pouco intensa, desde que a intensidade seja mantida abaixo de 500mW/cm^2 . Atualmente, este laser é amplamente utilizado na prática clínica, porém sem conotação cirúrgica. Neste caso, se atribui o efeito comumente denominado "bioestimulação laser". A figura 2.10 mostra o coeficiente de absorção dos principais cromóforos do tecido.

De acordo com a literatura, é o comprimento de onda mais indicado para tratamento de feridas cutâneas abertas. Como o laser de He-Ne pode ser adquirido comercialmente emitindo este comprimento de onda, foi o laser utilizado na parte experimental deste trabalho.

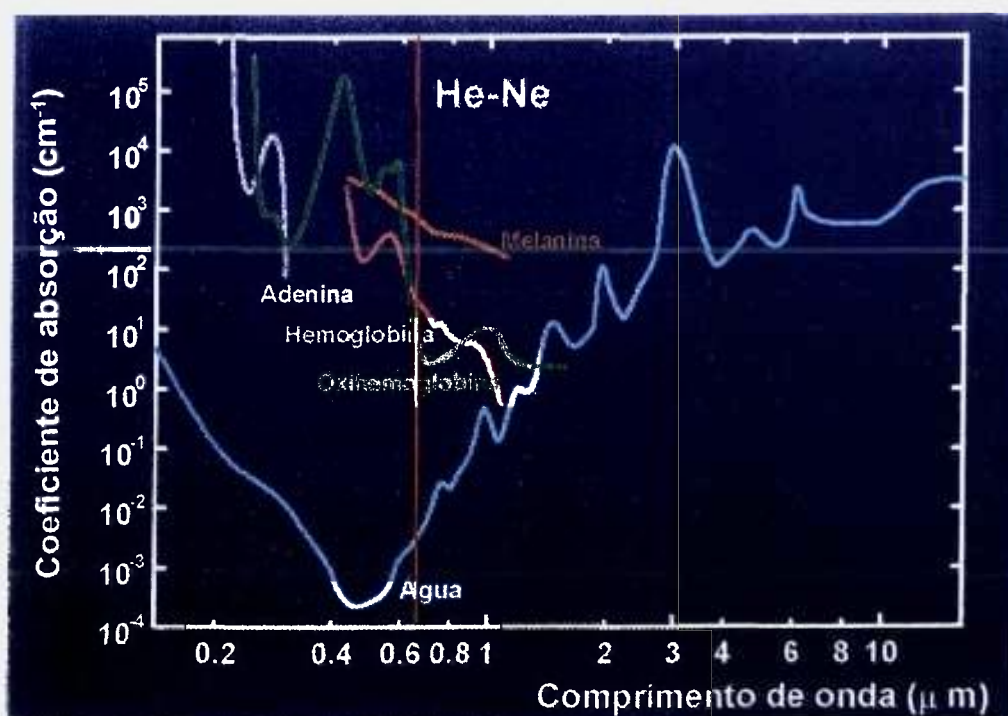


Figura 2.10: Absorção óptica de alguns cromóforos do tecido biológico⁵⁸.

3. A TERAPIA COM LASERS DE BAIXA INTENSIDADE

3.1. Introdução

Um dos pioneiros na pesquisa da aplicação do laser de baixa intensidade nas áreas biomédicas foi o Professor Endre Mester. Em 1966, seu grupo do hospital Semmelweiss, em Budapeste, Hungria, publicou o primeiro trabalho científico referente aos efeitos não-térmicos da luz laser sobre a pele de ratos⁵⁹. Nos anos seguintes, foram publicados vários artigos sobre o efeito do laser em feridas e leucócitos em cultura. Mester demonstrou que células em cultura e no tecido podem ser estimuladas por uma certa dose de luz laser. Com baixas doses, não há efeito terapêutico ou o efeito é insuficiente, enquanto que com uma dose muito alta pode haver inibição dos efeitos. Ele publicou muitos trabalhos em vários campos da medicina, tais como o efeito desta terapia no crescimento de cabelos, na fagocitose de bactérias, na atividade intestinal, na formação de vasos, na geração de fibras musculares etc. Seus filhos Adam e Andrew Mester o sucederam nestas pesquisas. Segundo Andrew Mester, a radiação eletromagnética não-ionizante pode interagir com o corpo em diferentes níveis: molecular, celular, tecidual e orgânico. Ele enfatizou ainda que os efeitos destes tipos de laser podem ser sinérgicos, como nas reações imunológicas; efeitos remotos, tais como a reprodução de substâncias ativas circulatórias; e efeitos de estimulação ou inibição, dependendo da dose utilizada. Atualmente, há vários estudos científicos encontrados na literatura onde são demonstrados os efeitos biológicos dos lasers de baixa intensidade. Entretanto, há ainda um longo caminho a percorrer para que os mecanismos envolvidos no processo sejam completamente entendidos.

3.2. Mecanismos da terapia

A terapia utilizando lasers de baixa intensidade não é baseada em aquecimento, ou seja, a energia dos fótons absorvidos não será transformada em calor, mas sim, nos efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas

células e no tecido. Quando a luz interage com as células ou tecido, se administrada na dose adequada, certas funções celulares poderão ser estimuladas. Esse efeito é particularmente evidente se a célula em questão tem a sua função debilitada⁶⁰. Trabalhos encontrados na literatura mostram que a terapia com luz laser de baixa intensidade (LILT – *Low Intensity Laser Therapy*) tem efeitos mais pronunciados sobre órgãos ou tecidos enfraquecidos, tais como em pacientes que sofrem algum tipo de desordem funcional ou de injúria ao tecido⁶¹.

3.3. Parâmetros associados

A radiação deve ser absorvida para produzir uma mudança física e/ou química, que resulte em uma resposta biológica. Uma vez que a resposta biológica é observada, o próximo passo é determinar a dose ótima de radiação em um dado comprimento de onda e o número ótimo de tratamentos necessários para produzir o efeito. O espectro de absorção de um sistema biológico mostrará quais comprimentos de onda da radiação serão absorvidos e, portanto, quais comprimentos de onda têm a chance de produzir um efeito. O espectro de absorção de alguns cromóforos do tecido foi mostrado na figura 2.10.

Os seguintes parâmetros, entre outros, são significantes nos bons resultados conseguidos com a LILT: escolha do comprimento de onda do laser, densidade de energia (dose ou fluência), densidade de potência (intensidade), tipo de regime de operação do laser, frequência do pulso (taxa de repetição), número de tratamentos e dados ópticos do tecido, como características de absorção e espalhamento.

3.3.1. Comprimento de onda

É importante utilizar o comprimento de onda/tipo de laser adequado em cada tratamento. Embora ainda não tenha sido possível determinar o melhor comprimento de onda para cada indicação, a literatura sugere que o laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$) é a melhor opção para úlceras, herpes, regeneração nervosa

e cicatrização de feridas abertas; o laser de GaAs ($\lambda = 904\text{nm}$) é a melhor escolha para o tratamento de injúrias do esporte e tem mais influência em tratamento de dor pós-operatória e inchaço; o laser de GaAlAs ($\lambda = 790\text{nm}$ ou 830nm) pode ser uma boa alternativa de terapia em analgesia, tendinites e edema, e há bons resultados do uso deste tipo de laser no tratamento de úlcera crônica⁶².

3.3.2. Potência do laser

É importante conhecer a potência média do laser, para o cálculo da dose a ser administrada. Quando o regime do laser é pulsado, a potência varia entre um valor máximo (potência pico) e zero, de forma que é a potência média do laser que é significativa para o cálculo da dose. Se o regime de operação do laser for contínuo, a potência do laser permanece constante por todo período de tempo e é igual a potência média.

3.3.3. Densidade de potência (Intensidade)

É a potência de saída da luz, por unidade de área, geralmente medida em W/cm^2 . É a grandeza física que avalia a possibilidade de dano microtérmico. A figura 3.1 exemplifica, para uma fonte de luz de potência 30mW , a relação entre o diâmetro do feixe, a área do feixe e a intensidade associada.

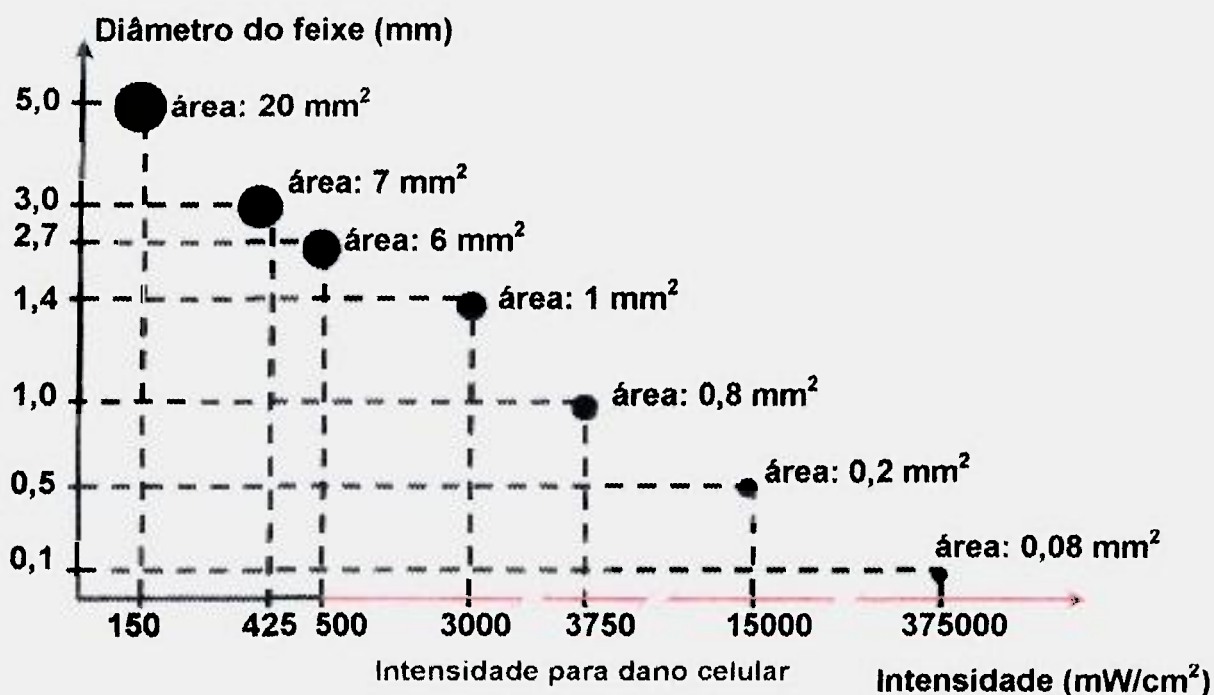


Figura 3.1: Relação entre o diâmetro do feixe, área do feixe e intensidade, para uma fonte de luz de potência 30 mW. Intensidades acima de 500 mW/cm² podem causar dano celular⁶³.

A penetração da luz laser na pele pode ser descrita, qualitativamente, pela Lei de Beer, como uma função exponencial, conforme mostra a figura 3.2.

O formato da curva depende do coeficiente de atenuação. O coeficiente de atenuação varia dependendo do comprimento de onda da luz e da composição do tecido.

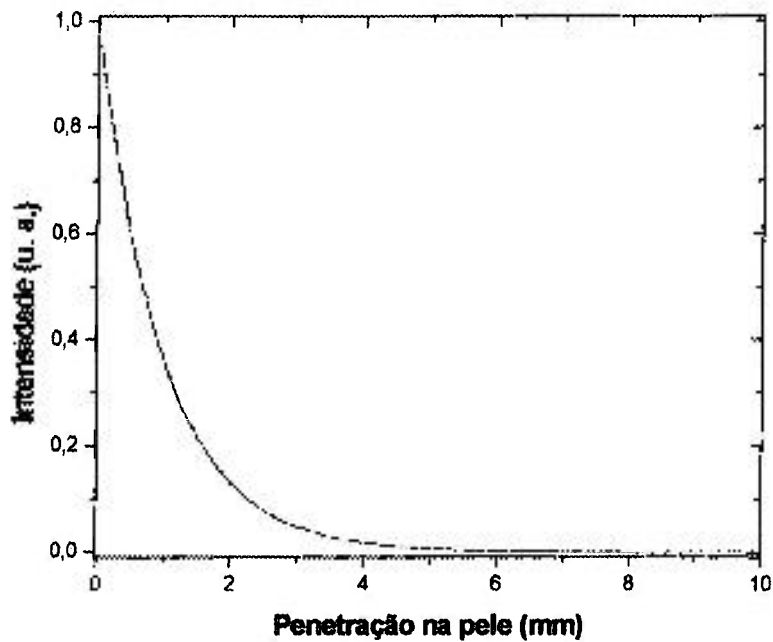


Figura 3.2: Redução relativa da intensidade do feixe laser em função da profundidade de penetração na pele⁶³.

Outro modo de ilustrar esta relação exponencial é exemplificado na figura 3.3.

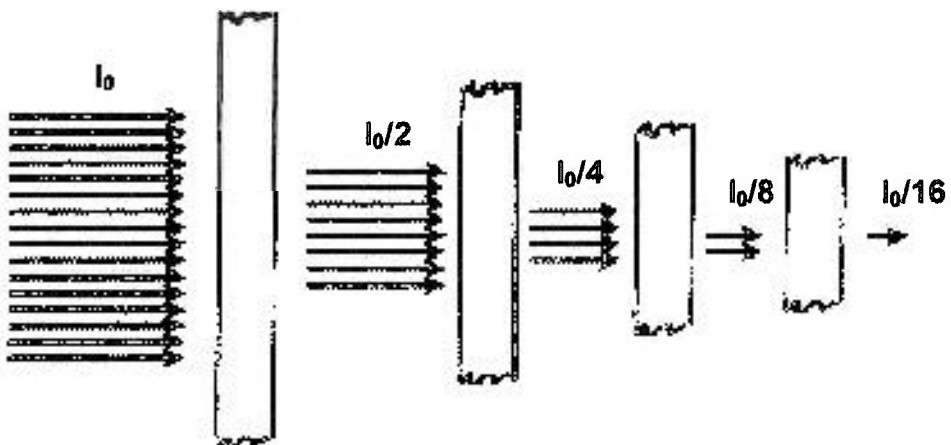


Figura 3.3: Diagrama do padrão exponencial da penetração de fótons no tecido. A intensidade do feixe vai diminuindo após uma certa profundidade ser alcançada⁶³.

3.3.4. Densidade de energia (Dose ou Fluência)

A dose do tratamento é o parâmetro mais importante para observação dos resultados obtidos com esta terapia. É a grandeza física que avalia a possibilidade de estimulação, inibição ou não-manifestação dos efeitos terapêuticos. A dose é a quantidade de energia por unidade de área transferida à matéria (tecido ou células em cultura). Geralmente é medida em J/cm^2 .

3.3.5. Cálculo do tempo de tratamento

A situação mais comum é aquela que se quer administrar uma certa dose a uma área específica que deve ser tratada e é necessário calcular o tempo de exposição. O tempo de exposição pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$t = \frac{D \times A}{P}$$

onde t é o tempo de exposição medido em segundos, D é a dose a ser transferida em J/cm^2 , A é a área tratada, calculada em unidades de cm^2 e P é a potência média medida em W .

A tabela abaixo resume a dosimetria associada à terapia utilizando lasers de baixa intensidade.

Tabela 3.1: Dosimetria associada à LILT⁶⁴.

Tipo de Laser Utilizado	Dose de Irradiação
Fatores Físicos	Fatores Clínicos
Comprimento de onda (nm)	Densidade de energia (J/cm ²)
Emissão (CW, PW)	Tempo de irradiação (s)
Potência pico (W)	Pontos irradiados
Taxa de repetição (Hz)	Método de irradiação
Duração de cada pulso (ms a fs)	Número de tratamentos
Potência média (W)	
Ciclo útil (%)	
Spot (cm)	
Divergência do feixe e expansão	
Distância fonte-tecido	
Propriedades ópticas do tecido	

3.4. Efeitos colaterais e contra-indicações

A literatura mostra que não há efeitos colaterais e contra-indicações relacionados à LILT, desde que esta terapia seja administrada corretamente. Também não há efeitos prejudiciais relacionados a esta terapia, excetuando-se a incidência do feixe, direta ou indireta, nos olhos^{62,63}.

A terapia com lasers de baixa intensidade não provoca câncer. Nenhum efeito mutagênico resultante de luz com comprimentos de onda no visível ou no infravermelho foi observado, no limite de doses preconizado nesta terapia.

Estudos mostram que células cancerosas podem ser estimuladas por luz laser. Entretanto, experiências *in vivo* indicam que pequenos tumores tratados com laser podem retroceder e até mesmo desaparecer, embora este tratamento não tenha efeito sobre tumores maiores⁶².

3.5. Efeitos sistêmicos relacionados

Segundo a literatura, lasers de baixa intensidade podem produzir efeitos em outras partes do corpo além do local onde o tecido é irradiado. Uma possível razão para o efeito sistêmico é que as células no tecido que são irradiadas produzem substâncias que se espalham e circulam nos vasos sanguíneos e no sistema linfático^{16,17,64,65}. Entretanto, efeitos sistêmicos associados à LILT ainda não estão claros. Há trabalhos na literatura que mostram resultados positivos estatisticamente significantes nos grupos irradiados quando comparados ao grupo controle, mesmo quando o controle situa-se no próprio animal ou no indivíduo tratado^{1,9,44,66,67,68}.

4. A PELE

A pele recobre a superfície do corpo e constitui-se de uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele, apenas lhe serve de suporte e união com os órgãos subjacentes. A figura 4.1 mostra a anatomia da pele humana sadia.

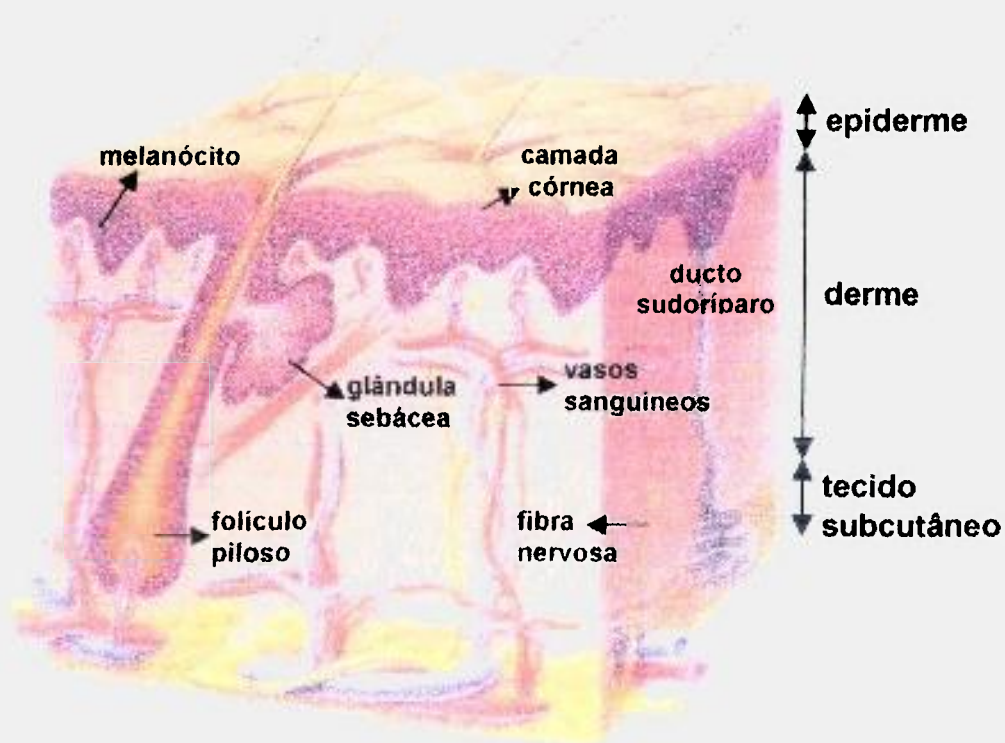


Figura 4.1: Anatomia da pele humana sadia ⁷⁰.

4.1. Epiderme

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

Os melanócitos são as células que produzem o pigmento melanina, protetor contra os raios ultravioleta. As células de Langerhans fazem parte do sistema imunitário e originam-se de células precursoras trazidas da medula óssea pelo sangue. As células de Merkel são tidas como mecanorreceptores. Esta interpretação, no entanto, não é universalmente aceita. Alguns pesquisadores acreditam que as células de Merkel sejam secretoras de hormônios⁷¹.

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

4.2. Derme

É o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. A derme apresenta espessura variável de acordo com a região observada. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme. Essas saliências recebem o nome de papilas dérmicas. Acredita-se que a função das papilas seja aumentar a zona de contato derme-epiderme, trazendo maior resistência à pele⁷¹.

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

A camada reticular, mais profunda, é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso e apresenta, portanto, menos células e fibras colágenas mais abundantes e espessas do que a camada papilar. Ambas as camadas contêm muitas fibras elásticas, responsáveis em parte pelas características de elasticidade da pele. Além dos vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, também

são encontradas na derme as seguintes estruturas derivadas da epiderme: pêlos, glândulas sebáceas e sudoríparas.

4.2.1. O tecido conjuntivo da derme

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

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

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

4.2.1.1. As células do tecido conjuntivo

O conjuntivo possui células próprias e células vindas do sangue. A divisão de trabalho entre as células do conjuntivo determina o aparecimento de vários tipos celulares, cada um com características morfológicas e funcionais próprias. Essas células são: fibroblasto, macrófago, mastócito, plasmócito, célula adiposa e leucócito. A figura 4.2 mostra as principais organelas de uma célula.

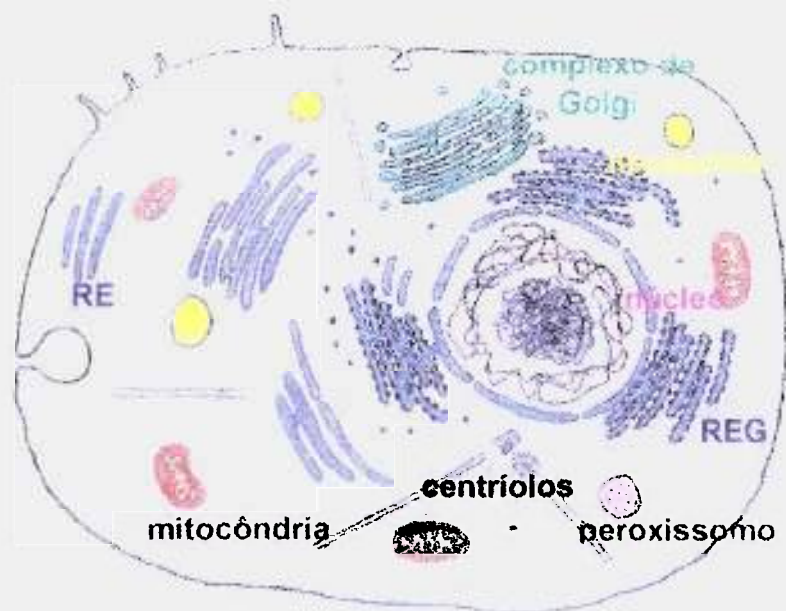


Figura 4.2: Organelas presentes em uma célula⁷².

O fibroblasto sintetiza colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas estruturais. É a célula mais comum no tecido conjuntivo e a principal responsável pela formação das fibras e do material intercelular amorfo. É uma célula dotada de mobilidade, porém sua movimentação é muito lenta. Há dois tipos extremos de fibroblastos, separados por tipos intermediários. A célula, em intensa atividade sintética, tem morfologia diferente do fibroblasto que já sintetizou muito e que se situa entre as fibras por ele fabricadas. Certos autores reservam a designação de fibroblasto para a célula mais ativa, chamando a célula "inativa" de fibrócito⁷¹. Havendo um estímulo adequado, como ocorre nos processos de cicatrização, o fibrócito pode voltar a sintetizar fibras, reassumindo o aspecto descrito para o fibroblasto. Na cicatrização dos ferimentos, aparece uma célula chamada miofibroblasto, com características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa. Essas células têm a morfologia do fibroblasto, mas contêm grande quantidade de microfilamentos de actina e contêm também miosina. Os miofibroblastos participam do fechamento dos ferimentos, pela contração da cicatriz formada^{71,73,74}. No conjuntivo do adulto, os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando ocorre uma solicitação, como por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo.

O macrófago é uma célula polifuncional oriunda dos monócitos do sangue. Tem grande capacidade de fagocitose e sua morfologia é variável conforme seu estado funcional e sua localização. Os macrófagos podem estar fixos ou em movimento amebóide e atuam como elementos de defesa. Fagocitam restos de células, material intercelular alterado, bactérias e partículas inertes que penetram no organismo. Quando estimulados (por exemplo, nas infecções), os macrófagos passam por modificações morfológicas e metabólicas, sendo chamados macrófagos ativados. Essas células têm maior atividade fagocitária, maior capacidade de matar e digerir partículas estranhas, produção de lisossomos aumentada e secretam diversas substâncias que participam do processo defensivo atraindo leucócitos e estimulando a atividade de outras células.

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

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

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

Os leucócitos, ou glóbulos brancos, são constituintes normais do tecido conjuntivo vindos do sangue por migração através da parede dos capilares e

vênulas (diapedese). Os leucócitos mais freqüentes no tecido conjuntivo são os neutrófilos, eosinófilos e os linfócitos.

4.2.1.2. A matriz extracelular

A matriz extracelular é o todo do conteúdo do tecido que está fora das células que o compõe. É composta por um conjunto heterogêneo de macromoléculas produzidas pelas próprias células dos tecidos. O tipo de macromolécula, bem como sua organização e quantidade relativa, determinam as propriedades físicas e funcionais dos tecidos. A matriz pode constituir a maioria do tecido como por exemplo na pele, ossos ou cartilagem, ou a minoria, como no tecido nervoso. Atualmente, sabe-se que a matriz não é apenas um componente passivo do tecido, mas pelo contrário, pode influenciar as suas células no que diz respeito a vários fenômenos biológicos importantes como migração, proliferação, desenvolvimento, forma e função⁷⁵. Didaticamente, pode-se dividir as macromoléculas da matriz em duas classes distintas: fibrilares e não-fibrilares.

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

Os componentes não-fibrilares são representados pelas glicosaminoglicanas e proteoglicanas. As primeiras são polissacarídeos de alto peso molecular e grande quantidade de cargas negativas. As glicosaminoglicanas são encontradas, em sua maioria, ligadas a proteínas e, neste caso, denominam-se proteoglicanas. Tais moléculas promovem um meio hidratado, similar a um gel, que permite

livremente a difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre a corrente sanguínea e as células, além de conferir resistência compressiva aos tecidos.

4.2.1.3. Colágeno como elemento da matriz extracelular

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

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

Num preparado por distensão, as fibras colágenas aparecem como estruturas cilíndricas alongadas e flexuosas, cujas extremidades se perdem entre os outros elementos do tecido. Têm diâmetro variável entre $1\mu\text{m}$ e $20\mu\text{m}$. Essas fibras mostram uma estriação longitudinal, devido ao fato de serem constituídas por fibrilas.

No microscópio eletrônico, verifica-se que as fibrilas colágenas apresentam uma estriação transversal típica. Essa estriação aparece como períodos de 67nm , cada período formado por duas faixas, uma clara e outra escura, conforme exemplifica a figura 4.3. Observadas no microscópio de luz, as fibras colágenas são acidófilas, corando-se de róseo pela técnica da hematoxilina-eosina.

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

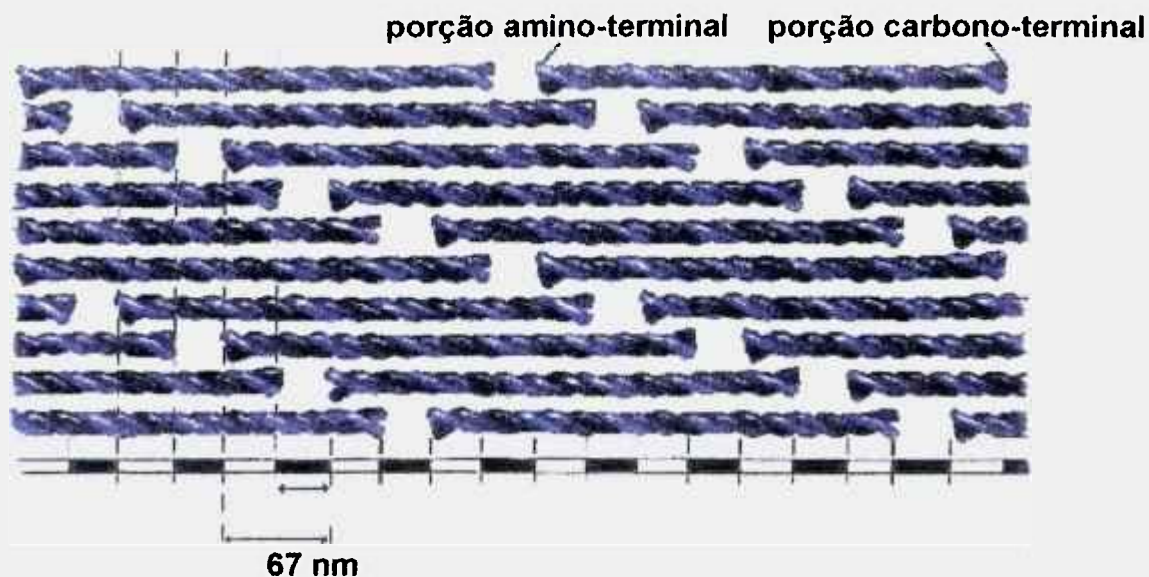


Figura 4.3: Estriação das fibrilas de colágeno⁷⁶.

A molécula do colágeno é constituída por três cadeias, denominadas cadeias- α (figura 4.4). Cada uma delas é composta pela combinação de três aminoácidos sintetizados em seqüência repetidamente, sendo o primeiro deles sempre a glicina. Estas três cadeias são enroladas em torno umas das outras formando uma tripla-hélice. A riqueza de glicina (33,5% dos aminoácidos totais do colágeno) e de prolina/hidroxiprolina (12%/10%) confere propriedades especiais à tripla-hélice, graças às suas características moleculares. O primeiro, por ser o menor aminoácido existente, permite uma aproximação maior entre as cadeias- α , mantendo-as bem unidas, e o segundo, devido à sua estrutura molecular cíclica, permite uma maior estabilidade helicoidal a cada cadeia- α .



Figura 4.4: Estrutura tripla-hélice da molécula de colágeno⁷⁷.

Devido às inúmeras combinações possíveis dos três aminoácidos iniciais, poderia, teoricamente, existir mais de 10.000 subtipos de colágeno, contudo, até hoje, foram descobertos por volta de 21 subtipos apenas, nomeados com algarismos romanos (Ex. colágeno tipo I, tipo II, tipo III, etc.)⁷¹. O colágeno tipo I representa mais de 90% do colágeno total e é o principal colágeno da pele e ossos.

4.2.1.4. A Síntese do Colágeno

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

Uma vez sintetizado o mRNA, este migra em direção ao retículo endoplasmático rugoso, onde formará polirribossomos que sintetizarão as cadeias- α para dentro do lúmen reticular. Tais cadeias- α , à medida que são sintetizadas, sofrem hidroxilação de alguns resíduos de lisina e prolina selecionados para tal. Outra característica importante é que tanto na porção amino-terminal, quanto na porção carbono-terminal, são sintetizados aminoácidos adicionais denominados peptídeos de registro. Esses alinham as cadeias- α entre si de modo a formar a tripla-hélice e a impede de polimerizar (formar fibrilas) com as outras tripla-hélices intracelularmente. A tripla-hélice já formada, ainda com os peptídeos de registro, é denominada procolágeno.

Posteriormente, as moléculas de procolágeno são transportadas ao complexo de Golgi, onde são separadas em vesículas de secreção e transportadas para a periferia da célula por microtúbulos do citoesqueleto celular. Ao sofrerem exocitose, ou seja, agora no meio extracelular, as moléculas de

procolágeno sofrem ação da enzima procolágeno peptidase, que separa as cadeias- α dos seus peptídeos de registro. A tripla-hélice, agora denominada tropocolágeno, sofre polimerização umas com as outras, formando as fibrilas de colágeno.

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

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

- através da síntese de outros componentes da matriz, que influenciam na orientação das fibrilas de colágeno e as secretam junto ao procolágeno. Assim, eles agem sobre as fibrilas recém-sintetizadas, orientando-as segundo a necessidade do tecido;
- através da tração mecânica da fibrilas, com a formação de recessos citoplasmáticos ou migração celular.

Finalmente, após orientar um grupo de fibrilas na mesma direção, esse grupo pode ser chamado de fibras de colágeno e num estágio mais tardio as fibras podem ser organizadas formando verdadeiros cabos na matriz extracelular denominados feixes, ou serem organizadas em camadas com orientações tridimensionais diferentes, umas sobre as outras, que formam a estrutura da maioria dos órgãos.

Tal embasamento teórico é útil para justificar alguns dos resultados observados neste trabalho:

- fibrilas mais finas de colágeno e mais próximas aos fibroblastos são mais novas, pois ainda não tiveram tempo ou substrato para se polimerizarem em fibrilas mais espessas;
- fibroblastos com retículo endoplasmático abundante indicam aumento da atividade de síntese protéica, sobretudo se a célula estiver rodeada de fibrilas recém-formadas. Muito provavelmente, em sua maioria, a proteína sintetizada é o colágeno, pois o tecido está em cicatrização;
- a presença de recessos citoplasmáticos mostra um estágio mais avançado da cicatrização, no qual o colágeno novo já foi sintetizado e agora está sendo organizado na matriz.

4.3. Hipoderme:

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

5. O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

5.1. Introdução

Várias situações podem traumatizar o organismo, como por exemplo, a exposição a agentes químicos e físicos. O trauma e a inflamação aguda causam morte celular e destroem a matriz extracelular. As tentativas do organismo para curar as lesões induzidas por agressões locais começam muito precocemente no processo de inflamação e, ao fim, resulta no reparo e na substituição das células mortas ou lesadas por células saudáveis. O processo de reparação tissular vai substituir as células mortas e a matriz extracelular destruída por um novo tecido. O reparo, geralmente, envolve dois processos distintos:

- a regeneração, que é a substituição do tecido lesado por células parenquimais do mesmo tipo, algumas vezes não deixando qualquer resíduo da lesão inicial;
- a substituição por um tecido conjuntivo, que no seu estado permanente forma uma cicatriz.

Neste trabalho, o processo de reparação tissular constitui-se na cicatrização de queimaduras criadas na pele de animais de experimentação. Neste caso, o reparo pode ser dividido em três etapas que se sobrepõem: inflamação, formação do tecido de granulação e remodelagem do tecido conjuntivo⁷³.

5.2. Queimaduras

A queimadura é um fenômeno que ocorre toda vez que a pele entra em contato com corpos em temperaturas que se afastam muito da média corpórea. Tanto uma temperatura muito elevada quanto uma muito baixa podem originar uma queimadura. Conforme a intensidade do agente, o tempo que a epiderme fica exposta e as características da pele, a queimadura varia de grau e gravidade.

O interesse pela determinação da profundidade de uma lesão por uma queimadura, provocando maior ou menor gravidade, já é patente desde Fabricius Heldanos, em 1607, quando propunha sua classificação no aspecto morfológico: primeiro grau: com rubor de pele e formação de flictenas; segundo grau: com pele dessecada, dura, porém sem mortificação; e terceiro grau: com necrose tecidual⁷⁸. A ele se seguiram, entre outros, Dupuytren (1832, seis graus), Marjolin (1834, dois graus), Boyer (1893, três graus), Goldblatt (1927, dois graus), Elman e Lischer (1944, três graus), Converse e Smith (1957, cinco tipos) e Benain (três tipos).

O uso da palavra "grau" para identificar a profundidade da lesão pode criar algumas confusões se não forem identificados o autor considerado e a classificação adotada. De acordo com Sucena⁷⁸, todas as classificações com denominações de graus, tipos ou letras apresentam as mesmas limitações de uso e interpretação devido à necessidade de se justificar, a cada vez, qual o seu significado. Mais recentemente, as queimaduras de primeiro e segundo grau têm sido denominadas queimaduras parciais da espessura da pele e as queimaduras de terceiro grau, queimaduras totais ou completas da espessura da pele⁷⁹.

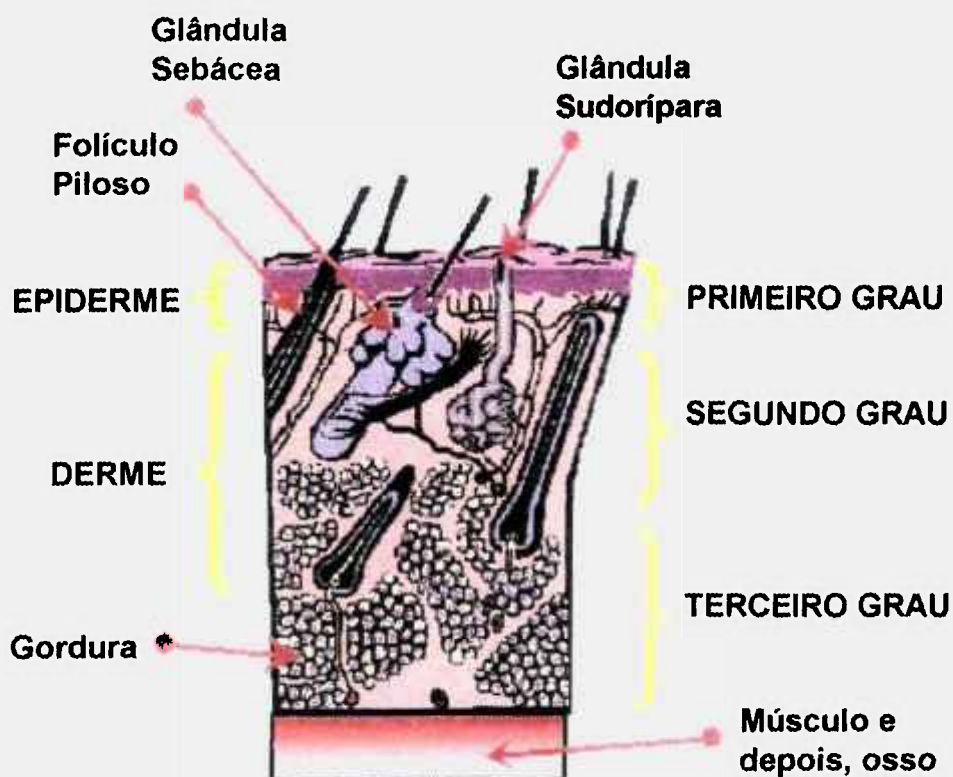


Figura 5.1: Classificação de queimaduras na pele segundo Boyer⁸⁰.

A classificação por Boyer é ainda utilizada, conforme a profundidade da lesão: primeiro grau, eritema; segundo grau, flictena e terceiro grau, escara. A figura 5.1 exemplifica esta classificação. É uma classificação simples, baseada essencialmente no aspecto clínico, mas perfeitamente adequada para o propósito deste trabalho.

As queimaduras de primeiro grau são as mais superficiais, como por exemplo, as produzidas pelo sol, caracterizada por hiperemia, dor e edema moderado na pele, mas sem necrose. Quando o calor, ou o frio, causa danos mais sérios, por maior susceptibilidade da pele, ou por maior tempo de exposição, além da vasodilatação e do ardor, ocorre também um aumento sensível da permeabilidade das paredes dos vasos sanguíneos. Através delas, escoam um líquido claro, de aspecto seroso, que é filtrado do plasma sanguíneo para os espaços intercelulares. O líquido acumula-se entre as várias camadas da epiderme, que se desloca e forma bolhas dermoepidérmicas, ou vesículas, características das queimaduras de segundo grau, na qual ocorre necrose da

epiderme. As queimaduras de terceiro grau são as mais profundas. Os vasos sangüíneos são tão prejudicados que o sangue se coagula dentro deles e não circula normalmente. Com isso, ocorre a necrose dos tecidos não-irrigados.

Os acidentes por queimadura têm recebido maior atenção por parte de profissionais das diversas áreas da saúde, principalmente porque as lesões térmicas ocupam o segundo lugar entre os acidentes que ocorrem no mundo⁸¹. Os únicos medicamentos que se aplicam no ferimento são antimicrobianos. Nas lesões de primeiro e segundo graus, o organismo consegue se recuperar sozinho. A epiderme renasce, a partir das bordas da lesão, das glândulas e dos folículos em que nascem os pêlos. Mas a pele restaurada tem uma cor diferente da original. A diminuição dos melanócitos, células que contêm moléculas de pigmento, desenha uma mancha mais clara. Tudo se complica nas lesões de terceiro grau, em que a derme também foi atingida. Nesse caso, uma possível solução seria um enxerto.

A utilização do laser de baixa intensidade para cicatrização de queimaduras apresenta-se como uma modalidade terapêutica alternativa, onde os trabalhos relatados na literatura apresentam resultados promissores na qualidade e aceleração da cicatrização^{65,66,82,83}.

5.3. Cicatrização

Cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, sendo semelhante quer a lesão tenha sido traumática, quer causada por necrose. Em ambos os casos, o primeiro passo é a instalação de uma reação inflamatória, cujo exsudato de células fagocitárias reabsorve o sangue extravasado e os produtos da destruição tecidual. Em seguida, há proliferação fibroblástica e endotelial, que resulta no tecido conjuntivo cicatricial⁸⁴.

A cicatrização inicia-se, portanto, na fase inflamatória, manifestada pela presença constante de macrófagos no local, que fagocitam e digerem restos

celulares presentes na área. A real atividade reparativa é atingida através do tecido especializado (tecido de granulação), que está bem formado de três a cinco dias após o início do processo. O tecido de granulação é a marca registrada do processo da cicatrização na inflamação. É constituído pela proliferação de vasos sanguíneos de neoformação (angiogênese), derivados daqueles pré-existentes na área, fibroblastos e células inflamatórias agudas e crônicas. O reparo final consiste da substituição do tecido lesado por células do mesmo tipo, algumas vezes, não deixando qualquer resíduo da lesão inicial, e da substituição por um tecido conjuntivo, que no seu estado permanente constitui uma cicatriz⁸¹.

A lesão pode ainda ser classificada em incisional, onde os bordos da ferida se mantêm em contato, como é o caso das feridas cirúrgicas, lineares, onde os bordos são aproximados através de suturas ou esparadrapos. Em lesões excisionais, os bordos se tornam afastados em consequência da perda de parte dos tecidos da pele. A perda do epitélio e parte da derme superficial pode levar à formação de úlcera. O primeiro caso é denominado cicatrização por primeira intenção e no segundo caso, por segunda intenção. Esta classificação é importante pois fenômenos diferentes ocorrem em cada tipo de cicatrização⁸¹.

Na cicatrização por primeira intenção ou união primária, a cicatrização ocorre sem contaminação bacteriana significativa e com um mínimo de perda do tecido. Quando há perda mais extensa de células e tecido, tal como ocorre na superfície dos ferimentos com perda de substância, o processo reparador é mais complicado e a perda de substância deve ser preenchida. A regeneração das células parenquimais não consegue reconstituir a arquitetura original. O tecido de granulação cresce a partir das margens para completar o reparo. Esta forma de cicatrização é referida como união secundária ou cicatrização por segunda intenção. As figuras 5.2 e 5.3 mostram uma representação artística para cicatrização por primeira e segunda intenção, respectivamente.

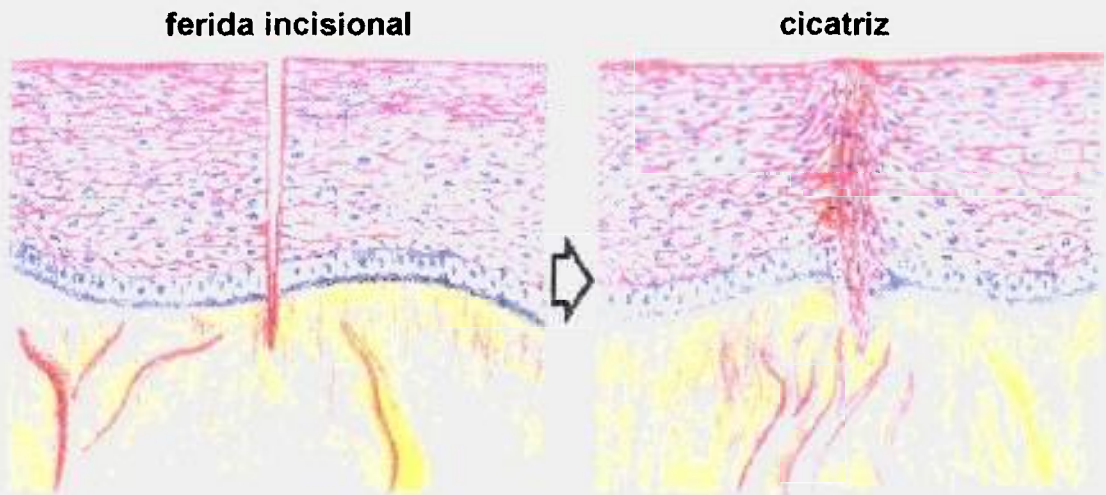


Figura 5.2: Cicatrização por primeira intenção⁸⁶.



Figura 5.3: Cicatrização por segunda intenção⁸⁵.

No nosso experimento, a lesão é uma queimadura, ferida excisional, com 6mm de diâmetro. Neste caso, a cicatrização se dá por segunda intenção.

5.3.1. A cicatrização por segunda intenção

5.3.1.1. Fase inflamatória

Nos primeiros momentos da lesão, há o rompimento de pequenos vasos sanguíneos, que causa o extravasamento do sangue e a conseqüente formação

de um coágulo. Para que o coágulo se forme, ocorre a ativação de plaquetas, que além de formar o trombo, liberam várias substâncias ativas no local da lesão. Essas substâncias e outras liberadas pelo tecido danificado vão funcionar como quimiotáticos e vasoativos, que promovem a exsudação de fagócitos do sangue para as margens da lesão. Os estímulos mais importantes são os fibrinopeptídeos gerados pela fibrinólise, as quimiocinas liberadas pelas plaquetas e monócitos do coágulo, e IL-1 e TNF- α , produzidos por macrófagos e monócitos. Aproximadamente seis horas depois, a margem da ferida contém fagócitos, e por volta de 24 horas, o coágulo já está invadido por essas células, com predomínio dos neutrófilos. Esses tipos celulares têm como função fagocitar e digerir microorganismos invasores, bem como restos de células mortas. Com 48 horas, o número de neutrófilos diminui sensivelmente, passando o exsudato a ser constituído predominantemente por macrófagos. Os macrófagos liberam uma grande quantidade de substâncias (enzimas, citocinas, fatores de crescimento, substância vasoativas e fatores quimiotáticos), que vão atrair outras células inflamatórias e iniciar a formação do tecido de granulação⁸⁴. Estimuladas pela falta da célula vizinha morta na lesão, as células da borda do epitélio (queratinócitos) se rediferenciam, tornando-se capazes de apoiar-se na rede de fibrina, adquirir capacidade de migração lateral e fagocitar o exsudato em seu caminho. Células endoteliais de capilares crescem em direção ao meio da lesão de ambas as bordas da ferida, em resposta a fatores angiogênicos, TNF- α e lactato. A anoxia, ausência de oxigênio local às células, provoca a liberação de TNF- α pelos macrófagos e o metabolismo anaeróbico local é responsável pela produção de lactato.

5.3.1.2. Formação do tecido de granulação

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

Nesta fase portanto, os macrófagos presentes já são maioria. A partir deste momento, os macrófagos controlam o processo de cicatrização através da secreção de fatores de crescimento. Os fibroblastos estão totalmente ativados,

proliferando e produzindo fibrilas de colágenos tipo III na fase inicial da cicatrização, e proteoglicanas. Entretanto, por razões ainda desconhecidas, produzem poucas fibras elásticas⁷³. Os fibroblastos, apoiando-se na rede de fibrina presente no exsudato destas células, estimulados pelo PDGF liberado, proliferam, migram para o centro da lesão, depositam matriz extracelular e causam a retração da ferida. A matriz extracelular sintetizada pelos fibroblastos serve como substrato para a migração de macrófagos, células angiogênicas e outros fibroblastos.

Nesta fase, começa a substituição da matriz extracelular antiga e lesada por uma matriz nova recém-sintetizada. A produção de colágeno é estimulada por fatores de crescimento (PDGF, FGF e TGF- β) e citocinas (IL-1, IL-4), estas últimas secretadas por leucócitos e fibroblastos ativados no local. Um ponto a ser destacado neste processo é que tão importante quanto a produção de matriz nova é a degradação da matriz antiga. O resultado final da cicatrização vai depender de um equilibrado balanço entre produção e degradação de componentes da matriz extracelular⁷³.

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

O processo de migração epitelial é lento (em torno de 0,5 mm/dia), de modo que para diminuir o tempo de ferida aberta e exposta, o tecido de granulação dispõe de dois mecanismos que promovem um fechamento mais rápido da ferida através de sua contração. O primeiro processo é representado pelo exsudato que, ao secar em contato com o meio ambiente, encolhe e traciona as bordas da lesão, uma em direção à outra; o segundo e mais importante processo ocorre através do aparecimento e contração dos miofibroblastos. Miofibroblastos são fibroblastos que se rediferenciam e passam a sintetizar proteínas contráteis

intracelulares semelhantes às do músculo liso, adquirindo a capacidade de contração. Até hoje, não se sabe o que estimula essa rediferenciação dos fibroblastos, mas acredita-se que existam fatores físicos e químicos envolvidos⁷³. Dessa forma, estando ligados uns aos outros e ao estroma, a sua contração promove a aproximação das bordas da ferida.

5.3.1.3. Remodelagem do tecido

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

Posteriormente, muitos vasos e células desaparecem através da apoptose (destruição programada da célula), o que torna a cicatriz cada vez mais pálida. O colágeno torna-se mais resistente através do aumento do número de ligações cruzadas entre suas moléculas, apesar de manter ainda um alto *turnover*. As fibras elásticas continuam escassas. Eosinófilos podem ser vistos nesta fase, mas não se sabe exatamente a sua função, apenas especula-se que liberam fatores de crescimento⁸⁴.

Uma cicatriz nunca atinge a mesma resistência tênsil que o tecido original possuía, podendo chegar no máximo, até 70-80% da resistência original ao final do processo⁷⁹.

O produto final no processo de reparação de feridas deve ser uma ferida cicatrizada. Para entender como a luz laser de baixa intensidade atua nesse processo, é necessário conhecer a estrutura normal dos tecidos envolvidos na injúria e os estágios envolvidos no reparo destes tecidos. Os efeitos da LILT nos

eventos celulares, que ocorrem durante a cicatrização de feridas agudas da pele, é importante no entendimento dos mecanismos que agem nesse processo. Estes estimulam a atividade celular, conduzindo à liberação de fatores de crescimento por macrófagos⁸⁶, proliferação de queratinócitos^{87,88}, aumento da população e desgranulação de mastócitos^{89,90} e angiogênese^{42,68,91}. Esses efeitos podem levar a uma aceleração no processo de cicatrização de feridas. Esta aceleração é devido, em parte, à redução na duração da inflamação aguda, resultando em uma entrada mais rápida no estágio proliferativo de reparo, quando o tecido de granulação é produzido⁹². O próximo capítulo revisará alguns dos artigos mais representativos, entre os vários encontrados na literatura, sobre os efeitos do laser no processo de cicatrização de feridas.

6. REVISÃO DA LITERATURA

6.1. Laser na Cicatrização

A radiação laser de baixa intensidade entrou no arsenal da medicina moderna, como um componente altamente eficiente para o tratamento de um grande número de enfermidades: feridas e úlceras indolentes, úlceras de estômago e duodeno, situações pós-cirúrgicas, contusões, artrite crônica, dermatose, isquemia, analgesia, entre outras.

O uso desta terapia nas áreas biomédicas é um tópico relativamente recente, constituindo-se pois, num campo de pesquisa a ser explorado e que levará ainda muitos anos para que seja completamente exaurido. Os primeiros estudos sobre os efeitos da LILT em cicatrização datam de aproximadamente 30 anos atrás^{1,2,59,93}. Desde então, um grande número de estudos foram realizados *in vitro* e *in vivo*, em animais e humanos, mas as informações obtidas ainda permanecem discordantes, principalmente em função da falta de um protocolo comum de pesquisa e da adoção de modelos e métodos, que não são freqüentemente reprodutíveis.

Até hoje, por exemplo, questiona-se se os efeitos positivos associados a essa terapia são específicos do laser. Vários autores que compararam comprimentos de onda emitidos por uma fonte de luz coerente com luz incoerente, relatam ter encontrado os mesmos efeitos estimulatórios e/ou inibitórios *in vitro*^{94,95,96,97}. Na literatura, entretanto, há uma série de trabalhos que fundamentam a hipótese de que, pelo menos para efeitos bioestimulantes *in vivo*, os efeitos positivos são específicos do laser^{44,62,69,83,98}.

É importante salientar que, apesar da grande quantidade de trabalhos encontrados na literatura, as informações sobre os efeitos do laser de baixa intensidade em tecidos biológicos são controversas, na maioria das vezes não são conclusivas, relatando principalmente casos clínicos ou observacionais, com

pouca fundamentação científica. Esta revisão da literatura considerará, portanto, alguns entre os muitos artigos publicados internacionalmente, consistentes ou não, que tratam dos efeitos não-térmicos da luz nos tecidos ou células. As pesquisas com luz de baixa intensidade em reparação podem ser divididas em três áreas: estudos nas funções celulares, estudos em animais e ensaios em humanos.

6.1.1. Estudos nas funções celulares (efeitos *in vitro*)

O estudo dos efeitos nas funções celulares busca promover o melhor entendimento quanto aos mecanismos de interação do laser com a matéria viva. Dentre estes efeitos, pode-se citar a estimulação de linfócitos, ativação de mastócitos, aumento na produção de ATP mitocondrial e proliferação de vários tipos de células.

A ação imunossupressiva da radiação laser de $\lambda = 457\text{nm}$, 476nm , 488nm , 496nm , 501nm , 514nm e 632nm , $E = 0,5\text{J}$ e $P = 50\text{mW}$ foi investigada por Mester e colaboradores em linfócitos humanos, através da inibição da migração de linfócitos e detecção de linfócitos cobertos por imunoglobulinas, com o auxílio de soro imune monoespecífico e métodos de imunofluorescência⁹⁹. Os resultados obtidos mostraram que o laser de argônio é mais efetivo no intervalo entre 488nm e 501nm , quando comparado aos outros comprimentos de onda investigados e ao laser de He-Ne. Os autores sugeriram que a supressão de alguma reação imune indesejável, como por exemplo processos auto-agressivos, contribuem ao efeito estimulante do laser em cicatrização de feridas.

O efeito biológico do laser de He-Ne sobre a alteração funcional e micromorfológica de membranas celulares *in vitro* foi estudado por Kubasova et. al.¹⁰⁰. Nesse trabalho, não foram observadas alterações funcionais e micromorfológicas na superfície celular de fibroblastos primários de embrião humano irradiados com uma dose única de $1\text{J}/\text{cm}^2$. Esta dose, entretanto, aplicada quatro vezes, com intervalos de 24 horas, mudou a condição funcional, bem como as cargas na superfície das membranas celulares. Os efeitos de uma

dose de $5\text{J}/\text{cm}^2$ não diferiram daqueles obtidos com $1\text{J}/\text{cm}^2$. Foi sugerido pelos autores que alterações sobre superfícies celulares induzidas por radiação laser podem contribuir à força de contato célula-célula e, assim, estimulariam a epitelização.

Karu et al. estudaram o efeito de vários tipos de laser de emissão no visível, sobre o conteúdo de cAMP em fibroblastos de hamsters chineses¹⁰¹. Eles obtiveram como resultado que $\lambda = 404\text{nm}$, $632,8\text{nm}$ e 760nm ocasionaram mudanças na concentração de cAMP intracelular. Para $\lambda = 404\text{nm}$ e $632,8\text{nm}$, a quantidade de cAMP intracelular diminuiu durante os 30 primeiros minutos e, então, cresceu excedendo à concentração normal (180-190%) de duas a três horas após a exposição. No caso de irradiação com $\lambda = 760\text{nm}$, a quantidade de cAMP primeiro aumentou (150%, 30min após a irradiação) e depois diminuiu, quando comparada ao controle. A irradiação das células com luz em $\lambda = 546\text{nm}$ ou 700nm , não tiveram um efeito marcante sobre a concentração intracelular de cAMP. As observações de mudanças na concentração de cAMP intracelular podem auxiliar a relacionar os efeitos na estimulação de crescimento causados pela irradiação com laser de He-Ne, por exemplo, ao mecanismo regulador da proliferação da atividade celular, visto que existem relações entre as variações na concentração de cAMP e Ca^{+2} , por um lado, e a taxa de síntese de DNA e RNA, por outro lado, nos primeiros estágios do processo regenerativo.

Em prosseguimento ao estudo realizado em 1984, Kubasova e colaboradores estudaram os efeitos biológicos sobre fibroblastos de embrião humano expostos à uma única irradiação, ou quatro vezes irradiados, com luz polarizada emitida por uma lâmpada de halogênio (fonte de luz não-coerente), com $4\text{J}/\text{cm}^2$ de densidade de energia¹⁰². O estado funcional da membrana plasmática foi examinado por meio das técnicas ligação-lectina e ligação-ferritina-policationizada. Estabeleceu-se que a ligação ConA das células não mudou, ao passo que o número de sítios ligados carregados negativamente aumentou significativamente em relação às amostras controle e às culturas de células expostas à luz difusa (não-polarizada). Os exames micromorfológicos não mostraram desvios estruturais. O aumento quantitativo de cargas negativas na

superfície pode ser observado como uma indicação do efeito biológico da luz polarizada exercido sobre a membrana celular.

O objetivo do estudo de Young e colaboradores em 1989 foi investigar se a luz poderia estimular a liberação de mediadores produzidos por macrófagos⁸⁶. As células (linhagem celular de macrófagos U-937) foram expostas em cultura aos $\lambda = 660\text{nm}$, 820nm , 870nm e 880nm ; $I = 120\text{mW/cm}^2$ e $D = 2,4\text{J/cm}^2$; emissão pulsada. A fonte de $\lambda = 820\text{nm}$ era coerente e polarizada e as outras eram fontes de luz não-coerentes. Doze horas após a exposição, os macrófagos sobrenadantes foram removidos e colocados em culturas de fibroblastos. A proliferação de fibroblastos foi avaliada durante um período de cinco dias. Os resultados mostraram que $\lambda = 660\text{nm}$, 820nm e 870nm estimularam macrófagos a liberar fatores que aumentaram a proliferação de fibroblastos em relação ao nível controle, ao passo que $\lambda = 880\text{nm}$ nem inibiu a liberação desses mediadores, nem estimulou a liberação de alguns fatores inibitórios para a proliferação de fibroblastos. Esses resultados sugeriram que luz em certos comprimentos de onda pode ser uma modalidade terapêutica útil por fornecer um meio para estimular ou inibir a proliferação de fibroblastos onde necessário. Em certos comprimentos de onda, a coerência não se mostrou essencial.

Ainda em 1989, Karu publicou um artigo onde foi feita uma revisão sobre a fotobiologia dos efeitos do laser de baixa intensidade, após vários estudos quantitativos serem realizados para determinar a ação da luz monocromática visível de baixa intensidade sobre várias células (*Escherichia Coli*, fermentos, células HeLa, fibroblastos de hamsters chineses e linfócitos humanos), bem como determinar as condições ideais de irradiação (comprimento de onda, dose e intensidade) que conduzem à estimulação da atividade vital⁶⁰. Ela concluiu que:

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

- os componentes da cadeia respiratória podem ser fotoaceitadores no caso da estimulação do metabolismo celular, bem como da inibição, dependendo da dose de luz. Em baixas doses, a irradiação causa regulação redox do metabolismo celular; em altas doses, prevalece o efeito fotodinâmico;
- o quantum de luz é somente um desencadeador para a regulação do metabolismo celular. Isto explicaria as baixas doses e intensidades necessárias;
- a magnitude do efeito da bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Isto explicaria porque o efeito não é sempre possível;
- os efeitos terapêuticos da LILT poderiam ser explicados por um aumento da proliferação de células em G_0 e G_1 , ou por mudanças na atividade fisiológica de células excitáveis.

Já Rigau e colaboradores estudaram as mudanças metabólicas, a proliferação e viabilidade de fibroblastos da pele de um humano sadio, depois da irradiação *in vitro* com um laser de He-Ne, operando em regime contínuo, de 10mW de potência²⁷. A análise estatística dos dados mostrou que não houve aumento no número de fibroblastos após a exposição, mas revelou mudanças significantes nas taxas metabólicas, quando comparadas ao controle não-irradiado. Nesse estudo, os autores não especificaram a densidade de energia utilizada, mas declararam que o resultado da avaliação destas mudanças metabólicas sugerem que uma modalidade eficiente para o aumento ou modulação da atividade celular poderia ser determinada para a LILT e, portanto, ser utilizada para propósitos terapêuticos, desde que as densidades de energia e potência apropriadas sejam estabelecidas.

O efeito da luz polarizada na liberação de fatores de crescimento da linhagem celular de macrófagos (U-937) foi estudado por Bolton e colaboradores¹⁰³. As células foram expostas *in vitro* a duas diferentes fontes de luz incoerente ($\lambda = 400\text{nm}-2000\text{nm}$), com diferentes níveis de polarização (95% e 14%). Os tempos de irradiação de 60s e 120 s corresponderam a densidades de energia de $1,44\text{J}/\text{cm}^2$ e $2,88\text{J}/\text{cm}^2$, respectivamente, para cada uma das fontes de

luz. Outros grupos de células foram deixados como controle. Doze horas depois da exposição, o meio condicionado com macrófagos foi removido e colocado sobre monocamadas de fibroblastos 3T3. A proliferação de fibroblastos foi examinada por um período de quatro dias. A resposta proliferativa foi maior nas culturas expostas a sobrenadantes de macrófagos tratados com a fonte de luz 95% polarizada. O tempo de exposição de 120s foi mais efetivo que o de 60s.

Num artigo de 1992, para avaliar a contribuição do aquecimento local pulsado de microrregiões absorvedoras de luz à atividade bioquímica, Karu realizou experimentos com um laser emitindo no modo de onda pulsado ($\lambda = 620\text{nm}$, $\tau_p = 300\text{fs}$, $f_p = 0,5\text{ Hz}$, $E_p = 1,1\text{nJ/cm}^2$, $I_m = 0,55\text{mW/cm}^2$, $I_p = 1,0\text{GW/cm}^2$) e com um laser de He-Ne emitindo no modo de onda contínuo ($\lambda = 632,8\text{nm}$, $I = 1,3\text{W/cm}^2$)¹⁰⁴. A dose de irradiação necessária para produzir um efeito biológico equivalente (um aumento na atividade clonal das células irradiadas quando comparadas ao controle não-irradiado) é um fator de aproximadamente 100-1000 vezes menor para radiação pulsada. O tamanho mínimo das microrregiões transitoriamente aquecidas na irradiação com pulsos da ordem de femtossegundos foi estimado em aproximadamente 1nm, que corresponde ao tamanho dos cromóforos dos fotoaceitadores primários, componentes da cadeia respiratória.

Com a finalidade de examinar o efeito de vários comprimentos de onda em diferentes doses de energia, Lubart e colaboradores decidiram irradiar células fibroblásticas NIH com fontes de luz emitindo em 360nm, 632nm e 780nm e foi verificado que em uma determinada dose de energia ($D = 15\text{J/cm}^2$ para $\lambda = 632\text{nm}$; $D = 7\text{J/cm}^2$ para $\lambda = 780\text{nm}$ e $D = 0,6\text{J/cm}^2$ para $\lambda = 360\text{nm}$), há aceleração da mitose celular³². Em doses de energia mais altas, as células foram destruídas. Estes resultados indicaram que o fotoefeito terapêutico pode ser devido a pequenas quantidades de oxigênio singleto $^1\text{O}_2$ fotoproduzidos pela porfirinas neutras ou pelos citocromos na célula, o que está de acordo com a teoria de Karu⁶⁰.

O efeito da luz sobre a proliferação de fibroblastos foi novamente estudado por Lubart e al. em 1993⁹⁷. Nesse trabalho, foi examinado o efeito de vários comprimentos de onda de fontes de luz não-coerente sobre a proliferação de fibroblastos da derme humana para investigar a importância da coerência da luz no processo de regeneração de tecidos. Eles observaram que luz em $\lambda = 540\text{nm}$ e $600\text{nm}-900\text{nm}$ acelera significativamente a mitose destas células, depois de 24 horas da irradiação. Além disso, foi encontrado que o efeito é dependente da dose de energia ($D = 4\text{ J/cm}^2$ para $\lambda = 540\text{ nm}$ e $D = 24\text{ J/cm}^2$, na região de $\lambda = 600\text{nm}-900\text{nm}$ e também depende da intensidade da fonte de luz de uma maneira não-linear.

Nara et al. estudaram os efeitos da irradiação com três tipos de lasers de baixa densidade de potência: um laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$, $P = 5\text{mW}$), e dois lasers de semicondutor ($\lambda = 790\text{nm}$ e 830nm , $P = 34\text{mW}$ e 14mW , respectivamente), na proliferação de fibroblastos humanos e os resultados foram comparados *in vitro*³¹. Os fibroblastos da polpa humana foram obtidos de subculturas e estas foram incubadas por 48 horas em meios suplementados por soro antes da irradiação laser. Cada laser foi usado no modo de emissão contínua e a irradiação foi realizada quatro vezes, no intervalo de dose total $0,05\text{J/cm}^2$ a $2,0\text{J/cm}^2$. Depois da incubação, as células foram fixadas e coradas em lâminas e o número de núcleos foi contado. O laser de He-Ne mostrou a capacidade de acelerar a proliferação de fibroblastos da polpa em uma baixa dose de irradiação ($0,1\text{J/cm}^2$). Por outro lado, os lasers de semicondutor falharam em produzir qualquer efeito estimulativo sobre estes fibroblastos.

Loevschall e Arenholt-Bindslev estudaram os efeitos da LILT na proliferação de fibroblastos bucais humanos³⁵. Eles desenvolveram um arranjo experimental utilizando um laser de GaAlAs de emissão coerente e polarizada ($\lambda = 812\text{nm}$ e $4,5 \pm 0,5\text{mW/cm}^2$) com auxílio de lentes, de modo a garantir uma exposição uniforme de todas as células em cultura. As culturas foram divididas em oito grupos (um grupo sendo o controle). A irradiação foi realizada por 0s, 1s, 3s, 10s, 32s, 100s, 316s e 1000s, correspondendo, respectivamente, a densidades de energia de 0; 4,5; 13,5; 45; 144; 450; 1422 e 4500mJ/cm^2 . Os resultados que eles obtiveram no

aumento da incorporação de ^3H -timidina em fibroblastos orais humanos, após à exposição, sugeriram que a LILT pode induzir um aumento na síntese do DNA, que é dependente da dose e do tempo de exposição. A proliferação celular aumentou gradativamente até $D= 450\text{mJ/cm}^2$, onde atingiu um máximo e depois decaiu lentamente.

Os efeitos da irradiação com laser de He-Ne sobre o aumento de níveis de ATP em células cultivadas *in vitro* foram investigados por Karu, Pyatibrat e Kalendo³⁶. Uma monocamada de células HeLa foi irradiada com um laser de He-Ne, $D= 100\text{J/m}^2$, $t= 10\text{s}$, e a quantidade de ATP foi medida pela análise bioluminescente de luciferina-luciferase, de cinco a 45 minutos após a irradiação. A quantidade de ATP na fase logarítmica das células em cultura permaneceu no nível controle durante os primeiros 15 minutos após irradiação; então, aumentou gradualmente e, após alcançar um máximo 20 minutos depois da irradiação, diminuiu lentamente até o nível controle. Foi sugerido pelos autores que a luz monocromática vermelha induz um aumento no nível de ATP celular dependente da fase de crescimento da cultura.

Segundo Karu, as respostas biológicas de células à radiação visível ou próxima ao infravermelho ocorrem devido a mudanças físicas e/ou químicas nas moléculas fotoaceitadoras, componentes da cadeia respiratória (citocromo a/a_3 nas mitocôndrias e citocromo d em *E. Coli*)¹⁰⁵. Como resultado da fotoexcitação de estados eletrônicos, as seguintes mudanças físicas e/ou químicas podem ocorrer: alteração das propriedades redox e aceleração de transferência de elétrons, mudanças na atividade bioquímica devido ao aquecimento local transitório de cromóforos, auto-oxidação de um elétron e produção de O_2^- e ação fotodinâmica e produção de $^1\text{O}_2$. Diferentes canais de reação podem ser ativados para se alcançar o macroefeito fotobiológico. As primeiras mudanças físicas e/ou químicas induzidas pela luz nas moléculas fotoaceitadoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas na célula, que não precisam de posterior ativação de luz e que ocorrem no escuro (transdução do fotossinal e cadeias de amplificação). Estas reações são conectadas com mudanças nos parâmetros da homeostase celular. Acredita-se que o ponto crucial seja uma alteração do estado redox celular: uma variação buscando oxidação é associada com estimulação da

vitalidade celular e uma variação buscando redução é ligada à inibição. Células com um pH mais baixo que o normal, onde o estado redox é alterado na direção reduzida, são consideradas mais sensíveis à ação estimuladora de luz que aquelas com os respectivos parâmetros sendo ótimos ou próximos a ótimo. Esta circunstância explica as possíveis variações nas magnitudes observadas com os efeitos da LILT. A ação da luz sobre o estado redox de uma célula, via cadeia respiratória, também explica a diversidade dos efeitos obtidos com a LILT. Além de explicar muitas controvérsias nesta área (isto é, a diversidade de efeitos, a magnitude variável ou ausência de efeitos em certos estudos), o mecanismo de regulação redox proposto pode ser uma explicação fundamental para alguns efeitos clínicos da radiação, por exemplo, os resultados positivos alcançados no tratamento de feridas e inflamações crônicas, ambas caracterizadas por acidose e hipoxia.

Para avaliar o efeito da LILT sobre a síntese de procolágeno de fibroblastos humanos *in vitro*, Yamamoto e colaboradores utilizaram um laser de He-Ne com potência de 8,5mW e exposição com método de varredura³⁸. Quatro diferentes meios de cultura foram utilizados: meio desprovido de soro (meio com déficit nutricional), meio com soro fetal bovino, meio com déficit nutricional contendo dexametasona e meio desprovido de soro com azul de metileno, que foram usados para a inibição de produtos de procolágeno no nível pré-translacional e para a inibição de processos mediados por cGMP, respectivamente. O efeito pronunciado do laser foi observado no meio desprovido de soro (50% de aumento na síntese de procolágeno, três minutos de exposição) e não foi observado no meio com soro fetal bovino. Tal efeito não foi bloqueado pela dexametasona (3% de inibição), mas sim pelo azul de metileno (40% de inibição). Os resultados sugeriram que alguns fatores no soro fetal bovino devem interferir com os efeitos do laser sobre a síntese de procolágeno e a luz coerente pode agir como estimuladora direta da síntese de procolágeno em fibroblastos. Estes efeitos devem ocorrer no nível translacional ou no nível pré-translacional, que não são afetados por dexametasona e cGMP.

O propósito do estudo de Grossman e colaboradores em 1998 foi determinar os parâmetros adequados, utilizando um laser de $\lambda = 780\text{nm}$ para estimulação da proliferação de queratinócitos humanos normais em cultura, avaliando a possível função das espécies reativas de oxigênio nessa resposta⁴⁰. As células foram expostas a uma dose única no intervalo de 0 a $3,6\text{J}/\text{cm}^2$. Os parâmetros de proliferação estudados foram a incorporação de ^3H -timidina de 6h a 24h após irradiação; porcentagem de células em divisão e número de células 24h e 48h após irradiação, respectivamente. A proliferação dos queratinócitos expostos a $0,45\text{J}/\text{cm}^2$ - $0,95\text{J}/\text{cm}^2$ foi significativamente maior (1,3 - 1,9), comparada ao controle não-irradiado. Outras doses foram menos efetivas em aumentar a proliferação nos parâmetros estudados. A adição de antioxidantes enzimáticos, superóxido dismutase ou catalase, eliminando ânions superóxido e H_2O_2 , suprimiu essa proliferação aumentada. Outros scavengers (acetato α -tocoferol, eliminando peroxidação de lipídios; ou azida de sódio, histidina, manitol, eliminando oxigênio singleto, ânions superóxido e radicais hidroxila, respectivamente) também suprimiram as respostas, mas em graus diferentes. Os resultados indicaram que a irradiação laser aumentou a proliferação de queratinócitos *in vitro*, com o envolvimento evidente das ROS nessa resposta.

A influência dos comprimentos de onda 410nm, 488nm, 630nm, 635nm, 640nm, 805nm, e 1064nm, além da luz branca, foi investigada sobre a proliferação de vários tipos de células: miotubos do esqueleto (C2), uroteliais (HCV29), carcinomas humanos da mucosa gengival (ZMK1), carcinomas uroteliais (J82), glioblastomas (U373MG) e adenocarcinomas de mama (MCF7), por Sroka e colaboradores⁴¹. Vinte e quatro horas depois do tratamento com o laser, houve um aumento significativo na atividade mitótica das células J82 e HCV29 com os comprimentos de onda 410nm, 635nm e 805nm; as células C2 mostraram aumento de atividade somente com $\lambda = 635\text{nm}$, porém, em todas estas três células, o pico de atividade ocorreu com dose entre $4\text{J}/\text{cm}^2$ e $8\text{J}/\text{cm}^2$ e todas as células mostraram ligeira diminuição da atividade mitótica com dose $20\text{J}/\text{cm}^2$, independente do comprimento de onda utilizado; com luz branca e $\lambda = 1064\text{nm}$, nenhuma atividade mitótica diferente do grupo controle foi verificada.

O espectro da resposta celular indicou a participação de porfirinas endógenas e citocromos como fotorreceptores primários.

O laser de baixa intensidade promoveu a regeneração de músculo-esquelético, conforme mostra o trabalho de Ben-Dov e colaboradores¹⁰⁶. Nesse estudo, o efeito do laser foi avaliado sobre a proliferação e diferenciação de células satélites *in vitro*, consideradas células precursoras no processo de regeneração do músculo-esquelético. Células satélites primárias de rato foram irradiadas com um laser de He-Ne por $t = 0s$; $2s$; $3s$; $5s$ e $10s$, imediatamente após preparação, e a incorporação de timidina foi determinada depois de dois dias em cultura. A radiação laser afetou a incorporação de timidina, com um pico em $3s$ de irradiação. O efeito da radiação laser sobre a proliferação celular foi dependente da idade do rato. Com três semanas de idade, a incorporação de timidina nas células irradiadas foi duas vezes maior que aquela nos controles, enquanto que com seis semanas de idade, essa diferença quase desapareceu.

O trabalho de Agaiby e co-autores sugeriu que pequena variação sobre a dose produz significativa diferença na produção de fatores angiogênicos de linfócitos-T *in vitro*⁴². Nesse estudo, o comprimento de onda utilizado foi $820nm$, em emissão pulsada, frequência $5000Hz$, $P_m = 50mW$ e doses $1J/cm^2$; $2J/cm^2$; $3,6J/cm^2$; $6,0J/cm^2$ e $8,4J/cm^2$. A produção de células endoteliais aumentou significativamente quando incubadas e condicionadas com células-T em repouso, expostas a $1,2J/cm^2$ e $3,6J/cm^2$. O resultado final mostrou que a estimulação de linfócitos produz fatores que podem modular a proliferação de células endoteliais e que tais estímulos são influenciados pela dose com a qual as células-T são irradiadas, pela exposição ao mitógeno e ao laser e pela duração da incubação das células-T na cultura.

6.1.2. Estudos em animais (efeitos *in vivo*)

Os estudos em animais têm colaborado, principalmente, para a verificação do efeito da luz laser de baixa intensidade no processo de cicatrização de feridas provocadas por queimaduras, suturas, cortes ou fraturas.

Um dos primeiros trabalhos em cicatrização de queimaduras, publicado pelo grupo de Mester, data de 1971¹. Nesse trabalho, foi investigado o efeito de um laser de rubi ($\lambda = 694,3\text{nm}$) no intervalo de doses de $0,5\text{J}/\text{cm}^2$ a $10\text{J}/\text{cm}^2$, incluindo doses de $1,0\text{J}/\text{cm}^2$; $4,0\text{J}/\text{cm}^2$ e $5,0\text{J}/\text{cm}^2$. Foram criadas duas queimaduras de terceiro grau no dorso de camundongos, em ambos os lados da coluna vertebral, de aproximadamente 5mm em diâmetro. As queimaduras do lado esquerdo foram irradiadas e as da direita foram o controle (sem irradiação). Os resultados obtidos mostraram que a exposição à radiação laser estimulou a cicatrização de queimaduras de terceiro grau, mais pronunciadamente na dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, com três irradiações, nos dias 3, 7 e 12 pós-operatório. Os autores sugeriram que a cicatrização de feridas estimulada pela radiação laser envolveu um aumento na taxa de crescimento epitelial, que pode, eventualmente, ser o ponto de partida para o crescimento neoplástico.

Em 1974, o grupo de Mester investigou a estimulação da vascularização no processo de cicatrização de feridas em coelhos, induzida por um laser de He-Ne². De acordo com os resultados obtidos, a área vascularizada no tecido em reparação (conduzindo a um aumento no número de fibroblastos e, assim, a um aumento na síntese de colágeno) foi significativamente aumentada pela irradiação com laser.

No trabalho de Jongsma e colaboradores, foi examinada a influência da radiação de um laser de argônio ($\lambda = 488\text{nm} - 514,5\text{nm}$) linearmente polarizada, no tempo de fechamento de feridas abertas em ratos³. No primeiro experimento, a dose utilizada foi $1\text{J}/\text{cm}^2$ e a intensidade, $50\text{mW}/\text{cm}^2$. A primeira irradiação foi feita no quarto dia pós-operatório, durante quatro semanas, duas vezes por semana. Neste experimento, as feridas foram limpas quando necessário; no segundo experimento, utilizou-se uma dose de $4\text{J}/\text{cm}^2$ e a intensidade foi $200\text{mW}/\text{cm}^2$. A primeira irradiação foi realizada dois dias pós-criação da ferida, durante quatro semanas, duas vezes por semana. Dessa vez, as feridas não foram tocadas. Os resultados indicaram que não houve aceleração no tempo de fechamento da lesão, nas condições utilizadas nesse trabalho, para os dois experimentos.

Como a estrutura da derme do animal suíno é a que mais se assemelha à derme humana, Hunter e colaboradores estudaram os efeitos do laser de He-Ne na cicatrização de feridas em um modelo porcino⁵. Sessenta e duas feridas de espessura parcial foram criadas no dorso de dois suínos domésticos e a metade delas, aleatoriamente, recebeu tratamento laser. As demais foram utilizadas como controle. As feridas foram tratadas com uma dose diária de $0,96\text{J}/\text{cm}^2$, em uma intensidade de $64\text{mW}/\text{cm}^2$, até completo fechamento da lesão. A dose foi diminuída conforme reparação do tecido, nos últimos dias sendo irradiada somente a porção não-cicatrizada. Com este protocolo, os autores não demonstraram qualquer efeito clinicamente significativo do laser na aceleração de cicatrização de feridas abertas em porcos.

Os aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos, após irradiação com laser de He-Ne, foram avaliados por Soares e colaboradores¹⁰⁷. Dezoito ratos machos foram utilizados, divididos em três grupos. Em cada animal, foram criadas duas feridas circulares de 1cm de diâmetro na região dorsal, sendo uma irradiada com dose diária de $2,7\text{J}/\text{cm}^2$, por 10 minutos, e a outra observada como controle. Os grupos 1, 2 e 3 foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dia pós-operatório, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram uma epitelização e contração mais precoce das feridas irradiadas. A proporção de fibras colágenas foi maior nas feridas irradiadas nos três tempos estudados. A proporção de fibroblastos foi maior no grupo irradiado apenas no sétimo dia pós-operatório. Os autores concluíram que o processo de reparação evoluiu de forma mais rápida nas feridas irradiadas, em relação ao controle.

Com o propósito de verificar possíveis efeitos sistêmicos da radiação laser de baixa intensidade, Rockind et al. utilizaram um laser de He-Ne na cicatrização de feridas cutâneas e queimaduras⁶⁵. A radiação laser, aplicada somente em feridas do lado direito do dorso de ratos, acelerou também a cicatrização de feridas do lado esquerdo, quando comparadas ao grupo controle, no qual nenhuma das duas lesões foi irradiada. Os autores sugeriram que efeitos

sistêmicos observados nesse trabalho são relevantes em termos da aplicação desta terapia na prática clínica.

O efeito do laser de He-Ne de baixa densidade de potência na cicatrização de anastomose intestinal foi estudado no rato albino por Yew e colaboradores⁸. Um pedaço pequeno de jejuno foi removido de cada animal e as extremidades traseiras foram suturadas de ponta a ponta. No animal experimental, a anastomose foi irradiada através de fibra óptica com um laser de He-Ne de 1mW por 15 minutos, ao passo que no animal controle a anastomose não foi irradiada. As diferenças entre os dois grupos foram comparadas por histologia, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e radioautografia, três e sete dias após a operação. Os animais tratados com laser demonstraram fibras colágenas mais grossas e um aumento na quantidade de colágeno na junção da anastomose, quando comparados ao animal controle. Estas observações apontaram para um possível aumento da síntese de colágeno desencadeado pela irradiação laser.

A ação do laser de He-Ne em macrófagos, utilizando camundongos, foi investigada por Zheng e colaboradores em 1992¹⁰⁸. Esse experimento foi dividido em duas partes. Na primeira, foram utilizados 36 camundongos, divididos em três grupos: dois grupos receberam tratamento com laser de He-Ne e o outro foi o grupo controle. Para os grupos que receberam irradiação, uma área sobre o fígado ou o baço do animal, foi irradiada em uma densidade de energia de $3,82\text{J}/\text{cm}^2$, $I = 6,37\text{mW}/\text{cm}^2$, durante dez dias consecutivos. Depois do décimo tratamento, em todos os grupos uma solução de tinta chinesa caligráfica, contendo uma alta concentração de carbono, foi injetada na veia do rabo do animal. A eliminação das partículas de carbono do sangue foi analisada e aumentou nos animais tratados com laser. Na segunda parte do experimento, macrófagos peritoneais foram irradiados *in vitro* nas doses $3,1\text{J}/\text{cm}^2$; $21,8\text{J}/\text{cm}^2$ e $46,8\text{J}/\text{cm}^2$. A quantidade de lisozima e a atividade de fosfatase ácida nos lisossomos foram significativamente mais altas nas soluções irradiadas, quando comparadas ao controle, principalmente nas duas doses mais altas. Os resultados indicaram que o laser pode exercer uma influência ativadora na resposta

imunológica de macrófagos mononucleares *in vivo* e *in vitro* e o grau de influência é dependente da dose.

No trabalho de Lee e colaboradores, investigou-se a influência da LILT no processo de cicatrização de feridas da pele infeccionadas com bactérias com um laser de GaAs ($\lambda = 904\text{nm}$), no modo de emissão de onda pulsada, com potência pico de 27W ⁹. A frequência do pulso foi 1000 Hz , dando uma potência média de 2mW e a densidade de energia utilizada foi $76,4\text{mJ/cm}^2$. As feridas abertas, de aproximadamente 6mm em diâmetro, foram criadas nas regiões glúteas de sete ratos e bactérias *Staphylococcus aureus* foram inseridas em todas as feridas. Uma ferida de cada rato foi irradiada com laser nos dias 1, 2, 3 e 4, e a ferida não-irradiada foi deixada para controle. As áreas das feridas foram medidas fotografando a lesão de uma distância constante no 1º, 3º, 5º e 7º dia pós-operatório e, então, os grupos controle e experimental foram comparados de acordo com o intervalo de tempo. Os resultados mostraram que a taxa de contração da ferida foi significativamente aumentada no grupo experimental e que a incidência de inchaço, indicando uma extensão da inflamação, foi menor no grupo exposto à LILT. Foi sugerido pelos autores que a aceleração de cicatrização na lesão infeccionada após a irradiação com laser de GaAs indicou que a atividade celular, devido ao efeito bioestimulante da LILT, predomina no tecido normal circunvizinho em relação ao tecido irritado, por causa do crescimento de bactérias na lesão infeccionada. A área total irradiada correspondeu a um círculo de diâmetro 2cm .

Bisht e colaboradores investigaram os efeitos da radiação laser de baixa intensidade no processo de cicatrização de feridas abertas em ratos⁶⁸. Nesse estudo, foram criadas duas lesões em ambos os lados da coluna vertebral no dorso de ratos saudáveis. As feridas do lado esquerdo foram tratadas diariamente com laser de He-Ne na dose 4J/cm^2 , durante 5 minutos. As feridas do lado direito não foram irradiadas e serviram como controle. O tempo médio necessário para completo fechamento da ferida no grupo controle foi 14 dias, enquanto que no grupo irradiado as lesões fecharam em 10 dias. No grupo irradiado, também foi observado tecido de granulação mais significativo, incremento na epitelização com

reação fibroblástica mais pronunciada, infiltração de leucócitos e neovascularização. A concentração de hidroxiprolina do tecido cicatrizado foi também significativamente mais alta no grupo tratado no 17^º dia pós-operatório. Os autores sugeriram que a radiação laser de baixa intensidade estabelece efeitos bioestimulatórios no processo de cicatrização de feridas da pele.

Para avaliar o efeito dos lasers de He-Ne e GaAIs em cicatrização de queimaduras, Cambier e co-autores fizeram duas lesões em ambos os flancos de 20 ratas, divididas em dois grupos¹⁰⁹. No grupo 1, uma queimadura foi irradiada com laser de He-Ne na dose de $0,75\text{J}/\text{cm}^2$ e a segunda queimadura não foi irradiada, servindo como controle. No segundo grupo, uma das feridas foi exposta à radiação com laser de GaAIs, dose $0,21\text{J}/\text{cm}^2$, e a outra não recebeu tratamento. A irradiação foi feita cinco vezes por semana, durante 30 dias consecutivos. Nenhum efeito estimulante do laser foi observado para ambos os grupos no processo completo da cicatrização das queimaduras, 42 dias depois do início do experimento.

No trabalho de Ghamsari et al., avaliou-se a ação da LILT na união primária de feridas suturadas em tetas de vacas⁶⁷. Dezesesseis tetas foram distribuídas em quatro grupos, A, B, C e D, com quatro tetas em cada. Nos grupos A e B, as feridas foram suturadas seguindo o padrão de Gambee. Nos grupos C e D, as lesões foram unidas por sutura contínua em três camadas. A lesão foi dividida em 30 círculos de tamanho igual e cada área circular dos grupos B e D foi submetida ao tratamento com laser de He-Ne na dose $3,64\text{J}/\text{cm}^2$ e intensidade $114\text{mW}/\text{cm}^2$. Os grupos A e C serviram como controle e não foram irradiados. O efeito antiinflamatório da LILT foi observado através de radiografias, pela diminuição de espessura na parede das tetas tratadas. Fluxometria Doppler a laser mostrou que a revascularização nos grupos tratados foi mais rápida que nos grupos controles. A microscopia de luz, tensiometria e concentração de hidroxiprolina indicaram que a LILT afetou a proliferação de fibroblastos e células epiteliais e influenciou a síntese de colágeno pelos fibroblastos.

Al-Watban e Zhang compararam o processo de cicatrização de feridas, utilizando dois lasers diferentes, argônio ($\lambda = 488\text{nm} - 514\text{nm}$) e criptônio ($\lambda = 670\text{nm}$)¹¹⁰. A aceleração na cicatrização foi avaliada através da taxa de contração da ferida e do tempo de cicatrização, em diferentes doses nos grupos tratados. Esse estudo mostrou que a dose ótima para ambos os lasers foi $20\text{J}/\text{cm}^2$, no entanto, o laser de argônio propiciou cicatrização mais rápida que o laser de criptônio, comparando-os com o grupo não-irradiado. Doses de $80\text{J}/\text{cm}^2$ e $100\text{J}/\text{cm}^2$ mostraram bioativação nula. A dose inibitória para ambos os lasers foi $140\text{J}/\text{cm}^2$. O aumento das temperaturas cutânea e subcutânea foi monitorado na intensidade de $31,85\text{mW}/\text{cm}^2$ até uma dose de $150\text{J}/\text{cm}^2$, resultando em $0,4^\circ\text{C}$, indicando que o tratamento realmente produziu efeito não-térmico.

Um estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea em gatos domésticos, utilizando um laser de GaAs ($\lambda = 904\text{nm}$), foi realizado por Tatarunas, Matera e Dagli¹¹¹. Nesse experimento, 63 animais foram divididos em três grupos, doses de $4\text{J}/\text{cm}^2$, $2\text{J}/\text{cm}^2$ e controle não-irradiado. A aplicação da radiação foi única no pós-operatório imediato, em feridas cirúrgicas de gatas submetidas à ovário-histerectomia por conveniência. Avaliação macroscópica e por microscopia de luz foram feitas no 2º, 4º, 8º e 15º dia pós-operatório. Os resultados indicaram um incremento na cicatrização de feridas irradiadas em relação ao grupo controle, com efeitos mais pronunciados para a dose de $2\text{J}/\text{cm}^2$. Os autores sugeriram que o laser pode ser um adjuvante na cicatrização cutânea, podendo otimizar a evolução de feridas pós-cirúrgicas por primeira intenção, nas condições e espécie animal estudadas.

O propósito do estudo de Reddy e colaboradores foi avaliar a influência da fotoestimulação laser na produção de colágeno em tendões de Aquiles de coelhos, tenotomizados e reparados¹⁰. Após tenotomia e reparo, os membros traseiros dos coelhos foram imobilizados em talas de poliuretano adaptadas. Os animais experimentais foram tratados com laser de He-Ne diariamente, com dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, durante 14 dias. Animais controle foram irradiados com $0\text{J}/\text{cm}^2$. No quinto dia pós-operatório, as talas foram removidas. Os animais foram sacrificados quinze dias depois do procedimento cirúrgico e os tendões foram

extirpados, processados e analisados. A análise bioquímica dos tendões revelou um aumento de 26% na concentração de colágeno no grupo tratado, indicando cicatrização mais rápida, quando comparada ao grupo controle. O perfil de solubilidade do colágeno foi examinado pela extração seqüencial de colágeno do tecido em reparação, em tampão neutro, tampão acetato e tampão acetato contendo pepsina. Os tendões fotoestimulados tiveram concentrações 32 e 33 % mais altas de colágeno solúvel em sal neutro e colágeno insolúvel, respectivamente, que tendões controle, sugerindo uma produção acelerada de colágeno no grupo irradiado. Essa extração seqüencial e estudos de distribuição de colágeno solúvel sugeriram que a taxa de *turnover* do colágeno nos tendões irradiados foi mais alta, quando comparada ao grupo controle.

Em 1999, Oliveira, Parizotto e Salvini investigaram o efeito do laser de GaAs ($\lambda = 904\text{nm}$) na regeneração do músculo-esquelético de camundongos¹³. Os animais foram divididos em dois grupos, após traumatismo muscular induzido no músculo tibial anterior direito e esquerdo. O laser, em emissão pulsada, com intensidade de $7,5\text{mW}/\text{cm}^2$, foi aplicado diariamente durante cinco dias consecutivos, diretamente à pele do músculo injuriado, e a primeira irradiação laser foi realizada duas horas depois da indução do trauma. O primeiro grupo foi tratado com dose de $3\text{J}/\text{cm}^2$ e o segundo, com dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$. Os resultados indicaram que o laser de GaAs não promoveu mudanças morfológicas significantes no processo de regeneração do músculo-esquelético neste protocolo.

Os efeitos da LILT na cicatrização de queimaduras em ratos, comparando dois diferentes comprimentos de onda ($\lambda = 635\text{nm}$ e $\lambda = 690\text{nm}$), foram estudados por Schlager et al.¹¹². Trinta ratos foram queimados em ambos os flancos e aleatoriamente alocados em três grupos experimentais. No grupo A, ambas as feridas permaneceram sem tratamento; nos grupos B e C, uma das feridas foi irradiada diariamente com $\lambda = 635\text{nm}$ ou $\lambda = 690\text{nm}$, dose $1,5\text{J}/\text{cm}^2$, por trinta dias consecutivos, enquanto que a outra serviu como controle e não foi irradiada. O diâmetro, vermelhidão e edema das feridas, foram examinados diariamente e foram similares no período inteiro de observação, entre e dentro dos grupos. Nas

condições usadas nesse experimento, os comprimentos de onda 635nm e 690nm não produziram qualquer efeito benéfico no processo de cicatrização de queimaduras criadas em ratos.

Os efeitos do laser de He-Ne em osteogênese foram investigados por Freitas e colaboradores, na fratura da superfície cortical de tibia de ratos¹¹³. O tratamento com laser iniciou-se 24 horas após o procedimento cirúrgico e tíbias contralaterais serviram como controle. Os animais foram separados em três grupos, doses de 3,15J/cm²; 31,5J/cm² e 94,7J/cm², e após aplicação diária, eles foram sacrificados no dia 8 ou 15 pós-operatório. Microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura revelaram que o tratamento da lesão com doses de 31,5J/cm² e 94,7J/cm² resultaram na formação de trabécula óssea mais espessa, que indicou uma maior síntese de fibras colágenas e, portanto, que a atividade osteoblástica foi aumentada pela radiação laser, comparada ao grupo controle. Os efeitos da dose de 94,7J/cm² foram mais pronunciados. Tratamento com dose de 3,15J/cm² não apresentou diferenças significantes em relação ao controle.

Walker e colaboradores verificaram o efeito da LILT na cicatrização de feridas pré-irradiadas com raios-X em camundongos¹⁴. Sessenta camundongos foram separados em cinco grupos experimentais. Em todos os grupos, uma área bem definida do dorso foi exposta a 20Gy de raios-X. Setenta e duas horas após a irradiação, foi feita uma área de 7x7mm no dorso dos camundongos. Dois grupos serviram como controle e os outros três foram tratados com um laser de GaAlAs ($\lambda = 660\text{nm}$) de emissão pulsada, nas doses de 0,5J/cm²; 1,5J/cm² e 4,0J/cm², I = 45mW/cm², três vezes por semana, até completo fechamento da ferida. Os resultados dessa investigação demonstraram que o tratamento com laser, nos parâmetros estudados, não causou efeito benéfico na taxa de contração das feridas, quando comparada aos grupos controles.

Guerino e colaboradores investigaram os efeitos da radiação laser de He-Ne com doses diárias de 7J/cm², aplicadas cinco dias consecutivos, no processo inflamatório da cartilagem articular do joelho direito de cobaias com artrite crônica

induzida¹¹⁴. Os animais foram sacrificados nos dias 7, 14 e 21 pós-indução de artrite. Através da análise por microscopia eletrônica de varredura, a superfície da cartilagem dos animais não-irradiados mostrou inflamação mais acentuada e destruição de superfície. Foi também observada a interrupção das fibras colágenas, destacamento do tecido, rugosidade acentuada, alta aderência das células às fibras colágenas e um maior número de leucócitos. Comparativamente, a cartilagem irradiada apresentou superfícies planas com maior número de orifícios, mas sem destacamento do tecido e quase completa ausência de leucócitos. Também a integridade da superfície articular foi mantida.

6.1.3. Estudos em humanos (*Ensaio in anima nobile*)

Os ensaios em humanos, no processo de reparo tecidual, utilizam a biomodulação laser principalmente para promover melhor cicatrização de úlceras, herpes e redução de inflamação.

Lundeberg e Malm investigaram os efeitos do laser de He-Ne como coadjuvante no tratamento padrão de úlceras varicosas em 46 pacientes divididos aleatoriamente em dois grupos¹¹⁵. Todos os pacientes receberam tratamento padrão. O primeiro grupo recebeu também aplicação de laser de He-Ne com densidade de energia de $4\text{J}/\text{cm}^2$, enquanto que o segundo recebeu tratamento laser placebo, duas vezes por semana, durante 12 semanas. As áreas da ferida foram examinadas e comparadas depois de 2; 4; 6; 8 e 12 semanas. Não houve diferenças significantes na proporção de úlceras cicatrizadas ou área ulcerada no grupo irradiado, em relação ao grupo placebo.

Em 1996, Eduardo, Cecchini e Cecchini apresentaram cinco estudos clínicos sobre os benefícios do laser de baixa intensidade na cicatrização de tecido mole oral¹¹⁶. Lesões da cavidade oral, como herpes e úlceras aftosas, foram irradiadas com laser de GaAlAs ($\lambda = 790\text{nm}$), em doses dependentes da área de irradiação. Em ambos os casos, foi obtido um excelente resultado. A LILT diminuiu a sintomatologia dolorosa imediatamente e acelerou o processo de reparação destas lesões. Também uma associação dos lasers de Nd:YAG

($\lambda = 1064\text{nm}$) e GaAIs provou ser efetiva para essas espécies de lesões. Os autores sugeriram que esta associação dos lasers de alta e baixa intensidade pode ser um complemento para terapias convencionais.

Cowen e colaboradores investigaram os efeitos do laser de He-Ne na prevenção ou redução de mucosite oral induzida em pacientes por alta dose de quimiorradioterapia, antes do transplante de medula óssea¹¹⁷. Trinta pacientes estabelecidos aleatoriamente, indicados à TMO, receberam radiação laser ou radiação placebo, diariamente, por cinco dias consecutivos, em cinco locais anatômicos, nos lados direito e esquerdo da cavidade oral: mucosa labial inferior e gengiva adjacente, mucosa labial superior e gengiva adjacente, mucosa bucal e gengiva adjacente, língua e assoalho bucal. Cada local foi irradiado em 15 pontos, durante 10s, na dose de $1,5\text{J}/\text{cm}^2$. O exame da cavidade oral foi feito do dia do transplante até o dia 20 pós-transplante. Os resultados obtidos indicaram que o tratamento preventivo com laser de He-Ne reduziu a mucosite oral induzida por altas doses de quimiorradioterapia, quando comparados ao grupo placebo.

Schindl et al. investigaram a influência da LILT na circulação de sangue na pele de pacientes diabéticos com microangiopatia por meio de termografia no infravermelho¹¹⁸. Trinta pacientes diabéticos, com úlceras ou gangrena, e níveis elevados de hemoglobina glicosada foram aleatoriamente divididos em dois grupos. O primeiro recebeu tratamento transcutâneo com laser de He-Ne numa única dose de $30\text{J}/\text{cm}^2$ e o segundo recebeu tratamento laser placebo. Os resultados obtidos demonstraram um aumento na circulação sanguínea dos pacientes tratados, quando comparados ao grupo placebo.

No trabalho de Schindl e colaboradores, utilizou-se um laser de He-Ne, com dose de $30\text{J}/\text{cm}^2$, três vezes por semana, para a indução da cicatrização de úlceras adquiridas por diversas causas²¹. Vinte e quatro pacientes, que já haviam sido tratados por métodos convencionais sem qualquer sinal de cicatrização significativa, foram divididos em quatro grupos, de acordo com o diagnóstico: diabetes, insuficiência arterial, radioterapia e vasculite autoimune. Em todas as úlceras, houve epitelização completa induzida pelo laser. Com relação aos

diferentes diagnósticos, observou-se uma diferença estatística significativa: úlceras devido à radioterapia cicatrizaram mais rápido comparadas àquelas provocadas por diabetes; o tamanho da úlcera também influenciou no tempo de cicatrização, indicando que causa e tamanho são fatores importantes para o tratamento de úlceras com laser.

O laser de baixa intensidade pode ser um tratamento efetivo para herpes simplex recorrente, conforme mostrou o trabalho de Schindl e Neumann²². O comprimento de onda utilizado foi 690nm, intensidade 80mW/cm² e dose 48J/cm². Cinquenta pacientes foram tratados com laser por duas semanas, ou receberam irradiação placebo. O grupo tratado apresentou intervalo médio de recorrência de 37,5 semanas, enquanto que o grupo placebo apresentou três semanas, tornando evidente a eficiência da luz laser emitida em baixas intensidades no protocolo utilizado.

Schindl e colaboradores publicaram o caso clínico de uma paciente com radiodermatite ulcerosa na região cervical esquerda, que não respondeu aos tratamentos clínicos convencionais e, por isso, foi submetida à terapia com lasers de baixa intensidade⁹¹. Foi utilizado um laser de He-Ne, 30J/cm², aplicado durante quatro semanas, totalizando sete irradiações, até completa cicatrização da úlcera. A microscopia de luz, em combinação com um sistema de vídeo, mostrou um aumento significativo no número de vasos na derme depois da LILT, nas regiões central e marginal da lesão, comparado com as condições pré-tratamento e à pele normal.

Recentemente, Schaffer e colaboradores investigaram o efeito de um laser de diodo ($\lambda = 780\text{nm}$) em pele humana normal, pelo aumento de contraste dependente do tempo, através de imagem por ressonância magnética²⁵. Seis voluntários sadios foram irradiados na sola do pé direito com 5J/cm² e intensidade de 100mW/cm². A MRI é utilizada para quantificar a acumulação local de gadolínio-DTPA, seu conteúdo real na corrente local do volume sangüíneo, bem como sua distribuição ao espaço extracelular. As imagens foram obtidas antes e depois da aplicação do laser. Quando o laser foi aplicado, a razão sinal-ruído

aumentou depois da irradiação, de acordo com o aumento do contraste por MRI. Foi observado que, depois da biomodulação com a radiação laser, a cicatrização de feridas melhorou e a dor foi reduzida. Os autores sugeriram que estes efeitos podem ser explicados pelo aumento do fluxo sanguíneo na área.

6.2. Outras aplicações do laser de baixa intensidade

6.2.1. Acupuntura

Yo-Cheng propôs, em 1984, o uso do laser de He-Ne, ao invés de acupuntura e anestesia de rotina, em cirurgias pequenas da região maxilofacial¹⁵. O efeito analgésico do laser aplicado em pontos de acupuntura tradicional foi satisfatório e sedativos ou outros analgésicos não foram administrados antes, ou durante as operações. A dose e intensidade utilizadas nesse trabalho não foram determinadas.

Martin e Klide trataram dor dorsal crônica em 14 cavalos, pela estimulação de pontos de acupuntura durante dois minutos, utilizando um laser em emissão infravermelha ($\lambda = 904\text{nm}$) pulsada ($f = 360\text{Hz}$), após não conseguirem melhora com outras formas de terapia⁷. Depois de 11 tratamentos, a dor dorsal foi aliviada em 10 dos 14 cavalos.

A medicina tradicional chinesa sugere que os pontos de acupuntura são locais de troca de energia entre o corpo e o meio que o envolve. O trabalho de Lazoura e colaboradores examinou a absorção relativa da luz laser ($\lambda = 780\text{nm}$), $P_m = 3\text{mW}$, usando diferentes frequências, nos pontos de acupuntura e pontos de não-acupuntura¹¹⁹. Os resultados revelaram que a absorção foi maior com 1Hz nos pontos de acupuntura, comparada aos pontos de não-acupuntura vizinhos; com alta frequência, esta diferença foi reduzida. Desta forma, os pontos de acupuntura, de fato, têm propriedades de absorção diferentes dos pontos de não-acupuntura e os autores sugeriram que pode haver uma correlação entre a condutividade elétrica da pele e a absorção da luz laser.

6.2.2. Analgesia

Para entender os efeitos do laser de He-Ne no sistema nervoso, Iwase e colaboradores realizaram dois tipos de experimentos¹²⁰. O sistema *in vivo* foi usado para confirmar o efeito analgésico do laser na dor de dente provocada por um estímulo elétrico na polpa de um coelho. O outro, o sistema *in vitro*, foi utilizado para analisar a mudança das características elétricas da membrana de um neurônio no encéfalo de um rato. Quando usado o sistema *in vivo*, o efeito do laser em aliviar a dor de dentes persistiu por 25 minutos. Para o sistema *in vitro*, o potencial de membrana foi hiperpolarizado e a membrana do neurônio foi estabilizada pelo laser, que devem estar relacionados ao sistema metabólico da célula. Os autores concluíram que o laser de He-Ne não é igualmente efetivo em qualquer sistema biológico. Para células que têm uma lesão moderada, possuindo um potencial de membrana mais baixo e instável, o laser é bastante eficiente. Em compensação, para células que possuem um potencial de membrana mais alto e estável, os efeitos do laser não são consideráveis.

O efeito da LILT em síndromes agudas de dor de cabeça foi estudado por Amoils e Kues em dez pacientes com dor de cabeça vascular aguda ou nevralgia occipital¹²¹. A terapia foi administrada, utilizando-se um laser de $\lambda = 670\text{nm}$; $I = 890\text{mW/cm}^2$, durante 30s-40s, em *trigger points* da segunda cervical e nervos trigêmeos. Houve uma diminuição significativa na dor de cabeça, quando reavaliada depois de 15 minutos.

No trabalho de Simunovic e colaboradores, esportistas de golfe e tênis com epicondilite média e lateral foram irradiados no cotovelo¹⁷. O melhor tratamento foi obtido com dois métodos: irradiação dos *trigger points* com laser de GaAlAs ($\lambda = 830\text{nm}$), emissão contínua, seguida da técnica de irradiação por varredura com o laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$), combinado com um laser de comprimento de onda $\lambda = 904\text{nm}$, emissão pulsada. O alívio total de dor, com conseqüente melhora da capacidade funcional, foi obtido em 82% dos pacientes, nos casos agudos e 66%, nos casos crônicos. A dose por *trigger point* foi 4J/ponto durante

32s, e para o método de varredura, $12\text{J}/\text{cm}^2$ em média, pois o tempo de exposição variou de paciente para paciente, conforme tolerância individual; também foi verificado que a superdosagem pode resultar em ausência de efeitos positivos ou efeitos inibidores. O grupo placebo obteve alívio de dor de, no máximo, 20%.

6.2.3. Odontologia

O efeito benéfico da radiação laser de baixa intensidade foi verificado no tratamento de desordens nas regiões oral e maxilofacial: dor na articulação têmporo-mandibular, nevralgia do trigêmio, dor muscular, inflamação, hipersensibilidade dentinária e pequenos hemangiomas¹⁸. Dependendo do diagnóstico, escolheu-se o melhor comprimento de onda: $\lambda = 632,8\text{nm}$, $\lambda = 670\text{nm}$ ou $\lambda = 830\text{nm}$. A dose utilizada foi $1,8\text{J}/\text{cm}^2$ e dos 271 pacientes submetidos à LILT, 154 não possuíam mais sintoma algum ao final do tratamento, 50 melhoraram consideravelmente e 37 ainda apresentavam sintomas.

6.2.4. Oncologia

Mikhailov e colaboradores publicaram uma experiência de cinco anos no tratamento de pacientes com câncer de mama estágios II^a e III^a, combinando LILT e cirurgia¹²². Um laser de GaAs ($\lambda = 890\text{nm}$) com frequência de até 3000Hz, foi utilizado em 41 pacientes antes da cirurgia e durante dois anos no período pós-operatório. O grupo controle, com 40 pacientes, sofreu cirurgia, mas não recebeu tratamento com laser. As pacientes que receberam irradiação laser foram divididas em três grupos, cada um com um protocolo de tratamento. Os resultados mostraram que a LILT diminuiu a complicação pós-operatória em 15,3% e duração de linforrécia. 100% das pacientes com câncer de mama II^a, que receberam tratamento com laser, estavam vivas após cinco anos e 91,3% das pacientes não tiveram recorrência; no grupo controle, 85,71% e 77,7%, respectivamente. Em pacientes com câncer de mama III^a tratadas por LILT, a sobrevivência foi de 94,44% e 82,35% não tiveram recorrência; no grupo controle, 78,94% e 60 %, respectivamente, no mesmo período.

O efeito da radiação laser de He-Ne e laser de vapor de cobre ($\lambda = 510\text{nm}$ e $\lambda = 578\text{nm}$) na atividade de células assassinas naturais, em condições de crescimento tumoral, foi investigado em animais intactos e animais portadores de tumor por Zyryanov et al.¹²³. Com dose de $30\text{J}/\text{cm}^2$ para ambos os lasers, os resultados obtidos mostraram que o laser de He-Ne inibe a atividade de NK no organismo de portadores de tumor e, portanto, estimula o crescimento e difusão metastática tumoral; o laser de vapor de cobre não promove a inibição de NK e, por isso, inibe o crescimento e metástase. Sob a influência da radiação com laser de vapor de cobre em uma dose de $1\text{J}/\text{cm}^2$, os processos de regeneração de lesões foram estimulados e o crescimento do tumor e metástase foram inibidos.

6.2.5. Pneumologia

Bhagwanani, Bathia e Sharma investigaram o efeito da LILT em pacientes com tuberculose pulmonar, utilizando um laser de nitrogênio ($\lambda = 337\text{nm}$), de emissão pulsada, $P_m = 2\text{mW}$ ¹²⁴. O laser foi administrado ao paciente através de uma agulha introduzida no pulmão, capaz de levar a luz até a cavidade torácica, durante 10 minutos e, geralmente, somente um local foi necessário. A melhora clínica ocorreu em 90% dos pacientes e 60% destes mostraram melhora através de radiografia.

6.2.6. Virologia

No trabalho de Perrin e colaboradores, estudou-se o efeito do laser de baixa intensidade na latência do vírus de herpes simplex em camundongos¹²⁵. Os animais foram inoculados pelo ouvido direito com dose viral tipo 2 e a irradiação foi realizada repetitivamente no gânglio cervical com laser semiconductor ($\lambda = 850\text{nm}$); frequência = 3000Hz ; potência = 20mW ; dose = $4\text{J}/\text{mm}^2$, tempo de exposição 160s, cada dois dias, durante quinze dias. O grupo controle foi inoculado com o vírus, mas não recebeu irradiação. Os resultados obtidos mostraram que o laser foi significativo em diminuir o estabelecimento de latência no gânglio de camundongos infectados.

6.3. Mecanismos propostos

Acredita-se que o laser de baixa intensidade seja responsável por efeitos fotoquímicos, fotofísicos e/ou fotobiológicos nas células e no tecido, excluindo a possibilidade de manifestação dos efeitos térmicos. Quando a luz interage com o tecido ou células, dependendo da dose administrada, certas funções celulares poderão ser estimuladas ou inibidas.

A absorção da radiação visível por um sistema biológico causa fotoquímica. Entretanto, a absorção de radiação emitida na região do infravermelho do espectro eletromagnético, resulta em rotações e vibrações moleculares. Atualmente o laser de Nd:YAG vem sendo utilizado amplamente na odontologia clínica para efeitos de bioestimulação¹²⁶. Também um trabalho elaborado por pesquisadores da FCM/UNICAMP consistiu no tratamento de faringites crônicas inespecíficas com lasers de CO₂, usando densidades de energia de 0,4J/cm² a 0,6J/cm², onde foram obtidos bons resultados na cura dessa patologia¹²⁷. Assim, não se espera que este tipo de radiação cause reações fotoquímicas nas moléculas. Já que tanto a radiação visível como a infravermelha mostram ser benéficas neste tipo de terapia e, já que elas diferem dramaticamente em suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas, Smith propõe uma modificação do modelo de Karu para explicar os efeitos produzidos por ambos comprimentos de onda¹²⁸. No modelo de Karu⁶⁰, a luz visível produz mudanças fotoquímicas nos fotorreceptores das mitocôndrias, que alteram o metabolismo, conduzindo à transdução do sinal a outras partes da célula (incluindo membranas), que finalmente conduzem à fotorresposta (biomodulação). Enquanto que a luz visível provavelmente inicia a cascata de eventos na cadeia respiratória das mitocôndrias, através de eventos fotoquímicos (provavelmente a fotoativação de enzimas), Smith sugere que, por causa das propriedades fotofísicas e fotoquímicas da radiação infravermelha, esta inicie a cascata de eventos metabólicos através de efeitos fotofísicos sobre as membranas (provavelmente nos canais Ca⁺⁺), conduzindo à mesma resposta final. O modelo para a LILT, sugerido por Smith, é mostrado na figura 6.1.

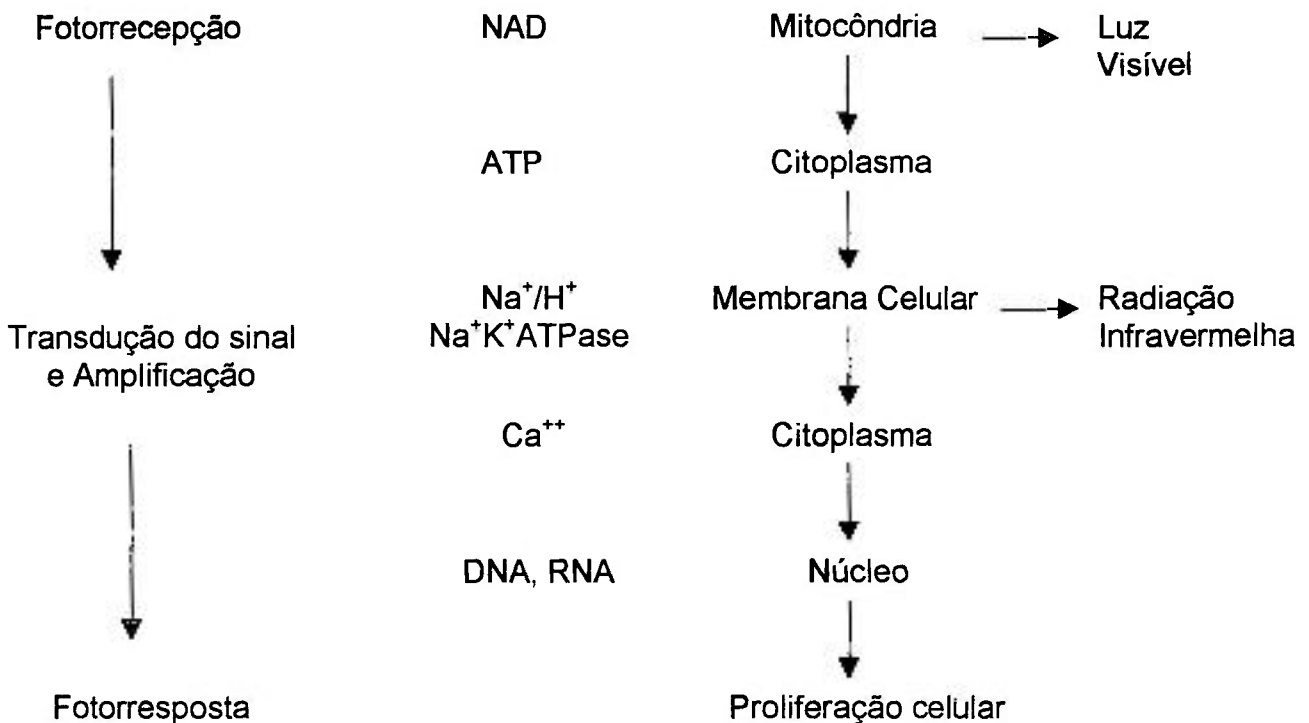


Figura 6.1: Modelo para a modulação de sistemas biológicos através da LILT¹²⁸.

Kamikawa e Ohnishi estão de acordo com Smith¹²⁹. A ação fotoquímica do laser sobre os cromóforos é importante para iniciar o efeito terapêutico, mas nem sempre considera os vários lasers utilizados nessa terapia. Por esta razão, eles realizaram um experimento utilizando ¹H-NMR para observação da flutuação dos sinais de prótons induzida pela radiação laser ($\lambda = 830\text{nm}$, $P = 10\text{mW}$, emissão contínua; $\lambda = 904\text{nm}$, $P_m = 10\text{mW}$, emissão pulsada). Dos resultados obtidos, os autores sugeriram que a ação fotofísica do laser sobre ligações de hidrogênio pode ser um dos mecanismos essenciais dos efeitos da LILT.

Karu, em um artigo mais recente, referente aos mecanismos de ação primários e secundários da radiação emitida no intervalo do visível ao infravermelho próximo sobre células, discute a enzima citocromo c oxidase como o possível fotoaceitador, quando células são irradiadas com luz monocromática no intervalo do visível ao infravermelho¹³⁰. A transdução e amplificação do fotossinal na célula conduziriam a uma cascata de reações conectadas com

alterações nos parâmetros da homeostase celular, que pode acontecer na ausência de luz (mecanismos secundários).

Apesar da vasta quantidade de trabalhos encontrados na literatura, nota-se que as informações sobre os efeitos não-térmicos do laser em tecidos biológicos não são conclusivas; muitas vezes, são conflitantes; outras, inconsistentes, relatando na sua maioria casos clínicos ou observacionais com pouco embasamento científico. Por exemplo, com relação a estudos realizados *in vivo*, não se encontram trabalhos na literatura que procurem investigar a distribuição da luz na pele em condições patológicas. Porém, conhecer a penetração da luz, nas diferentes camadas da pele para determinada patologia, é fator decisivo para selecionar-se a dose a ser administrada nesta terapia.

7. A ÓPTICA DA PELE NORMAL

Os tecidos biológicos são meios absorvedores opticamente inhomogêneos, com índices de refração mais alto que o do ar. Assim, na interface ar-biotecido, uma parte da radiação é refletida (devido à lei de Fresnel), e a outra parte penetra no tecido. Enquanto se propaga no tecido, o feixe laser diverge e é atenuado devido a múltiplos espalhamentos e à absorção. No UV e no IV, $\lambda \geq 2\mu\text{m}$, a absorção predomina e a influência do espalhamento é relativamente pequena. Neste caso, a onda de luz não penetra profundamente no tecido. No intervalo de comprimentos de onda mais curtos do espectro visível, a profundidade de penetração no tecido varia de 0.5mm a 2.5mm. Neste caso, há absorção e espalhamento, sem que nenhum prevaleça. O espalhamento predomina em relação à absorção dentro do intervalo de $\lambda = 0.6\mu\text{m}$ a $1.5\mu\text{m}$, e por isso, a profundidade de penetração pode aumentar para cerca de 8mm a 10mm¹³¹. A figura 7.1 retrata a interação da radiação com a pele.

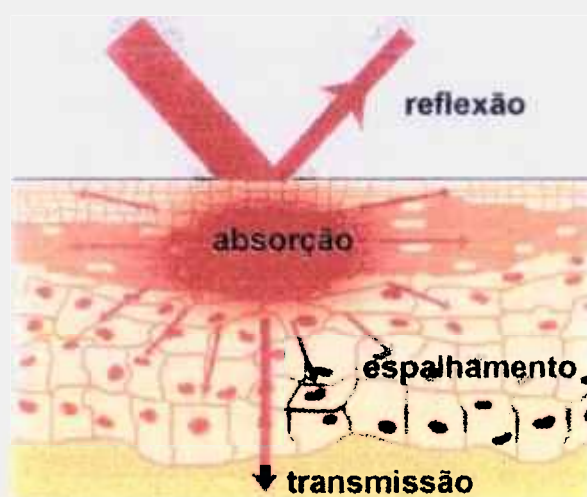


Figura 7.1: Interação da luz com tecidos⁵².

Quando a radiação atinge a superfície da pele, uma parte do feixe de luz é reemitida e a outra, transmitida às camadas mais internas. A reemitância é definida como a fração da radiação incidente que retorna na mesma direção. Existem dois processos diferentes que dão origem ao feixe reemitido: a reflexão

direta, causada pela superfície da camada córnea, e o retroespalhamento, que provém das outras camadas da epiderme, derme e hipoderme. A óptica da pele pode ser esquematizada conforme mostra a figura 7.2.

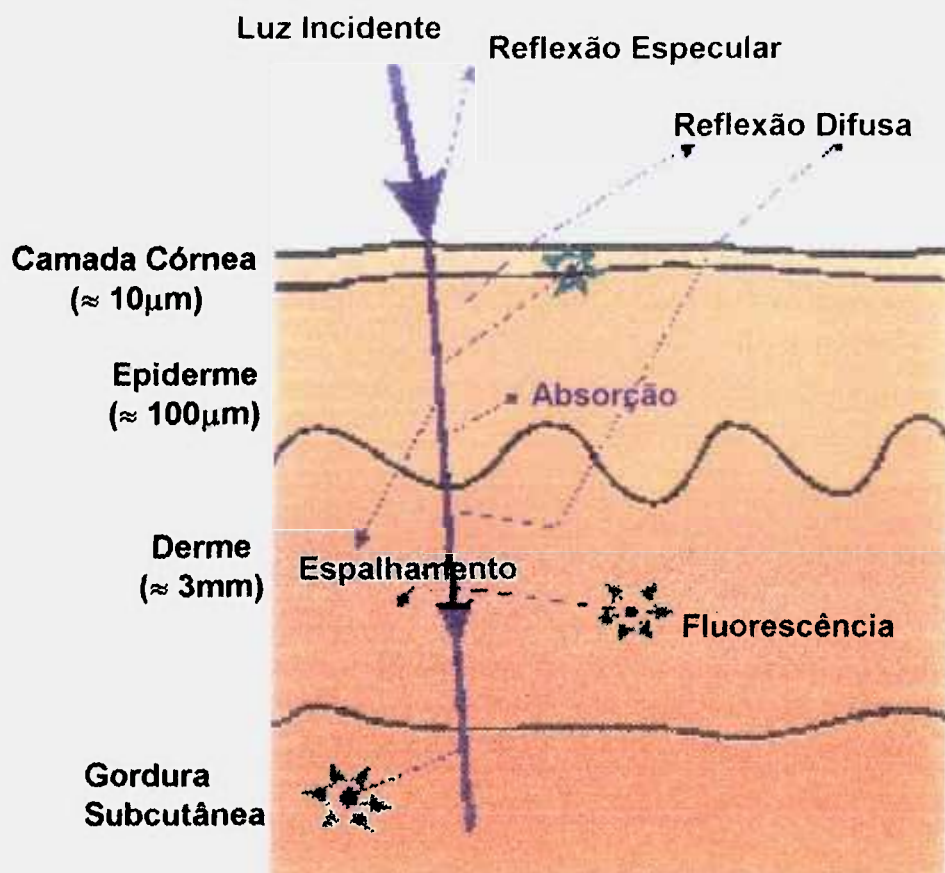


Figura 7.2: Óptica da pele normal ¹³².

Em incidência normal, uma pequena fração da radiação incidente é refletida devido à mudança do índice de refração na interface ar ($n_{ar}= 1,0$) e camada córnea ($n_c= 1,55$). Para radiação incidente normal à superfície, esta refletância regular está sempre no intervalo de 4 a 7% para comprimentos de onda de 250nm a 3000nm¹³³.

Entretanto, a superfície da camada córnea, cuja espessura varia de 8nm a 20nm, não é uma superfície lisa nem planar, que pode refletir perfeitamente. A superfície é irregular, composta de microrrugosidades e portanto, a refletância regular da pele não é especular. O feixe paralelo do laser que incide sobre estas microestruturas é refletido de acordo com as leis da reflexão, e a fração da

radiação que penetra as camadas mais internas é refratada, podendo portanto, tornar-se mais difusa em todas as direções, causando o efeito da reflexão superficial difusa.

A fração da radiação que é transmitida para as camadas mais profundas da pele, está no intervalo de 93 a 96% da radiação incidente. Esta fração da radiação que é transmitida, pode ser então absorvida ou espalhada. Estes dois processos determinam a profundidade de penetração na pele, bem como a reemitância da radiação espalhada da pele.

O intervalo do espectro eletromagnético correspondente aos comprimentos de onda mais utilizados na LILT, situa-se entre $\lambda = 600\text{nm}$ e $\lambda = 1000\text{nm}$, devido à maior profundidade de penetração deste intervalo de comprimentos de onda. A capacidade da luz emitida no vermelho ou infravermelho próximo em penetrar no tecido é devido a dois fatores: a grande maioria das interações é evento de espalhamento, ao invés de absorção, e estas interações que resultam em espalhamento são anisotrópicas, tanto que o fóton continua a penetrar no tecido apesar dos múltiplos espalhamentos¹³⁴.

A absorção nos tecidos ocorre pelos cromóforos naturais, tais como o grupo heme da hemoglobina, melanina e citocromos da cadeia respiratória nas mitocôndrias. O espalhamento resulta das diferenças entre os índices de refração das inhomogeneidades no meio, correspondendo às inhomogeneidades físicas. A distribuição espacial e a intensidade da luz espalhada dependem do tamanho e do formato destas microestruturas para cada comprimento de onda, e da diferença entre o índice de refração do meio e destas inhomogeneidades. Quando um fóton se propaga em um meio, ele pode colidir com uma partícula ou uma microestrutura, cujo índice de refração é diferente do meio de propagação e, neste caso, ele muda sua direção de propagação inicial.

Para partículas de dimensão menor que 1/10 do comprimento de onda da radiação incidente (por exemplo, íons e moléculas), o espalhamento geralmente é fraco, quase isotrópico, isto é, igualmente distribuído espacialmente, e é

inversamente proporcional à quarta potência do comprimento de onda (efeito Rayleigh). Para partículas cujas dimensões são maiores que o comprimento de onda da luz incidente (por exemplo, macromoléculas), o espalhamento é mais diretamente dirigido, e a dependência em relação ao comprimento de onda da luz espalhada é afetada pelo tamanho, formato e índice de refração da partícula espalhadora (efeito Mie)^{135,136}.

Organelas celulares, tais como as mitocôndrias, são consideradas os principais espalhadores em vários biotécidos^{137,138}. Na pele normal, embora estes dois efeitos estejam presentes na epiderme e na derme, prevalece o efeito Mie. Acredita-se que o espalhamento pelas fibras de colágeno na matriz extracelular seja de maior importância em determinar a penetração da radiação dentro da derme¹³⁵. Schmitt e Kumar, recentemente, propuseram um modelo microóptico de tecido biológico mole, que permitiu o cálculo numérico das magnitudes absolutas de seus coeficientes de espalhamento¹³⁹. Os resultados obtidos mostraram que no intervalo de comprimentos de onda utilizados na LILT, os diâmetros dos espalhadores que contribuem na sua maior parte ao retroespalhamento são significativamente menores, $\lambda/4 - \lambda/2$, que os diâmetros dos espalhadores que causam a extinção da luz espalhada anisotropicamente, $3\lambda - 4\lambda$.

A figura 7.3 mostra a profundidade de penetração na pele para vários comprimentos de onda. Pode-se observar que o comprimento de onda do laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$) atinge uma profundidade de penetração de até aproximadamente 65% na derme e 11% na hipoderme.

8. PROPAGAÇÃO DA LUZ NO TECIDO

8.1. Teoria

O laser é uma ferramenta amplamente utilizada na prática clínica atualmente, entretanto, antes que se utilize esta ferramenta, deve-se selecionar o comprimento de onda, a área irradiada, o intervalo de tempo de irradiação, o número e a periodicidade de irradiações para determinada terapia. Já que pequenas diferenças em alguns destes parâmetros podem determinar se uma aplicação é eficiente, ou desastrosa, é necessário algum conhecimento sobre os efeitos de cada parâmetro. Esta informação geralmente é fornecida por modelos matemáticos.

Qualquer modelo de um tratamento a laser, seja térmico ou não-térmico, é baseado na distribuição da luz no tecido. No entanto, um modelo preciso da propagação da luz em meios túrbidos, isto é, onde absorção e espalhamento da luz estão presentes, tais como os tecidos biológicos, permanece um desafio para a comunidade científica. A investigação de como a luz se propaga no tecido requer que tanto a absorção como o espalhamento sejam considerados. Entre as diferentes aproximações, a teoria de transporte radioativo tem servido como fundamento para muitas investigações teóricas^{141,142,143,144,145}.

De acordo com a equação de transporte (1), a radiância $L(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$) da luz se propagando na direção do vetor unitário \mathbf{s} diminui pela absorção e espalhamento, mas aumenta através da luz que é espalhada de direções \mathbf{s}' na direção \mathbf{s} . A equação de transporte que descreve esta interação da luz é¹⁴⁶:

$$\mathbf{s} \cdot \nabla L(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = -(\mu_a + \mu_s)L(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') \cdot L(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\omega' \quad (1)$$

onde: μ_a (m^{-1}) = coeficiente de absorção;

μ_t (m^{-1}) = coeficiente de atenuação;

$d\omega'$ = diferencial do ângulo sólido na direção \mathbf{s}' ;

$p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ = função de fase;

$\mathbf{s} \cdot \nabla L(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ = taxa de mudança da intensidade no ponto \mathbf{r} , na direção \mathbf{s} .

A integral na equação (1) é realizada sobre todos os ângulos sólidos e $d\omega'$ é a diferencial do ângulo sólido na direção \mathbf{s}' . Vale ressaltar que a radiância é uma função de cinco variáveis: três no vetor \mathbf{r} e duas no vetor unitário \mathbf{s} (já que \mathbf{s} é um vetor unitário, a magnitude é fixada e, conseqüentemente, um grau de liberdade foi removido). O lado esquerdo da equação (1) descreve a taxa de mudança da intensidade no ponto indicado por \mathbf{r} , na direção \mathbf{s} . Esta taxa de mudança é igual à intensidade perdida devido à absorção e espalhamento (o segundo termo da equação (1)) mais a intensidade obtida através do espalhamento da luz de todas as outras direções na direção \mathbf{s} (o terceiro termo da equação (1)).

Quando a luz atinge uma partícula com um índice de refração diferente de seu ambiente, a luz é refratada. O ângulo no qual a luz é refratada é uma função do tamanho e do formato da partícula, bem como do comprimento de onda da luz incidente e do ângulo de incidência da luz. Em geral, cada partícula terá um diferente perfil de espalhamento. Este perfil de espalhamento é chamado de função de fase. A função de fase $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ descreve a quantidade de luz espalhada da direção denotada pelo vetor unitário \mathbf{s} na direção \mathbf{s}' ; em outras palavras, ela caracteriza um ato elementar de espalhamento. Se o espalhamento é simétrico com relação à direção da onda incidente, então a função de fase depende somente do ângulo θ entre as direções \mathbf{s} e \mathbf{s}' , isto é, $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\theta)$.

Para a função de fase ser normalizada, trata-se a mesma como uma distribuição de probabilidades; conseqüentemente, sua condição de normalização requer que a integral da função de fase sobre todos os ângulos sólidos seja 1, isto é:

$$\int p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\omega = 1 \quad (2)$$

onde $d\omega$ é uma diferencial de ângulo sólido na direção \mathbf{s} . Esta condição não permite que a função de fase descreva a absorção da luz pela partícula, mas somente uma descrição da distribuição de espalhamento pela partícula. Assim, $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')d\omega$ é a probabilidade que um fóton incidente da direção \mathbf{s} saia na unidade diferencial de ângulo sólido na direção \mathbf{s}' . A expressão (2) também pode ser escrita:

$$\int_0^\pi p(\theta) 2\pi \sin \theta d\theta = 1 \quad (3)$$

A função de fase, em geral, será diferente de partícula para partícula, portanto, diferente de tecido para tecido. Para simplificar, utiliza-se uma função de fase média que adequadamente descreva os aspectos mais importantes do processo de espalhamento. Obtém-se esta função de fase média, assumindo-se que a probabilidade de espalhamento de uma direção a outra é uma função somente do ângulo θ entre as duas direções, assim $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\cos \theta)$.

Se a função de fase não é isotrópica, então, introduz-se o parâmetro g para descrever o grau de anisotropia da função de fase, chamado de cosseno médio da função de fase, definido como a integral sobre todos os ângulos da função de fase multiplicada pelo cosseno do ângulo. Assim,

$$g = \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') (\mathbf{s} \cdot \mathbf{s}') d\omega \quad (4)$$

ou

$$g = \langle \cos(\theta) \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta 2\pi \sin \theta d\theta \quad (5)$$

Na prática, a função de fase é geralmente bem aproximada com o auxílio da função de Henyey-Greenstein^{45,138,144}.

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (6)$$

O valor de g varia no intervalo de 0 a 1: $g=0$, corresponde ao espalhamento isotrópico (Rayleigh) e $g=1$ corresponde ao espalhamento completamente dirigido (Mie).

O coeficiente de atenuação total é:

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s \quad (7)$$

Assume-se que o tecido seja um meio denso ao acaso, com variações nas propriedades ópticas pequenas o suficiente para prevenir absorção localizada. Em outras palavras, considera-se que o tecido tenha propriedades de espalhamento e absorção volumétricas, ao invés de ser composto de centros discretos de espalhamento e absorção distribuídos em um meio não-espalhador, não-absorvedor. A absorção volumétrica (ou espalhamento) é obtida pela multiplicação da seção de choque da absorção (ou espalhamento) pela densidade de absorvedores (ou espalhadores). Assim são definidos os coeficientes de absorção μ_a e de espalhamento μ_s . O inverso destes coeficientes é a distância média que a luz se propagará antes de ser absorvida ou espalhada, respectivamente.

A formulação da equação de transporte assume que cada partícula espalhada está suficientemente distante de seus vizinhos para evitar interações entre sucessivos efeitos de espalhamento. Na teoria, estes espalhadores e absorvedores devem ser uniformemente distribuídos através do meio.

O formalismo acima descrito considera a radiância dada pela expressão (1) como uma grandeza escalar. Quando os efeitos da polarização são incluídos, a radiância em (1) é substituída pelo vetor de Stokes 4×1 , o coeficiente de atenuação é substituído pela matriz de atenuação 4×4 e a função de fase é dada pela matriz de Mueller 4×4 ^{141,147}. A equação de transporte torna-se, então, uma equação matricial íntegro-diferencial e é chamada equação de transporte vetorial ou equação de transferência radiativa vetorial.

A equação de transporte vetorial pode então ser escrita como¹⁴²:

$$\frac{d}{ds}[\mathbf{S}] = [\Lambda][\mathbf{S}] + \rho \int [\mathbf{M}][\mathbf{S}'] d\omega' \quad (8)$$

onde: $[\mathbf{S}] = [\mathbf{S}(\mathbf{r}, \mathbf{s})]$ é o vetor de Stokes em \mathbf{r} , na direção \mathbf{s} ;
 $[\mathbf{S}'] = [\mathbf{S}(\mathbf{r}, \mathbf{s}')$ é o vetor de Stokes em \mathbf{r} , na direção \mathbf{s}' ;
 $[\Lambda] = [\Lambda(\mathbf{s})]$ é a matriz 4x4 de atenuação;
 $[\mathbf{M}] = [\mathbf{M}(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ é a matriz de Mueller 4x4;
 ds = distância elementar na direção de \mathbf{s} ;
 ρ = número de partículas por unidade de volume;
 $d\omega'$ = diferencial de ângulo sólido na direção de \mathbf{s}' .

Cheung e Ishimaru estudaram a evolução da polarização em meios altamente espalhadores, obtendo a equação de transporte radiativa para partículas esféricas, que resultou numa considerável simplificação da equação (8)¹⁴¹. Neste caso, a equação de transporte com vetores de Stokes é decomposta em componentes de Fourier e, no caso de onda linearmente polarizada em incidência normal, somente duas componentes de Fourier são necessárias. Para partículas não-esféricas, o campo coerente torna-se despolarizado¹⁴².

Portanto, na teoria de transporte radiativa para luz que é polarizada, o estado de polarização e intensidade de um feixe é especificado pelo vetor de Stokes (\mathbf{S}) na forma¹⁴⁸:

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle E_h E_h^* + E_v E_v^* \rangle \\ \langle E_h E_h^* - E_v E_v^* \rangle \\ \langle E_h E_v^* + E_v E_h^* \rangle \\ \langle i(E_h E_v^* - E_v E_h^*) \rangle \end{pmatrix} \quad (9)$$

Os elementos S_1 , S_2 , S_3 definem o estado de polarização e S_0 denota a intensidade do feixe de luz¹⁴⁷.

Na expressão (9) E_h e E_v são as componentes do campo elétrico horizontal e vertical, respectivamente, em relação à direção de propagação da luz. Exemplos para a notação vetorial de Stokes na representação normalizada são:

- $[1,0,0,0]$ para luz não-polarizada;
- $[1,1,0,0]$ para luz linearmente polarizada na horizontal;
- $[1,-1,0,0]$ para luz linearmente polarizada na vertical;
- $[1,0,0,1]$ para luz circularmente polarizada para a direita;
- $[1,0,0,-1]$ para luz circularmente polarizada para a esquerda.

Em geral, a interação da luz com elementos ópticos, tais como lentes, polarizadores, filtros, superfícies, meios espalhadores etc, muda o estado de polarização da luz de \mathbf{S} para \mathbf{S}' . Quando a luz é descrita por um vetor de quatro componentes, esta interação com qualquer elemento óptico ou material pode ser expressa como uma multiplicação do vetor de Stokes com uma matriz 4x4. Portanto:

$$\mathbf{S}' = \mathbf{M} \cdot \mathbf{S} \quad (10)$$

A matriz de 16 elementos é chamada de Matriz de Mueller ou, envolvendo espalhamento, matriz de espalhamento:

$$\begin{pmatrix} M_{11} & M_{12} & M_{13} & M_{14} \\ M_{21} & M_{22} & M_{23} & M_{24} \\ M_{31} & M_{32} & M_{33} & M_{34} \\ M_{41} & M_{42} & M_{43} & M_{44} \end{pmatrix} \quad (11)$$

Esta matriz caracteriza completamente qualquer componente ou material em termos das suas propriedades ópticas. Por exemplo, um polarizador linear na horizontal é descrito por $M_{11} = M_{12} = M_{21} = M_{22} = 1$ e todos os outros elementos são iguais a zero.

Se uma onda plana incide sobre um meio na direção \mathbf{s}_0 , pode-se escrever o vetor de Stokes $[S]$ como a soma da intensidade coerente $[I_c]$ com a intensidade difusa $[I_d]$ ¹⁴²:

$$[S(\mathbf{r}, \mathbf{s})] = [I_c(\mathbf{r}, \mathbf{s}_0)\delta(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)] + [I_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})] \quad (12)$$

onde $\delta(\mathbf{s} - \mathbf{s}_0)$ é a função delta de Dirac.

A intensidade coerente satisfaz a seguinte expressão:

$$\frac{d}{ds} [I_c] = [\Lambda][I_c] \quad (13)$$

Logo,

$$\frac{d}{ds} [I_d] = [\Lambda][I_d] + \rho \int [\mathbf{M}][I_d] d\omega' + [I_i] \quad (14)$$

onde $[I_i(\mathbf{r}, \mathbf{s})]$ é a matriz da intensidade incidente dada por:

$$[I_i(\mathbf{r}, \mathbf{s})] = \rho [\mathbf{M}(\mathbf{s}, \mathbf{s}_0)][I_c(\mathbf{r}, \mathbf{s}_0)] \quad (15)$$

A matriz de coerência, ou de Jones $[J]$ é definida por¹⁴²:

$$[J] = [J_{ij}] = \begin{pmatrix} \langle E_v E_v^* \rangle & \langle E_v E_h^* \rangle \\ \langle E_h E_v^* \rangle & \langle E_h E_h^* \rangle \end{pmatrix} \quad (16)$$

Por definição, $[J]$ é Hermitiana e não-negativa.

Os parâmetros de Stokes médios são obtidos de $[J]$ com:

$$\langle S_k \rangle = \text{tr}([J][\sigma_k]) \quad (17)$$

onde $[\sigma_k]$ é a notação usual para as matrizes de Pauli ($[\sigma_0]$ sendo a matriz unidade 2×2). A decomposição de qualquer luz parcialmente polarizada em uma onda completamente não-polarizada e uma completamente polarizada, que são independentes uma da outra, permite escrever¹⁴⁹:

$$[J] = \frac{1}{2} \langle S_0 \rangle [\sigma_0] + \sum_{k=1}^3 \langle S_k \rangle [\sigma_k] \quad (18)$$

Para cada matriz de Jones $[J]$, há uma matriz de Mueller $[M]$ correspondente, derivada pela fórmula¹⁵⁰:

$$[M] = [A]([J]X[J^*])[A^{-1}] \quad (19)$$

O oposto geralmente não é verdadeiro. Na expressão (19), X significa o produto Kronecker de matrizes, $*$ denota o complexo conjugado e $[A]$ é a matriz constante^{142,150}:

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \\ 0 & i & -i & 0 \end{pmatrix}$$

O grau de polarização da luz P é dado por^{149,151}:

$$P = \left(1 - 4 \frac{\det[J]}{(\text{tr}[J])^2} \right) \quad (20)$$

Uma formulação alternativa para o grau de polarização, em termos dos parâmetros de Stokes, é¹⁴⁷:

$$P = \left(\sum_{k=1}^3 \left(\frac{\langle S_k \rangle}{\langle S_0 \rangle} \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} = \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2}}{S_0} \quad (21)$$

No caso de polarização linear, a expressão (21) se reduz a:

$$P_L = \frac{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}{S_0} \quad (22)$$

onde P_L é o grau de polarização linear e a quantidade $\sqrt{S_1^2 + S_2^2}$ representa a magnitude da polarização linear do feixe de luz.

Na literatura, existem vários trabalhos publicados que tratam da interação da luz com tecido biológico, usando alguns modelos bem estabelecidos: o modelo de Kubelka-Munk¹⁵², simulações pelo método de Monte Carlo^{153,154,155,156} e a teoria da difusão^{157,158, 159, 160, 161}.

Múltiplos espalhamentos da luz de partículas, em meios altamente espalhadores, tornam randômica a direção de propagação, a fase e o estado de polarização da onda incidente. Esta randomização é responsável pelo sucesso da teoria escalar da difusão em descrever as propriedades de transporte dos múltiplos espalhamentos da luz¹⁶².

Alguns trabalhos sugerem que nem toda informação sobre a polarização da luz incidente é perdida durante a propagação da luz^{151,160,161,162,163,164}. Ao se propagar no tecido, a luz torna-se despolarizada, mas a escala espacial deste fenômeno é de difícil modelação.

Um feixe de luz laser altamente colimado é atenuado exponencialmente no biotecido, de acordo com a lei de Beer :

$$I(z) = (1-R) I_0 \exp(-\mu_t z) \quad (23)$$

onde R é o coeficiente de Fresnel para reflexão em incidência normal,

$R = [(n-1)/(n+1)]^2$; n é o índice de refração relativo;

I_i é a intensidade de luz incidente;

μ_t é definido na expressão (3);

z é a espessura da amostra.

O livre caminho médio de um fóton no tecido é denotado por $l_t = \mu_t^{-1}$.

A radiância na equação (1) pode ser separada em duas componentes, espalhada e não-espalhada :

$$L(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = L_c(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + L_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \quad (24)$$

O segundo membro da equação (24), $L_c(\mathbf{r}, \mathbf{s})$, contém toda luz que não interagiu com o tecido. Ela satisfaz a lei de Beer. O terceiro membro, $L_d(\mathbf{r}, \mathbf{s})$, contém toda luz que é espalhada ao menos uma vez e pode ser expresso exatamente como uma soma infinita de polinômios de Legendre^{45,131}. A aproximação por difusão trunca esta soma aos dois primeiros termos, um isotrópico e um ligeiramente direcionado. Esta aproximação simplifica a equação de transporte à equação de difusão em um meio que espalha e absorve luz^{45,131}.

$$(\nabla^2 - k^2)\Phi(\mathbf{r}) = -Q(\mathbf{r}) \quad (25)$$

onde $\Phi(\mathbf{r})$ é a taxa de fluência total espalhada (difusa) dada por:

$$\Phi(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} L_d(\mathbf{r}, \mathbf{s}) d\omega \quad (26)$$

e $k = [3 \mu_a (\mu_a + \mu'_s)]^{1/2}$ é o coeficiente de difusão do meio, também chamado de coeficiente efetivo μ_{ef} se $\mu_a \ll \mu_s$

$Q(\mathbf{r}) = D^{-1} q(\mathbf{r})$, $q(\mathbf{r})$ é a função fonte, isto é, o número de fótons injetados por unidade de volume;

$D = c [3 (\mu_a + \mu'_s)]^{-1}$ é o coeficiente de difusão do fóton;

$\mu'_s = (1-g)\mu_s$ é o coeficiente de espalhamento reduzido;

c é a velocidade da luz no meio.

O caminho médio de transporte de um fóton no meio é $l_s = (\mu_a + \mu'_s)^{-1}$. O caminho de transporte l_s é a distância após a qual o fóton perde sua direção inicial.

Bicout et al. propuseram uma aproximação para o grau de polarização linear P_L da luz transmitida através de uma amostra, que é válida para um grande número de eventos de espalhamento ($n \geq 10$)¹⁶¹. Nesse trabalho, foi desenvolvida uma simulação numérica para o estudo da despolarização da luz em múltiplos espalhamentos, como função do número de eventos de espalhamentos em suspensões, que obedeciam aos regimes de espalhamento Rayleigh, intermediário e Mie. Nesse modelo, verificou-se, através de medidas experimentais realizadas com partículas de látex em água, a influência do tamanho da partícula sobre o comprimento característico de despolarização.

Seja uma onda plana quasi-monocromática em incidência normal a uma superfície de espessura z ($z \gg l_s$) na direção z e de extensão infinita nas direções x e y . O grau de polarização da luz transmitida pelo meio espalhador para luz incidente linearmente polarizada é calculado através das diferentes contribuições da luz, que se propaga em diferentes direções. Considerando-se uma seqüência de eventos de espalhamentos, o número de eventos nesta direção de comprimento s é $n = \frac{s}{l_s}$, onde $l_s = \frac{1}{\mu_s}$. O número de direções de espalhamento de comprimento s é dado pela função de Green $G(n, z)$ da equação de difusão¹⁴⁹. Segue destes resultados que o grau de polarização linear P_L é dependente da função de Green $G(n, z)$ de direções de espalhamento de comprimento s . A expressão resultante é¹⁶¹:

$$P_L = \frac{\int_0^{\infty} f_L G(n, z) dn}{\int_0^{\infty} G(n, z) dn} \quad (27)$$

onde o sub-índice L se refere ao estado de polarização linear. No regime de múltiplos espalhamentos, a função f abaixo, expressa a dependência do grau de polarização de saída para um número de espalhamentos igual a $n+1$. No limite de $n \rightarrow \infty$, f se reduz a

$$f_L(n) \approx \frac{3}{2} \exp\left[-n\left(\frac{l_s}{\zeta_L}\right)\right] \quad (28)$$

onde ζ_L define o comprimento característico de despolarização para um caminho de $n+1$ espalhamentos : $\zeta_L = \frac{l_s}{\ln \frac{10}{7}}$ ¹⁴⁹.

Resolvendo-se a integral em (27), obtém-se

$$P_L = \frac{z}{l} \frac{\sinh\left(\frac{l_s}{\xi_L}\right)}{\sinh\left(\frac{z}{\xi_L}\right)} \quad (29)$$

onde $\xi_L = \left(\frac{\zeta_L l_s}{3}\right)^2$ define o comprimento característico de despolarização para a geometria da superfície¹⁴⁹. Para $z \gg \xi_L$, o grau de polarização da luz transmitida pode ser aproximado por

$$P_L \approx \frac{2z}{l_s} \sinh\left(\frac{l_s}{\xi_L}\right) \exp\left(-\frac{z}{\xi_L}\right) \quad (30)$$

Esta aproximação é igualmente válida para um sistema de grandes espalhadores (da ordem do comprimento de onda, espalhamento Mie), se l_s é substituído pelo caminho de transporte l_s ^{161,165}. Vale ressaltar que, quando o campo elétrico incidente é puramente s- ou p-polarizado, o campo espalhado conserva o estado de polarização¹⁶⁶.

O ponto crucial a ser observado nas equações (23) a (30) é que a atenuação da luz não-espalhada é dependente somente do número de eventos de

espalhamento (μ_s), ao passo que a despolarização da luz espalhada é dependente do número de eventos de espalhamento e do tamanho da partícula.

Na próxima seção, é apresentado um arranjo experimental para a investigação do grau de polarização linear da radiação laser de He-Ne na pele de ratos sadia e sob condição patológica. O propósito deste modelo é verificar a preservação da polarização linear em pele sob condições patológicas e, assim, dar fundamentos para os resultados obtidos no próximo capítulo.

8.2. Grau de polarização linear em amostras de pele

Neste experimento, foram utilizados quatro ratos machos adultos Wistar, com massa corpórea de aproximadamente 300g, provenientes do biotério do ICB/USP, que, depois de devidamente tricotomizados na região dorsal, foram submetidos à anestesia com éter etílico. Estando os animais anestesiados, foram criadas três queimaduras com N₂ líquido na parte inferior do dorso do rato, seguindo o método de padronização estabelecido anteriormente por Ribeiro⁴⁴. Com um “dedo frio”, foi aplicado N₂ líquido (-196°C) por cinco segundos, duas vezes consecutivas, com intervalo de tempo de cinco minutos entre as aplicações. A aplicação foi repetida por três dias consecutivos (dias 1; 2 e 3 do experimento), sendo a primeira irradiação laser feita após a última aplicação de N₂ líquido, no 3º dia pós-criação da ferida. A área da lesão, determinada pela área da base do recipiente em contato com a pele do animal, foi circular com diâmetro $\Phi = 6\text{mm}$.

A fonte de luz foi um laser de He-Ne com potência de saída igual a 10mW modelo 1300 (UNIPHASE, EUA), $\lambda = 632,8\text{nm}$ e diâmetro do feixe de 2mm, acoplado a um sistema óptico. O sistema óptico foi composto por um polarizador Glan-Thompson modelo 10GT04AR.14 (NEWPORT, EUA), de razão de extinção $< 1 \times 10^{-5}$, com transmissão de aproximadamente 36%. Foi feito um disco graduado como suporte do polarizador, de modo que este pudesse ser rotado de 90°. Utilizou-se também uma lente convergente de $f = 7\text{cm}$ e um filtro de densidade neutra aproximadamente igual a 0,04 para $\lambda = 632,8\text{nm}$. Por último, utilizou-se

de $f = 5\text{cm}$ e razão 2:1, de modo a obter-se um feixe de 6mm. A nova potência de saída após o sistema de lentes da objetiva, $P \approx 1,8\text{mW}$, foi registrada através de um detector modelo LM-1 (COHERENT, EUA), devidamente calibrado. A potência foi aferida antes de cada experimento. A montagem experimental é mostrada na figura 8.1.

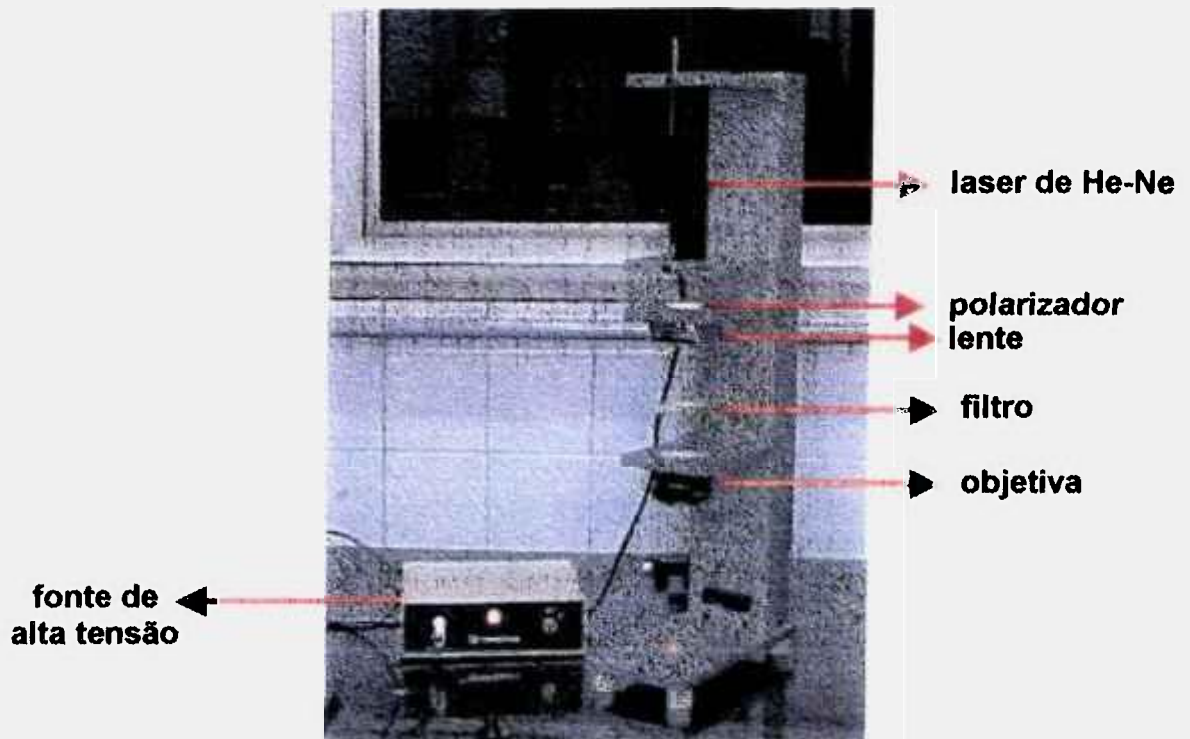


Figura 8.1: Montagem experimental utilizada na irradiação de animais de experimentação.

Baseando-se ainda no trabalho de Ribeiro⁴⁴, seguiu-se o mesmo procedimento para a irradiação das lesões. Optou-se por uma série de quatro irradiações, aplicadas até duas vezes por semana, utilizando-se uma densidade de energia de $1\text{J}/\text{cm}^2$, correspondendo a uma exposição de três minutos.

Nos quatro animais utilizados, foram criadas três lesões. A lesão #1 foi a lesão controle (sem irradiação- L1); na lesão #2, incidiu-se luz He-Ne, cuja polarização foi alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal (L2) e a lesão

perpendicular relativa (L3). A figura 8.2 mostra as lesões em um animal que está anestesiado, sob tratamento com laser.

Os animais foram irradiados nos dias 3, 7, 10 e 14 após a primeira aplicação de N₂ líquido. Depois de cada irradiação, um rato foi sacrificado e botões de $\phi=6\text{mm}$, correspondendo à pele lesada (irradiada ou controle) e sadia (sem nenhum tipo de patologia) foram retirados e fixados em suporte de metal apropriado. Os suportes contendo a amostra foram congelados em isopentano, um crioprotetor, e armazenados em N₂ líquido.



Figura 8.2: Lesões em um animal que está anestesiado recebendo tratamento com laser.

Para obtenção dos cortes paralelos à superfície da pele sadia e lesada em diferentes espessuras, foi utilizado um micrótomo de congelação modelo HM 500 OM (MICRON LABORGERÄTE GmbH, Alemanha). Como a espessura da epiderme do rato sadia é aproximadamente $45\mu\text{m}$, fatias da pele na espessura de $10\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}$, $30\mu\text{m}$, $40\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ foram obtidas a -21°C e fixadas em lâmina histológica à temperatura ambiente. As amostras foram conservadas a -5°C e,

temperatura ambiente. A lâmina foi posteriormente corada com azul de toluidina para análise morfológica das amostras de pele.

Para estudo do grau de polarização linear nas amostras de pele, utilizou-se a mesma montagem experimental apresentada na figura 8.1, porém na horizontal, acrescida de um analisador depois das amostras. O analisador consistiu em um polarizador Glan-Thompson 10GT04AR.14 (NEWPORT, EUA) acoplado a um goniômetro. As medidas da intensidade do feixe de luz foram realizadas por um detector modelo LM-1 (COHERENT, EUA) após o analisador (figura 8.3). As medidas foram obtidas à temperatura ambiente.



Figura 8.3: Montagem experimental para estudo do grau de polarização linear em amostras de pele.

Com base no trabalho de Sankaran e colaboradores¹⁶⁷, determinou-se o grau de polarização linear para a propagação de luz coerente em meios túrbidos. O grau de polarização é usado para quantificar a quantidade de luz que é polarizada em relação à quantidade de luz que é polarizada ou não-polarizada. Para um grau de polarização $P=1$, a luz é completamente polarizada, ao passo que $P=0$ corresponde à luz completamente não-polarizada.

O grau de polarização linear pode ser obtido da expressão (22). Devido à

zero. Portanto, para cálculo do grau de polarização linear, a lâmina foi posicionada entre os dois polarizadores. Os parâmetros S_0 e S_1 foram obtidos das medidas para $I_{máx}$, que corresponde à intensidade com os polarizadores paralelos e $I_{mín}$, que é a intensidade com os polarizadores ortogonais. Também foram medidas intensidades rotando o analisador a cada 15° . O grau de polarização linear é então:

$$P_L = \frac{S_1}{S_0} = \frac{|I_{máx} - I_{mín}|}{|I_{máx} + I_{mín}|} \tag{31}$$

O gráfico 8.1 é uma representação da intensidade em função do ângulo do analisador e da espessura da amostra, para pele sadia. O ângulo do polarizador foi mantido fixo. Observa-se que quando os polarizadores estão paralelos a intensidade é máxima. Quando eles estão ortogonais, a intensidade é mínima.

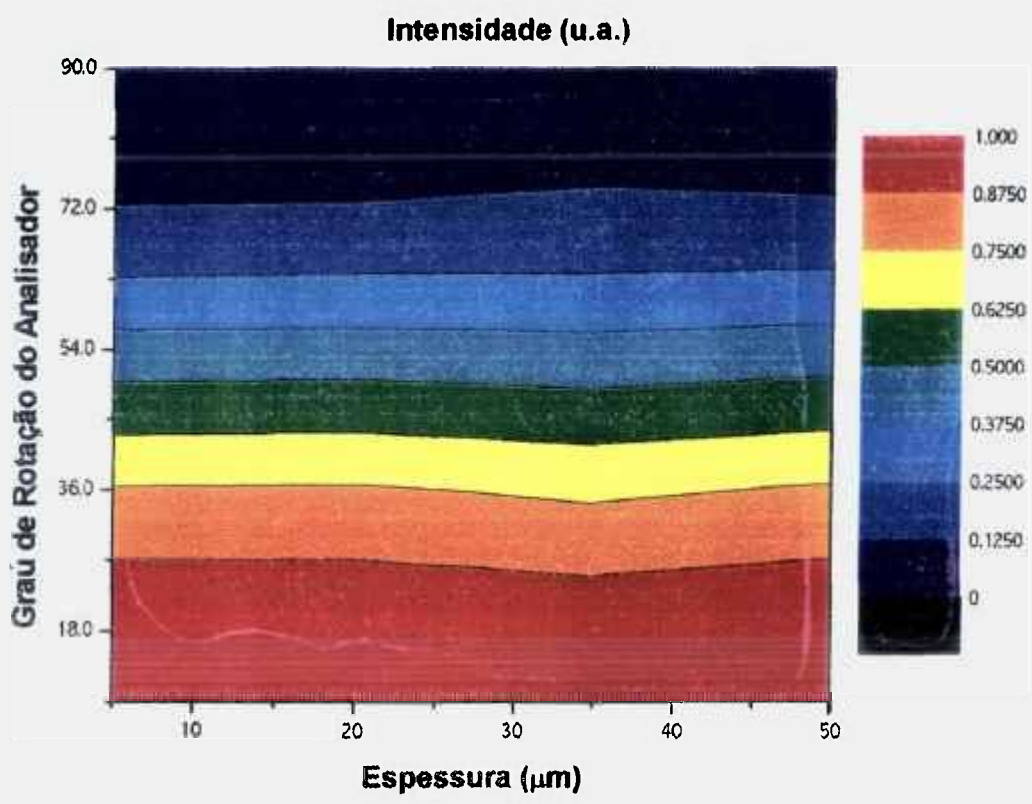


Gráfico 8.1: Intensidade x Ângulo de Rotação do Analisador x

O gráfico 8.2 foi obtido, sem a amostra, para verificação do alinhamento entre os polarizadores. A curva obtida com este gráfico representa a intensidade incidente. O polarizador permaneceu fixo e o analisador foi roçado 360°. Medidas obtidas com a lâmina, sem as amostras de pele, resultaram na mesma curva polar, demonstrando, assim, que a lâmina era isotrópica.

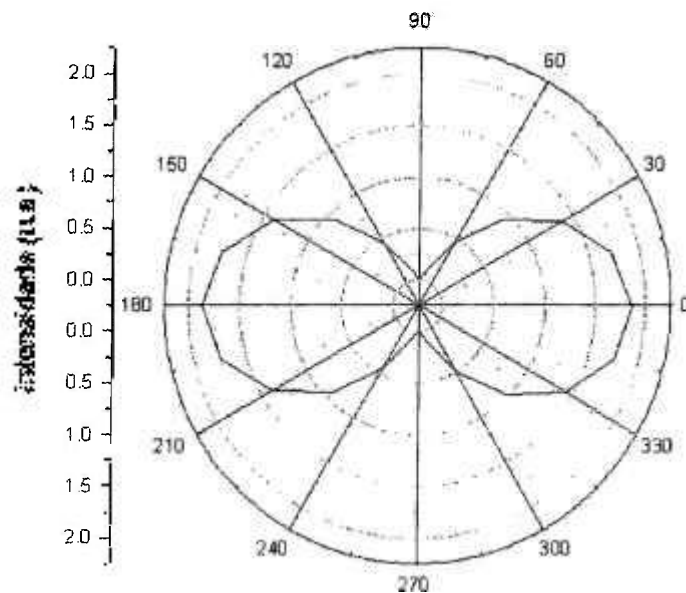


Gráfico 8.2: Representação polar da intensidade incidente.

O gráfico 8.3 mostra o grau de polarização linear para pele sadia e pele lesada (L1) obtida no 3º dia pós-criação da queimadura, em função da espessura da amostra. Neste período, as lesões irradiadas L2 e L3 não apresentaram diferenças significantes em relação ao grau de polarização linear, quando comparadas à amostra controle L1.

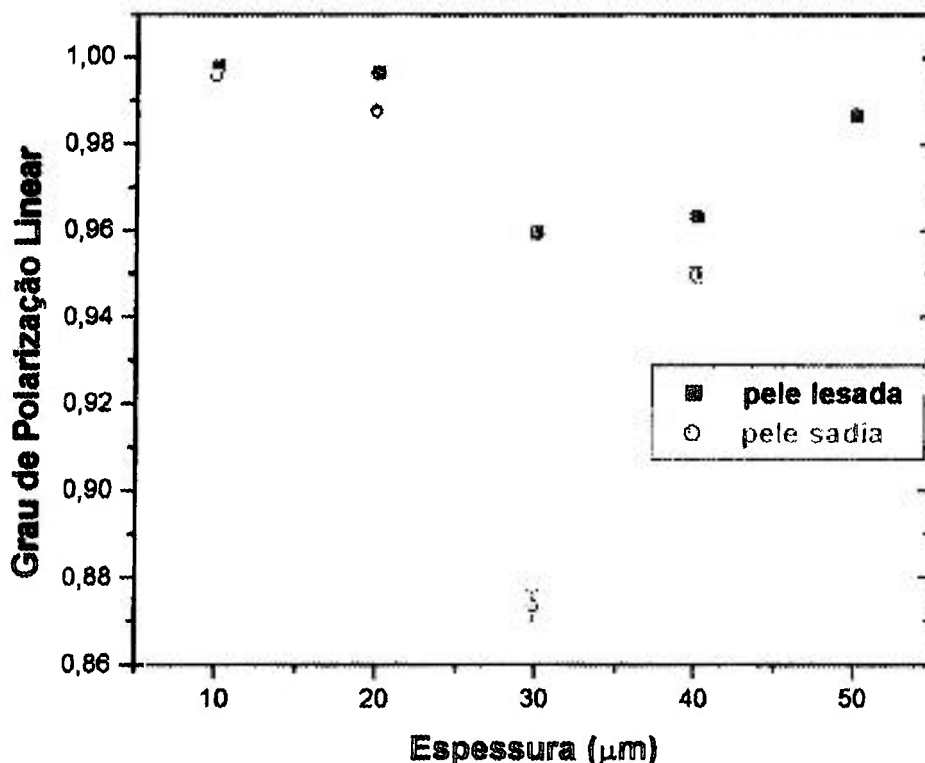


Gráfico 8.3: Grau de polarização linear para pele sadia e lesada obtida no 3º dia após a criação da queimadura.

Observa-se no gráfico 8.3, que a polarização na pele sob condição patológica é mais preservada, quando comparada à pele sadia. Também é possível notar que, na espessura de 30µm, o grau de polarização linear diminui, quando então volta a aumentar na espessura de 40µm. Analisando as amostras ao microscópio de luz, observou-se que na espessura de 30µm, encontra-se a interface epiderme-derme.

O gráfico 8.4 apresenta o grau de polarização linear em função da espessura das amostras de pele (L1, L2 e L3) no dia 7 após a criação das lesões. Os resultados mostram que, neste período, ainda na fase inflamatória do processo de cicatrização, o grau de polarização linear não apresenta diferença significativa entre as lesões.

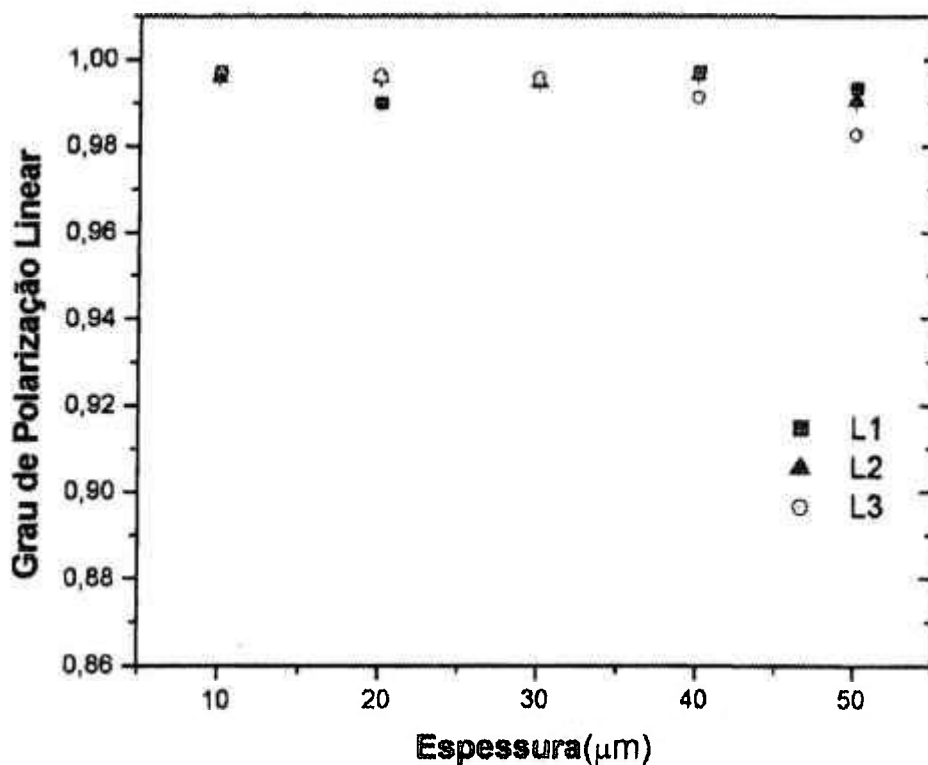


Gráfico 8.4: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 7º dia após a criação da ferida.

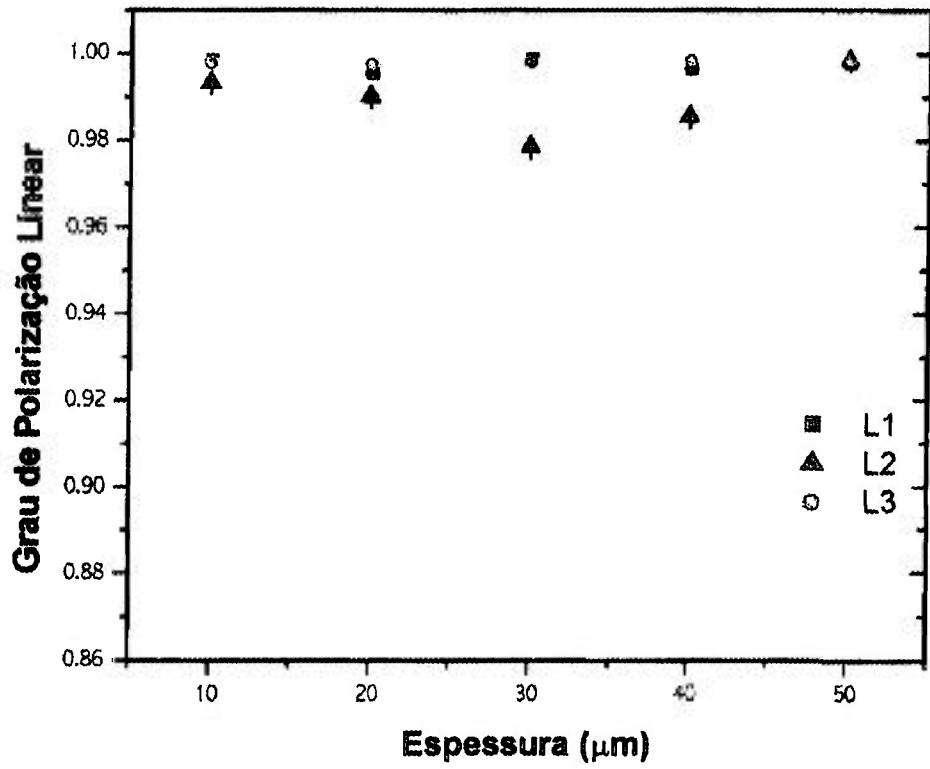


Gráfico 8.5: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 10^o dia após a criação da ferida.

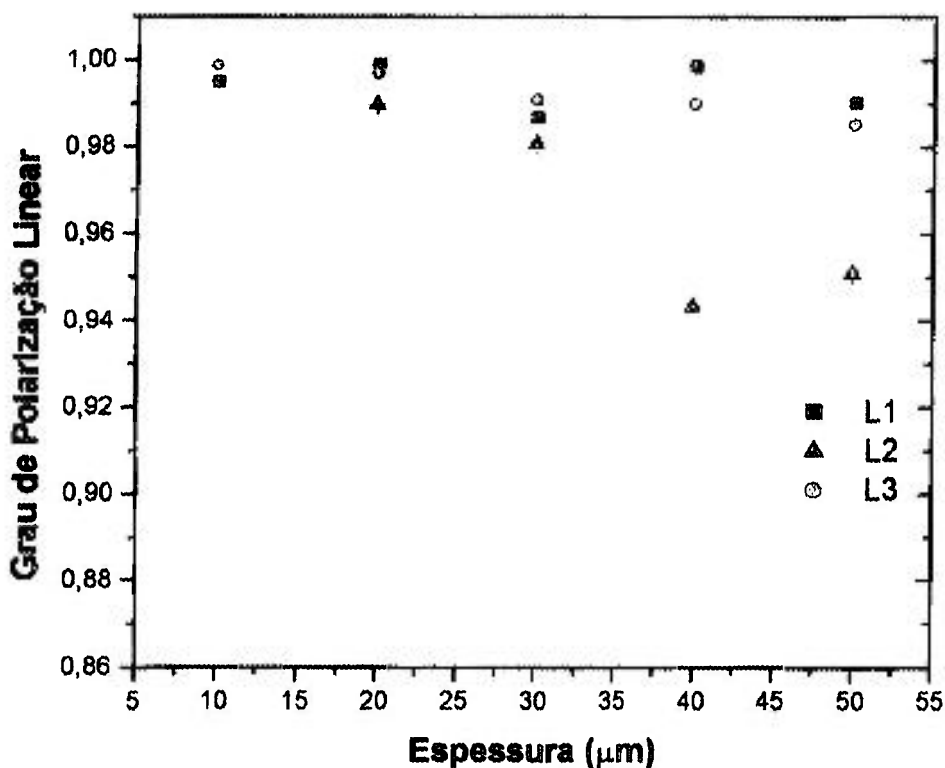


Gráfico 8.6: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 14º dia após a criação da ferida.

Observa-se nos gráficos 8.5 e 8.6, que a lesão L2 possui um grau de polarização linear mais baixo, quando comparado às lesões L1 e L3, nas espessuras de 40μm e 50μm. Este resultado sugere que a lesão L2, neste período, está num estágio de cicatrização mais avançado em relação às lesões L1 e L3, conforme será comprovado no próximo capítulo, pois o grau de polarização linear se reduz àquele da pele sadia, que foi anteriormente observado no gráfico 8.3.

A tabela 8.1 apresenta algumas das propriedades ópticas obtidas para a pele no comprimento de onda 632,8nm. Dos dados obtidos na literatura, é possível estimar o comprimento de despolarização na derme de rato sadia:

$$\mu_a = 0,22 \text{cm}^{-1}$$

$$\mu'_s = 23 \text{cm}^{-1}$$

$$l_s = \frac{1}{0,22 + 23} \approx 430 \mu\text{m} \quad (32)$$

O comprimento característico de despolarização para um caminho de $n+1$ espalhamentos, no regime de espalhamento Mie, pode ser calculado como:

$$\zeta_L = \frac{l_s}{\ln \frac{10}{7}} \approx 1206 \mu\text{m} \quad (33)$$

e o comprimento característico de despolarização para a geometria da superfície é dado por:

$$z_{D1} = \left(\frac{\zeta_L k}{3} \right)^{\frac{1}{2}} \approx 416 \mu\text{m} \quad (34)$$

Pode-se dizer, portanto, que a luz laser de He-Ne linearmente polarizada propaga-se na derme de rato sadia, cuja espessura é aproximadamente 1mm, cerca de 416 μm até completa despolarização.

Tabela 8.1: Propriedades ópticas da pele para $\lambda=632,8$ nm.

camada	amostra	μ_a, cm^{-1}	μ_s, cm^{-1}	μ_t, cm^{-1}	μ'_s, cm^{-1}	g	$\mu_{\text{ef}}, \text{cm}^{-1}$	referência
epiderme	leitão	$1,0 \pm 0,1$	492 ± 17		$22,7 \pm 0,8$	$0,953 \pm 0,01$		168
epiderme	humana	35	450		88	0,80		169
derme	leitão	$0,89 \pm 0,1$	289 ± 7		$21,1 \pm 0,4$	$0,926 \pm 0,02$	$7,1 \pm 0,5$	168
derme	coelho	$0,33 \pm 0,02$	306 ± 12		$31,6 \pm 2,2$	$0,898 \pm 0,007$	$5,4 \pm 0,2$	168
derme	rato	0,22			23		3,9	170
derme	humana	1,5			50,2			144
derme	humana	$1,9 \pm 0,6$			$23,8 \pm 3,3$			171
derme	humana	2,7	187	190	35,5	0,81		172
derme	humana	2,0	187	189	37	0,80		169
derme	caucasiana	$0,33 \pm 0,09$			$27,3 \pm 5,4$			173
derme	negróide	$24,1 \pm 1,53$			$32,1 \pm 20,4$			173

9. Procedimento Experimental

9.1. Microscopia de luz

Neste experimento, foram utilizados 20 ratos machos adultos Wistar provenientes do biotério do IPEN, com massa corpórea aproximada 300g. Os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico, tricotomizados na região dorsal e submetidos ao mesmo procedimento descrito no capítulo 8, na seção 8.2 desta tese. Foram criadas três queimaduras com N₂ líquido na parte inferior do dorso do rato. Com um “dedo frio”, foi aplicado N₂ líquido por cinco segundos, duas vezes consecutivas, com intervalo de tempo de cinco minutos entre as aplicações. A aplicação foi repetida por três dias consecutivos, sendo a primeira irradiação laser feita após a última aplicação de N₂ líquido.

A fonte de luz foi o laser de He-Ne e o procedimento para irradiação das lesões também foi anteriormente relatado em 8.2. A montagem experimental utilizada foi mostrada na figura 8.1.

Nos 20 animais utilizados, foram criadas três lesões, conforme mostrou a figura 8.2. A lesão #1 foi a lesão controle (sem irradiação- L1); na lesão #2 incidiu-se luz He-Ne, cuja polarização foi alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal (L2) e a lesão #3 foi irradiada pelo laser He-Ne, cuja polarização foi alinhada à direção perpendicular relativa (L3).

Os animais foram irradiados nos dias 3, 7, 10 e 14 após a primeira aplicação de N₂ líquido. Depois de cada irradiação, quatro ratos foram sacrificados para obtenção das amostras destinadas aos estudos histológicos. No dia 17, foram sacrificados os últimos animais. Após sacrifício, as feridas foram removidas e fixadas em líquido de Bouin durante 6 horas. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e depois diafanizadas em xilol. Os espécimes foram, então, infiltrados em paraplast e cortados na espessura de 5 µm. As

lâminas assim obtidas foram coradas com HE e observadas ao microscópio de luz.

9.1.1. Resultados

A figura 9.1 mostra uma fotomicrografia de pele de rato sadia. A pele está revestida por uma camada fina e contínua de epiderme. Na derme, predominam feixes espessos de colágeno, entre os quais observam-se poucos fibroblastos com núcleo fortemente corado pela hematoxilina. Alguns anexos da pele, como glândulas sebáceas e folículos pilosos, também são observados.

A análise histológica mostrou que o processo de cicatrização varia significativamente entre os grupos irradiados e controle. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos nos dias 3 e 7. Nestes grupos, tanto nas áreas irradiadas, quanto nas não-irradiadas, a região lesada estava ainda desprovida de epiderme. Na derme subjacente, foi observada uma variedade de células inflamatórias e restos de células. As células predominantes eram neutrófilos, porém, monócitos, macrófagos e algumas células gigantes de corpo estranho também estavam presentes. Os vasos sanguíneos mostraram-se dilatados e, em sua maioria, preenchidos com células sanguíneas (figura 9.2).

A partir do dia 10, pôde-se observar alguns sinais de reparo da epiderme nos grupos irradiados. Em ambos os lados da ferida, a camada epitelial havia migrado sobre um tecido conjuntivo frouxo que continha fibroblastos ativos, formados na derme subjacente durante o período de reparação. É importante observar que o processo de reepitelização foi mais rápido nos grupos irradiados, quando comparados com o controle não-irradiado (figura 9.3).

Após 14 dias da criação das feridas, observaram-se algumas diferenças morfológicas na pele, quando os grupos irradiados e controle foram comparados. Os animais irradiados mostraram uma reepitelização mais avançada em relação ao controle. Entretanto, em ambos os grupos, a derme subjacente ainda apresentava-se infiltrada por grande quantidade de células inflamatórias e restos

de células, particularmente nas áreas da pele ainda não-epitelizadas (figuras 9.4 e 9.5).

Após 17 dias do início do experimento, a lesão controle não estava ainda completamente reepitelizada. A derme desta ferida mostrava ainda um extenso processo inflamatório, bem como restos de células (figura 9.6).

A influência da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade, no processo de cicatrização de feridas, depende da polarização do campo elétrico quando um laser de He-Ne é usado. A lesão #2, que foi irradiada com a polarização do laser alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal, estava completamente cicatrizada após 17 dias. Os cortes histológicos mostraram a superfície da pele que havia sido queimada, completamente recoberta por uma camada epitelial, que se apresentava mais espessa que a epiderme normal. A derme reparada foi formada por um tecido conjuntivo frouxo composto principalmente por fibroblastos, que apresentavam ampla área citoplasmática fortemente corada pela hematoxilina, o que indica alta atividade metabólica, conforme mostra a figura 9.7.

A epiderme da lesão #3, que foi iluminada pelo laser de He-Ne com a polarização alinhada perpendicularmente à coluna vertebral do animal, estava também reepitelizada após 17 dias. Entretanto, embora a derme subjacente contivesse muitos fibroblastos ativos como na L2, um processo inflamatório moderado ainda estava presente, indicando que o processo de cicatrização não havia sido completado (figura 9.8).

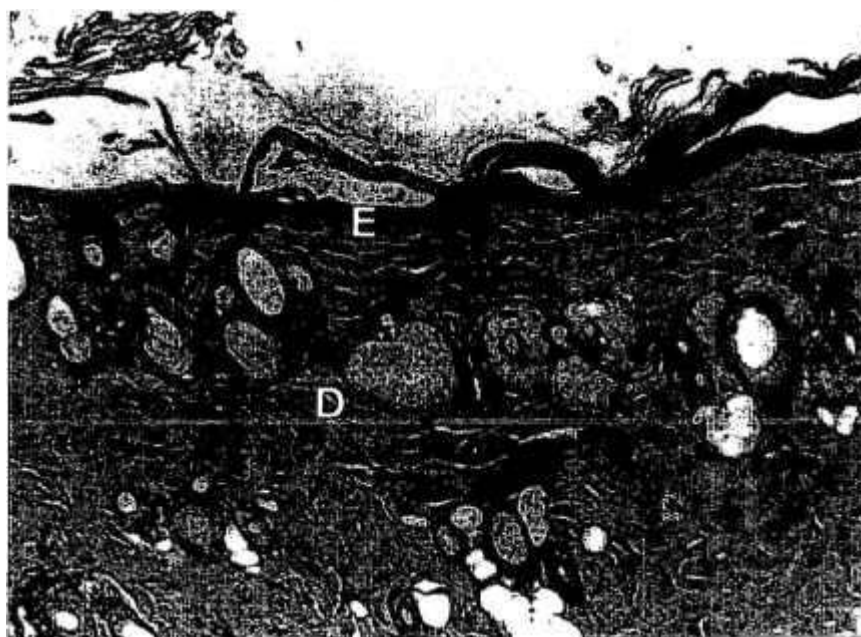


Figura 9.1: Fotomicrografia de pele sadia de rato. Observa-se uma epiderme delgada (E) revestindo uniformemente a superfície da pele. A derme subjacente (D) exhibe grande quantidade de feixes de colágeno, poucas células do tecido conjuntivo e anexos da pele: glândulas sebáceas e folículos pilosos. HEX80.



Figura 9.2: Fotomicrografia de L2 obtida no 7^o dia pós-criação da ferida. Observa-se na borda direita desta figura, bem como na derme superficial (D), um acúmulo de células com núcleos densos indetificando áreas de necrose (★). HEX80.

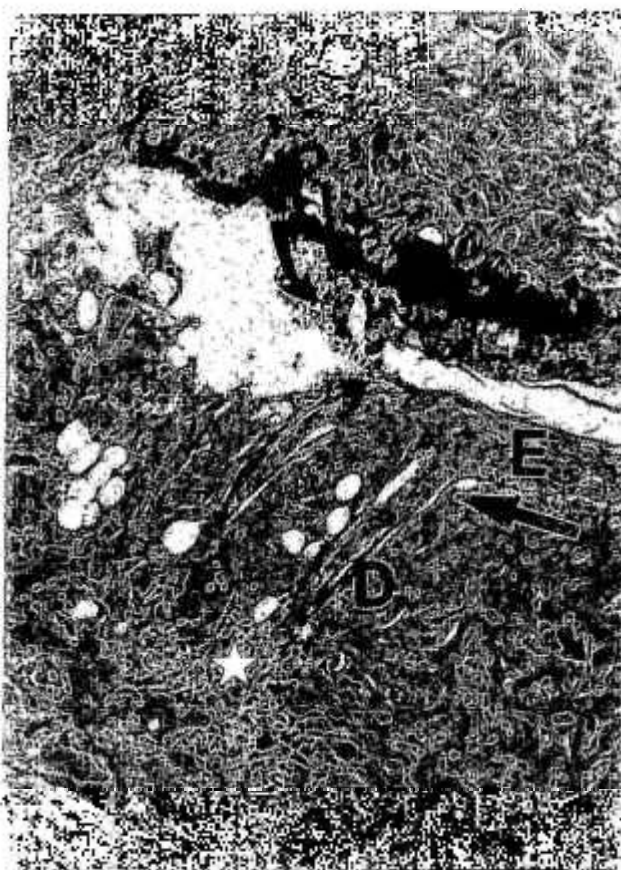


Figura 9.3: Fotomicrografia de L2 obtida no 10º dia pós-operatório. Observa-se na borda esquerda da figura, uma região já recoberta por epitélio (E). A seta indica a direção de reepitelização. A derme subjacente (D) apresenta fibroblastos com amplo citoplasma, características morfológicas de ativação celular (seta curva pequena). Na porção inferior esquerda, a derme ainda apresenta um infiltrado inflamatório (★). Notar a neovascularização da região de reparo. A superfície da pele ainda contém restos de células mortas (seta curva). HEX80.



Figura 9.4: Fotomicrografia de L1 obtida no 14^o dia pós-criação da lesão. Observa-se que a epiderme (E) ainda não recobriu completamente a área lesada (★). Restos celulares estão depositados na superfície da pele (seta).

HEX80.



Figura 9.5: Fotomicrografia de L2 obtida no 14^o dia do experimento. A derme (D) encontra-se completamente revestida por um novo epitélio (E). Observa-se também na derme superficial uma concentração de fibroblastos com cromatina frouxa e ampla área de citoplasma (seta). HEX80.

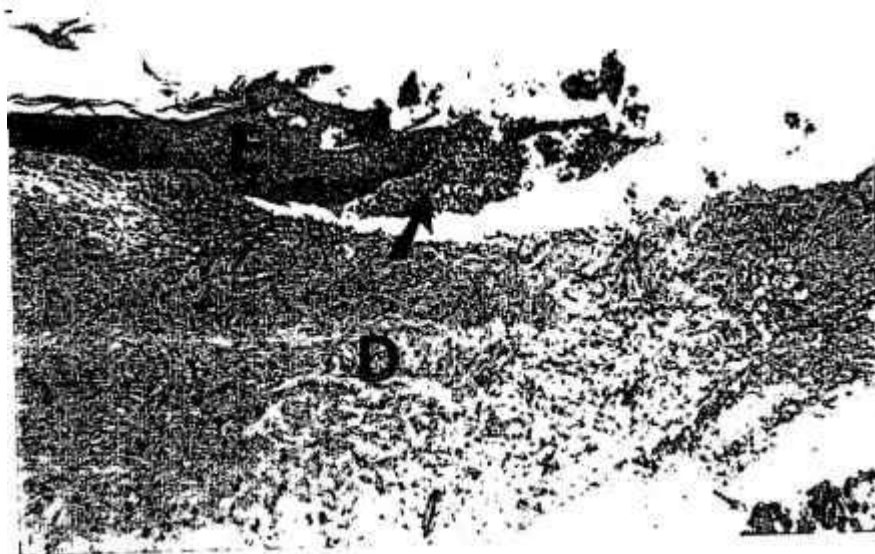


Figura 9.6: Fotomicrografia de uma pele não-irradiada (L1) obtida no dia 17. Observa-se uma grande área da derme (D) ainda desprovida de epitélio (E). Restos de células podem também ser observados próximo à superfície da pele lesada (seta). HEX40.

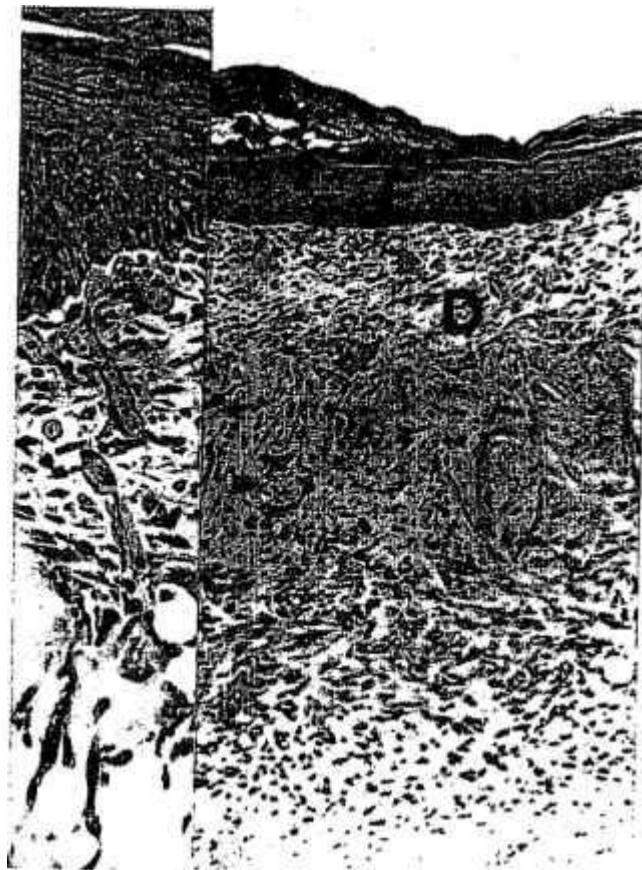


Figura 9.7: Fotomicrografia de L2 obtida no 17º dia. Observa-se que a área lesada está completamente recoberta por uma epiderme (E). A derme (D) é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, rico em fibroblastos com citoplasma amplo e basófilo (HEX80). O detalhe mostra em maior aumento uma região de reparo ricamente vascularizada e fibroblastos com ampla área de citoplasma, que contrasta com o conjuntivo denso subjacente.

HEX200.



Figura 9.8: Fotomicrografia de L3 obtida no dia 17 pós-criação da lesão. A epiderme (E) está completamente restaurada, entretanto, a derme (D) subjacente ainda mostra sinais de remodelação, estando a derme profunda ainda infiltrada por um grande número de células inflamatórias (★). HEX40.

9.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Neste experimento, 15 camundongos (*Mus musculus*) machos (F2) adultos, obtidos do cruzamento de machos F1 (AKR x NZW) com fêmeas F1 (Balb/c x A/J) fornecidos pelo Biotério do ICB/USP, com idade entre quatro e cinco meses, foram utilizados. Os animais foram mantidos com ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram tricotomizados no dorso, onde foram criadas duas queimaduras circulares de 6 mm de diâmetro com o uso do “dedo frio”, conforme procedimento descrito em 8.2. Os animais foram divididos em cinco grupos de três animais cada. Em cada grupo, uma lesão foi deixada para controle (sem irradiação- L1) e a outra foi irradiada com o laser de He-Ne, cuja polarização foi alinhada à coluna vertebral (L2) ou com a direção perpendicular relativa (L3). A figura 9.8 mostra as lesões criadas no dorso de camundongos.

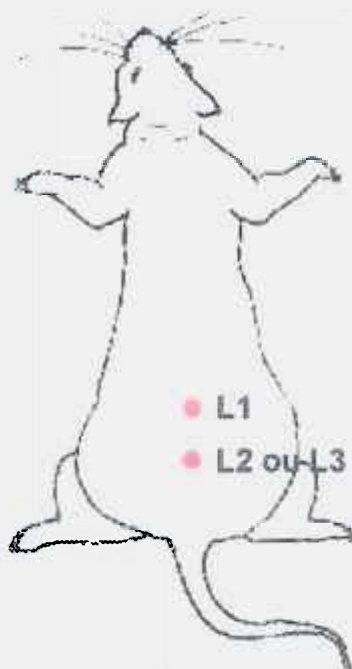


Figura 9.9: Lesões criadas na pele de camundongos.

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com Avertin (0,5g 2,2,2-tribromoetanol [Aldrich Chemical Company], 0,31mL de álcool amílico terciário e 39,5mL de água destilada) na dose de 0,025mL/grama de massa

corporal. O procedimento para irradiação das lesões seguiu o mesmo protocolo descrito na seção 8.2.

Cada grupo de animais foi sacrificado através de deslocamento cervical nos dias 3, 7, 10, 14 e 17, conforme protocolo. As amostras de pele foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,1M – pH 7,2-7,3).

As amostras permaneceram no fixador por, aproximadamente, 72 horas, seguindo-se a lavagem das mesmas em 4 banhos de 15 minutos em tampão cacodilato 0,1M; pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% e tampão cacodilato 1:1 0,2M por 2 horas. A desidratação foi realizada através da imersão das amostras em concentrações crescentes de álcool etílico. Após a desidratação, iniciou-se o procedimento de inclusão das amostras, que consistiu em imersão destas em óxido de propileno puro; em óxido de propileno e resina spurr 2:1 *overnight*; em óxido de propileno e resina spurr 1:1 por 6 horas e finalmente, em resina spurr pura *overnight*. As amostras foram então incluídas em resina spurr pura e armazenadas em estufa a 72°C durante 3 a 5 dias para que o processo de polimerização fosse completado.

Cada uma das lesões foi dividida em dois fragmentos, totalizando 60 blocos ao final do processamento. Cada bloco foi aparado com o auxílio de uma lâmina de aço e foram feitos cortes histológicos semifinos de 2µm com o auxílio de navalhas de vidro, utilizando um “Pyramitome” (LKB). Os cortes foram corados com azul de toluidina 1% e analisados ao microscópio de luz para avaliação do material e seleção de áreas para análise posterior em microscopia eletrônica.

9.2.1. Resultados

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle (L1), 14 ou 17 dias após a criação das lesões. Da mesma forma, os grupos tratados (L2 e L3) não apresentaram diferenças quando estes dois períodos foram comparados. Entretanto, entre as três lesões analisadas, L2 mostrou um processo

de cicatrização mais avançado em relação às demais. L3 estaria num estágio mais avançado de cicatrização, quando comparada à pele não-irradiada L1, porém, menos desenvolvido do que L2.

9.2.1.1. Ativação Celular

Na amostra L3, pôde ser observado que os fibroblastos continham grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, demonstrando grande atividade de síntese e secreção de macromoléculas. Ao mesmo tempo, os fibroblastos apresentavam grande quantidade de fagossomos contendo fibrilas de colágeno parcialmente digeridas, indicando o envolvimento destas células com a reabsorção destes componentes da matriz extracelular. Estas células apresentavam recessos citoplasmáticos que envolviam grupos de fibrilas delgadas de colágeno. Provavelmente, esta disposição auxilia a orientação das fibrilas no espaço extracelular. Essas observações indicam claramente a ocorrência de intensa remodelação dos componentes da matriz extracelular que acompanha o processo de cicatrização. Em ambas as amostras, foi observado um infiltrado inflamatório, constituído principalmente por polimorfonucleares, particularmente por neutrófilos (figura. 9.10).

Estas características morfológicas também foram encontradas nos fibroblastos da amostra controle L1, porém em intensidade muito menor, principalmente no que se refere à reabsorção da matriz. Algumas regiões aparentavam estar mais ativadas devido à maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de recessos celulares. Entretanto, em algumas células, as cisternas do REG mostraram-se excessivamente dilatadas, o que pode indicar perda do potencial elétrico de sua membrana e conseqüente sofrimento celular. Algumas células apresentavam citoplasma excepcionalmente elétron-denso, o que também indica morte celular. (figura 9.11).

Em L2, assim como em L3, foi possível observar uma maior ativação dos fibroblastos, deduzida a partir da observação do grande desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso, o que espelha sua atividade de síntese e

secreção de macromoléculas. Contudo, fagossomos contendo fibrilas de colágeno com sinais de digestão parcial não foram observados com tanta frequência quanto em L3, o que denota uma menor reabsorção da matriz antiga em comparação com L3 (figura 9.11). Por outro lado, notou-se uma maior quantidade de fibrilas finas (portanto novas) de colágeno localizadas nas imediações da superfície dos fibroblastos. Tais achados sugerem uma maior atividade de síntese, em detrimento da reabsorção, de componentes da matriz extracelular, indicando que o processo cicatricial provavelmente se encontrava mais avançado em relação a L3, cujas células ainda exibiam sinais de atividade de reabsorção da MEC. As atividades de degradação e síntese de moléculas da MEC são fenômenos essenciais no processo de cicatrização. O resultado final do reparo tecidual depende de um correto equilíbrio entre estas duas atividades celulares. Neste trabalho, a reabsorção, aparentemente, antecede a síntese “de novo” de moléculas da MEC. Também foram encontrados recessos citoplasmáticos envolvendo principalmente as fibrilas muito delgadas de colágeno, provavelmente recém-sintetizadas.

9.2.1.2. Matriz Extracelular

Na amostra L3, observou-se que as fibrilas de colágeno estavam em maior quantidade, apresentavam-se compactadas e dispostas em feixes em diferentes sentidos. O número de fagossomos contendo colágeno era menor quando comparado com a amostra controle L1 (figura 9.13).

Em L1, observou-se uma menor quantidade de fibrilas de colágeno, as quais eram mais curtas e finas, sem uma orientação definida. Estas fibrilas eram mais espaçadas entre si e exibiam perda parcial do bandeamento característico do colágeno. Foram observados sinais de degradação extracelular de componentes da MEC, sobretudo próximo às áreas de necrose. Nestes locais, os feixes de colágeno estavam desorganizados e apresentavam áreas claras entre eles. Várias células com citoplasma elétron-denso também foram observadas nestas áreas (figura 9.14).

Em L2, foi observada uma maior quantidade de fibrilas de colágeno, as quais se apresentavam compactadas, muito bem organizadas e orientadas numa mesma direção, formando verdadeiros feixes de colágeno (figura 9.15).

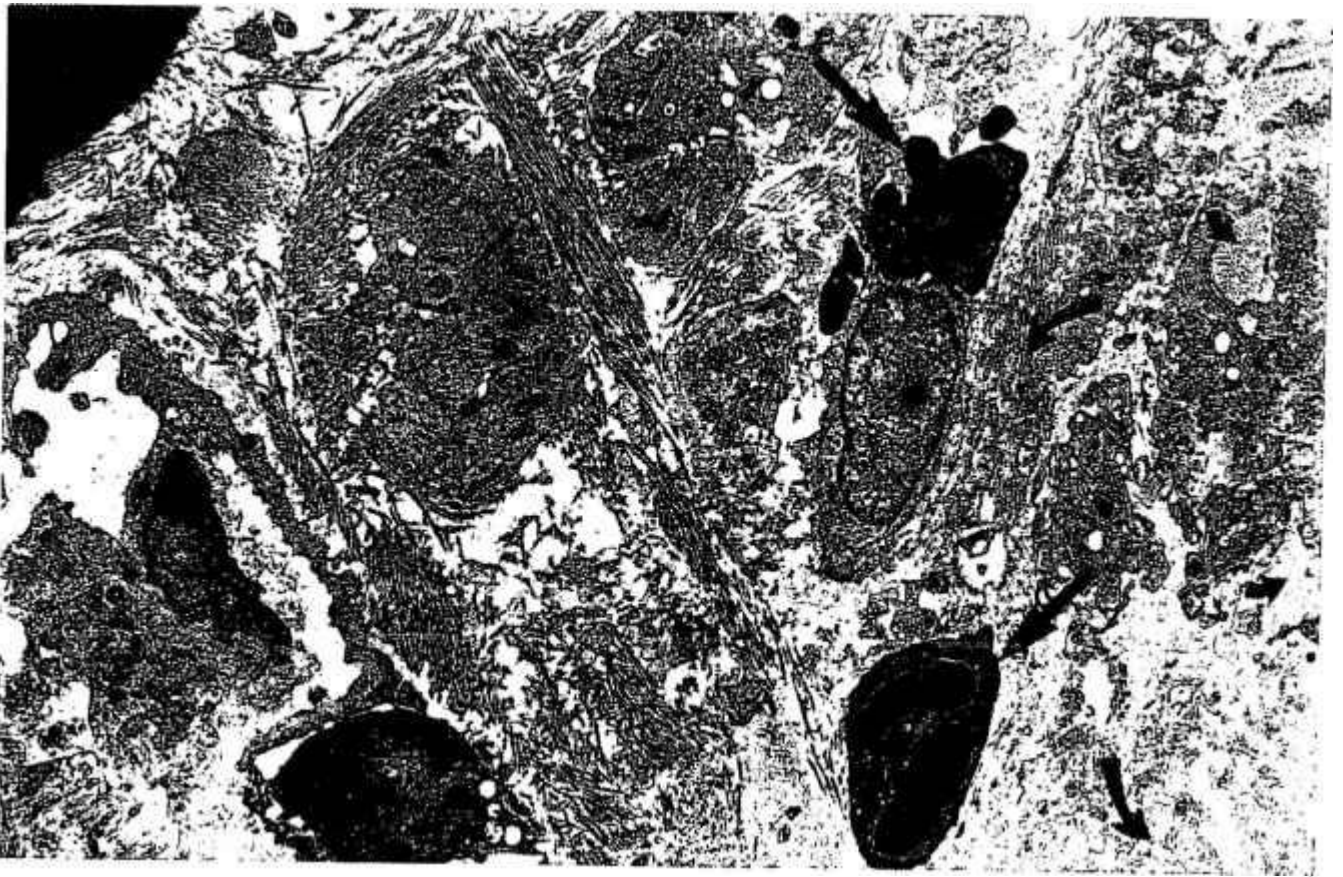


Figura 9.10.: Elétron-micrografia da derme de L3 no 14º dia pós-criação da queimadura. Observa-se que os fibroblastos apresentam grande quantidade de REG nos seus citoplasmas (seta curva). Nota-se grande quantidade de recessos citoplasmáticos contendo fibrilas de colágeno compactadas (seta curva pequena). Observa-se também infiltrado inflamatório neutrofílico no interstício (seta). 2700X.

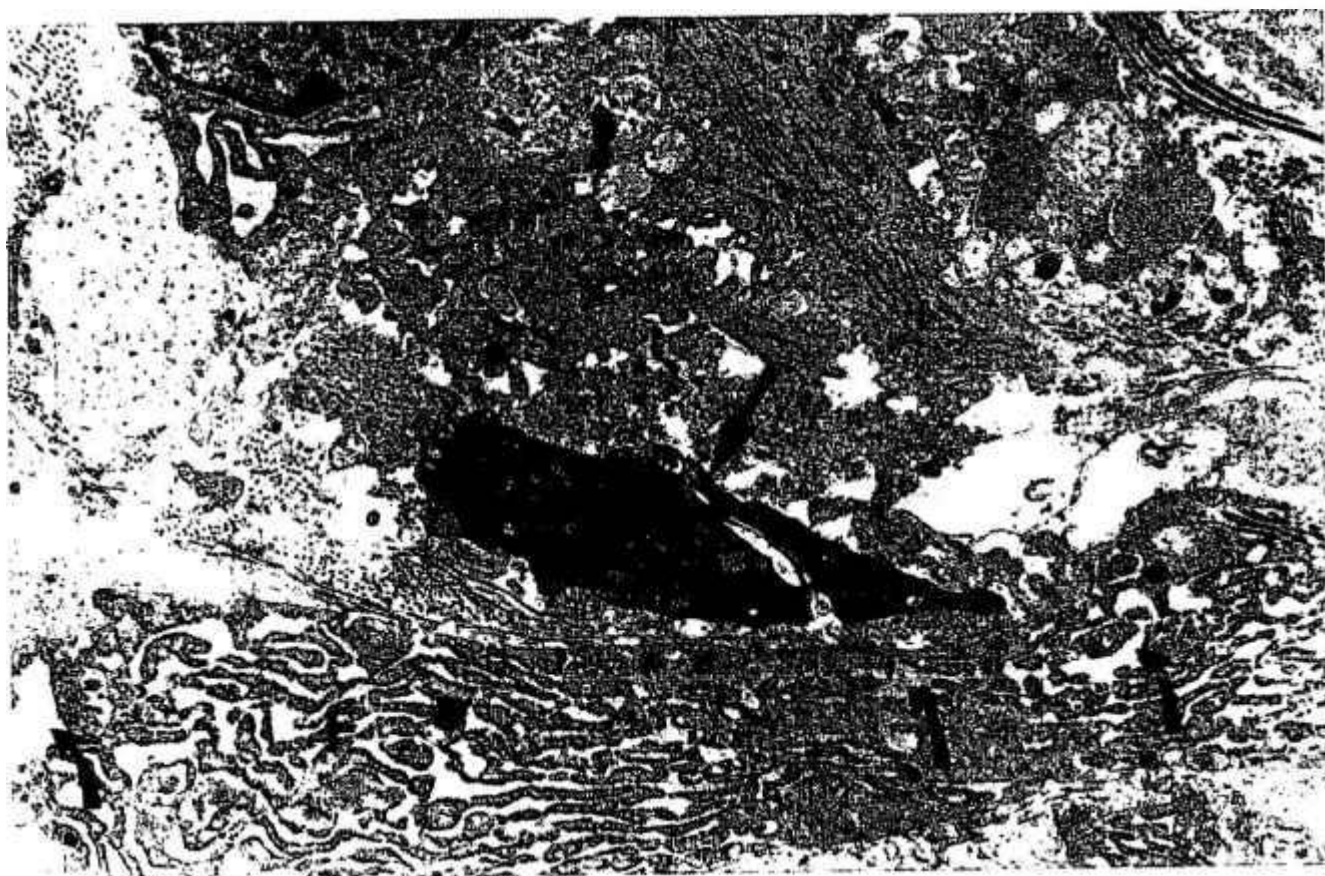


Figura 9.11: Elétron-micrografia da derme de L1 no 14º dia pós-criação da lesão. Observa-se parte do citoplasma de um fibroblasto (F) que apresenta um retículo endoplasmático com cisternas extremamente dilatadas (setas curvas). A seta longa aponta uma porção de um fibroblasto, que apresenta uma excessiva elétron-densidade, indicando morte desta célula. 5000X.



Figura 9.12: Montagem de micrografia eletrônica de região da derme de L2, após 14 dias da criação da lesão. A figura mostra um fibroblasto que exhibe um REG bastante desenvolvido (seta curta). O citoplasma destas células mostra ainda fagossomos contendo fibrilas de colágeno (seta longa). Nota-se ainda a presença de fibrilas delgadas de colágeno adjacente aos fibroblastos (seta curva longa), por vezes envolvidas por prolongamentos celulares (seta curva pequena), que formam uma abundante rede de recessos na superfície celular. 14720X.

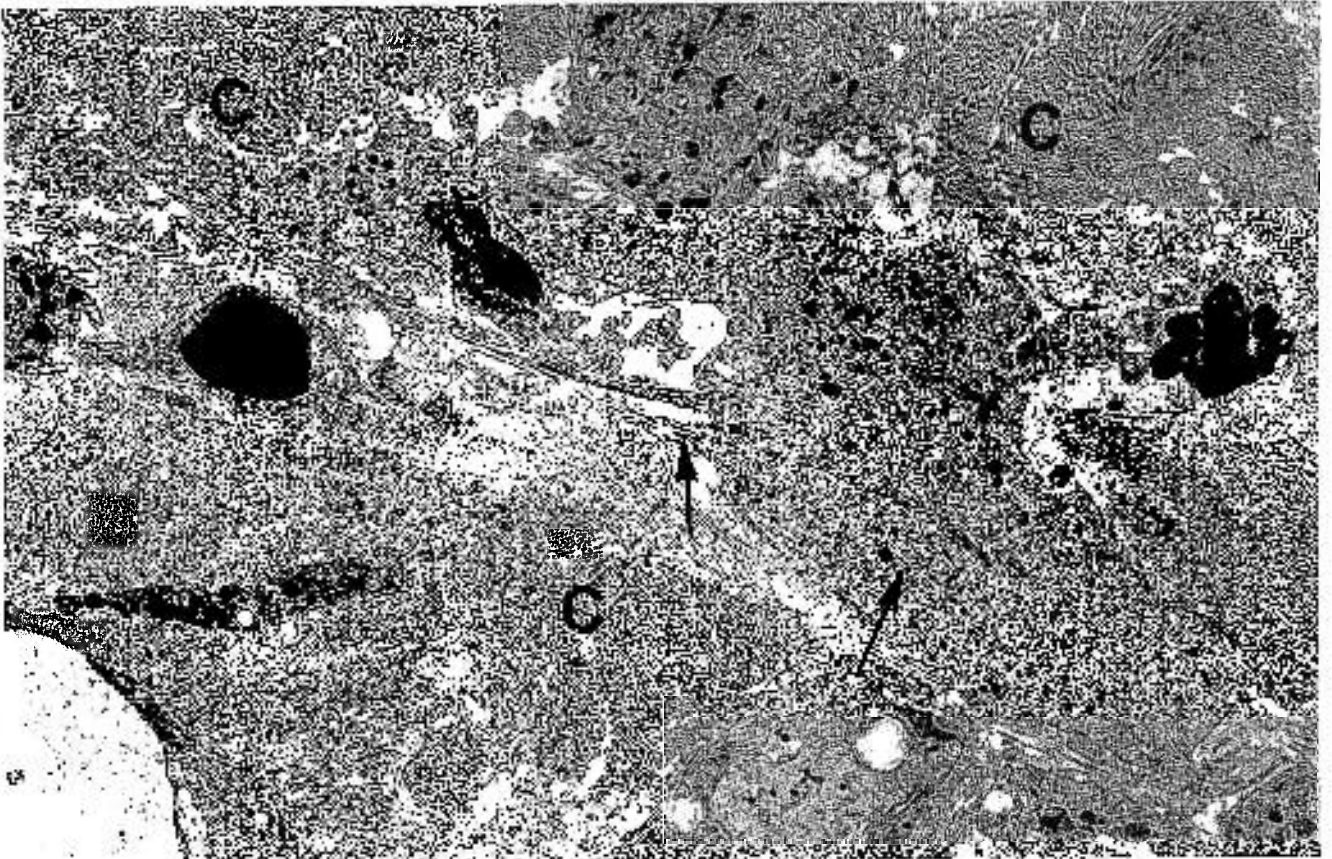


Figura 9.13: Micrografia eletrônica da derme de L3 no 14º dia pós-operatório. Em pequeno aumento, observa-se a distribuição das fibrilas de colágeno (C) na matriz extracelular. Pode-se notar fibrilas longas e espessas organizadas em feixes dispostos em diferentes sentidos. Observa-se também, no centro da foto, um fibroblasto com características morfológicas de uma célula altamente envolvida na síntese de macromoléculas para exportação. Nota-se ainda certo número de fagossomos de colágeno (setas). 2000X.

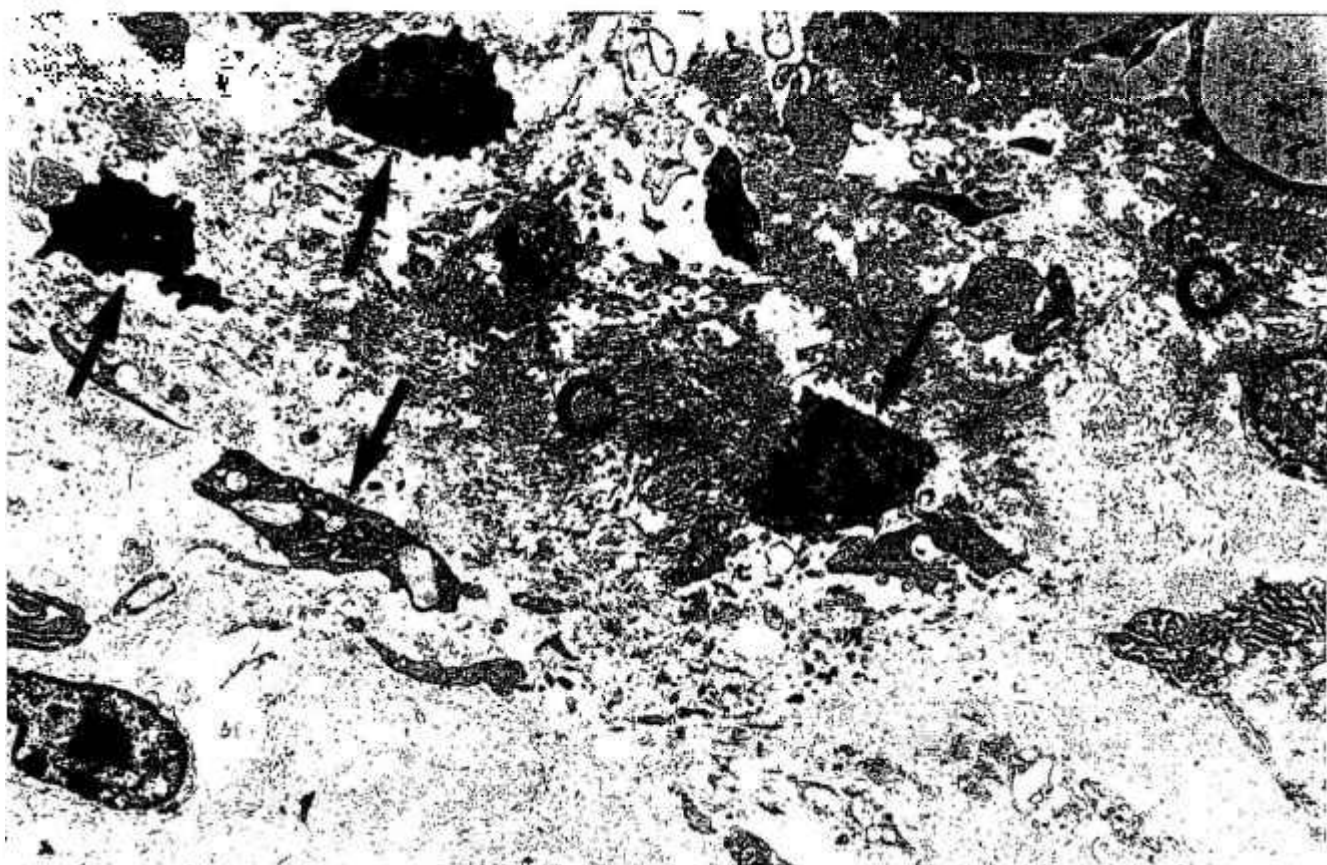


Figura 9.14: Elétron-micrografia da derme de L1 no 17º dia. Observam-se fibrilas de colágeno finas (C), desorganizadas e espaçadas, quando comparadas com o grupo tratado. Também nota-se a presença de células elétron-densas, com núcleo de cromatina condensada, indicando morte celular, além de restos celulares (setas). 2700X.

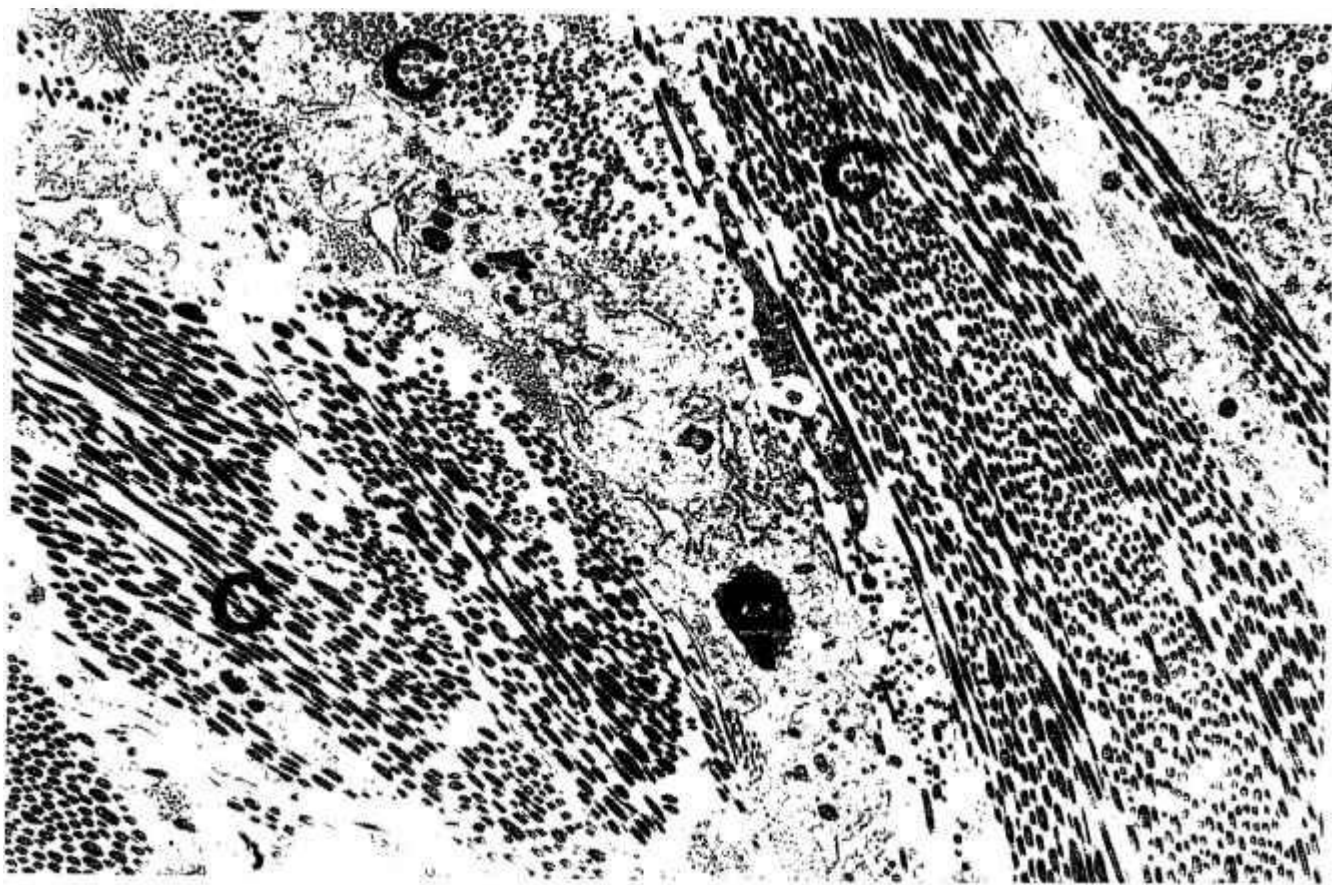
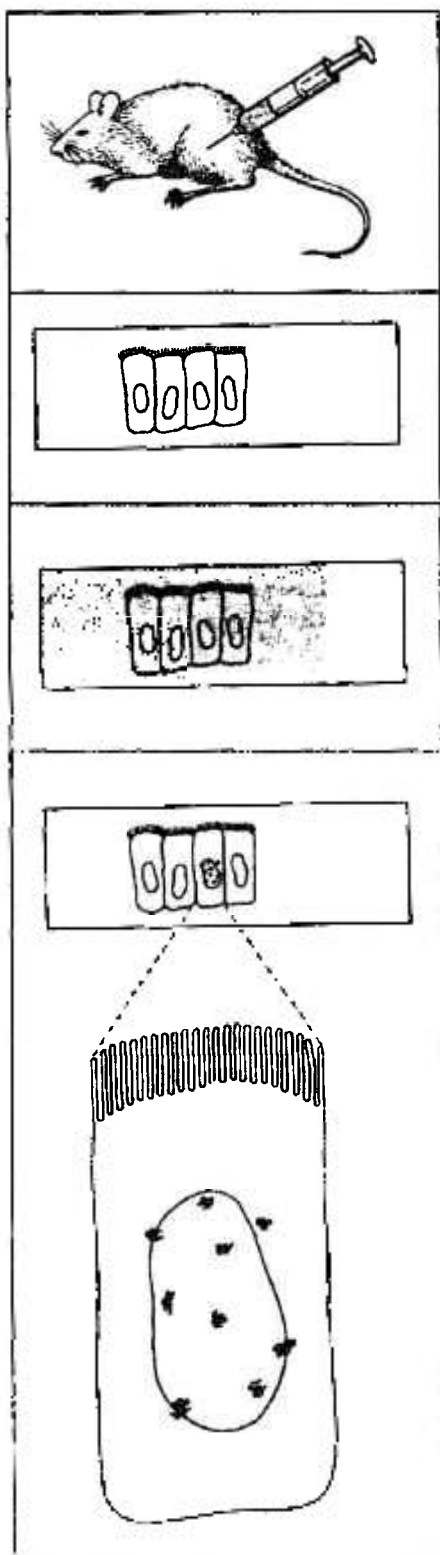


Figura 9.15: Micrografia eletrônica da derme de L2 após 17 dias da criação da queimadura. A matriz extracelular é ocupada por fibrilas de colágeno (C) muito bem organizadas e orientadas no tecido em uma mesma direção, no mesmo feixe. O diâmetro das fibrilas de colágeno é bastante heterogêneo, o que indica a presença de fibrilas sintetizadas em diferentes períodos.

5600X.

9.3. Estudo radioautográfico

A radioautografia é uma técnica bastante sofisticada, que torna possível a localização de substâncias radioativas nos tecidos. Baseia-se no efeito das radiações ionizantes sobre emulsões fotográficas. Nesta técnica, os cristais microscópicos de brometo de prata, presentes na emulsão fotográfica, agem como microdetectores da radioatividade. Os cristais atingidos pela radiação, depois de revelados, transformam-se em grãos de prata metálica, que aparecem negros ao microscópio, denunciando a presença de radioatividade nas estruturas com as quais estão em contato. Para se obter uma radioautografia, um corte de órgão com o isótopo radioativo injetado previamente no animal é posto em contato íntimo com uma película de emulsão fotográfica. Depois do período de exposição, a película é revelada e os pontos negros que nela aparecem vão corresponder aos locais do órgão que contém o isótopo. A figura 9.16 exemplifica o método radioautográfico para estudo da síntese de DNA pela injeção de ^3H -timidina .



Injeta-se ^3H -timidina no animal que será sacrificado uma hora depois.

As células que estiverem sintetizando DNA incorporarão a timidina radioativa injetada.

Os tecidos são fixados, incluídos em parafina, cortados no micrótomo e presos em lâmina histológica.

Na câmara escura, a lâmina é coberta com delgada câmara de emulsão fotográfica e guardada em caixa à prova de luz por alguns dias ou meses, para que a radioatividade atue na emulsão.

Após esse período, a lâmina é revelada, aparecendo grânulos negros de prata sobre os núcleos radioativos.

Conclusão: das três células, apenas uma estava sintetizando DNA no momento da injeção de ^3H -timidina.

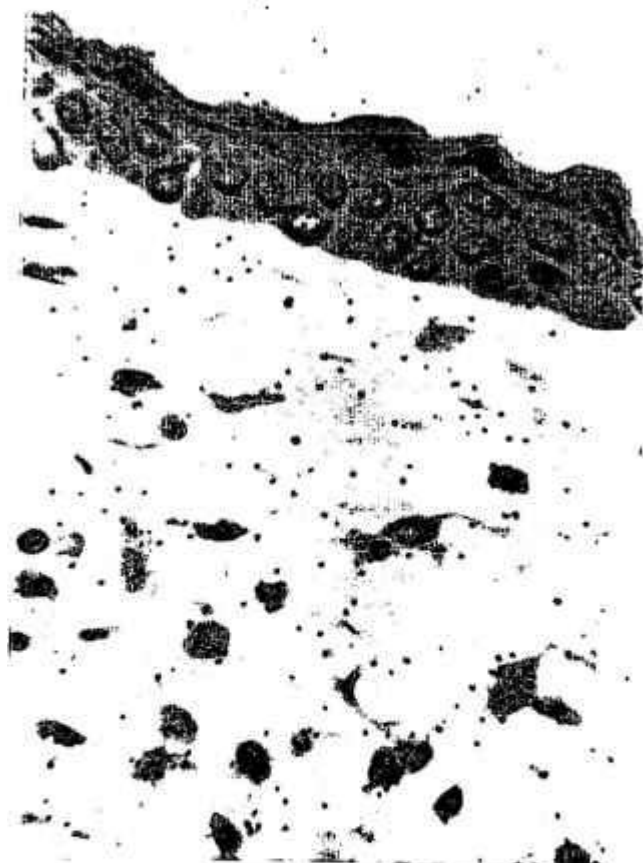
Figura 9.16: Esquema das diversas fases da técnica radioautográfica para estudo da síntese de DNA através da injeção de ^3H -timidina⁷⁵.

Como a quantidade dos grãos de prata é proporcional à radioatividade presente, a radioautografia, além de localizar substâncias radioativas, permite também a medida de sua quantidade relativa. O método radioautográfico é utilizado para o estudo da síntese de proteínas através da injeção de aminoácidos marcados com C^{14} e H^3 . Neste trabalho, utilizou-se como precursor de colágeno a prolina marcada com trício, já que este aminoácido, embora não-exclusivo, é um dos principais constituintes do colágeno. Desta maneira, as moléculas de colágeno que se formaram a partir do *pool* de prolina triciada disponível no organismo tornaram-se radiativas e puderam ser localizadas no tecido através da RAG.

Para o estudo radioautográfico, utilizou-se um grupo de 10 camundongos adultos pesando aproximadamente 30g, divididos em 5 grupos. A fonte de luz neste experimento foi o laser de He-Ne e o método para criação e irradiação das lesões seguiu o mesmo procedimento já descrito anteriormente em 8.2. Em cada camundongo, foram criadas duas lesões, conforme mostrou a figura 9.9.

Após cada irradiação, um grupo de camundongos recebeu, via intraperitoneal, uma injeção de 3H -prolina na dose de $5\mu Ci/g$ de peso corporal, sendo sacrificados após uma hora. Os cortes histológicos foram obtidos conforme descrito na seção 9.1. Depois de incluídos em parafina e cortados em $5\mu m$, as peças foram submetidas à técnica da emulsão líquida¹⁷⁴. Os espécimes foram colocados em lâminas, que foram mergulhadas na emulsão nuclear Ilford K2 e, em seguida, levadas para secar em posição vertical, em câmara escura. Após um período de duas horas, elas foram guardadas em uma caixa preta à prova de luz, que foi mantida em geladeira à temperatura de $4^\circ C$ pelo período de 30 dias, correspondendo ao período de exposição. Após a exposição, os radioautogramas foram revelados com revelador D19b por 3 minutos e fixados com fixador F5 por 3 minutos à temperatura de $18^\circ C$. Após este procedimento, os radioautogramas foram submetidos a uma série de 5 banhos, de 10 minutos cada, em água destilada, com a finalidade de eliminar o excesso do fixador fotográfico da preparação. Os radioautogramas foram, então, corados pela HE, montados com lamínula em resina sintética e levados para secar na estufa a $56^\circ C$.

Para a contagem dos grãos de prata, foi utilizada uma ocular de 8X, provida de um retículo que delimitava 100 áreas quadradas acoplada a um microscópio de luz. Cada área media $81\mu\text{m}^2$, quando se utilizou uma objetiva de 100X. Para a análise quantitativa, contou-se o número de grãos de prata em 20 áreas quadradas, nas regiões lesada e não-lesada, escolhidas aleatoriamente na derme do animal. O número de grãos de prata reflete a atividade de síntese de colágeno pelos fibroblastos. A figura 9.17 mostra os grãos de prata em radioautogramas de (a) pele sadia e (b) pele lesada.



(a)



(b)

Figura 9.17: Radioautogramas da pele de camundongos uma hora após injeção de ^3H -prolina no dia 7 pós-criação das feridas. (a) área sadia (HEX200) e (b) área em processo de cicatrização (HEX400).

9.3.1. Resultados

A curva de incorporação de ^3H -prolina, indicando a atividade de síntese de colágeno pelos fibroblastos, é mostrada na figura 9.18. Pôde-se observar que:

- ambos os grupos irradiados mostraram um padrão similar de incorporação;
- a incorporação na derme irradiada com luz, cuja polarização foi alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal (L2), foi ligeiramente maior em relação à derme irradiada com luz, cuja polarização foi alinhada à direção perpendicular relativa (L3) nos primeiros 7 dias;
- ambos os grupos mostraram uma incorporação mais alta no dia 3, comparando-se ao grupo controle (L1);
- nos grupos irradiados, entretanto, a incorporação diminuiu no dia 7 e aumentou novamente até um pico no dia 14;
- a incorporação no grupo controle é mais baixa no início, mas aumentou progressivamente até o dia 10, quando, então, diminuiu abaixo do nível de incorporação do grupo irradiado;
- no dia 17, ambos os grupos irradiados e controle apresentaram níveis similares de incorporação.

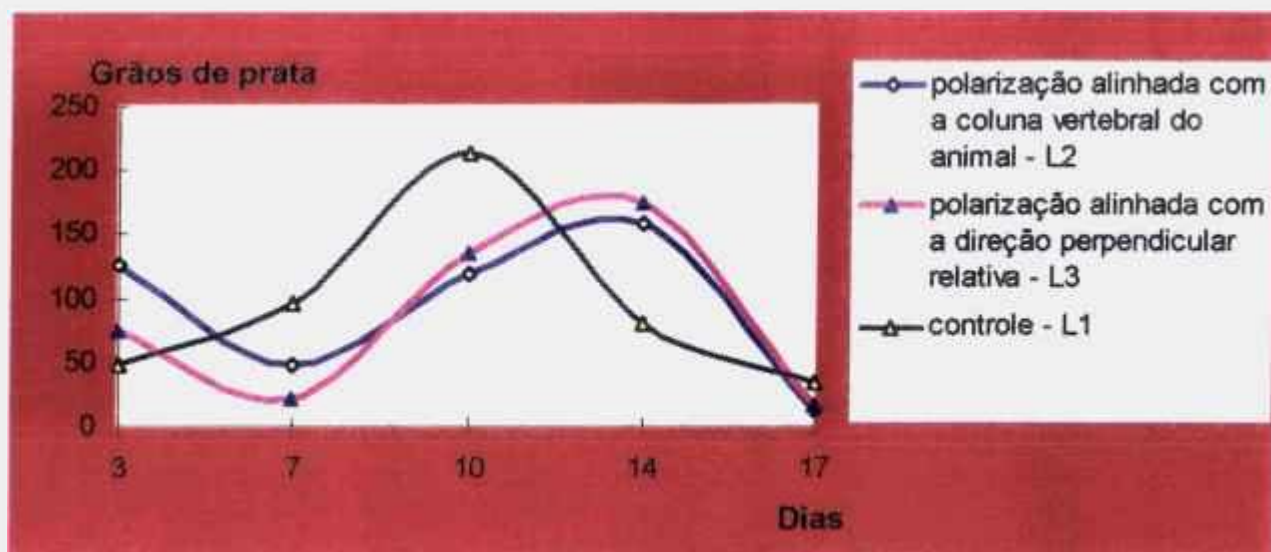


Figura 9.18: Curva de incorporação de H^3 -prolina na derme de camundongos.

10. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que a radiação laser de He-Ne linearmente polarizada acelerou a cicatrização de queimaduras criadas artificialmente na pele de ratos e camundongos, em relação ao controle. A análise morfológica realizada ao microscópio de luz e ao microscópio eletrônico de transmissão também demonstrou que a progressão da reparação, bem como as características estruturais da cicatrização do tecido conjuntivo - quantidade de tecido conjuntivo cicatrizado e presença de células inflamatórias - são dependentes da orientação relativa entre a polarização do campo elétrico e a direção referencial no animal. Com relação ao tempo de reepitelização, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos irradiados. Entretanto, ambos os grupos irradiados apresentaram a epiderme completamente restituída 17 dias após a criação das lesões, enquanto que o grupo controle, nesse mesmo período, não tinha completado o processo de reepitelização.

Os efeitos biomoduladores da terapia com lasers de baixa intensidade têm sido publicados na literatura desde a década de 60. Muitos estudos relatam os efeitos da fotoestimulação laser em uma variedade de condições patológicas, incluindo cicatrização de feridas^{1,2,9,19,44,66,67,68,83,93,107,110,111,116}. Recentemente, foi mostrado por Reddy e colaboradores que a bioestimulação laser pode conduzir a um aumento na produção de colágeno na regeneração de tendão de Aquiles em coelhos¹⁰ e foi demonstrado por Saperia et al.⁶, um aumento nos níveis de mRNA em procolágeno tipo I e tipo III em feridas de pele tratadas com laser de He-Ne. Estes resultados demonstraram que a terapia com laser de He-Ne deve exercer efeitos na expressão gênica de procolágeno.

O efeito terapêutico positivo da luz polarizada em células e processos biológicos é igualmente bem documentado na literatura^{100,102,175}. A luz polarizada estimula a atividade energética da membrana celular, induzindo processos regenerativos e aumentando a absorção de oxigênio no tecido do corpo.

Em 1982, Kertesz e colaboradores propuseram um modelo físico para explicar o efeito bioestimulante de um feixe de luz polarizado¹⁷⁶. Este modelo supôs que a luz linearmente polarizada, tendo um campo eletromagnético unidirecional, age sobre a bicamada lipídica da membrana celular e, portanto, poderiam ocorrer mudanças estruturais. Conseqüentemente, as características superficiais (por exemplo, a distribuição de cargas na superfície) e as ligações lipídio-proteína poderiam ser modificadas. Isto ocorre devido à intensidade do campo elétrico da luz linearmente polarizada, que muda a conformação da bicamada lipídica, bem como ainda reordena as cabeças polares dos lipídios. A reordenação dos lipídios é considerada análoga à reordenação já observada no caso de moléculas de cristal líquido, quando são irradiadas por luz polarizada. Como no caso das moléculas do cristal, em resposta ao campo unidirecional induzido, as cabeças polares tendem a rotar na direção do campo elétrico. Esta mudança na conformação da bicamada lipídica pode influenciar qualquer processo celular que é conectado a membrana celular, tais como a produção de energia da célula, os processos imunológicos e as reações enzimáticas. Karu apresenta dois argumentos contra este mecanismo de interação⁹⁵:

- os efeitos causados pela irradiação independem das propriedades específicas da luz, como coerência e polarização (vale ressaltar que os trabalhos publicados por Karu são sempre resultados de experimentos *in vitro*);
- os lipídios não possuem bandas de absorção no intervalo vermelho do espectro eletromagnético.

Entretanto, um trabalho mais recente, cujo objetivo foi investigar o nível de organização de vários sistemas biológicos, concluiu que mudanças da estrutura espacial de componentes celulares induzidas por luz de vários comprimentos de onda, emitida em baixas intensidades, formam a base da atividade biológica e, como conseqüência, o efeito terapêutico³⁷. Os resultados obtidos permitiram concluir a possibilidade de modificação reversível da estrutura espacial e atividades funcionais de enzimas sob a influência da radiação laser; os máximos efeitos fotobiológicos foram observados para radiação linearmente polarizada.

É bem conhecido que a polarização permanece inalterada através de uma fina camada de células, entretanto, ao irradiar-se um meio altamente espalhador, como o tecido vivo, a polarização é perdida depois de uma determinada profundidade. No entanto, o tratamento de feridas abertas pode ser efetivo com luz polarizada, pois, neste caso, não há epitélio para contribuir ao espalhamento da luz, reduzindo ou destruindo a polarização⁶².

Em um recente estudo, Sankaran concluiu, experimentalmente, que a luz linearmente polarizada preserva suas propriedades de propagação por profundidades de penetração mais longas do que a luz circularmente polarizada em tecidos biológicos, em $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ¹⁷⁷. De fato, um estudo experimental mostrou que a polarização linear pode ser preservada por aproximadamente 2,2 caminhos de transporte no comprimento de onda de $632,8 \text{ nm}$ ¹⁷⁸. Portanto, a luz pode se propagar por uma distância de aproximadamente 1,5mm na pele humana sem a completa perda da polarização linear. Convém ressaltar que estes estudos foram realizados em pele sadia, onde a estrutura da pele é bem caracterizada. Sob condições patológicas, como uma queimadura, a pele perde suas características estruturais. De fato, recente estudo de Kolárova e colaboradores sobre a penetração da luz laser na pele *in vitro* mostrou, analisando a profundidade de penetração nas camadas individuais da pele em diferentes localizações sobre a superfície da pele, que as propriedades ópticas de espécimes *in vitro* são diferentes para pele normal e tecido de granulação de úlceras de pele¹⁷⁹. A medida da profundidade de penetração da luz laser no tecido de granulação foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a profundidade de penetração em pele normal de espessura similar.

Na seção 8.2 deste trabalho, foi investigado o grau de polarização linear em amostras de pele de rato sadia e sob condições patológicas durante o processo cicatricial de queimaduras, nos períodos correspondentes às análises histológicas. Os resultados obtidos indicaram que a polarização linear é mantida nas camadas superficiais da pele e a pele lesada preserva mais a polarização, quando comparada à pele sadia. Conforme a lesão cicatrizou, o grau de polarização linear se aproximou daquele observado em pele sadia. Estes

resultados estão de acordo com Jacques e colaboradores¹⁸⁰, que estudaram a transição de luz linearmente polarizada em luz aleatoriamente polarizada durante a propagação da luz em tecidos. Concluíram que a randomização da polarização linear é mais rápida em tecidos birrefringentes. As fibras colágenas na derme, por exemplo, são aleatoriamente orientadas, embora elas estejam orientadas no plano longitudinal da pele. Por isso, a luz linearmente polarizada incidente sobre a pele será despolarizada pelo colágeno. Entretanto, a epiderme e a derme superficial (papilar) permitem a penetração da luz polarizada com modesta despolarização. De fato, esse estudo comprovou que a polarização na pele, em um modelo porcino, persiste por 265 μm além da epiderme, cuja espessura varia entre 60 e 100 μm .

Através da análise histológica dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar que, no primeiro dia de tratamento, a região lesada estava totalmente destituída de epiderme. Com a perda da epiderme, a luz interage diretamente na derme subjacente, onde foi observada uma variedade de células inflamatórias e restos de células, plasma extravasado dos vasos sanguíneos, além das células normais do tecido conjuntivo. Deve-se, portanto, para proposta do modelo deste estudo, considerar a interação da luz linearmente polarizada nessa formação do tecido de granulação, que surge antes da reconstrução do tecido. Vale ressaltar que, em 1992, van Breugel e Bär, estudando a fotobiomodulação de fibroblastos *in vitro*, mostraram que o espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos possui várias bandas de absorção, entre elas, uma centrada em $\lambda = 630\text{nm}$ (figura 10.1)¹⁸¹.

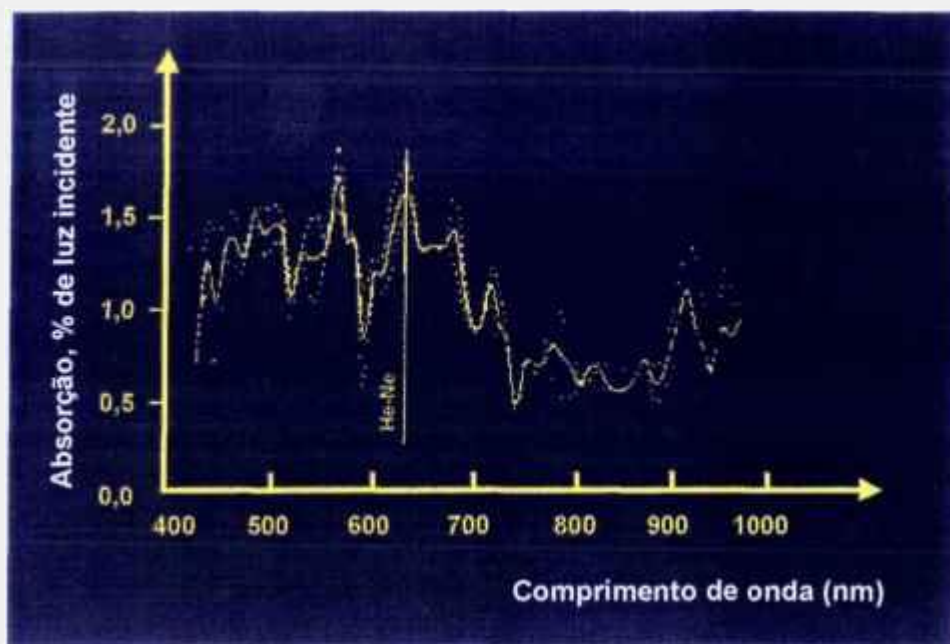


Figura 10.1: Espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos¹⁸¹.

Karu, em um recente artigo referente aos mecanismos de ação primários e secundários da radiação emitida no intervalo do visível ao infravermelho próximo sobre células, discute a enzima citocromo c oxidase como o possível fotoaceitador, quando as células são irradiadas com luz monocromática no intervalo do visível ao infravermelho do espectro eletromagnético¹³⁰. Quatro mecanismos primários de ação são propostos pela autora: mudanças nas propriedades redox dos componentes da cadeia respiratória após excitação dos seus estados eletrônicos, formação de oxigênio singleto, aquecimento transitório local de cromóforos absorvedores e aumento da produção do ânion superóxido com aumento subsequente na concentração dos produtos de sua dismutação, H_2O_2 . A transdução e amplificação do fotossinal na célula conduziria a uma cascata de reações conectadas com alterações nos parâmetros da homeostase celular, que pode acontecer na ausência de luz (mecanismos secundários). De acordo com Karu, não existem argumentos para se acreditar que somente um destes processos ocorra quando uma célula é irradiada e uma importante questão para o futuro seria determinar qual destas reações é responsável por um determinado efeito relativo à terapia com lasers de baixa intensidade.

É sugerido por Friedmann e Lubart que o aumento da produção do gradiente de prótons eletroquímicos transmembrana pelo laser desempenha um papel importante no entendimento da modulação de culturas celulares (estimulação e dano)³⁰. Nesse trabalho, as porfirinas naturalmente presente nas células, ou pigmentos da cadeia respiratória, são assumidos como os fotoaceitadores primários. As porfirinas são elementos da cadeia respiratória, sensíveis à polarização, pois possuem dipolos de absorção que absorvem e emitem luz linearmente polarizada¹⁸². É razoável propor, portanto, que os efeitos observados na utilização de luz linearmente polarizada conduzam a mecanismos primários na cadeia respiratória, por absorção do quantum de luz pelas porfirinas, que levam à geração de oxigênio singleto, produzindo mudanças nas atividades redox das células. As porfirinas possuem uma banda de absorção centrada em $\lambda = 630\text{nm}$ ¹⁸³.

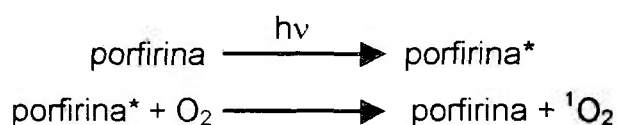


Figura 10.2: Formação de ${}^1\text{O}_2$ pela absorção de um fóton por porfirinas³⁰.

Por outro lado, o colágeno é uma biomolécula cuja birrefringência intrínseca está relacionada ao grau de agregação ordenada lateralmente das fibras, à sua estrutura primária e à participação das proteoglicanas. Desta forma, o aumento da birrefringência de forma intrínseca está intimamente ligado ao aumento de ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno, aumentando a cristalinidade e a agregação ordenada do colágeno tipo I¹⁸⁴. De acordo com Vidal, aumenta-se a birrefringência do colágeno utilizando-se corantes que se ligam de forma orientada às fibras¹⁸⁵. Esses corantes podem conferir aos feixes de colágeno uma capacidade dicróica. O dicroísmo linear é uma anisotropia de absorção que se manifesta em estruturas que absorvem luz polarizada dependendo da direção do azimute e do vetor elétrico da luz¹⁸⁴.

A análise da cicatrização da pele através da MET, neste estudo, mostrou que 17 dias pós-padronização da lesão, a matriz extracelular da amostra L3 apresentava uma maior quantidade, compactação e orientação das fibras

colágenas em diferentes sentidos. Na amostra controle L1, observou-se uma menor quantidade, com fibras mais curtas e finas, sem uma orientação definida, mais espaçadas entre si e com perda parcial do bandeamento característico do colágeno fibrilar. Em L2, foi observada uma maior quantidade de fibrilas de colágeno, as quais se apresentaram compactadas e orientadas na mesma direção. Os achados descritos mostram que a lesão L2 apresentou uma matriz colágena bem mais orientada em relação a L1 e L3, provavelmente por um efeito estimulador do laser na síntese e organização desse componente da MEC.

Estes resultados concordam com Parizotto¹⁸⁴. É sugerido em sua tese de doutoramento que há uma grande probabilidade do colágeno ser uma espécie de fotorreceptor secundário e produzir reações fotoinduzidas, já que propriedades de piezeletricidade e pizeletricidade já foram demonstradas para o colágeno. Parizotto investigou a influência do laser de He-Ne, em diferentes densidades de energia, sobre o processo de reparo tecidual em tendão de ratos, estudando os aspectos morfológicos e bioquímicos do colágeno através da Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia por Infravermelho. Concluiu-se que o laser de He-Ne teve efeito no reparo tecidual com melhores resultados para doses de 0,5 e 5,0 J/cm², acelerando o processo de reparação; houve um aumento na quantidade de pontes de hidrogênio formadas nas moléculas de colágeno; houve uma melhor organização da estrutura fibrilar e molecular do colágeno, com melhor orientação azimutal e empacotamento dos feixes de fibras e das moléculas, com destaque para a espessura dos feixes formados.

Na pele, a orientação das fibras colágenas não é como no tecido tendinoso. A pele não tem uma organização estrutural com um direcionamento preferencial das fibras do colágeno. Na derme, os colágenos do tipo I e tipo III se orientam em diferentes planos no tecido, formando uma rede. É claro, pelos resultados obtidos neste trabalho, que o laser linearmente polarizado acelera a cicatrização de feridas, de modo que o estágio de organização das fibrilas de colágeno observado nas queimaduras irradiadas após 14 dias ainda não é observado nas lesões controle no 17^o dia pós-lesão. Deste modo, pôde-se concluir que a melhor

organização das fibrilas de colágeno nas peles irradiadas está relacionada com a aceleração da cicatrização nestes animais e não com um efeito direto da irradiação sobre a orientação das fibrilas de colágeno no tecido. É bem conhecido que na ferida em processo de cicatrização, as fibras distribuem-se inicialmente de modo randômico¹⁸⁶

Com relação aos resultados obtidos pela RAG, em trabalho publicado em 1973, Van Winkle Jr. e colaboradores investigaram o papel do fibroblasto em controlar a extensão do reparo em feridas de vários tecidos, incluindo feridas de pele, medindo a taxa de síntese de colágeno através da atividade específica de ¹⁴C-hidroxirolina por μg de hidroxirolina total¹⁸⁷. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo na taxa de síntese de colágeno na área lesada, comparado ao tecido não-lesado, no 5º dia pós-operatório. A curva mostrou também uma diminuição da atividade específica da ¹⁴C-hidroxirolina por μg de hidroxirolina total no dia 14, atingindo taxas máximas de síntese de colágeno nos dias 21-28. Depois desse período, a taxa de síntese de colágeno declinou, alcançando níveis de incorporação para pele normal no dia 70 pós-operatório.

Os resultados bioquímicos não podem ser diretamente confrontados com os resultados radioautográficos, uma vez que o primeiro mede a quantidade de colágeno depositado na ferida como um todo e o segundo faz uma análise *in situ* da distribuição do colágeno sintetizado nos tecidos durante o período do experimento (no caso deste trabalho, uma hora). Verificou-se que a atividade de deposição de colágeno é bastante heterogênea nas diferentes regiões do tecido, o que torna a análise radioautográfica mais complicada do que se supunha anteriormente. Por esta razão, os resultados radioautográficos incluídos neste trabalho podem ser considerados parciais. Mesmo assim, a diminuição na taxa de síntese de colágeno entre os dias 3 e 10, obtidos neste trabalho através da técnica radioautográfica, para ambas as feridas irradiadas, concordam com o perfil de incorporação obtido por Van Winkle. Neste trabalho, os grupos irradiados mostraram um padrão de incorporação que diminuiu no dia 7 e aumentou novamente até um pico no dia 14. Entretanto, a lesão controle mostrou um perfil

diferente de incorporação, em relação ao grupo irradiado, sendo mais baixa no início e aumentando progressivamente até o dia 10, quando então diminuiu até um nível abaixo de incorporação em relação ao grupo irradiado.

A taxa da síntese de colágeno mensura diretamente a atividade funcional dos fibroblastos. A maior incorporação de ^3H -prolina no dia 3 permite especular que a luz, cuja direção de polarização foi alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal, estimula a atividade de fibroblastos, ainda na fase inflamatória, quando comparada às outras lesões, e isso pode estar relacionado à aceleração e qualidade da cicatrização, observados pela análise morfológica. Deve-se lembrar que o colágeno, sintetizado em período "X", só irá ser observado como complexo macromolecular (fibrila de colágeno) no período "Y". A maior incorporação de prolina nos grupos irradiados, em relação ao grupo controle, nos primeiros dias pós-operatório, está de acordo com o trabalho publicado por Yew e co-autores⁸.

Entretanto, de uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo propõem que a irradiação pelo laser muda o padrão normal de atividade fibroblástica durante o processo de reparação. Parece haver uma estimulação inicial para a síntese de colágeno logo no início do processo de cicatrização, que pode ser importante para o resultado final da cicatrização. Um segundo pico de estimulação é observado no tecido irradiado aos 14 dias pós-lesão, o que também pode explicar um incremento da qualidade da cicatrização das queimaduras irradiadas em relação ao controle. O resultado final da cicatrização, entretanto, depende de um complexo de fatores que inclui degradação e deposição de matriz por enzimas específicas, algumas das quais produzidas por células inflamatórias. Deste modo, não se pode descartar a ação do laser sobre a atividade das células inflamatórias, como já mencionado anteriormente neste trabalho.

11. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi realizada uma avaliação da influência da direção de polarização do campo elétrico da radiação laser de He-Ne de baixa intensidade em queimaduras criadas artificialmente no dorso de animais de experimentação, através da microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e radioautografia. Os resultados obtidos demonstraram que a direção de polarização do campo elétrico, que é alinhada paralelamente à uma direção preferencial no animal, afeta o processo cicatricial, particularmente a formação do tecido conjuntivo na derme, consistindo em um importante fator para a aceleração da cicatrização de lesões inflamatórias.

Teoricamente, descreveu-se a propagação da luz em meios túrbidos, mostrando que os fótons podem preservar seu estado de polarização inicial até uma certa profundidade no tecido. Experimentalmente, verificou-se que, nas condições utilizadas neste estudo, a luz polarizada pode ser preservada nas primeiras camadas da pele. Além disso, o grau de polarização linear foi mais preservado nas amostras patológicas, quando comparado às amostras de pele sadia.

Portanto, a direção de polarização da radiação laser de He-Ne pode acelerar a resposta biológica durante a cicatrização de queimaduras na pele de ratos e camundongos, nas condições experimentais utilizadas neste estudo.

APÊNDICE 1: LISTA DE ABREVIATURAS

A1.1: Acrogramas

CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear

CNPq: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

CW: *C(ontinuous) W(ave)*, onda contínua

et al.: *et alii*, e outros

EUA: Estados Unidos da América

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCM: Faculdade de Ciências Médicas

FEEC: Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação

FM: Faculdade de Medicina

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IV: infravermelho

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

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

L1: lesão controle

L2: lesão irradiada, cuja polarização da luz foi alinhada paralelamente à coluna vertebral

L3: lesão irradiada, cuja polarização da luz foi alinhada perpendicularmente à coluna vertebral

MASER: *M(icrowave) A(mplification) by S(timulated) of E(mission) R(adiation)*;
amplificação de microondas por emissão estimulada de radiação

MET: microscopia eletrônica de transmissão

MEV: microscopia eletrônica de varredura

ML: microscopia de luz

MRI: *M(agnetic) R(essonance) I(mage)*, imagem por ressonância magnética

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

PW: *P(ulsed) W(ave)*, onda pulsada

RAG: radioautografia ou autorradiografia

TEM: *T(ransverse), E(lectromagnetic), M(odes)*, modos eletromagnéticos transversais

TMO: transplante de medula óssea

UNICAMP: Universidade Estadual de Campinas

USP: Universidade de São Paulo

UV: ultravioleta

A1.2: Biologia

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

cAMP: *cyclic A(denosine) M(ono)P(hosfate)*, adenosina monofosfato cíclica

cGMP: *cyclic G(uanosine) M(ono)P(hosfate)*, guanosina monofosfato cíclica

ConA: concanavalina A

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

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

E.Coli: Escherichia Coli

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

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

G₁: fase do ciclo celular anterior à síntese de DNA

³H-prolina: prolina marcada com trício

³H-timidina: timidina marcada com trício

HE: hematoxilina e eosina

HeLa: células de linhagem HeLa

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

MEC: matriz extracelular

mRNA: RNA mensageiro

NAD: nicotinamida adenina dinucleotídeo

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

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

pH: potencial hidrogeniônico

RE: retículo endoplasmático agranular

REG: retículo endoplasmático granular ou rugoso

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

ROS: *R(eactive) O(xygen) S(pecies)*, espécies reativas de oxigênio

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

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

A1.3: Física

A: área

c: velocidade da luz

D: dose ou fluência

D: coeficiente de difusão do fóton

E: energia

E_p : energia do pulso

f: comprimento focal

f: frequência ou taxa de repetição

ϕ : diâmetro

$\Phi(\mathbf{r})$: taxa de fluência

g: grau de anisotropia da função de fase

h: constante de Planck, $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

[J]: matriz de coerência ou matriz de Jones

I: intensidade

I_c : intensidade coerente

I_d : intensidade difusa

I_i : intensidade incidente

I_m : intensidade média

I_p : intensidade do pulso

l_f : livre caminho médio

l_s : caminho médio de transporte

l_s : comprimento de espalhamento

λ : comprimento de onda

[Λ]: matriz de atenuação

L: radiância

L_c : radiância coerente

L_d : radiância difusa

[M]: matriz de Mueller

μ_a : coeficiente de absorção

μ_d : coeficiente de difusão do meio = μ_{ef}

μ_{ef} : coeficiente efetivo

μ_s : coeficiente de espalhamento

μ'_s : coeficiente de espalhamento reduzido

μ_t : coeficiente de atenuação

n: número de eventos de espalhamento

n: índice de refração

n_c : índice de refração da camada córnea da pele

ν : frequência de um fóton

p: função de fase

P: potência

P_m : potência média

P: grau de polarização

P_L : grau de polarização linear

q: função fonte

R: coeficiente de Fresnel para reflexão em incidência normal

ρ : número de partículas por unidade de volume

S = [S]: vetor de Stokes

t: tempo

T: período

τ_p : largura temporal do pulso

z: espessura da amostra

A1.4: Prefixos, símbolos e valores

Prefixo	Símbolo	Valor
tera	T	10^{12}
giga	G	10^9
mega	M	10^6
quilo	k	10^3
centi	c	10^{-2}
mili	m	10^{-3}
micro	μ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
angstrom	Å	10^{-10}
pico	p	10^{-12}
femto	f	10^{-15}

A1.5: Química

Al: alumínio

Al_2O_3 : óxido de alumínio (safira)

Ar: argônio

As: arsênio

C: carbono

CO_2 : dióxido de carbono

Ca: cálcio

Er: érbio

GGG: *G(adolinium) G(alium) G(arnet)*, granada de gadolínio e gálio; $\text{Gd}_3\text{Ga}_5\text{O}_{12}$: óxido de gadolínio e gálio

Ga: gálio

GaAs: *galium arsenide*, arseneto de gálio

GaAlAs: *galium aluminum arsenide*, arseneto de gálio e alumínio

Gd: gadolínio

H: hidrogênio

^1H : prótio

^3H : trítio ou trítio

H_2O_2 : peróxido de hidrogênio (água oxigenada)

He: hélio

He-Ne: hélio e neônio

Ho: hólmio

InGaAs: *indium gallium arsenide*, arseneto de gálio e índio

K: potássio

Kr: criptônio

Li: lítio

LiCAF: *Li(thium) C(alcium) A(luminum) F(luoride)*, LiCaAlF_6 : hexafluoreto de lítio, cálcio e alumínio

LiSAF: *Li(thium) S(trontium) A(luminum) F(luoride)*, LiSrAlF_6 : hexafluoreto de lítio, estrôncio e alumínio

N: nitrogênio

N_2 : nitrogênio molecular

Na: sódio

Nd: neodímio

Nd:YAG: matriz hospedeira YAG dopada com Nd

Ne: neônio

O: oxigênio

$^1\text{O}_2$: oxigênio singleto

Y: ítrio

YAG: *Y(trium) A(luminum) G(arnet)*, granada de ítrio e alumínio; $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$: óxido de ítrio e alumínio

YLF: *Y(trium) L(ithium) F(luoride)*, fluoreto de ítrio e lítio; LiYF_4 : tetrafluoreto de ítrio e lítio

A1.6: Unidades

$^\circ\text{C}$: graus Celsius ou graus centígrados

cm: centímetro
cm²: centímetro ao quadrado
eV: elétron-Volt
fs: femtossegundo
g: grama
Gy: Gray
h: hora
Hz: Hertz
J: Joule
m: metro
M: molar
min: minuto
ml: mililitro
mm: milímetro
ms: milissegundo
mW: miliwatt
μCi: microcurie
μm: micrômetro
μm²: micrômetro ao quadrado
μs: microssegundo
nm: nanômetro
ns: nanossegundo
ps: picossegundo
s: segundo
sr: steradiano ou estererradiano
u.a.: unidades arbitrárias
W: Watt

APÊNDICE 2: LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1: Esquemas para lasers de (a) três níveis e (b) quatro níveis	7
Figura 2.2: Elementos fundamentais constituintes de um laser.....	9
Figura 2.3: Características de (a) uma fonte de luz laser e (b) uma fonte de luz comum	13
Figura 2.4: Modo de emissão de (a) um feixe laser contínuo e (b) um feixe laser contínuo interrompido.....	14
Figura 2.5 : Perfil temporal de um laser de emissão pulsada.....	15
Figura 2.6: Padrões de intensidade para alguns modos TEM.....	16
Figura 2.7: Modelo para obtenção de luz plano-polarizada.....	17
Figura 2.8: Padrão instantâneo (à esquerda) e seccional (à direita) de um feixe de luz polarizado.....	18
Figura 2.9: Níveis de energia do laser de He-Ne.....	19
Figura 2.10: Absorção óptica de alguns cromóforos do tecido.....	20
Figura 3.1: Relação entre o diâmetro do feixe, área do feixe e intensidade, para um laser de 30mW. Intensidades acima de 500mW/cm ² podem causar dano celular	24
Figura 3.2: Redução relativa da intensidade do feixe laser em função da profundidade de penetração na pele.....	25
Figura 3.3: Diagrama mostrando o padrão exponencial da penetração de fótons no tecido. A intensidade do feixe vai diminuindo após uma certa profundidade ser alcançada	25
Figura 4.1: Anatomia da pele humana sadia.....	29
Figura 4.2: Organelas presentes em uma célula.....	32
Figura 4.3: Estriação das fibrilas de colágeno.....	36
Figura 4.4: Estrutura tripla-hélice da molécula de colágeno.....	36
Figura 5.1: Classificação de queimaduras na pele segundo Boyer.....	42
Figura 5.2: Cicatrização por primeira intenção	45

Figura 5.3: Cicatrização por segunda intenção	45
Figura 6.1: Modelo para a modulação de sistemas biológicos através da LILT	77
Figura 7.1: Interação da luz com tecidos	79
Figura 7.2: Óptica da pele normal	80
Figura 7.3: Profundidade de penetração na pele humana sadia para vários comprimentos de onda.....	83
Figura 8.1: Montagem experimental utilizada na irradiação de animais de experimentação	97
Figura 8.2: Lesões em um animal que está anestesiado recebendo tratamento com laser.....	98
Figura 8.3: Montagem experimental para estudo do grau de polarização linear em amostras de pele	99
Figura 9.1: Fotomicrografia de pele sadia de rato. Observa-se uma epiderme delgada (E) revestindo uniformemente a superfície da pele. A derme subjacente (D) exhibe grande quantidade de feixes de colágeno, poucas células do tecido conjuntivo e anexos da pele: glândulas sebáceas e folículos pilosos. HEX80.....	111
Figura 9.2: Fotomicrografia de L2 obtida no 7 ^o dia pós-criação da ferida. Observa-se na borda direita desta figura, bem como na derme superficial (D), um acúmulo de células com núcleos densos indentificando áreas de necrose (★). HEX80	112

Figura 9.3: Fotomicrografia de L2 obtida no 10º dia pós-operatório. Observa-se na borda esquerda da figura, uma região já recoberta por epitélio (E). A seta indica a direção de reepitelização. A derme subjacente (D) apresenta fibroblastos com amplo citoplasma, características morfológicas de ativação celular (seta curva pequena). Na porção inferior esquerda, a derme ainda apresenta um infiltrado inflamatório (★). Notar a neovascularização da região de reparo. A superfície da pele ainda contém restos de células mortas (seta curva).

HEX80 113

Figura 9.4: Fotomicrografia de L1 obtida no 14º dia pós-criação da lesão. Observa-se que a epiderme (E) ainda não recobriu completamente a área lesada (★). Restos celulares estão depositados na superfície da pele (seta). HEX80..... 114

Figura 9.5: Fotomicrografia de L2 obtida no 14º dia do experimento. A derme (D) encontra-se completamente revestida por um novo epitélio (E). Observa-se também na derme superficial uma concentração de fibroblastos com cromatina frouxa e ampla área de citoplasma (seta).

HEX80 115

Figura 9.6: Fotomicrografia de uma pele não-irradiada (L1) obtida no dia 17. Observa-se uma grande área da derme (D) ainda desprovida de epitélio (E). Restos de células podem também ser observados próximo à superfície da pele lesada (seta). HEX40 116

Figura 9.7: Fotomicrografia de L2 obtida no 17º dia. Observa-se que a área lesada está completamente recoberta por uma epiderme (E). A derme (D) é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, rico em fibroblastos com citoplasma amplo e basófilo (HEX80). O detalhe mostra em maior aumento uma região de reparo ricamente vascularizada e fibroblastos com ampla área de citoplasma, que contrasta com o conjuntivo denso subjacente. HEX200..... 117

- Figura 9.8: Fotomicrografia de L3 obtida no dia 17 pós-criação da lesão. A epiderme (E) está completamente restaurada, entretanto, a derme (D) subjacente ainda mostra sinais de remodelação, estando a derme profunda ainda infiltrada por um grande número de células inflamatórias (★). HEX40..... 118
- Figura 9.9: Lesões criadas na pele de camundongos 119
- Figura 9.10: Elétron-micrografia da derme de L3 no 14º dia pós-criação da queimadura. Observa-se que os fibroblastos apresentam grande quantidade de REG nos seus citoplasmas (seta curva). Nota-se grande quantidade de recessos citoplasmáticos contendo fibrilas de colágeno compactadas (seta curva pequena). Observa-se também infiltrado inflamatório neutrofílico no interstício (seta). 2700X..... 124
- Figura 9.11: Elétron-micrografia da derme de L1 no 14º dia pós-criação da lesão. Observa-se parte do citoplasma de um fibroblasto (F) que apresenta um retículo endoplasmático com cisternas extremamente dilatadas (setas curvas). A seta longa aponta uma porção de um fibroblasto que apresenta uma excessiva elétron-densidade, indicando morte desta célula. 5000X..... 125
- Figura 9.12: Montagem de micrografia eletrônica de região da derme de L2, após 14 dias da criação da lesão. A figura mostra um fibroblasto que exibe um REG bastante desenvolvido (seta curta). O citoplasma destas células mostra ainda fagossomos contendo fibrilas de colágeno (seta longa). Nota-se ainda a presença de fibrilas delgadas de colágeno adjacente aos fibroblastos (seta curva longa), por vezes, envolvidas por prolongamentos celulares (seta curva pequena), que formam uma abundante rede de recessos na superfície celular. 14720X..... 126

- Figura 9.13: Micrografia eletrônica da derme de L3 no 14º dia pós-operatório. Em pequeno aumento, observa-se a distribuição das fibrilas de colágeno (C) na matriz extracelular. Pode-se notar fibrilas longas e espessas organizadas em feixes dispostos em diferentes sentidos. Observa-se também no centro da foto, um fibroblasto com características morfológicas de uma célula altamente envolvida na síntese de macromoléculas para exportação. Nota-se ainda certo número de fagossomos de colágeno (setas). 2000X 127
- Figura 9.14: Elétron-micrografia da derme de L1 no 17º dia. Observam-se fibrilas de colágeno finas (C), desorganizadas e espaçadas quando comparadas com o grupo tratado. Também nota-se a presença de células elétron-densas, com núcleo de cromatina condensada, indicando morte celular, além de restos celulares (setas). 2700X..... 128
- Figura 9.15: Micrografia eletrônica da derme de L2 após 17 dias da criação da queimadura. A matriz extracelular é ocupada por fibrilas de colágeno (C) muito bem organizadas e orientadas no tecido em uma mesma direção, no mesmo feixe. O diâmetro das fibrilas de colágeno é bastante heterogêneo, o que indica a presença de fibrilas sintetizadas em diferentes períodos. 5600X..... 129
- Figura 9.16: Esquema das diversas fases da técnica radioautográfica para estudo da síntese de DNA através da injeção de ^3H -timidina 131
- Figura 9.17: Radioautogramas da pele de camundongos uma hora após injeção de ^3H -prolina no dia 7 pós-criação das feridas. (a) área sadia (HEX200) e (b) área em processo de cicatrização (HEX400)..... 134
- Figura 9.18: Curva de incorporação de H^3 -prolina na derme de camundongos 136
- Figura 10.1: Espectro de absorção de monocamadas de fibroblastos humanos..... 141
- Figura 10.2: Formação de $^1\text{O}_2$ pela absorção de um fóton por porfirinas..... 142

APÊNDICE 3: LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 8.1: Intensidade x Grau de Rotação do Analisador x Espessura da amostra de pele sadia	100
Gráfico 8.2: Representação polar da intensidade incidente	101
Gráfico 8.3: Grau de polarização linear para pele sadia e lesada obtida no 3 ^o dia após a criação da queimadura	102
Gráfico 8.4: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 7 ^o dia após a criação da ferida	103
Gráfico 8.5 : Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 10 ^o dia após a criação da ferida	104
Gráfico 8.6: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 14 ^o dia após a criação da ferida	105

APÊNDICE 4: LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1.1: Resultados macroscópicos obtidos no trabalho de Ribeiro	3
Tabela 2.1: Principais comprimentos de onda de emissão de alguns lasers	12
Tabela 3.1: Dosimetria associada à LILT	27
Tabela 8.1: Propriedades ópticas da pele para $\lambda=632,8\text{nm}$	107

APÊNDICE 5: FORMALISMO MATEMÁTICO

[A]: matriz $A = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} \\ a_{21} & a_{22} \end{pmatrix}$

$[A^{-1}]$: matriz inversa de A; $AxA^{-1}=U$

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

$\cos\theta$: cosseno do ângulo θ

$\sin\theta$: seno do ângulo θ

$\det[A]$: determinante de $[A] = a_{11} \cdot a_{22} - a_{21} \cdot a_{12}$

∇^2 : operador diferencial de Laplace ou Laplaciano; $\nabla \cdot \nabla\phi$: divergência do gradiente da função ϕ

δ : função delta de Dirac; $\delta(x) = \begin{cases} 0 & (x \neq 0), \\ \infty & (x = 0), \end{cases}$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x) dx = 1$$

G: função de Green da equação de Helmholtz modificada $\nabla^2 - k^2$. No espaço

tridimensional $G(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{\exp(-k |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|)}{4\pi |\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|^2}$

$\sum_{k=1}^3 \phi_k$: somatória de $k=1$ até $k=3$; $\sum_{k=1}^3 \phi_k = \phi_1 + \phi_2 + \phi_3$

$[\sigma_k]$: matrizes de Pauli, $k = x=1, y=2, z=3$; $[\sigma_x] = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}$; $[\sigma_y] = \begin{pmatrix} 0 & -i \\ i & 0 \end{pmatrix}$; $[\sigma_z] = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$

$[\sigma_0]=[U]$: matriz unidade ou matriz identidade = $\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$

$\text{tr}[A]$: traço de $[A] = a_{11} + a_{22}$

$\langle x \rangle$ = valor médio de x

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B.; TOTA, J.G. Effect of laser rays on wound healing. **Am. J. Surg.**, v.122, p.532-5, 1971.

- 2- KOVÁCS, I.B.; MESTER, E.; GORÖG, P. Laser-induced stimulation of the vascularization on the healing wound. An ear chamber experiment. **Experientia**, v.30, p.341-3, 1974.

- 3- JONGSMA, F.H.M.; BOGAARD, A.E.J.M.; VAN GEMERT, M.J.C.; HENNING, J.P.H. Is closure of open skin wounds in rats accelerated by argon laser exposure? **Lasers Surg. Med.**, v.3, p.75-80, 1983.

- 4- SURINCHAK, J.S.; ALAGO, M.L.; BELLAMY, R.F.; STUCK, B.E.; BELKIN, M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. **Lasers Surg. Med.**, v.2, p.263-274, 1983.

- 5- HUNTER, J.; LEONARD, L.; WILSON, R.; SNIDER, G.; DIXON, J. Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. **Lasers Surg. Med.**, v.3, p.285-290, 1984.

- 6- SAPERIA, D.; GASSBERG, E.; LYONS, R.F.; ABERGEL, R.P.; BANEUX, P.; CASTEL, J.C.; DWYER, R.; UITTO, J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with Helium-Neon laser. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.138, p.1123-8, 1986.

- 7- MARTIN JR., B.B.; KLIDE, A.M. Treatment of chronic back pain in horses- stimulation of acupuncture points with a low powered infrared laser. **Veterinary Surg.**, v.16, p.106-110, 1987.

- 8- YEW, D.; LI, W.; PANG, K.; MOK, Y.; AU, C. Stimulation of collagen formation in the intestinal anastomosis by low dose He-Ne laser. **Scanning Microsc.**, v.3, p.379-386, 1989.

-
- 9- LEE, P.; KIM, K.; KIM, K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wound in rats. **Laser Ther.**, v.5, p.59-64, 1993.
- 10- REDDY, G.K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C.S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit Achilles tendons. **Lasers Surg. Med.**, v.22, p. 281-7, 1998.
- 11- LUGER, E.J.; ROCKIND, S.; WOLLMAN, Y.; KOGAN, G.; DEKEL, S. Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. **Lasers Surg. Med.**, v.22, p.97-102, 1998.
- 12- UTSUNOMIYA, T. A. histopathological study of the effects of low power laser irradiation on wound healing of exposed dental pulp tissues in dogs, with special reference to lectins and collagens. **J. Endodont.**, v.24, p.187-193, 1998.
- 13- OLIVEIRA, N.M.L.; PARIZZOTTO, N.A.; SALVINI, T.F. GaAs (904 nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle. **Lasers Surg. Med.**, v.25, p.13-21, 1999.
- 14- WALKER M.D.; RUMPF S.; BAXTER G.D.; HIRST D.G.; LOWE A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.41-7, 2000.
- 15- YO-CHENG, Z. An advanced clinical trial with laser acupuncture anesthesior operations in the oro-maxillofacial region. **Lasers Surg. Med.**, v.4, p.297-303, 1984.
- 16- SIMUNOVIC, Z. Low level laser therapy with trigger points technique. A clinical study on 243 patients. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p.163-7, 1996.

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

18- PINHEIRO, AL; CAVALCANTI, ET; PINHEIRO, TI; ALVES, MJ; MIRANDA, ER; DE QUEVEDO, AS; MANZI, CT; VIEIRA, AL; ROLIM, AB. Low-level laser therapy is an important tool to treat disorders of the maxillofacial region. **J Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, p.223-6, 1998.

19- SCHINDL, M.; SCHINDL, A.; PÖLZLEITNER, D.; SCHINDL, L. Healing of bone affections and gangrene with low intensity laser irradiation in diabetic patients suffering from foot infections. **Forsch Komplementäimed**, v.5, p.244-7, 1998.

20- TSUSHIMA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K.; SHIROTO C. Effects of two-point linear polarized near-infrared irradiation in difficult temporomandibular joint disorder. **Proc. of Second World Congress for Laser Therapy**, p.29-30, 1998.

21- SCHINDL, M.; KERSCHAN, K.; SCHINDL, A.; SCHÖN, H; HEINZL, H.; SCHINDL, L. Induction of complete wound healing in recalcitrant ulcers by low-intensity laser irradiation depends on ulcer cause and size. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.15, p.18-21, 1999.

22- SCHINDL, A; NEUMANN, R. Low-intensity laser therapy is an effective treatment for recurrent herpes simplex infection. Results from a randomized double-blind placebo-controlled study. **J Invest. Dermatol** , v.113, p.221-3, 1999.

23- TAM, G. Low power laser therapy and analgesic action. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.17, p.29-33, 1999.

-
- 24- SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; PERNERSTORFER-SCHON, H.; MOSSBACHER, U.; SCHINDL, L. Low intensity laser irradiation in the treatment of recalcitrant radiation ulcers in patients with breast cancer-long-term results of 3 cases. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.16, p.34-7, 2000.
- 25- SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; SCHAFFER, P.M.; BUSCH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.54, p.55-60, 2000.
- 26- KARU, T.I.; KALENDO, G.S.; LETOKHOV, V.S.; LOBKO, V.V. Biostimulation of HeLa cells by low-intensity visible light. **Il Nuovo Cimento**, v.1, p.828-840, 1982.
- 27- RIGAU, J.; TRELLES, M.A.; CALDERHEAD, R.G.; MAYAYO, E. Changes in fibroblast proliferation and metabolism following *in vitro* helium-neon laser irradiation. **Laser Ther.**, v.3, p.25-33, 1991.
- 28- FRIEDMAN, H.; LUBART, R.; LAULICHT, I.; ROCHKIND, S. A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.11, p.87-91, 1991.
- 29- KARU, T.; SMOLYANINOVA, N.; ZELENIN, A. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. **Lasers Life Sci.**, v.4, p.167-178, 1991.
- 30- FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Towards an explanation of visible and infrared laser induced stimulation and damage of cell cultures. **Laser Ther.**, v.4, p.39-42, 1992.

-
- 31- NARA, Y.; TSUKAMOTO, Y.; FUKUTANI, S.; YAMAGUCHI, N.; MORI, M.; MORIOKA, T. Stimulative effect of He-Ne laser irradiation on cultured fibroblasts derived from human dental pulp. **Lasers Life Sci.**, v.4, p.249-256, 1992.
- 32- LUBART, R.; WOLLMAN, Y.; FRIEDMAN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near-infrared laser on cell cultures. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.12, p.305-310, 1992.
- 33- YAMAYA, M.; SHIROTO, C.; KOBAYASHI, H.; NAGANUMA, S.; SAKAMOTO, J.; SUZUKI, K.-J.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K.; KUMAE, T. Mechanistic approach to GaAlAs diode laser effects on production of reactive oxygen species from human neutrophils as a model for therapeutic modality at cellular level. **Laser Ther.**, v.5, p.111-6, 1993.
- 34- YAMAGUCHI, N.; TSUKAMOTO, Y.; MATONO, S. The effects of semiconductor laser irradiation on the immune activities of human lymphocytes *in vitro*. **Lasers Life Sci.**, v.6, p.143-9, 1994.
- 35- LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, v.14, p.347-354, 1994.
- 36- KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultured *in vitro*. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.27, p.219-233, 1995.
- 37- MOSTOVNIKOV, V. A.; MOSTOVNIKOVA, G.R.; PLAVSKI, V.Yu.; PLAVSKAJA, L.G. Biophysical principles of regulatory action of low intensity laser irradiation. In **Lasers in Oncology**, Andrei V. Isanov and Mishik A. Kazaryan editors, CIS Selected Papers, Proc. SPIE v.2728, p.50-62, 1996.

-
- 38- YAMAMOTO, Y.; KONO, T.; KOTANI, H.; KASAI, S.; MITO, M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p.129-132, 1996.
- 39- MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T.I. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.38, p.25-30, 1997.
- 40- GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers Surg. Med.**, v.22, p.212-8, 1998.
- 41- SROKA, R.; SCHAFFER, M.; FUCHS, C.; PONGRATZ, T.; SCHRADER-REICHARD, U.; BUSCH, M.; SCHAFFER, P.M.; DUHMKE, E.; BAUMGARTNER, R. Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. **Lasers Surg. Med.** v.25, p.263-271, 1999.
- 42- AGAIBY, A.D.; GHALI, R.L.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.357-363, 2000.
- 43- COULTER, A.H. Low-energy laser research in wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.12, p.117-8, 1994.
- 44- RIBEIRO, M.S. Estudo teórico-experimental dos efeitos não-térmicos da radiação laser polarizada em tecidos vivos. **Dissertação de Mestrado**, IPEN/CNEN-SP, 1991.
- 45- CHEONG, W.F.; PRAHL, S.A.; WELCH, A.J. A review of the properties of biological tissues. **IEEE J. Quant. Elect.**, v.26, p.2166-2185, 1990.

-
- 46- EINSTEIN, A. Zur quantum theorie der Strahlung. **Phys. Z.**, v.117, p.218, 1917.
- 47- SVELTO, O. **Principles of Lasers**. Plenum Press, New York, 1989.
- 48- HECHT, E.; ZAJAC, A. **Optica**. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., 1986.
- 49 - SCHAWLOW, A.L.; TOWNES, C.H. Infrared and optical masers. **Phys. Rev.**, v.112, p.1940-9, 1958.
- 50- MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in rubi. **Nature**, v.107, 493-4, 1960.
- 51- MAILLET, H. **O Laser: Princípios e técnicas de aplicação**. Manole Ltda., São Paulo, Brasil, 1987.
- 52- DOMINGOS, M.M. Aplicação do laser de CO₂ ou Er-YAG em rugas faciais. Estudo Comparativo. **Dissertação de Mestrado**, FMUSP, 1999.
- 53- <http://webphysics.davidson.edu/Alumni/BeDenius/modes/reshair.htm>
- 54- FORD, B.J. First Encyclopedia of Science. The Random House – Library of Knowledge. Random House, New York, 1993.
- 55- SHURCLIFF, W. ; BALLARD, S. **Polarized Light**. Van Nostrand Company Inc., 1964.
- 56- JAVAN, A.; BENNETT JR., W.R.; HERRIOTT, D.R. Population inversion and continuous optical maser oscillation in a gas discharge containing a He-Ne mixture. **Phys. Rev. Letters**, v.6, p.106-7, 1961.

-
- 57- WHITE, A.D.; RIGDEN, J.O. Continuous gas maser operation in the visible. **Proc. IRE**, v.50, p.1796- , 1962 *apud* ITZKAN, I.; DRAKE, E.H. History of Lasers in Medicine. In: **Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery**, Lippincott-Raven Pub., Philadelphia – New York, p.3-10, 1997.
- 58- MALDONADO, E.P. Interação da luz laser com tecidos biológicos: aplicações. **Apostila do curso de Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia**, IPEN/FOUSP, 1999.
- 59- MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orv. Hetilap.** v.107, p.1012, 1966 *apud* ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999.
- 60- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, v.56, p.691-704, 1989.
- 61- TÚNER, J.; HODE, L. It's all in parameters: a critical analysis of some well-know negative studies on low-level laser therapy. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.16, p. 245-8, 1998.
- 62- TÚNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy**: clinical practice and scientific background. Prima Books, Sweden, 1998.
- 63- KERT, J.; ROSE, L. **Clinical laser therapy**. Low level laser therapy. Rosenberg Bogtryk, Ballerup, Denmark, 1989.
- 64- LONGO, L.; MESTER, A. Present and future of laser cicatrization. **Proc. of Second World Congress for Laser Therapy**, 03 a 05/09, Kansas City – EUA, p.10-1, 1998.

-
- 65- ROCKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLARREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D.G. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds and burns. **Lasers Surg. Med.**, v.9, p.174-182, 1989.
- 66- MESTER, A.; MESTER, E.; MESTER, A. Open wound healing- bed sores, ulcus cruris, burns- with systemic effects of LLLT. In **Lasers in Medicine and Dentistry**, European Medical Laser Association, p.227-242, 2000.
- 67- GHAMSARI, S.M.; TAGUCHI, K.; ABE, N.; ACORDA, J.A.; SATO, M.; YAMADA, H. Evaluation of low level laser therapy on primary healing of experimentally induced full thickness teat wounds in dairy cattle. **Veter. Surg.**, v.26, p.114-120, 1997.
- 68- BISHT, D.; GUPTA, S.C.; MISRA, V.; MITAL, V.P.; SHARMA, P. Effect of low-intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, v.100, p.43-6, 1994.
- 69- COTTA, M.A. Estudo de efeitos não-térmicos da radiação laser em tecidos vivos. **Dissertação de Mestrado**, IF/UNICAMP, 1987.
- 70- <http://www.pbandelskincare.com/Anatomy%20of%20the%20Skin.htm>
- 71- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 1995.
- 72- <http://orbita.starmedia.com/~animalia/celula/celula.htm>
- 73- COSTA, A.M.A. Contribuição ao estudo dos mecanismos envolvidos na reparação tissular: miofibroblastos e matriz extracelular. **Tese de Doutorado**, ICB/USP, 1999.

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

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

76- http://mytilene.ucdavis.edu/~smith/210Data.dir/Struct_III/sld011.htm

77- <http://www.bio.mtu.edu/campbell/401lec9p2d.html>

78- SUCENA, RC. Queimaduras: Princípios gerais e controvérsias. Em: **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**, Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, Brasil, p.193-9, 1988.

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

80- http://rherman.pharmacy.uiowa.edu/BurnTrt00_files/frame.htm

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

82- ZHANG, D.; CHEN, T.; WANG, C.; WU, S.; FU, C. Effect of Helium Neon laser irradiation on serum lipid peroxide concentrations in burnt mice. **Lasers Surg. Med.**, v.12, p.180-3, 1992.

83- RIBEIRO, M.S.; ZECELL, D.M.; CARBONE, K.; PELLEGRINI, C.M.R.; ZORN, T.M.T. Effects of He-Ne polarized laser radiation on skin wounds repair. A morphological study. In: **Effects of Low Power Light on Biological Systems**. T. Karu and R. Lubart eds., Proc. of SPIE v.3198, 1997.

-
- 84- PEREIRA, F.E.L. Degenerações. Morte Celular. Alterações do Interstício. Em: **Bogliolo- Patologia Geral**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, p.38-68, 1998.
- 85- ALMEIDA-LOPES, L. Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Vale do Paraíba, São Paulo, 1999.
- 86- YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage responsiveness to light therapy. **Lasers Surg. Med.**, v.9, p.497-505, 1989.
- 87- HAAS, A.F.; ISSEROFF, R.R.; WHEELAND, R.G.; ROOD, P.A.; GRAVES, P.J. Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v.94, p.822-6, 1990.
- 88- YU, H-S.; CHANG, K-L.; YU, C-L.; CHEN, J-W.; CHEN, G-S. Low energy He-Ne laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v.107, p.593-6, 1996.
- 89- EL SAYED, S.O.; DYSON, M. Effect of laser pulse repetition rate and pulse duration on mast cell number and degranulation. **Lasers Surg. Med.**, v.19, p.433-7, 1996.
- 90- TRELLES, M.A.; RIGAU, J.; VELEZ, M. LLLT *in vivo* effects on mast cells. In: **Lasers in Medicine and Dentistry**, European Medical Laser Association, p. 169-185, 2000.
- 91- SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHINDL, L.; JURECKA, W.; HONIGSMANN, H.; BREIER, F. Increased dermal angiogenesis after low-intensity laser therapy for a chronic ulcer determined by a video measuring system. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.40, p.481-4, 1999.

92- DYSON, M. Laser therapy in wound management, the new era. **Proc. of Third World Congress for Laser Therapy**, 10 a 13/05, Atenas – Grécia, p.20, 2000.

93- KOVÁCS, I.B.; MESTER, E.; GÖRÖG, P. Stimulation of wound healing with laser beam in the rat. **Experientia**, v.30, p.1275-6, 1974.

94- GREGUSS, P. Low-level laser therapy – reality or myth?. **Opt. Laser Tech.**, v.16, p.81-5, 1984.

95- KARU, T.I. **Photobiology of low-power laser therapy**. Harwood Academic Publishers, New York, 1989.

96- BOLTON, P.A.; YOUNG, S.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy- a dose response study. **Laser Ther.**, v.2, p.101-6, 1990.

97- LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; PELED, I.; GROSSMAN, N. Light effect on fibroblast proliferation. **Laser Ther.**, v.5, p.55-7, 1993.

98- RIBEIRO, M.S.; ZECELL, D.M.; SILVA, D.F.T.; MALDONADO, E.P. Effects of low-intensity, linearly polarized neodymium laser beam on skin wounds healing. **Proc. of Third World Congress for Laser Therapy**, p.78, 2000.

99- MESTER, E.; NAGYLUCSKAY, S.; TISZA, S.; MESTER, A. Stimulation of wound healing by means of laser rays. Part III- Investigation of the effect on immune competent cells. **Acta Chir. Acad. Sci. Hung.**, v.19, p.163-170, 1978.

100- KUBASOVA, T.; KOVACS, L.; SOMOSY, Z.; LINK, P.; KOKAI, A. Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, v.4, p.381-8, 1984.

101- KARU, T.; TIPHLOVA, O.; LUKPANOVA, G.; PARKHOMENKO, I. Effect of irradiation with monochromatic visible light on cAMP content in chinese hamster fibroblasts. **Il Nuovo Cimento D**, v.9, p.1245-1252, 1987.

102- KUBASOVA, T.; FENYO, M.; SOMOSY, Z.; GAZSÓ, L.; KERTÉSZ, I. Investigation on biological effect of polarized light. **Photochem. Photobiol.**, v. 48, p.505-9, 1988.

103- BOLTON, P.; DYSON, M.; YOUNG, S. The effect of polarized light on the release of growth factors from the U-937 macrophage-like cell line. **Laser Ther.**, v.4, p.33-7, 1992.

104- KARU, T.I. Local pulsed heating of absorbing chromophores as a possible primary mechanism of low power laser effects. In: **Lasers Applications in Medicine and Surgery**, Monduzzi, Bologna, p.253-8, 1992.

105- KARU, T. Interactions of monochromatic visible light and near infrared radiation with cells: currently discussed mechanisms. In: **Laser-Tissue Interaction VI**, S. L. Jacques and A. Katzir, eds., Proc. SPIE v.2391, p.576-586, 1995.

106- BEM-DOV, N.; SHEFFER, G.; IRINICHEV, A.; WERNIG, A.; ORON, U.; HALEVY, O. Low energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1448, p.372-380, 1999.

107- SOARES, J.H.; TARDIVO, J.P.; GOLDENBERG, S.; KATZ, S.; MOURA, L.A.R. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o laser de He-Ne. **Acta Cir. Bras.**, v.4, p.56-60, 1989.

-
- 108- ZHENG, H.; QIN, J-Z.; XIN, H.; XIN, S-Y. The activating action of low level helium neon laser radiation on macrophages in the mouse model. **Laser Ther.**, v.4, p.55-8, 1992.
- 109- CAMBIER, D.C.; VANDERSTRAETEN, G.G.; MUSSEN, M.J.; VAN DER SPANK, J.T. Low-power laser and healing of burns. A preliminary assay. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.97, p.555-8, 1996.
- 110- AL-WATBAN, F.A.H.; ZHANG, X.Y. Comparison of wound healing process using argon and krypton lasers. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.15, p.209-215, 1997.
- 111- TATARUNAS, A.C.; MATERA, J.M.; DAGLI, M.L.Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). **Acta Cir. Bras.**, v.13, 1998.
- 112- SCHLAGER, A.; KRONBERGER, P.; PETSCHKE, F.; ULMER, H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. **Lasers Surg. Med.**, v.27, p.39-42, 2000.
- 113- FREITAS, I.G.F.; BARANAUSKAS, V.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Laser effects on osteogenesis. **Appl. Surf. Sci.**, v. 154-155, p.548-554, 2000.
- 114- GUERINO, M.R.; BARANAUSKAS, V.; GUERINO, A.C.; PARIZOTTO, N. Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. **Appl. Surf. Sci.**, v.154-155, p.561-4, 2000.
- 115- LUNDEBERG, T.; MALM, M. Low-power He-Ne laser treatment of venous leg ulcers. **Ann. Plast. Surg.**, v.27, p.537-9, 1991.

-
- 116- EDUARDO, C.P.; CECCHINI, S.C.M.; CECCHINI, R.C.M. Benefits of low power lasers on oral soft tissues. In: **Lasers in Dentistry II**, H.A. Wigdor, J.D.B. Featherstone, J.M. White, J. Neev, eds., Proc. SPIE v.2672, p. 27-33, 1996.
- 117- COWEN, D.; TARDIEU, C.; SCHUBERT, M.; PETERSON, D.; RESBEUT, M.; FAUCHER, C.; FRANQUIN, J.C. Low energy He-Ne laser in the prevention of oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. **Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.**, v.38, p.697-703, 1997.
- 118- SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHÖN, H.; KNOBLER, R.; HAVELEC, L.; SCHINDL, L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. **Diabetes Care**, v.21, p.580-4, 1998.
- 119- LAZOURA, H.; COHEN, M.; LAZOURA, E.; COSIC, I. Do acupuncture points have different absorption properties to laser light than surrounding skin? **Proc. of Second International Conference on Bioelectromagnetism**, Melbourne-Austrália, p.171-2, 1998.
- 120- IWASE, T.; HORI, N.; MORIOKA, T. Possible mechanisms of the He-Ne laser effects on the cell membrane characteristics. **Lasers Med. Surg.**, v.4, p.166-171, 1988.
- 121- AMOILS, S.; KUES, J. The effect of low level laser therapy on acute headache syndromes. **Laser Ther.**, v.3, p.155-7, 1991.
- 122- MIKHAILOV, V.A.; SKOBELKIN, O.K.; DENISOV, I.N.; FRANK, G.A.; VOLTCHENKO, N.N. Results of treatment in patients with IIa – IIIast. breast cancer treated by combination of low level laser therapy (LLLT) and surgery (5-years experience). In: **Laser Use in Oncology: CIS Selected Papers**, A.V. Ivanov, M.A. Kazaryan, eds., Proc. SPIE v.2728, p.83-91, 1996.

123- ZYRYANOV, B.N.; EVTUSHENKO, V.A.; EVTUSHENKO, G.S.; SOLDATOV, L.I.; MUSABAEVA, L.I.; UDALYI, I.F.; TARASENKO, T.I.; CHERDYNTSEVA, N.V.; VUSIK, M.V.; POPOVICH, V.I.; PETRAKOVA, V.S.; DIKOVICH, V.A. Copper-vapor low-intensity laser therapy. In: **Laser Use in Oncology: CIS Selected Papers**, A.V. Ivanov, M.A. Kazaryan, eds., Proc. SPIE v.2728, p.100-107, 1996.

124- BHAGWANANI, N.S.; BATHIA, G.C.; SHARMA, N. Low level nitrogen laser therapy in pulmonary tuberculosis. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v.14, p.23-5, 1996.

125- PERRIN, D.; JOLIVALD, J.R.; TRIKI, H.; GARBARG-CHENON, A.; D'INCAMPS, B.L.; LEFEVRE, B.; MALKA, G.; MIRO, L.; NICOLAS, J.C. Effect of laser irradiation on latency of herpes simplex virus in a mouse model. **Path. Biol.**, v.45, p.24-7, 1997.

126- MYERS, T.; MURPHY, D.; WHITE, J.; GOLD, S. Conservative soft tissue management with the low-powered pulsed Nd:YAG dental laser. **Prac. Perio. Aesth. Dent.**, v.4, p.6-12, 1992.

127- NICOLA, E.M.D. Caracterização de micro-lesões produzidas por laser de CO₂ na mucosa oral de cães, em função da variação de parâmetros intrínsecos do equipamento. **Tese de Doutorado**, FCM/UNICAMP, 1984.

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

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

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

131- TUCHIN, V.V. Fundamentals of the interaction of low-intensity laser radiation with biotissues : dosimetric and diagnostic therapeutics. **Bull. Russian Acad. Soc.**, v.59, p.1031-1053, 1995.

132- http://www.bccancer.bc.ca/research/imaging/to01_intro.html

133- CASTRONUOVO, G.; FAVA, G.; GIAVELLI, S. The skin role during a low level laser therapy. In **Lasers Applications in Medicine**, Monduzzi, Bologna, p.19-24, 1992.

134- WILSON, B.C.; JACQUES, S.L. Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications. **IEEE J. Quant. Elect.**, v.26, p.2186-2199, 1990.

135- ANDERSON, R.R.; PARRISH, J.A. The optics of human skin. **J. Invest. Dermat.**, v.77, p.13-9, 1981.

136- SAIDI, I.S.; JACQUES, S.L.; TITTEL, F.K. Mie and Rayleigh modeling of visible-light scattering in neonatal skin. **Appl. Opt.**, v.34, p.7410-8, 1995.

137- HIELSCHER, A.H.; MOURANT, J.R.; BIGIO, I.J. Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light from tissue phantoms and biological cell suspensions. **Appl. Opt.**, v.36, p.125-135, 1997.

138- TUCHIN, V.V. Light scattering study of tissues. **Physics-Usppekhi**, v.40, p.495-515, 1997.

139- Schmitt, J.M.; Kumar, G. Optical scattering properties of soft tissue : a discrete particle model. **Appl. Opt.**, v.37, p.2788-2797, 1998.

-
- 140- OBOLENSKAYA, K.; SAMOILOVA, K.; SNOPOV, S.; SHEVCHENKO.
Modulation of functional state of circulating leukocytes after single exposure of skin to visible incoherent polarized light. **Proc. of Second World Congress for Laser Therapy**, 03 a 05/09, Kansas City – EUA, p.10-1, 1998.
- 141- CHEUNG, R.L-T.; ISHIMARU, A. Transmission, backscattering, and depolarization of waves in randomly distributed spherical particles. **Appl. Opt.**, v.21, p.3792-8, 1982.
- 142- ISHIMARU, A.; YEH, C.W. Matrix representation of the vector radiative-transfer theory for randomly distributed nonspherical particles. **J. Opt. Soc. Am. A**, v.1, p.359-364, 1984.
- 143- ISHIMARU, A. Diffusion of light in turbid material. **Appl. Opt.**, v.28, p.2210-5, 1989.
- 144- PRAHL, S.A. Light transport in tissue. **PhD Thesis**, University of Austin, 1990.
- 145- GORODNICHEV, E.E.; ROGOSKIN, D.B. Polarization effects during light propagation in media characterized by highly anisotropic scattering. **Atm. Oc. Phys.**, v.31, p.619-630, 1996.
- 146- CHANDRASEKHAR, S. **Radiative Transfer**. Dover Publ., New York, 1960.
- 147- AMBIRAJAN, A.; LOOK, D.C. A backward Monte Carlo of the multiple scattering of a polarized laser beam. **J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer**, vol. 58, p.171-192, 1997.
- 148- HIELSCHER, A.H.; EICK, A.A.; MOURANT, J.R.; SHEN, D.; FREYER, J.P.; BIGIO, I.J. Diffuse backscattering Mueller matrices of highly scattering media. **Opt. Express**, v.1, p.441-453, 1997.

-
- 149- BICOUT, D.; BROSSEAU, C. Multiply scattered waves through a spatially random medium: entropy production and depolarization. **J. Phys. I France**, v.2, p.2047-2063, 1992.
- 150- BROUSSEAU, C. Mueller matrix analysis of light depolarization by a linear optical medium. **Opt. Comm.**, v.131, p.229-235, 1996.
- 151- JARRY, G.; STEIMER, E.; DAMASCHINI, V.; EPIFANIE, M.; JURCZAK, M.; KAISER R. Coherence and polarization of light propagating through scattering media and biological tissues. **Appl. Opt.**, v.37, p.7357-7367, 1998.
- 152- ROGATKIN, D. A. Development of the two-flux Kubelka-Munk model for solution of 1D problems of light propagation in scattering biological tissues and media. **Phys. Quantum Opt.**, v.87, p.109-113, 1999.
- 153- BARTEL, S.; HIELSCHER, A.H. Monte Carlo simulations of the diffuse backscattering Mueller matrix for highly scattering media. **Appl. Opt.**, v.39, p.1580-8, 2000.
- 154- YAROSLAVSKII, I.V.; TUCHIN, V.V. Light propagation in multilayer scattering media: modeling by Monte Carlo method. **Opt. Spectrosc.**, v.72, p.505-509, 1992.
- 155- GRAAFF, R.; KOELINK, M.H.; DE MUL, F.F.M.; ZIJLSTRA, W.G.; DASSEL, A.C.M.; AARNOUDSE, J.G. Condensed Monte Carlo simulations for the description of light transport. **Appl. Opt.**, v.32, p.426-434, 1993.
- 156- SONG, Z.; DONG, K.; HU, X.H.; LU, J.Q. Monte Carlo simulation of converging laser beams propagating in biological materials. **Appl. Opt.**, v.38, p.2944-9, 1999.

-
- 157- SCHMITT, J.M.; ZHOU, G.X.; WALKER, E.C.; WALL, R.T. Multilayer model of photon diffusion in skin. **J. Opt. Soc. Am. A**, v.7, p.2141-2153, 1990.
- 158- BICOUT, D.J.; WEISS, G.H. A measure of photon penetration into tissue in diffusion models. **Opt. Comm.**, v.158, 213-220, 1998.
- 159- WANG, L.V.; JACQUES, S.L. Source of error in calculation of optical diffuse reflectance from turbid media using diffusion theory. **Comp. Meth. Prog. Biomed.**, v.61, 163-170, 2000.
- 160- ELIYAHU, D.; ROSENBLUH, M.; FREUND, I. Angular intensity and polarization dependence of diffuse transmission through random-media. **J. Opt. Soc. Am. A**, v.10, p.477-491, 1993.
- 161- BICOUT, D.; BROSSEAU, C.; MARTINEZ, A.S.; SCHMITT, J.M. Depolarization of multiply scattered waves by spherical diffusers- influence of the size parameter. **Phys. Rev. E**, v.49, p.1767-1770, 1994.
- 162- MACKINTOSH, F.C.; ZHU, J.X.; PINE, D.J.; WEITZ, D.A. Polarization memory of multiply scattered light. **Phys. Rev. B**, v.40, p.9342-5, 1989.
- 163- SCHMITT, J.M.; GANDJBAKHCHÉ, A.H.; BONNER, R.F. Use of polarized light to discriminate short-path photons in a multiply scattering medium. **Appl. Opt.**, v.31, p.6535-6546, 1992.
- 164- DEMOS, S.G.; ALFANO, R.R. Optical polarization imaging. **Appl. Opt.**, v.36, p.150-5, 1997.
- 165- MORGAN, S.P.; KHONG, M.P.; SOMEKH, M.G. Effects of polarization state and scatterer concentration on optical imaging through scattering media. **Appl. Opt.**, v.36, p.1560-5, 1997.

-
- 166- MÉNDEZ, E.R., NAVARRETE, A.G.; LUNA, R.E. Statistics of the polarization properties of one-dimensional randomly rough surfaces. **J. Opt. Soc. Am. A**, v.12, p.2507-2516, 1995.
- 167- SANKARAN, V.; SCHÖNENBERGER, K.; WALSH JR., J.T.; MAITLAND, D.J. Polarization discrimination of coherently propagating light in turbid media. **Appl. Opt.**, v.38, p.4252-4261, 1999.
- 168- BEEK, J.F.; BLOKLAND, P.; POSTHUMUS, P.; AALDERS, M.; PICKERING, J.W.; STERENBORG, H.J.C.M.; VAN GEMERT, M.J.C. *In vitro* double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm. **Phys. Med. Biol.**, v.42, p.2255-2261, 1997.
- 169- VAN GEMERT, M.J.C.; JACQUES, S.L.; STERENBORG, H.J.C.M.; STAR, W.M. Skin optics. **IEEE Trans. Biomed. Eng.**, v.36, p.1146-1154, 1989.
- 170- <http://omlc.ogi.edu/pubs/pdf/cheong90a.pdf>
- 171- GRAAF, R.; DASSEL, C.M.; KOELINK, M.H.; DE MUL, F.F.M.; AARNOUDSE, J.G.; ZIJLSTRA, W.G. Optical properties of human dermis *in vitro* and *in vivo*. **Appl. Opt.**, v.32, p.435-447, 1993.
- 172- JACQUES, S.L.; ALTER, C.A.; PRAHL, S.A. Angular dependence of HeNe laser light scattering by human dermis. **Lasers Life Sci.**, v.1, p.309-333, 1987, *apud* CHEONG, W.F.; PRAHL, S.A.; WELCH, A.J. A review of the properties of biological tissues. **IEEE J. Quant. Elect.**, v.26, p.2166-2185, 1990.
- 173- SIMPSON, C.R.; KOHL, M.; ESSENPREIS, M.; COPE, M. Near-infrared optical properties of *ex vivo* human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. **Phys. Med. Biol.**, v.43, p.2465-2478, 1998.

-
- 174- OLIVEIRA, S.F.; ABRAHAMSOHN, P.A.; NAGATA, T.; ZORN, T.M.T.
Incorporation of ^3H -amino acids by endometrial stromal cells during decidualization in the mouse. A radioautographical study. **Cell. Mol. Biol.**, v.41, p.107-116, 1995.
- 175- FENYÖ, M. Theoretical and experimental basis of biostimulation by laser irradiation. **Opt. Laser Tech.**, v.16, p.209-215, 1984.
- 176- KERTESZ, I.; FENYÖ, M.; MESTER, E.; BATHORY, G. Hypothetical physical model for laser biostimulation. **Opt. Laser Tech.**, v.14, p.31-2, 1982.
- 177- SANKARAN, V.; EVERETT, M.J.; MAITLAND, J.; WALSH JR., J.T.
Comparison of polarized light propagation in biological tissue and phantoms. **Opt. Letters**, v.24, p.1044-46, 1999.
- 178- JACQUES, S.L.; OSTERMEYER, M.; WANG, L.; STEPHENS, D. Polarized light transmission through skin using video reflectometry: toward optical tomography of superficial tissue layers. In: **Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems VI**, R.R. Anderson, ed., Proc. SPIE v.2671, p.199-220, 1996.
- 179- KOLÁROVÁ, H., DITRICOVÁ, D. WAGNER, J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. **Lasers Surg. Med.**, v.24, p.231-5, 1999.
- 180- JACQUES, S.L.; ROMAN, J.R.; LEE, K. Imaging superficial tissues with polarized light. **Lasers Surg. Med.**, v.26, p.119-129, 2000.
- 181- VAN BREUGEL, H.H.F.I.; BÄR, P.R.D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblasts *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, v.12, p.528-537, 1992.

-
- 182- CHERRY, R. Measurement of protein rotational diffusion in membranes by flash photolysis. **Meth. Enzimol.**, v. 54, p.47, 1978, *apud* TÚNER, J.; HODE, L. **Low level laser therapy: clinical practice and scientific background.** Prima Books, Sweden, 1998.
- 183- ZECELL, D.M. Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores. **Tese de Doutorado**, IF/UNICAMP, 1991.
- 184- PARIZOTTO, N.A. Ação do laser de He-Ne sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. **Tese de Doutorado**, FEEC/UNICAMP, 1998.
- 185- VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.S. **Biologia Celular.** Livraria Ateneu, Rio de Janeiro, 1987.
- 186- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Bioquímica: mamíferos.** Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1985.
- 187- VAN WINKLE JR., W.; HASTINGS, J.C.; BARKER, E.; WOHLAND, W. Role of the fibroblast in controlling rate and extent of repair in wounds of various tissues. In **Biology of Fibroblast**, Academic Press London and New York, p.559-570, 1973.