



BR0645467

INIS-BR--4048

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**EFEITO DO LASER DE HÉLIO NEÔNIO SOBRE A
MICROCIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA DURANTE A
REPARAÇÃO TECIDUAL**

**ESTUDO *IN VIVO* POR MEIO DE FLUXOMETRIA LASER
DOPPLER**

SILVIA CRISTINA NÚÑEZ

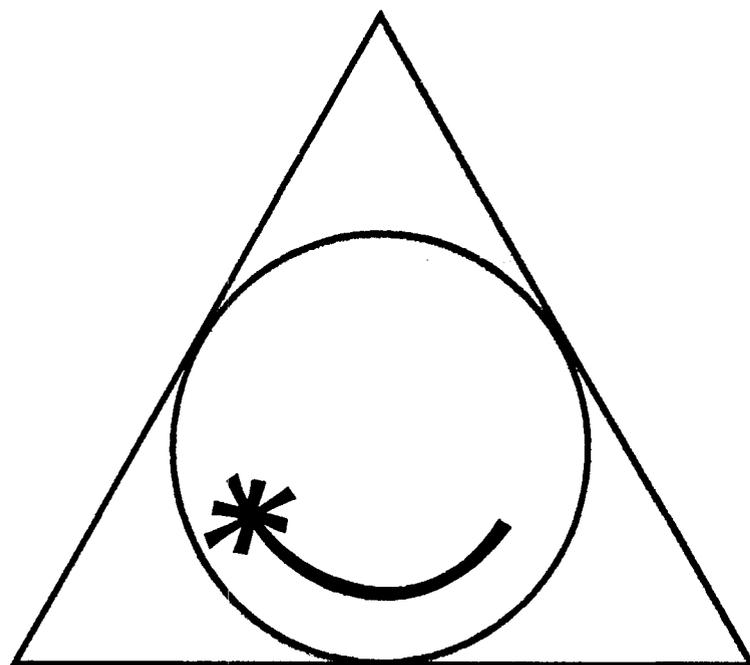
Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre Profissional na área de Lasers em
Odontologia.

Orientador:
Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

Co-orientador:
Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira

**São Paulo
2002**





**MESTRADO PROFISSIONALIZANTE DE LASER EM
ODONTOLOGIA**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EFEITO DO LASER DE HÉLIO NEÔNIO SOBRE A
MICROCIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA DURANTE A REPARAÇÃO
TECIDUAL

ESTUDO *IN VIVO* POR MEIO DE FLUXOMETRIA LASER
DOPPLER

Silvia Cristina Núñez

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



Orientador: Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques

Co-Orientador: Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira

SÃO PAULO
2002





INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITO DO LASER DE HÉLIO NEÔNIO SOBRE A
MICROCIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA DURANTE A REPARAÇÃO
TECIDUAL**

**ESTUDO *IN VIVO* POR MEIO DE FLUXOMETRIA LASER
DOPPLER**

Silvia Cristina Núñez

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

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz
Lage-Marques**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Gessé
Eduardo Calvo Nogueira**

SÃO PAULO
2002



Aos meus pais pelo esforço de uma vida em prol de meu desenvolvimento pessoal, vocês sempre serão meus maiores ídolos.

Ao meu marido, Hector, pelo apoio, incentivo e confiança. Sem você tudo teria sido mais difícil.

A minha irmã Mavilde, pela paciência, e ajuda, sei que sempre poderei contar com você.

Marcos e Juliana, conviver com vocês faz a vida especial.

AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas a quem devo agradecimentos, sem elas, a conclusão deste trabalho seria se não impossível, com certeza muito mais difícil, entre estas estão:

Prof. Dr. José Luiz Lage-Marques, por ter me conduzido neste trabalho.

Prof. Dr. Gessé Eduardo Calvo Nogueira, que participou da execução de todo o trabalho, transmitindo seus conhecimentos sobre o tema estudado, sempre com paciência e dedicação.

Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro, sua amizade, sabedoria e colaboração serão sempre lembradas.

Profa. Dra. Martha Marques Ferreira Vieira, por sua sabedoria e bom senso, incentivando-me no início deste projeto.

Professores do Mestrado Profissionalizante de Lasers em Odontologia representados pelo Prof. Dr. Nilson Dias Vieira Junior e pelo Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo pela transmissão do conhecimento, colaboração e exemplo.

Os funcionários do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Daniela de Fátima Teixeira da Silva, pelo apoio, paciência e conhecimento partilhado.

Aécio M. Yamada Júnior, por estar presente em momentos difíceis.

Aos meus colegas de Mestrado e de laboratório pelos momentos de descontração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho (Projeto/Processo 00/14817-9).

EFEITO DO LASER DE He-Ne NA MICROCIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA

ESTUDO *IN VIVO* POR MEIO DE FLUXOMETRIA LASER DOPPLER

Silvia Cristina Núñez

RESUMO

A microcirculação sangüínea desempenha função importante no processo de reparação tecidual e na melhora dos processos álgicos, podendo aumentar a oxigenação dos tecidos, e acelerar a retirada de produtos metabólicos que possam estar contribuindo para o quadro de dor. A terapia laser em baixa intensidade (LILT) é utilizada para promover melhora no processo de reparação tecidual e na obtenção de efeitos analgésicos, sendo esses efeitos associados, a um possível aumento do suprimento sangüíneo das áreas irradiadas. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio da fluxometria laser Doppler (FLD), os efeitos provocados pela radiação emitida por um laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{nm}$) na microcirculação sangüínea durante o processo de reparação tecidual. Para esta finalidade foram selecionados 15 ratos machos que receberam uma lesão provocada por nitrogênio líquido aplicado sobre a região dorsal, sendo o fluxo sangüíneo desta área, avaliado em diferentes momentos durante 21 dias. Devido à emissão de radiação pelo fluxômetro um grupo controle foi instituído para a avaliação de possíveis efeitos causados por esta radiação na microcirculação. Para a avaliação dos efeitos do laser de He-Ne foi utilizada dose de $1,15\text{J}/\text{cm}^2$, com intensidade de $6\text{mW}/\text{cm}^2$. Os resultados obtidos demonstram alterações de fluxo provocadas pela lesão e conseqüente resposta inflamatória. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estudados. Pela observação dos resultados obtidos, a radiação proveniente do laser de He-Ne não afeta a microcirculação imediatamente após a irradiação, embora o grupo irradiado tenha apresentado aumento percentual de fluxo médio no sétimo dia experimental em relação ao grupo controle. Novos estudos são necessários, a fim de validar o uso deste comprimento de onda na promoção de alterações benéficas no fluxo sangüíneo das áreas irradiadas.

**He-Ne LASER EFFECTS ON BLOOD MICROCIRCULATION
AN *IN VIVO* STUDY THROUGH LASER DOPPLER FLOWMETRY**

Silvia Cristina Núñez

ABSTRACT

Blood microcirculation performs an important function in tissue repair process, as well as in pain control, allowing for greater oxygenation of the tissues and the accelerated expulsion of metabolic products, that may be contributing to pain. Low Intensity Laser Therapy (LILT) is widely used to promote healing, and there is an assumption that it's mechanism of action may be due to an enhancement of blood supply. The purpose of this study was to evaluate, using laser Doppler flowmetry (LDF), the stated effects caused by radiation emitted by a He-Ne laser ($\lambda=632.8\text{nm}$) on blood microcirculation during tissue repair. To this end, 15 male mice were selected and received a liquid nitrogen provoked lesion, above the dorsal region, and blood flow was measured periodically, during 21 days. Due to radiation emission by the LDF equipment, a control group was established to evaluate possible effects caused by this radiation on microcirculation. To evaluate the He-Ne laser effects, a $1.15\text{J}/\text{cm}^2$ dose was utilized, with an intensity of $6\text{mW}/\text{cm}^2$. The results obtained demonstrate flow alterations, provoked by the lesion, and subsequent inflammatory response. There was no statistical difference between the studied groups. As per the analysis of the results there is no immediate effect due the radiation emitted by a He-Ne laser on microcirculation, although a percentage increase was observed in day 7 on medium blood flow rate in irradiated specimes. New studies are necessary to validate the use of this wavelength, in order to promote beneficial alterations in blood supply in radiated areas.

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 6.1 – Registros de R3 a R3E realizados em 21 dias e resumo dos eventos.....	43
Tabela 6.2 – Valores de F(%) do grupo 1 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 1 a 5 (A1 a A5).....	46
Tabela 6.3 – Valores de F(%) do grupo 2 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 6 a 10 (A6 a A10).....	47
Tabela 6.4 – Valores de F(%) do grupo 3 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 12 a 15 (A12 a A15).....	48
Tabela 6.5 – Valores estatísticos (t) e valores de Probabilidade (p), obtidos comparando os momentos R3 a R3E em relação ao inicial (R1) dos grupos 2 e 3.....	50

Tabela 6.6 - Intervalo de confiança dos valores médios de F(%) dos grupos 1, 2 e 3, correspondentes ao grau de confiança de 95%.....	51
Tabela 6.7 – Valores estatísticos (t) e valores de Probabilidade (p) obtidos comparando os momentos semelhantes entre os grupos 1 e 3.....	51
Tabela 6.8 - Valores estatísticos (t) e valores de Probabilidade (p) obtidos comparando os momentos semelhantes entre os grupos 2 e 3.....	52
Tabela 6.9 - Valores estatísticos (t) e valores de Probabilidade (p) obtidos comparando os momentos consecutivos R5-R7, R5A-R7A e R5B e R7B do grupo 2.....	52

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 5.1 – Braço metálico articulado, confeccionado para a fixação da sonda do fluxômetro.....	32
FIGURA 5.2 – Medição da região dorsal e seleção das áreas anatômicas para monitoração do luxo.....	33
FIGURA 5.3 – Ajuste da distância da sonda do fluxômetro em relação à pele do animal.....	33
FIGURA 5.4 – Aspecto da pele após aplicação de nitrogênio líquido.....	34
FIGURA 5.5 – Irradiação realizada nos animais do Grupo 2.....	36
FIGURA 5.6 – Aspecto da lesão dos espécimes do Grupo laser no sétimo dia experimental.....	37
FIGURA 5.7 – Aspecto da lesão dos espécimes do Grupo controle no sétimo dia experimental.....	38

FIGURA 6.1 - Gráfico dos valores de F(%) do grupo 1 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.....	46
FIGURA 6.2 – Gráfico dos valores de F(%) do grupo 2 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.....	47
FIGURA 6.3 – Gráfico dos valores de F(%) do grupo 3 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.	48
FIGURA 6.4 – Gráfico dos valores médios de F(%) dos grupos 1, 2 e 3 em função dos momentos registrados em escala não linear para evidenciar os momentos.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

- °C – Graus Celsius
- 5 HT – 5-hidroxitriptamina
- cm – centímetro
- cm² – centímetro quadrado
- DNA – Ácido Dessoxiribonucleico
- ERO – Espécimes Reativas de Oxigênio
- FLD – Fluxometria Laser Doppler
- RMI – Ressonância Magnética de Imagem
- GaAlAs – Arseneto de Gálio Alumínio
- He-Ne – Hélio-Neônio
- Hz – Hertz
- IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
- J – joule
- kHz – kilohertz
- LED – Light Emitted Diode
- LILT – Low Intensity Laser Therapy
- m² – metro quadrado
- mm – milímetro
- mm² – milímetro quadrado
- mmHg – milímetro de mercúrio
- mW – miliwatt
- nm – nanometro
- RNA – Ácido Ribonucleico
- s – segundos
- W – watt
- λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 BIOMODULAÇÃO E MICROCIRCULAÇÃO SANGÜÍNEA.....	5
3.1 Pele.....	5
3.2 Fluxo sangüíneo e Microcirculação.....	5
3.3 Reparação Tecidual.....	9
3.4 Biomodulação.....	10
4 FLUXOMETRIA LASER DOPPLER.....	25
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1 Descrição do experimento.....	31
5.2 Modelagem para análise de resultados.....	39
6 RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	42
6.1 Resultados.....	44
6.2 Análise dos Resultados.....	53
6.2.1 Grupo 1 – Controle Fluxômetro.....	53

6.2.2 Grupo 2 – Tratamento Laser.....	53
6.2.3 Grupo 3 – Controle Laser.....	54
6.2.4 Comparação entre Grupo 1 e 3.....	56
6.2.5 Comparação entre Grupo 2 e 3.....	56
6.3 Significância dos resultados	57
6.4 Considerações gerais e sugestões para trabalhos futuros.....	58
7 CONCLUSÕES.....	66
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1- INTRODUÇÃO

As características morfológicas e fisiológicas dos tecidos são essenciais para o correto funcionamento dos sistemas biológicos. Alterações morfológicas nos tecidos são provocadas por agentes físicos, químicos ou microbiológicos.

A função microcirculatória desempenha importante papel na reparação tecidual, permitindo a chegada de células de defesa na área afetada, com conseqüente eliminação do agente agressor, por permitir a chegada de células fagocitárias e enzimas proteolíticas promovendo o debridamento e a limpeza da lesão, além de prover condições necessárias para formação dos tecidos. Condições clínicas que dificultem ou impossibilitem a completa função microcirculatória, como o diabetes acarretam atraso no reparo tecidual.

A terapêutica convencional consiste no uso de medicamentos sistêmicos, terapia hiperbárica e quando possível, associação de terapia local, com a finalidade de promover uma melhora na irrigação sangüínea dos tecidos afetados .

A radiação laser em baixa intensidade vem se destacando como uma das ações terapêuticas possíveis, e vêm sendo estudada, para auxiliar o processo de reparação tecidual há mais de 30 anos. Apesar de ser uma modalidade de tratamento amplamente estudada, seu uso clínico ainda gera controvérsias na comunidade científica, sendo possível encontrar, na literatura especializada, estudos favoráveis ao uso desta modalidade terapêutica, enquanto, outros questionam sua validade.

Um dos fatores que geram controvérsias é a dificuldade em se estabelecer parâmetros adequados de uso, devido ao desconhecimento dos exatos mecanismos de ação desta fonte de luz nos tecidos biológicos. A modulação do fluxo sangüíneo da microcirculação encontra-se como um dos efeitos fisiológicos associados à terapia laser em baixa intensidade, sendo este dado associado a efeitos benéficos na reparação tecidual, bem como na obtenção de efeitos analgésicos.

Em odontologia os lasers em baixa intensidade têm sido utilizados com sucesso para o tratamento de lesões de mucosa e pele com finalidade reparadora, sendo descritas diversas aplicações clínicas que resultam em melhora na reparação tecidual e no conforto proporcionado aos pacientes. Existe, entretanto, a necessidade de maiores evidências científicas sobre os mecanismos de ação dos diferentes comprimentos de onda, intensidades, regimes de operação e formas de aplicação utilizados a fim de obterem-se efeitos clínicos uniformes.

As radiações visível e infravermelha diferem em seu mecanismo de ação, logo, é controversa a afirmação de que ambas radiações possam atuar da mesma forma sobre o fluxo sanguíneo na microcirculação.

O laser de He-Ne emitindo em 632,8 nm tem apresentado em diversos estudos, eficácia na proliferação celular, tendo sido demonstrado sua ação específica sobre fibroblastos e sobre a deposição de colágeno durante o processo de reparação tecidual, porém seu efeito sobre a microcirculação sanguínea, representa um ponto de divergência entre diferentes autores na literatura especializada.

A microcirculação sanguínea pode ser avaliada através de diferentes métodos. Entre eles podem ser citados os métodos histológicos, estudo por meio de câmara termográfica, e o uso de contrastes radioativos e imagem por ressonância magnética.

Um método utilizado para avaliar a microcirculação é a fluxometria laser Doppler (FLD), que permite, dentro das limitações da técnica, avaliar o fluxo sanguíneo na microcirculação.

As vantagens oferecidas por esta técnica incluem a possibilidade de avaliação da microcirculação de forma não invasiva, e a execução de um estudo dinâmico em tempo real que pode ser efetuado por um período de tempo prolongado.

Sendo assim, foi utilizada neste estudo, a fluxometria laser Doppler, para análise dos efeitos sobre a microcirculação sanguínea advindos de uma agressão, e as possíveis alterações provocadas pelo

uso do laser de He-Ne em baixa intensidade sobre a microcirculação, nos parâmetros escolhidos para este estudo .

2 - OBJETIVO

A proposta deste estudo é a avaliação do fluxo sanguíneo em áreas não lesionadas, bem como lesionadas e irradiadas ou não, com laser de He-Ne em baixa intensidade, empregando a técnica de fluxometria laser Doppler em ratos, verificando:

1- A capacidade da técnica de fluxometria laser Doppler (FLD) em captar alterações de fluxo decorrentes do processo de reparação tecidual, nas condições propostas neste estudo;

2- A ocorrência de efeitos de biomodulação sobre a microcirculação sanguínea que possam ser associados à radiação emitida pelo fluxômetro nas condições estabelecidas por este estudo;

3- A ocorrência de efeitos de biomodulação sobre a microcirculação sanguínea que possam ser associados à radiação emitida pelo laser de He-Ne, nas condições propostas.

3 - BIOMODULAÇÃO E MICROCIRCULAÇÃO

Para a compreensão deste estudo serão inicialmente revisados aspectos conceituais relacionados à pele, microcirculação, fluxo sanguíneo, e a reparação tecidual e em seguida uma revisão literária sobre biomodulação.

3.1 - Pele

A pele é composta por três camadas, partindo da superfície para a profundidade, denominadas epiderme, derme e hipoderme .

A epiderme, um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, não apresenta vasos sanguíneos nem linfáticos, porém, contém numerosas terminações nervosas sensitivas livres.

A derme é um tecido conjuntivo do tipo frouxo na região superficial e do tipo denso ou fibroso na região mais profunda. Contém numerosos vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas sensitivas livres e corpusculares, além de anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas).

3.2 - Fluxo sanguíneo e microcirculação

Os mamíferos e as aves de forma geral apresentam elevado nível de atividade metabólica, e conseqüentemente, um complexo e dispendioso sistema circulatório.

Para a compreensão do fluxo sanguíneo e suas variações, o sistema circulatório pode ser comparado a um tubo contendo um líquido, sujeito às leis da Física para poder mover-se. É denominado fluxo ou vazão, o volume de líquido que passa por um ponto qualquer do tubo, por unidade de tempo.

O fluxo pode ser descrito na forma de uma equação matemática, que relaciona as diferenças de pressão entre as extremidades do tubo, seu raio e comprimento, e a viscosidade do líquido, demonstrando o

fluxo que poderá ocorrer nestas circunstâncias. Tal expressão é definida matematicamente pela fórmula:

$$F = \Delta P \pi r^4 / 8NL \quad (1)$$

onde F, representa fluxo; ΔP a diferença de pressão entre as extremidades do tubo; r, o raio do tubo; N, o coeficiente de viscosidade do líquido e L o comprimento do tubo.

A importância da equação (1) está nas variáveis que controlam o fluxo. Quanto maior a diferença de pressão entre as extremidades, maior o fluxo, sendo que o aumento da viscosidade e o comprimento do tubo contribuem para uma diminuição do fluxo. Porém o fator mais importante da equação está relacionado ao raio do tubo por se encontrar elevado à quarta potência, sendo assim, se for dobrado o raio do tubo, o fluxo aumentará em 16 vezes seu valor original.

Na microcirculação sangüínea o fluxo sangüíneo é controlado pelas arteríolas e capilares. As arteríolas são os últimos vasos pré-capilares, têm calibre de aproximadamente 0,15 mm e apresentam características físicas e funções diferentes das artérias.

Suas funções são reduzir a pressão arterial que atingirá os capilares, até níveis adequados para a entrada e saída de produtos e, o controle do fluxo, através de variação de seu calibre. As arteríolas são capazes de alterações de calibre da ordem de 1 para 4 e assim, o fluxo sangüíneo nestes vasos varia cerca de 256 vezes podendo alcançar até 625 vezes na irrigação muscular.

Os capilares são vasos delgados de cerca de 0,004 mm de diâmetro, de pequeno comprimento e numerosos. A rede circulatória periférica compreende cerca de 10 bilhões de vasos capilares. Suas paredes são delgadas, constituídas por uma única camada de células do epitélio circulatório, conhecido como endotélio, circundado por uma lâmina basal acelular e relativamente rígida. Esta estrutura permite que ocorram as trocas entre o sangue e os tecidos, em virtude da

permeabilidade apresentada pelo cemento celular e lâmina basal, que constituem a camada de revestimento destes vasos. A superfície total disponível para trocas, representada pela extensão do endotélio capilar é de cerca de 120 m² para um ser humano adulto.

Os capilares, devido à simplicidade de sua organização, não possuem vasomotricidade capaz de realizar vasoconstrição ou dilatação, porém o fluxo capilar é regulado, uma vez que os plexos capilares possuem um anel de musculatura lisa conhecido como esfíncter pré-capilar ou metarteríola, cuja atividade permite apenas a abertura ou o fechamento do plexo em sua porção arteriolar.

A circulação venosa é uma circulação de baixa pressão, encarregada de promover o retorno sangüíneo para o coração. A pressão venosa varia de 10 mmHg no final dos capilares a valores próximos a 0 mmHg na desembocadura das veias cavas. O sistema venoso apresenta a função de reservatório sangüíneo, o qual é capaz de ajustar a capacidade do sistema circulatório, levando a aumentos ou reduções do volume sangüíneo circulante.

O fluxo sangüíneo local é regulado, em praticamente todos os territórios vasculares por um mecanismo automático na intimidade dos tecidos, e não requer necessariamente regulagem hormonal ou do sistema nervoso.

Toda vez que a atividade metabólica se altera em um determinado tecido, torna-se necessária uma alteração de fluxo, que é por sua vez determinada pela própria alteração metabólica, pois, os produtos do metabolismo local influenciam de forma acentuada a musculatura das arteríolas e dos esfíncteres pré-capilares.

Na ocorrência de uma obstrução temporária do fluxo em qualquer área, ocorrerá um acúmulo localizado de metabólitos anaeróbicos, promovendo uma vasodilatação local que resulta em aumento do fluxo, levando à condição clínica denominada hiperemia reativa, caracterizada por um aspecto avermelhado da área.

Além da regulação metabólica o fluxo pode ser ajustado por meio de mecanismos nervosos e hormonais. A ativação do sistema nervoso simpático determina vasoconstrição arteriolar na grande maioria dos territórios, com conseqüente redução do fluxo.

Os hormônios e as substâncias vaso ativas, apresentam ação sobre o sistema circulatório e participam dos mecanismos de regulação do fluxo, quer isoladamente ou em conjunto com o sistema nervoso. Dentre essas substâncias podem ser citadas:

Adrenalina: Hormônio secretado pela glândula supra-renal, em resposta ao estímulo da terminação nervosa simpática supra-renal. Tem ação predominantemente vasoconstritora sobre o sistema circulatório em geral.

Angiotensina: Essa substância resulta da ação de um hormônio produzido pelo rim, a renina, sobre proteínas plasmáticas, formando angiotensina I, que ao ser degradada por uma enzima conversora presente em certos tecidos, transforma-se em angiotensina II, um agente vasoconstritor.

Vasopressina ou hormônio antidiurético: Secretado pelas células neurais do hipotálamo anterior e conduzido a neuro-hipófise ou hipófise posterior com função de regular o volume hídrico. Apresenta ação vasoconstritora quando presente em altas concentrações no sangue circulante.

Bradicinina: Esta cinina que é um peptídeo vaso ativo se encontra em estado inativo na forma de bradicininogênio ligada a proteínas plasmáticas. Pode ser liberada de seu precursor inativo por vários agentes fisiológicos e fisiopatológicos. Uma vez liberada, esta substância apresenta ação vasodilatadora. Em condições fisiopatológicas como a inflamação, tem ação nos mecanismos locais de elevação do fluxo sanguíneo e no aumento da permeabilidade vascular.

Histamina e Serotonina (5-hidroxitriptamina): Estas substâncias são classificadas como aminas vasoativas. A histamina está armazenada nos grânulos dos mastócitos, dos basófilos e plaquetas, a serotonina está presente nos mastócitos de roedores e nas plaquetas em seres

humanos. Estas aminas causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

3.3 - Reparação tecidual

A microcirculação tem ação direta sobre o processo de reparação tecidual. A inflamação é bem definida como uma reação local do tecido conjuntivo às agressões. A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo, sendo que, a inflamação serve para destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, e ao mesmo tempo, desencadeia uma série complexa de eventos que tem como objetivo a cura e a reconstituição do tecido lesado. O reparo começa durante a fase ativa da inflamação, porém, só é finalizado após a neutralização do agente agressor.

A inflamação pode ser causada por agentes microbianos como fungos e bactérias; agentes físicos como queimaduras, radiação e trauma; agentes químicos como substâncias causticas e por reações imunológicas que, em particular, são comuns a vários aspectos da inflamação.

Pode se classificar a inflamação em aguda e crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, ocorrendo por poucos minutos até alguns dias, e suas características principais são a exudação de água e proteínas do plasma e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. É de certa forma estereotipada seja qual for à natureza do agente lesivo.

A inflamação crônica é menos uniforme, apresenta duração mais longa e está associada histologicamente com a presença de linfócitos e macrófagos além da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e tecido conectivo.

Embora o padrão da inflamação aguda seja único, a intensidade e a duração da reação é determinada tanto pela gravidade do agente lesivo, como pela capacidade reacional do hospedeiro.

A exudação característica da inflamação aguda é definida como escape de líquido, proteínas e células sanguíneas do sistema vascular para o tecido intersticial ou cavidades do corpo. Essa saída de proteínas plasmáticas significa uma alteração na permeabilidade normal da microcirculação na área da lesão.

Logo após a ação do agente flogístico começam a ocorrer transformações na microcirculação sanguínea do local afetado, iniciando uma isquemia transitória, seguida de hiperemia. Tais alterações fisiológicas são importantes para o início da resposta tecidual a agressão.

A reparação depende do estabelecimento, durante o processo inflamatório, de um ambiente favorável para o metabolismo celular por meio da eliminação de microorganismos, tecido necrótico e partículas externas.

Alguns fatores locais ou gerais alteram a reparação tecidual. Entre os fatores locais podem ser incluídos o tipo de agente agressor, contaminação da área lesionada, características da ferida e irrigação sanguínea da área.

Os fatores gerais que afetam a qualidade da reparação são o estado fisiológico, o estado nutricional, a temperatura corporal e o uso de terapêutica medicamentosa.

3.4 - Biomodulação

De acordo com Karu (1998), a energia de um fóton pode ser utilizada em medicina de duas formas, pelo aumento de temperatura podendo causar um dano esperado ao tecido como os métodos cirúrgicos de ablação e coagulação, ou através da absorção da energia do fóton por cromóforos absorvedores, causando alterações fotoquímicas e fotofísicas como a biomodulação.

A biomodulação, ou o uso de lasers sem efeito térmico em aplicações clínicas, foi relatada pela primeira vez em 1967 pelo professor Endre Mester e equipe, que demonstraram os efeitos da

radiação laser sobre a pele lesionada de ratos . O estudo foi realizado utilizando um laser de rubi de 694nm (Tunér e Hode,1999).

Segundo Smith (1991) a terapia utilizando laser em baixa intensidade é efetiva em uma série de situações clínicas, porém as bases fotobiológicas desta terapia não são completamente compreendidas.

Comprimentos de onda que variam da região visível ao infravermelho próximo do espectro eletromagnético demonstram efetividade clínica. Porém as propriedades fotoquímicas e fotofísicas destes comprimentos de onda diferem completamente.

A radiação visível quando absorvida por uma molécula pode excitar os elétrons nos átomos desta molécula levando-os a um estado maior de energia. Estes átomos excitados devem perder esta energia excedente e isto pode ocorrer através da emissão de um fóton porém, com um maior comprimento de onda, e com menos energia, como ocorre nos casos de fluorescência. A energia pode ainda ser desprendida na forma de calor; ou pode haver consumo de energia para processos fotoquímicos.

Ainda de acordo com Smith (1991), a absorção de radiação infravermelha pode resultar na rotação molecular (rotação da molécula sobre seu eixo) e vibração molecular. Desta forma não podem ser esperadas mudanças químicas nas moléculas provocadas por esse tipo de radiação, apesar da velocidade das reações bioquímicas poder ser aumentada devido à produção de calor.

As respostas fotobiológicas são resultados de mudanças fotoquímicas ou fotofísicas produzidas pela absorção de radiação eletromagnética não ionizante (Smith, 1991).

Os efeitos destes acontecimentos em nível celular seriam o aumento do metabolismo celular, aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos, estímulo à síntese de DNA e RNA, efeitos locais no sistema imunológico, aumento na formação de vasos capilares, entre uma série de outros efeitos (Tunér e Hode,1999; Danhof,2000).

Segundo Chow (2001) revisões sistemáticas como as realizadas pela Revisão Cochrane, sugerem que, o envolvimento de vários parâmetros diferente na terapia laser, torna difícil a avaliação da literatura, conforme demonstrado por Flemming e colab. (2002) e Turnér e colab. (1998).

Fatores como comprimento de onda da radiação utilizada para a terapia, regime de operação do laser contínuo ou pulsado e neste caso a freqüência, intensidade, densidade de energia ou fluência, tempo de irradiação, intervalos de tratamento, e o método de irradiação são aspectos a serem considerados, pois podem alterar a possibilidade de se obter os efeitos biológicos desejados (Turnér e Hode, 1999; Silveira, 2000; Ribeiro,2000; Núñez e colab.,2002).

A dose correta de tratamento para determinada condição clínica é aquela que deposita no tecido alvo a quantidade ótima de energia em Joules, com uma particular densidade de energia e com específica densidade de potência, na freqüência apropriada, usando ainda o comprimento de onda adequado (Chow, 2001).

As fluências, intensidades e freqüências utilizadas em estudos relativos aos efeitos da LILT em animais são extremamente variadas conforme descrito por Baxter (1994).

A fluência ou densidade de energia pode ser calculada como sendo $D (J/cm^2) = P(W) \times t (s) / A (cm^2)$, onde D é a densidade de energia, P a potência do equipamento, t é o tempo em segundos e A corresponde à área a ser irradiada (Simunovic,2000).

No trabalho de Kana *et al.* (1981) foram avaliados os efeitos da terapia laser em baixa intensidade sobre a cicatrização de feridas, utilizando ratos incisionados nos dois lados da coluna vertebral. As irradiações foram realizadas apenas do lado esquerdo, utilizando-se laser de He-Ne (632,8nm) ou laser de argônio (514,5nm) com as mesmas densidades de energia. A primeira irradiação ocorreu entre 16 e 18 horas após a operação com densidades de energias de 4, 10 e 20 J/cm^2 , e seguiu-se diariamente por 17 dias.

Segundo os autores, no décimo oitavo dia todas as lesões encontravam-se em estado de reparação avançado. Entre os dias três e doze o fechamento da ferida foi acelerado com laser de He-Ne a 4 J/cm^2 , havendo uma desaceleração do processo com a densidade de energia de 20 J/cm^2 . Os autores reportam a importância do comprimento de onda utilizado no processo de reparação tecidual, sendo que a radiação emitida pelo laser de He-Ne apresentou melhores resultados quando comparada à emitida pelo laser de argônio.

Mester e colab. (1985), obtiveram resultados sobre a reparação tecidual em pele de ratos tratados com laser de He-Ne com densidade de energia de 1 J/cm^2 , observando um aumento na síntese de prostaglandinas, logo após as primeiras irradiações, sendo que, os autores supõem que um aumento na síntese de colágeno, com conseqüente melhora da resistência à tração da pele lesionada, deva-se primariamente, a um estímulo na síntese de prostaglandinas.

Bisht e colab. (1994), provocaram feridas em ratos dos lados direito e esquerdo da linha dorsal média, com 8 mm de diâmetro. O lado direito serviu como controle e o esquerdo foi irradiado. Para a irradiação foi utilizado um laser de He-Ne contínuo com 5 mW de potência e diâmetro do feixe de 2 mm, com uma intensidade de 13 mW/cm^2 . A densidade de energia utilizada foi de 4 J/cm^2 , o tempo de irradiação de 5 minutos, a irradiação foi realizada por 17 dias.

Os critérios de avaliação foram visual e histológico com biópsias realizadas nos dias 3, 5, 7, 9, 12, 15 e 17 pós-operatório. Foram avaliadas a neovascularização, a proliferação de fibroblastos, e a formação de colágeno. Em seus resultados a terapia com laser em baixa intensidade promoveu um tempo de reparação menor. A diferença mais significativa na quantidade de colágeno ocorreu no dia 9, porém a maior produção ocorreu nos dias 3 e 4, e a neovascularização teve maior significância nos dias 5 e 7.

De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a radiação emitida pelo laser de He-Ne altera de forma positiva a ação

dos fibroblastos e das células epiteliais, juntamente com a atividade de células fagocitárias e polimorfonucleares, e segundo seus estudos os efeitos do laser de He-Ne na reparação tecidual estão associados principalmente a epitelização e a proliferação de fibroblastos nas áreas irradiadas.

Ribeiro (2000), demonstrou a importância da polarização do feixe laser, no processo de reparação tecidual *in vivo*, utilizando laser de He-Ne com fluência de 1 J/cm^2 , obtendo efeitos significantes, particularmente na formação do tecido conjuntivo na derme. Foi demonstrado em seu trabalho que a polarização da radiação pode ser preservada nas primeiras camadas da pele, com maior preservação do grau de polarização linear nas amostras de tecidos patológicas, quando comparadas às sadias. Seus resultados demonstram que a direção de polarização do campo elétrico alinhada paralelamente a uma direção preferencial no animal, afeta o processo cicatricial. Ribeiro e colab. (2002), também demonstraram efeitos benéficos sobre a reparação tecidual, utilizando laser de Nd:YFL (1047nm), com fluência de 1 J/cm^2 .

Para o teste de resistência a tração da pele de ratos diabéticos irradiados com laser emitindo em 830 nm, Stadler e colab. (2001), utilizaram ratos diabéticos para teste, e não diabéticos para controle. Para a realização da lesão os animais foram anestesiados via intraperitoneal, com uma mistura de Ketamina-Xilasina, tiveram a superfície da pele tricotomizada e limpa com chumaço de algodão, seguido da aplicação de Betadine para a desinfecção da superfície. Foram realizadas duas incisões de 1 cm, suturadas posteriormente para aposição dos bordos.

A irradiação com laser emitindo em 830 nm, com uma fluência de 5 J/cm^2 foi realizadas nos dias 0-4 ou 3-7 pós-trauma. Os animais foram sacrificados nos dias 11 ou 23 e foram realizados testes de tração com as amostras de tecido cicatrizado.

Os autores concluem que dentro dos parâmetros deste trabalho, houve um aumento significativo na resistência a tração da pele de ratos

diabéticos, após o uso do laser, sendo que, a diferença foi mais acentuada no grupo irradiado nos dias 3-7 pós-trauma.

De acordo com Bradley (1996), os lasers com emissão infravermelha são mais efetivos na obtenção de efeitos analgésicos. Os mecanismos para explicação dos efeitos analgésicos não estariam completamente elucidados, porém, entre as prováveis explicações encontra-se o aumento no fluxo sanguíneo, eliminando assim moléculas mediadoras do processo inflamatório presentes nos tecidos.

Simunovic (1996) cita em seu trabalho algumas explicações sobre os efeitos analgésicos da terapia com laser em baixa intensidade, reportados por diferentes autores. Entre eles estão o aumento da excreção urinária de serotonina, a alteração do equilíbrio adrenalina-noradrenalina, o aumento da microcirculação sanguínea local e portanto do suprimento de oxigênio, reduzindo assim a asfixia do tecido e agilizando a coleta de metabólitos nos tecidos.

Para análise dos efeitos da irradiação em dores miofasciais crônicas e agudas Simunovic (1996) realizou o tratamento de 243 pacientes realizando a irradiação de "trigger points". Seus resultados clínicos demonstraram efetividade de 96%, sendo que, após a terapia apenas 4% dos pacientes apresentavam persistência do quadro doloroso.

Kubota *et al* (1989) estudaram a viabilidade de enxertos tratados com laser de diodo emitindo em 830 nm, comparados com enxertos irradiados com LED (light emitted diode) emitindo em banda estreita de 840 nm ambos com fluências de 10 J/cm^2 , e controle sem tratamento.

Um retalho com 9 cm de comprimento e 3 cm de largura foi removido do dorso de ratos e suturado em posição logo em seguida. Foram utilizados diferentes métodos de análise para verificar a vascularização do retalho.

Após 10 minutos da irradiação um grupo de animais, selecionados dos grupos estudados, recebeu injeção intraperitoneal de *fluorescin* a 10% na quantidade de 0,2 ml. Decorridos 30 minutos a área

reimplantada foi examinada através da exposição à luz ultravioleta para observação de fluorescência, sendo que quanto maior a fluorescência melhor era classificado o estado de perfusão vascular do retalho; áreas não fluorescentes demonstravam falta de suprimento sangüíneo viável. De acordo com este teste o grupo irradiado com laser de diodo demonstrou uma maior perfusão, não tendo sido notadas diferenças entre o grupo irradiado com LED e o grupo não irradiado.

Os retalhos de um grupo de animais foram removidos, desidratados e preparados para avaliação através da técnica de transiluminação a fim de serem verificadas alterações microvasculares. De acordo com os resultados reportados, o grupo laser apresentou um maior número de vasos quando comparado aos dois outros grupos.

Foi avaliada também a taxa de viabilidade dos enxertos, mensurando a área sadia sem presença de necrose, através de análise fotográfica. O grupo irradiado mostrou uma menor área de necrose, sendo que não foram observadas diferenças entre o grupo LED e o grupo não irradiado.

De acordo com seus resultados os autores concluem que o laser de diodo de GaAlAs emitindo em 830 nm produz efeitos imediatos e duradouros tanto no fluxo vascular como na revascularização e na neovascularização de enxertos. Os efeitos na microcirculação foram notados por até 7 dias após a irradiação. Foi demonstrado neste estudo, que os efeitos sobre a microcirculação utilizando LEDs, quando comparados aos efeitos do laser emitindo em 830 nm são estatisticamente diferentes, com o laser apresentando melhores resultados. Os autores relatam a importância da coerência do feixe para a obtenção dos efeitos fisiológicos.

Os efeitos da irradiação com laser de diodo de 780 nm, na microcirculação sanguínea foram estudados por Schaffer e colab. (2000), usando imagem por ressonância magnética com contraste na pele sadia de seis voluntários.

Os voluntários foram irradiados na planta do pé direito com densidade de energia de 5 J/cm^2 e intensidade de 100 mW/cm^2 . As imagens de ressonância magnética foram registradas antes e depois da irradiação, e a técnica foi utilizada para quantificar o acúmulo local em relação ao tempo do contraste Gadolinium-DPTA, não somente sua quantidade na corrente sanguínea, mas também sua distribuição no espaço extravascular, comparada ao pé esquerdo não irradiado. Os autores observaram um aumento no fluxo sanguíneo na área após a irradiação, relatando que os efeitos da biomodulação na melhora do processo de reparação de lesões e na redução da dor podem estar relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo.

Schindl e colab. (1991), em relato de caso clínico demonstraram os efeitos da irradiação com laser de He-Ne com diferentes fluências em casos de Tromboangiite Obliterante (Doença de Buerger). Essa condição clínica afeta primariamente as extremidades inferiores dos membros com comprometimento de pequenos e médios vasos sanguíneos.

Esta condição clínica resulta na amputação de membros. A causa da perda dos membros é associada a altos índices de dor sem remissão após terapêutica medicamentosa, mesmo após a remoção cirúrgica de nervos sensitivos.

Os autores apresentam neste relato, três casos clínicos da doença, onde a terapia convencional não surtia efeitos e que teriam como solução à amputação da área afetada. Foi realizado tratamento com laser de He-Ne utilizando diferentes fluências, de acordo com as características das áreas afetadas e diferentes tempos de tratamento, esquematizados de acordo com a evolução clínica do caso.

Como resultados dois dos três pacientes apresentaram remissão completa dos sintomas com acompanhamento de um ano, e o terceiro caso, encontrava-se ainda em tratamento, porém, com prognóstico favorável.

Segundo os autores foi demonstrado através destes casos clínicos que a LILT aumenta o fluxo sanguíneo na microcirculação de áreas isquêmicas, e apesar de seus mecanismos de ação não estarem completamente evidentes, essa terapia deve ser considerada como uma alternativa terapêutica no tratamento de condições clínicas desfavoráveis em relação a microcirculação.

Segundo Danhof (2000), os efeitos do laser na microcirculação sanguínea podem ser gerados por uma ação indireta sobre os esfíncteres pré-capilares através da liberação de substâncias químicas como a histamina e a serotonina. Sobre condições patológicas o laser pode atuar sobre a microcirculação sanguínea promovendo um aumento de temperatura através do aumento da atividade celular gerando aumento da circulação por calor, tendo como consequência a vasodilatação de arteríolas.

O mecanismo de ação da radiação laser com baixa intensidade na microcirculação, não é completamente conhecido, muitas são as possíveis explicações para os efeitos clínicos observados.

O efeito sobre a liberação de aminas vaso-ativas é considerado por alguns autores, como potencial efeito causado pela irradiação, podendo promover alterações de fluxo sanguíneo (Walker, 1983; Simunovic,2000; Mester, 2000).

A histamina encontra-se em mastócitos e é liberada na fase imediata ou inicial da inflamação, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A serotonina promove o aumento da permeabilidade vascular, no homem encontra-se nas plaquetas, já em espécimes animais como ratos e camundongos está localizada nos mastócitos.

Walker (1983) investigou os efeitos analgésicos da LILT. Foram analisados nesse estudo 36 pacientes com dor crônica (duração maior que 6 meses), irradiados com laser de He-Ne, potência de 1 mW, frequência de 20Hz em uma área de 4 mm².

Foram coletadas amostras de urina de 24 horas antes do início do experimento e em intervalos regulares durante o período experimental a fim de verificar a concentração de 5-hidroxitriptamina (5HT) um catabólito da serotonina.

Os níveis maiores de excreção de 5HT precederam o alívio da dor por vários dias. Em um exemplo citado pelo autor, um paciente portador de nevralgia trigeminal, teve pico de excreção de 5HT após 10 sessões de irradiação, enquanto o alívio completo da dor ocorreu após 20 sessões de irradiação. Resultados similares foram observados em indivíduos com diferentes diagnósticos de dor.

O autor reporta que de acordo com esses resultados o pico de excreção urinária de 5HT pode ser indicador do início da analgesia, e tal alteração no catabolismo da serotonina pode representar um pré-requisito para efeitos de analgesia duradouros.

As alterações no catabolismo da serotonina não foram observadas em pacientes sem dor que receberam irradiação por até 30 sessões, sendo que as alterações na excreção de 5HT podem ser relacionadas ao mecanismo de analgesia através da radiação laser, pois, indivíduos que obtiveram alívio da dor como resultado da injeção de anestésicos locais, ou massagem profunda, também não demonstraram alterações em tal catabolismo.

Silveira (2001) demonstrou os efeitos da radiação laser sobre a degranulação dos mastócitos. Quando ocorre a degranulação do mastócito substâncias vaso-ativas são liberadas no local.

Em seus resultados o autor obteve efeitos significantes sobre a degranulação de mastócitos em tecido gengival humano, usando lasers emitindo em 785 nm e 688 nm com potência de 50 mW e fluência de $8\text{J}/\text{cm}^2$.

O modo de emissão do laser pode influenciar os efeitos produzidos pela radiação, segundo Karu (1998), a resposta celular é diferente quando as culturas celulares são expostas à emissão contínua ou pulsada.

Em uma avaliação sobre os efeitos da irradiação sobre a microcirculação sanguínea Baxter (1994), reporta a importância da frequência para a obtenção de resultados. Em seus estudos o autor reporta mudanças significantes usando-se a mesma intensidade e dose alterando-se apenas a taxa de repetição de pulsos. A taxa de repetição de pulsos segundo o autor, pode ser um parâmetro crítico para a observação de alguns efeitos fisiológicos. O autor relata que afirmações apresentadas em alguns estudos, de que baixas frequências devem ser utilizadas no tratamento de condições clínicas agudas, e altas frequências devem ser reservadas para o tratamento de condições crônicas podem ter validade clínica de acordo com os resultados observados em seu estudo.

Alteração térmica na intimidade dos tecidos é classificada, por alguns pesquisadores, como responsável pelos efeitos da LILT na microcirculação (Schindl e colab., 1991; Danhof,2000), porém esses resultados são conflitantes, pois, usando o mesmo método de análise, a termografia, diferentes resultados são reportados. Schindl e colab.(1991) reportam um aumento de 0,9°C nas áreas irradiadas, com sucesso clínico da terapia em casos de imparidade severa da microcirculação. Cada aumento de 1°C na temperatura, aumenta a taxa de reação química no organismo, ou fora dele, aproximadamente em 10%(Guyton, 1974). Já no trabalho de Obata e colab.(1990) uma diminuição da temperatura foi observada na área irradiada em 52,6% dos casos, com taxa de sucesso terapêutico de 90% destes. Em 42,1% dos casos houve aumento de temperatura pós-irradiação, sendo o índice de sucesso neste caso de 37,5%. Um total de 5,4% dos casos não apresentaram efeitos relativos à irradiação. Como conclusão estes autores relatam que, os efeitos analgésicos observados após irradiação, são efeitos primariamente não térmicos, é a resposta orgânica à irradiação, não é uniforme.

Bradley e colab.(2000), avaliaram a reação vascular na região maxilofacial, após irradiação com quatro diferentes comprimentos de

onda (660nm, 820nm, 1060nm e 10600nm) por meio de termografia para investigar a temperatura superficial da pele, fluxometria laser Doppler de imagem para avaliar o fluxo microcirculatório e ultrasonografia Doppler de imagem para observar o estado arterial (calibre e fluxo). Os resultados observados demonstraram que os comprimentos de onda de 820 e 660 nm com densidades de energia menores que 100 J/cm^2 obtinham pequenos aumentos da temperatura superficial da pele, não apresentando efeitos no fluxo da microcirculação. A aplicação dos comprimentos de onda de 1060nm e 10600nm desfocados com densidades de energia acima de 150 J/cm^2 produziam grande aumento da temperatura superficial com aumento do fluxo na microcirculação. Foi observado que os efeitos alcançados com o emprego do laser emitindo em 10600nm, poderiam perdurar por até 30 minutos.

Segundo os autores, o comprimento de onda de 820nm, aplicado com densidades de energia superiores as utilizadas convencionalmente, pode promover aumento no fluxo sangüíneo microcirculatório.

Em nenhum caso foi observada alteração no calibre ou fluxo da artéria facial.

Os autores concluem que os efeitos sobre a cicatrização promovidos pela LILT em regimes de aplicação convencionais não podem ser atribuídos a efeitos vasculares imediatos, porém pode haver um estímulo angiogênico durante o processo de reparo.

Alterações na viscosidade do sangue, na concentração de oxihemoglobina, bem como alterações na quantidade de eritrócitos são reportadas como possíveis influências da radiação na microcirculação (Korolevich e colab.,2000; Stadler e colab.,2000).

Agaiby e colab. (2000) investigaram a produção de fator angiogênico por linfócitos T após a irradiação com laser de comprimento de onda de 820 nm, 5000 Hz e 50 mW com densidades de energia de 1,2, 3,6, 6 e 8,4 J/cm^2 . As células T isoladas do sangue foram preparadas em suspensão com e sem a adição de mitógeno e irradiadas. Após o período de três a cinco dias de incubação os linfócitos

T foram coletados e adicionados à cultura de células endoteliais. O efeito sobre a proliferação destas células foi avaliado por um período de 72 horas.

Neste modelo de estudo à irradiação de linfócitos T estimulou a produção de fatores que podem modular a proliferação de células endoteliais *in vitro*. Este efeito é modulado pela densidade de energia, as melhores densidades foram 1.2 e 3.6 J/cm².

Stadler e colab. (2000), irradiando sangue com laser emitindo em 660 nm e usando fluências entre 0 e 5 J/cm², observaram a reação à radiação na proliferação de linfócitos tanto isolados como na presença de hemoglobinas.

A dose de 3 J/cm², foi a que apresentou maiores índices de estimulação, sendo considerado a presença de hemoglobina fundamental para a magnitude dos efeitos. Os autores sustentam a hipótese de a hemoglobina presente nas células vermelhas do sangue, poder servir como porfirina endógena provocando a formação de espécies reativas de oxigênio em baixos níveis, não citotóxicos, quando irradiadas com comprimento de onda de 660 nm.

Segundo Lubart *et al* (2000), recentes evidências demonstram que em doses baixas e em concentrações controladas espécies reativas de oxigênio (ERO), apresentam um importante papel na ativação de processos celulares como aumento da proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de DNA por células hematopoiéticas, sendo que, observou-se efeitos das ERO sobre a contração muscular e o crescimento celular.

No estudo de Siposan e colab. (2001), sobre os efeitos da irradiação do sangue humano, os autores citam reportes, principalmente de especialistas da antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, a respeito da irradiação direta do sangue humano. Foram estudadas modificações causadas no sangue de pacientes com diferentes patologias e várias observações positivas foram feitas. Entre elas encontram-se, efeitos antiinflamatórios, estímulo do sistema

imunológico, melhora da microcirculação sangüínea, efeito bactericida, dentre outros.

Em seu estudo foram analisados os efeitos da irradiação com laser de He-Ne, com os seguintes parâmetros, potência de 6 mW, intensidade média de aproximadamente 180 mW/cm^2 , diâmetro do feixe de 2 mm, contínuo, com doses entre 0 e 9346 J/cm^3 , no sangue recém coletado de 16 doadores saudáveis, sendo que, observaram-se várias modificações em função da dose recebida.

Após irradiação houve mudança significativa na viscosidade do sangue, e em índices hematológicos de leucócitos e eritrócitos. Na maior parte dos casos, segundo os autores os efeitos máximos observados ocorreram com a dose de $1,2 \text{ J/cm}^3$.

Segundo alguns pesquisadores, para a obtenção de efeitos sobre a microcirculação sangüínea *in vivo*, os lasers com emissão infravermelha seriam mais eficientes (Kubota e colab., 1989; Baxter, 1994; Bradley, 1996, Saito, 1997, Parrado e colab., 1999,)

Baxter (1994), afirma que o emprego do laser de He-Ne na maioria dos estudos sobre LILT, pode ter relação com os casos de falha no alcance de analgesia reportada em alguns estudos, devido a pouca penetração deste comprimento de onda nos tecidos biológicos.

Essa declaração, segundo Chow (2001), pode ser verdadeira quando a área estudada não se encontra na superfície dos tecidos, sendo que, efeitos positivos, podem ter sido mediados por estímulos involuntários de pontos relacionados à acupuntura. Os pontos relacionados à acupuntura são pontos superficiais que podem ser estimulados com pequenas doses de energia.

De acordo com Tuchin (1997), em termos de propriedades ópticas, os tecidos biológicos incluindo-se o sangue, a linfa e outros fluidos corporais, podem ser divididos em duas classes: os espalhadores ou opacos, cujos exemplos são a pele, o cérebro, a parede vascular e o sangue; e os pouco espalhadores ou transparentes, como por exemplo, a córnea.

A profundidade de penetração da radiação no tecido, varia de acordo com o comprimento de onda da radiação incidente (Ribeiro,2000). Maldonado (2001), define profundidade de absorção óptica, ou comprimento de absorção como o comprimento correspondente no qual 63% da radiação incidente é absorvida.

O estudo de Envemeka (2001), sobre a profundidade de penetração da radiação com comprimento de onda de 632,8nm comparada a 904nm, em diferentes tecidos como pele, músculo, tendão e cartilagens de coelhos mostrou que o comprimento de onda tem um papel fundamental na profundidade de penetração da luz nos diferentes tecidos, sendo que, a mesma não está relacionada com a potência média da fonte de emissão.

Os efeitos positivos sobre a microcirculação sangüínea são associados por alguns autores a comprimentos de onda superiores a 780nm quando utilizado *in vivo* (Kubota e colab.,1989; Sasaki e colab.,1989; Obata e colab.,1990; Saito, 1997; Parrado e colab.,1999, Maegawa e colab., 2000, Bradley e colab. 2000). Já *in vitro* comprimentos de onda entre 632,8 e 660nm demonstraram efetividade sobre células sangüíneas (Korolevich e colab., 2000; Stadler e colab., 2000; Siposan e colab., 2001). Porém nos estudos de Walker (1983), Schindl e colab. (1991), Bisht e colab. (1994), Ghamsari e colab. (1997), e Silveira (2000), utilizando lasers com emissão vermelha (660nm e 632,8nm), os resultados observados, foram relacionados a efeitos benéficos sobre a microcirculação sangüínea.

4 - FLUXOMETRIA LASER DOPPLER

A velocidade da luz é constante, independente de qual seja a velocidade relativa entre a fonte luminosa e o observador, porém, a frequência e o comprimento de onda podem variar de forma que o produto, que é igual à velocidade da luz, permaneça constante. Essas variações de frequência são chamadas efeito Doppler, em homenagem a Johann Doppler, que foi o primeiro a observá-las (Halliday e Resnick, 1984).

A radiação refletida por superfícies estacionárias mantém a mesma frequência da radiação incidente. Porém de acordo com o efeito Doppler, a frequência das ondas refletidas por objetos em movimento, tais como as células vermelhas do sangue, sofre uma alteração proporcional à velocidade do alvo (Donnelly, 2000).

A fluxometria laser Doppler vem sendo desenvolvida a fim de permitir acesso a parâmetros hemodinâmicos do sistema microvascular. Os fluxômetros convencionais indicam quantidades proporcionais ao fluxo sanguíneo e à concentração de hemácias móveis contidas no volume investigado (Nogueira e colab., 2000).

Esta técnica monitora o fluxo sanguíneo em vasos de pequeno calibre na microvascularização, ou seja, o fluxo sanguíneo de capilares, próximos à superfície da pele, e o fluxo das arteríolas e vênulas da camada inferior da pele¹.

De acordo com Nogueira e colab. (2000) a técnica tem como base o efeito Doppler, e o uso de radiação coerente monocromática de baixa potência de um laser estável, como um laser a gás de He-Ne ou por um diodo laser de baixa potência (1 a 2 mW), usualmente emitindo entre 633 a 810nm, acoplado a uma fibra óptica que entrega a radiação laser ao tecido a ser estudado.

A radiação laser ao atingir os tecidos biológicos que circundam os vasos sanguíneos é espalhada. Essa radiação retroespalhada, ao atingir as células sanguíneas em movimento, predominantemente as hemácias,

¹ <http://www.moor.co.uk>

sofre desvio de frequência, segundo os princípios do efeito Doppler. Outra fibra óptica próxima à emissora coleta uma parcela da radiação retroespalhada e a conduz a um fotodiodo que a converte em sinais elétricos. O sinal elétrico, também conhecido como fotocorrente, tem espectro na faixa audível e é processado para a extração de informações sobre o fluxo sanguíneo. Considerando as potências emitidas envolvidas e todo o processo de interações, à distância e o volume típicos aos quais os fluxômetros convencionais são sensíveis é de aproximadamente 1 mm e 1 mm³ respectivamente.

O termo comumente usado para descrever a quantidade medida pelo fluxômetro é "fluxo", que é proporcional ao produto da velocidade média das células sanguíneas e sua concentração (volume sanguíneo). Isto é expresso em unidades de perfusão arbitrárias, sendo calculado usando o primeiro momento da densidade de potência do espectro do sinal de fotocorrente¹.

Um dos fatores de interesse nesta técnica é a possibilidade de monitoração do fluxo sanguíneo de forma não invasiva, permitindo uma análise dinâmica da microcirculação sanguínea (Foth e colab. 2000).

Como a área sob monitoração da microcirculação não apresenta valores definidos, as medidas de fluxo não podem ser apresentadas como valores absolutos. Porém, apesar disso, a técnica têm seu valor estabelecido para a avaliação de alterações de perfusão em casos de estresse fisiológico, entre outras aplicações (Carolan-Ress e colab. 2002).

De acordo com Carolan-Ress e colab. (2002), os sinais da FLD (Fluxometria Laser Doppler) normalmente apresentam pronunciada variação temporal tanto em função da natureza pulsátil do fluxo sanguíneo como em função das mudanças na atividade dinâmica vasomotora.

O uso da FLD está bem estabelecido para a monitoração da microcirculação na pele na literatura especializada, porém, têm sido

¹ <http://www.moor.co.uk>

constantemente demonstrado que há uma variação espacial substancial nos valores de perfusão do tecido, mesmo em áreas adjacentes, levando a dificuldades experimentais (Obaid e colab., 2002).

Brande e colab. (1997) demonstraram que, em condições de repouso em humanos, as medições efetuadas com FLD resultam algumas vezes em grande variação nos valores de fluxo medidos em função de variações espaciais. Desta forma obtêm-se resultados individuais de difícil reprodução. Porém com o aumento do número de registros e utilizando-se um período de leitura constante e não prolongado, valores mais reprodutíveis são obtidos e a comparação entre grupos torna-se mais viável. Os autores concluem que utilizando um período curto e constante de monitoração, a FLD permite a avaliação do fluxo da microcirculação na pele.

Blot e colab. (2001), reportam que na avaliação de trabalhos onde é demonstrada a reparação tecidual de feridas, uma das grandes dificuldades é estabelecer um critério para a verificação da eficácia dos métodos utilizados. Segundo os autores, o uso da FLD é um bom método de avaliação, pois fluxos elevados indicam um prognóstico bom para a reparação, enquanto que um fluxo diminuído indica dificuldades ou impossibilidade de reparação espontânea. Sendo assim, a perfusão do tecido pode indicar, de acordo com os autores, o progresso ou a piora do estágio de reparação de toda ferida.

O emprego da FLD como método de avaliação dos efeitos do laser em baixa intensidade foi efetuado por Ghamsari e colab. (1997), utilizaram a fluxometria laser Doppler como um dos métodos de avaliação da cicatrização de incisões em mamas de vacas irradiadas ou não com laser em baixa intensidade. Para a realização do trabalho, os animais foram divididos em grupos, e incisões foram realizadas. Em um dos grupos a cicatrização foi acompanhada de irradiação, executada todos os dias durante há primeira semana e a cada dois dias na segunda semana, perfazendo um total de dez sessões. Foi utilizado um laser de He-Ne, contínuo, com potência de 8,5 mW, em contato. Cada

área de 0,3 cm foi irradiada por 30 segundos num total de 15 minutos por lesão, tendo assim intensidade de 0,114 W/cm² e densidade de energia de 3,6 J/cm².

Realizaram-se análises radiográficas, histopatológicas, tensiométricas, de fluxo sanguíneo e análise de aminoácidos.

O laser Doppler foi utilizado no vigésimo primeiro dia em dois pontos: um na sutura e um na pele não incisionada no lado oposto da mama para controle. O fluxo foi calculado por um minuto, sendo que a similaridade do fluxo sangüíneo na área irradiada com o fluxo sangüíneo na área controle sem lesão indicou, segundo os autores, que a revascularização nos grupos tratados com laser foi mais rápida do que nos grupos não irradiados.

Maegawa e colab. (2000), estudaram os efeitos da irradiação com laser emitindo em 830 nm sobre a microcirculação.

As alterações da microcirculação *in vivo*, foram analisadas por meio de FLD, e medição da concentração de íons Ca²⁺, após irradiação com laser emitindo em 830 nm, diretamente sobre as arteríolas mesentéricas através de exposição cirúrgica do mesentério de ratos. Os autores observaram efeitos pronunciados na microcirculação, tanto imediatos como vinte minutos após irradiação, aparentemente mediados pela redução da concentração de íons Ca²⁺, alterando o tônus muscular das arteríolas. Demonstrando desta forma, segundo os autores, que a profundidade de penetração deste comprimento de onda não seria o único fator responsável pelos efeitos causados na microcirculação.

Ainda de acordo com as observações de Maegawa e colab. (2000), a remoção das ligações nervosas da artéria superior do mesentério não afetou a vasodilatação observada pelos pesquisadores, desta forma, seria pouco provável que a dilatação arteriolar observada neste estudo tenha sido causada por uma atenuação no potencial neural derivado da irradiação.

O uso de FLD em ratos foi realizado com sucesso por Cui e colab. (1999), para verificar o efeito de vasoconstritores no fluxo sanguíneo da

mucosa da traquéia e no músculo esquelético da perna, obtendo dados significantes sobre a vasoconstrição ocorrida nestes tecidos, através da técnica.

Kilic e colab. (2001) utilizaram FLD em ratos, conseguindo evidencias de alterações hemodinâmicas seguidas do uso de ativador plasminogênio tecido recombinante, em tecido cerebral isquêmico de ratos, encontrando uma hiperperfusão inicial e uma resposta tardia de hipoperfusão.

A relação de alterações no sistema circulatório com a microcirculação cutânea foram estudadas por Qi e colab. (2002), utilizando FLD para avaliar o impacto de um trombo em uma artéria na microcirculação cutânea.

Os autores monitoraram simultaneamente o fluxo sangüíneo em uma artéria e na microcirculação cutânea nos seguintes momentos: antes da indução, por estímulo elétrico, de um trombo, durante a formação do mesmo e no processo de eliminação natural do trombo pelo fluxo sangüíneo.

Durante todo o processo de formação e eliminação do trombo a pressão arterial sistêmica foi medida, sendo que a mesma manteve-se constante. O fluxo foi previamente monitorado tanto na artéria como na microcirculação cutânea para que dados base fossem obtidos, sendo esses dados caracterizados como 100% de fluxo, as variações decorrentes do processo de trombólise foram feitas tomando-se este valor como referência.

Em seus resultados os autores reportaram uma diminuição do fluxo de 90% na artéria e 70% na microcirculação cutânea após a formação do trombo, sendo que o decaimento ocorreu de forma simultânea nas duas áreas de estudo. Após a trombólise o fluxo arterial voltou aos valores iniciais, porém os valores da microcirculação cutânea permaneceram entre 10 a 20% dos valores originais. Esses dados sugeriram segundo os autores que fatores liberados de forma local nas

células endoteliais das artérias podem ser responsáveis por uma deficiência na microcirculação cutânea.

Kannurpatti e colab. (2002), verificando a efetividade da apnéia como estímulo da capacidade vasodilatadora cerebral através de ressonância magnética de imagem (RMI), utilizaram ratos anestesiados com respiração natural ou assistida com 100% de oxigênio.

O fluxo sanguíneo cerebral dos ratos foi monitorado através de fluxometria laser Doppler e, foi observado aumento de fluxo de $45\% \pm 8\%$ durante apnéia com ventilação natural e $10\% \pm 3\%$ com ventilação mecânica, e ainda, em ratos com respiração natural a saturação de oxigênio arterial caiu de $96\% \pm 1\%$ para $29\% \pm 5\%$, não sendo observadas essas variações em animais sob respiração assistida. Nos resultados os autores concluem que a apnéia pode provocar em animais com ventilação natural uma diminuição de oxigênio arterial, sendo o observado, oposto ao ocorrido em humanos.

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresentará inicialmente a descrição do experimento realizado, seguindo uma explanação sobre a modelagem utilizada para análise dos resultados.

5.1 - Descrição do experimento

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, elaborados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao Internacional Council of Laboratory Animal Science (ICLAS) com base em normas internacionais, que visam o aprimoramento de condutas na experimentação animal baseando-se em três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência.

Para este estudo do tipo experimental, *in vivo*, foram selecionados 15 ratos machos adultos da raça Wistar, com massa corporal aproximada de 300 gramas, cedidos e mantidos pelo Biotério do IPEN, sendo que, durante todo o período do experimento, os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum* em condições controladas de temperatura em regime de luz de 12 em 12 horas.

Os espécimes foram divididos de forma aleatória em três grupos de 5 animais, de acordo com o tratamento a ser efetuado, sendo que, durante todo o experimento, os procedimentos executados em cada grupo foram realizados no mesmo período do dia, para que, variações fisiológicas de metabolismo não interferissem nos resultados obtidos. Na fase experimental após a chegada ao laboratório os animais permaneceram em repouso por aproximadamente 10 minutos para que ocorresse a climatização dos mesmos a temperatura do local.

Os espécimes foram sedados com inalação de éter e posteriormente anestesiados por via intramuscular com uma combinação anestésica de cloridrato de ketamina (Ketamina®) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum®), sendo a posologia de 0,1ml/Kg.

Após a anestesia realizou-se a tricotomia da região dorsal e a pele desta área foi limpa com chumaço de algodão embebido em solução aquosa de digluconato de clorhexidina a 2%. Os animais foram mantidos em biotério por 24 horas após este procedimento a fim de permitir-se, um ajuste natural da microcirculação cutânea à perda de calor devido à remoção da camada de pêlos da região, bem como, evitar-se uma possível resposta inflamatória provocada pelo uso da lâmina de tricotomia sobre a pele.

Decorridas 24 horas, realizou-se o procedimento anestésico e o início da monitoração. Para a monitoração do fluxo sanguíneo foi utilizada a sonda P13 com 1,5 mm de diâmetro e o fluxômetro Flowlab emitindo em 780 nm com potência de aproximadamente 1 mW, e diâmetro da fibra óptica de 0,25mm - Moor Instruments Ltd., UK, calibrado em 15kHz. A potência do equipamento foi medida utilizando-se um medidor de potência calibrado - LaserCheck, Coherent, USA - durante o experimento.

A sonda do fluxômetro foi fixada através de um braço metálico, a fim de se evitarem movimentos involuntários devidos à manipulação, que pudessem afetar os resultados obtidos, conforme representado na FIG.5.1.

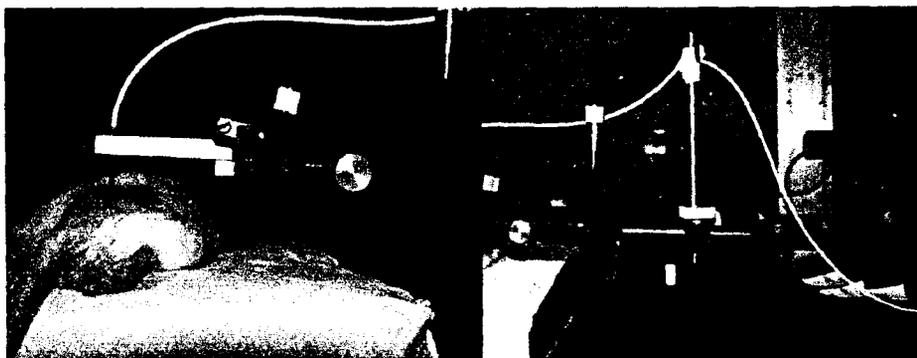


Figura 5.1 – Braço metálico articulado, confeccionado para fixação da sonda do fluxômetro.

A superfície corporal foi medida com uma régua milimetrada, conforme demonstra a FIG. 5.2, sendo selecionadas duas áreas

anatômicas sobre a coluna vertebral no sentido antero-posterior. A primeira, na região média do dorso, a 3 cm da base da cauda, que recebeu a lesão, e a segunda área, a 1cm da base da cauda, onde foram realizadas, para controle, as medições de fluxo da pele sadia, durante todo o experimento. Optou-se pela padronização das áreas de lesão e controle devido a grande variação espacial de fluxo mesmo em regiões anatômicas próximas conforme descrito no capítulo 4, sendo assim uma randomização das áreas poderia levar a impossibilidade de análise dos dados obtidos



Figura 5.2 – Medição da região dorsal e seleção das áreas anatômicas para monitoração de fluxo.

A FIG. 5.3 apresenta o ajuste vertical da distância da sonda em relação à pele do animal, realizado por meio da utilização de uma película com 1mm de espessura colocada entre a sonda e a pele do animal, a fim de manter-se uma distância constante.

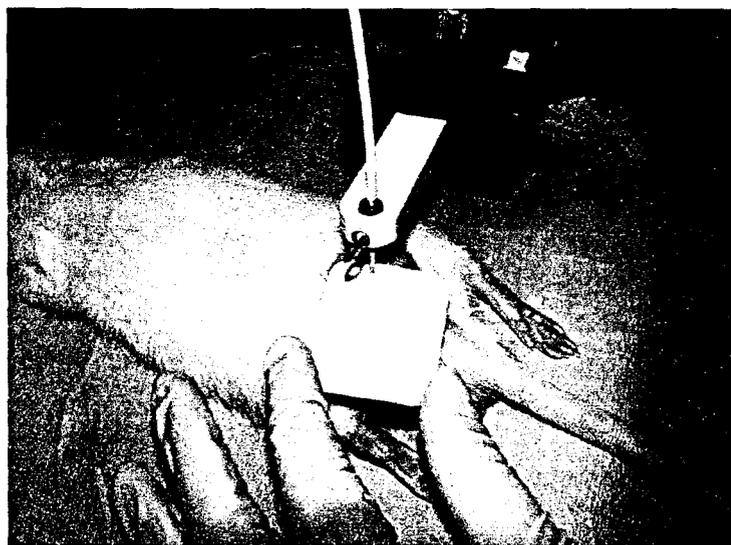


Figura 5.3 – Ajuste da distância da sonda do fluxômetro em relação à pele do animal

Com a sonda posicionada nos sentidos antero-posterior e vertical, foram executadas as primeiras medições de fluxo das áreas determinadas, antes da realização de qualquer procedimento.

Em ambas as regiões foram selecionadas áreas de aproximadamente 6 mm de diâmetro, dentro das quais foram realizadas três medições distintas com trinta segundos de duração cada, totalizando 90 segundos para a leitura de fluxo em cada área de 6 mm.

Após a monitoração de fluxo inicial foi realizada a lesão na região média do dorso de cada animal, com nitrogênio líquido aplicado com auxílio de um “dedo frio” em seqüências de duas aplicações de quinze segundos cada, com intervalo de cinco minutos entre elas.

A FIG. 5.4 mostra o aspecto da pele após a aplicação do nitrogênio líquido. Uma nova monitoração do fluxo foi então realizada, mantendo-se a calibragem do equipamento e os mesmos padrões de distância controlada, anteriormente descritos, tanto na área lesionada, como na área sadia.



Figura 5.4 – Aspecto da pele após aplicação de nitrogênio líquido.

Os animais passaram então por diferentes procedimentos de acordo com o grupo a ser estudado.

Os animais selecionados para o grupo 1, denominado Grupo Controle Fluxômetro, foram mantidos até o décimo quarto dia de experimento, sem que nenhum procedimento fosse executado nos mesmos, possibilitando uma comparação entre os animais que tiveram o fluxo monitorado nos demais dias experimentais, recebendo desta forma radiação proveniente do fluxômetro.

No décimo quarto dia, os animais foram anestesiados, conforme o protocolo descrito anteriormente, e registros de fluxo da área de lesão e pele sadia foram efetuados. Este procedimento foi repetido no vigésimo primeiro dia experimental.

Os animais do grupo 2, denominado Grupo Laser, tiveram a área da lesão irradiada com laser de He-Ne, comprimento de onda de 632,8 nm, potência de 10 mW, e diâmetro do feixe de 2mm, acoplado a um sistema óptico que produz um feixe polarizado, com direção preferencial linear, que foi alinhado durante a irradiação à coluna vertebral, sendo que o sistema óptico reduz a potência do laser para aproximadamente 1,8 mW. Obtém-se com o acoplamento de lentes um feixe de 6 mm de diâmetro.

A potência do laser foi medida antes de cada irradiação com uso de um medidor de potência calibrado – LaserCheck, Coherent USA - , e uma densidade de energia de $1,15 \text{ J/cm}^2$, que corresponde a 3 minutos de exposição, foi empregada. A FIG. 5.5 demonstra o modo de aplicação da radiação.



Figura 5.5 – Irradiação realizada nos animais do grupo 2

Os cálculos das condições de irradiação são:

$$\text{Potência do laser} = 1,8 \text{ mW} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ W}$$

$$\text{Área do feixe} = 6 \text{ mm} = \pi \times r^2 = 0,28 \text{ cm}^2$$

$$\text{Área da lesão} = 6 \text{ mm} = \pi \times r^2 = 0,28 \text{ cm}^2$$

$$\text{Tempo de exposição} = 3 \text{ min} = 180 \text{ seg.}$$

$$\text{Intensidade (I)} = P \text{ (W)} / \text{área do feixe (cm}^2\text{)}$$

$$I = 1,8 \times 10^{-3} / 0,28 \text{ cm}^2$$

$$I = 6 \times 10^{-3} \text{ W / cm}^2 \text{ ou } 6 \text{ mW / cm}^2$$

$$\text{Dose} = t \text{ (s)} \times P \text{ (W)} / \text{área da lesão (cm}^2\text{)}$$

$$\text{Dose} = 180 \times 1,8 \cdot 10^{-3} / 0,28$$

$$\text{Dose} = 1,15 \text{ J / cm}^2$$

Este procedimento foi realizado em todos os animais do grupo 2, após a incisão, repetindo-se 24 e 48 horas depois.

Decorridos sete minutos da irradiação, foi realizada a monitoração do fluxo na área de lesão, bem como na pele sadia, sempre se obedecendo aos critérios para a localização das áreas anatômicas, para o posicionamento da sonda e mantendo-se a calibragem do equipamento constante.

Um tempo de espera de 20 minutos era aguardado e executava-se uma nova medição, com a finalidade de verificar possíveis alterações imediatas no fluxo causadas pela irradiação, no protocolo estudado neste experimento.

Esses procedimentos foram repetidos após 24 e 48 horas, com os animais anestesiados, sendo que, ao final deste período os espécimes deste grupo foram mantidos em biotério até o sétimo dia experimental.

No sétimo dia experimental novos registros de fluxo das áreas de lesão, que se apresentava clinicamente conforme observado na FIG. 5.6, bem como da pele sadia, foram efetuados, sendo que para esta finalidade os animais foram novamente anestesiados. Este procedimento foi repetido 14 e 21 dias após o início do experimento.

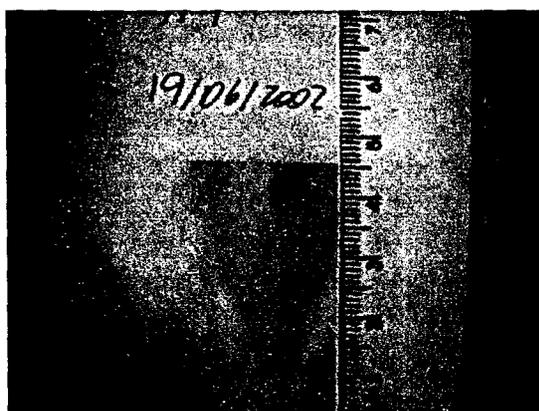


Figura 5.6 – Aspecto da lesão dos espécimes do Grupo Laser no sétimo dia experimental.

Os animais do grupo 3, denominado Grupo Controle Laser, receberam o mesmo procedimento experimental dos espécimes do Grupo Laser, excluindo a irradiação com laser de He-Ne.

A intensidade da radiação proveniente do fluxômetro sobre a área lesionada nos animais do grupo 2 e 3 foi calculada como sendo:

$$\text{Potência do laser} = 1,0 \text{ mW} = 10^{-3} \text{ W}$$

$$\text{Área do feixe} = 0,25 \text{ mm} = \pi \times r^2 = 4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$\text{Área da lesão} = 6 \text{ mm} = \pi \times r^2 = 0,28 \text{ cm}^2$$

$$\text{Intensidade (I)} = P \text{ (W)} / \text{área do feixe (cm}^2\text{)}$$

$$I = 1,0 \times 10^{-3} / 4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$$

$$I = 2,5 \text{ W} / \text{cm}^2$$

Apesar de a área de lesão irradiada pelo fluxômetro corresponder a apenas 14% da área total, o pequeno diâmetro da fibra óptica do fluxômetro, obtinha uma intensidade alta, motivando o estudo, através do grupo controle, dos possíveis efeitos causados por esta intensidade.

Após o registro de fluxo efetuado sobre a lesão e sobre a área controle, um período de espera de 27 minutos foi aguardado, para a obtenção de um registro comparativo ao último registro efetuado nos animais que receberam irradiação. Esse procedimento foi repetido nos dias 1,2 e 3 experimentais, sendo que após este período os animais foram mantidos em biotério até o sétimo dia, quando foram realizados os registros comparativos com o grupo 2. A FIG. 5.7 mostra o aspecto da lesão do grupo controle laser no sétimo dia do experimento.



Figura 5.7 – Aspecto da lesão do grupo controle no sétimo dia experimental

Novos registros foram realizados nos dias 14 e 21 pós-lesão, finalizando a monitoração do grupo controle.

Os dados coletados em todos os registros foram armazenados em computador, e analisados através do programa MoorSoft for Windows/ moorLAB v1.2, fornecido pelo fabricante do equipamento.

5.2 - Modelagem para análise de resultados

Para a análise dos dados coletados foi utilizada a modelagem que segue.

Consideremos uma região delimitada, onde a microcirculação, estabelecida pela rede de microvasos, é alterada por fatores locais e sistêmicos.

Consideremos F_1 uma função matemática que descreve o fluxo (F) numa região da pele, que depende apenas de fatores locais de regulação. Nesta região, esta função é modulada por uma função $M_1(s)$ que depende da variável s (fator sistêmico). Esta função depende do tempo (t), temperatura (T) e de outras variáveis sistêmicas. Assim, o fluxo medido nesta região (F_s) é:

$$F_s = F_1 \cdot M_1$$

Quando ocorre a lesão nesta região, o fluxo é alterado pela lesão, aqui descrita pela função L_E . E quando há a irradiação com laser, o fluxo supostamente será alterado pela função L_A , cujas variáveis (de L_E e L_A) são desconhecidas.

Assim, nesta região, o fluxo medido F_L é:

$$F_L = F_1 \cdot M_1 \cdot L_E \cdot L_A$$

Na região pele sadia, seguindo o modelo acima, o fluxo medido é:

$$F_S = F_2 \cdot M_2$$

Note-se que o fluxo na região pele sadia é modulado por outra função (M_2).

Dividindo F_L por F_S , obtêm-se:

$$F = \frac{F_1 \cdot M_1 \cdot L_E \cdot L_A}{F_2 \cdot M_2} \quad (1)$$

A quantidade F expressa a variação de fluxo de uma região em relação a outra. Mas a expressão acima é complexa e dificilmente analisável.

Mas note-se que F_1 e F_2 dependem somente de fatores locais de regulação da microcirculação. Controlando outros fatores que não a lesão e irradiação (e. g., alterações locais de temperatura, outras lesões, etc.) F_1/F_2 é constante durante o experimento.

Restringindo o modelo às condições em que a relação entre M_1 e M_2 seja linear, então $M_1 = k \cdot M_2$, onde k é uma constante. Assim, a expressão (1) fica:

$$F = k \cdot \frac{F_1 \cdot L_E \cdot L_A}{F_2} \quad (2)$$

Note-se que F_1/F_2 é constante, ou seja:

$$F = k_1 \cdot L_E \cdot L_A \quad (3)$$

onde $k_1 = k \cdot F_1/F_2$. Assim, a expressão (3) evidencia L_E e L_A .

No entanto é conhecido que os valores de fluxo medidos F_1 e F_2 variam largamente entre animais, decorrente das variações fisiológicas entre os animais. Ou seja, é esperado que o fluxo real varie largamente entre animais, e como uma conseqüência, também seus valores medidos via fluxômetro laser Doppler.

Visando minimizar a variação dos valores de F entre animais, adotamos o procedimento que segue.

No momento inicial, antes de provocar a lesão e antes de irradiar a área lesada, sabemos (por definição) que $L_E = 1$ e $L_A = 1$. Assim, neste momento, no instante $t = 0$, a quantidade F é:

$$F(0) = k_1$$

Dividindo todos os momentos por $F(0) = k_1$ e multiplicando por 100, tem-se a quantidade:

$$F(\%) = \frac{F}{F(0)} \cdot 100 = L_E \cdot L_A \cdot 100$$

aqui definida como variação percentual de fluxo. Ou seja, no momento inicial $F(\%) = 100$ e nos outros momentos $F(\%)$ representa a variação percentual da razão entre o fluxo na região lesada e sadia, em relação ao momento inicial.

No grupo controle, onde $L_A = 1$, para verificar se num determinado momento L_E altera $F(\%)$, é suficiente comparar o valor de $F(\%)$ neste momento com seu valor inicial, $F(\%) = 100$.

No grupo laser, para verificar se L_A altera $F(\%)$, é possível comparar os valores de $F(\%)$ com os de momentos (sessões) semelhantes do grupo controle, desde que o fator lesão seja controlado, ou seja: que os valores de L_E sejam iguais nos grupos comparados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os registros de fluxo armazenados em computador foram analisados usando um software fornecido pelo fabricante do fluxômetro (MoorSoft for Windows/moorLAB, v1.2). Em cada registro foram selecionados três segmentos estáveis, de aproximadamente trinta segundos. Ou seja, sem a ocorrência de grandes variações dos valores de fluxo, decorrentes de artefatos gerados por movimentos da fibra óptica ou do animal. Em cada segmento, a média aritmética dos valores de fluxo, em unidade arbitrárias (UA), foi calculada. Foram selecionados somente os segmentos com desvios padrões menores que 4,9 UA. Em cada registro, a média aritmética dos valores médios dos três segmentos foi calculada. Assim, o valor médio de fluxo em UA de cada registro corresponde à média dos valores médios de fluxo dos três segmentos de cada registro.

Em cada região estudada, três registros foram efetuados em regiões próximas. E o valor médio de fluxo de cada região corresponde à média aritmética dos valores médios de fluxo de cada registro.

Cada animal teve o fluxo sanguíneo monitorado em duas regiões anatômicas distintas: uma no local da lesão e em outra área anatômica posterior à área lesionada, aqui denominada pele sadia.

Os valores médios de fluxo, em UA, de cada região (pele sadia e lesada), foram computados para serem obtidos os valores de variação percentual de fluxo de cada região, $F(\%)$, em cada sessão, conforme o procedimento explanado anteriormente, ou seja: $F(\%) = [F_1 / (F_2 \cdot F(0))] \cdot 100$, onde F_1 e F_2 são os valores de fluxo médios, em UA, das regiões lesada e sadia, respectivamente, e $F(0)$ é a razão F_1/F_2 no momento inicial, antes da lesão.

Os animais foram acompanhados ao longo de 21 dias, e os registros de fluxo foram realizados nos momentos (sessões) indicados na TAB. 6.1. Como um exemplo, R1, na Tabela, significa $F(\%)$ no dia 1, antes da lesão, sendo R1, por definição, igual a 100%. Os outros

momentos indicados na TAB 6.1 correspondem aos momentos: após a lesão; 7 minutos e 20 minutos após a irradiação com laser, nos dias apontados; e nos dias 7, 14 e 21, após a lesão.

Tabela 6.1 – Registros de R3 a R3E realizados em 21 dias e resumo dos eventos.

R1	Dia 1	Antes da lesão
R3	Dia 1	Após lesão
R5	Dia 1	7 minutos após irradiação
R7	Dia 1	27 minutos (após irradiação, G2 ou após a R3 no G3)
R3A	Dia 2	Fluxo na região da lesão
R5A	Dia 2	7 minutos após irradiação
R7A	Dia 2	27 minutos (após irradiação, G2 ou após a R3A, G3)
R3B	Dia 3	Fluxo na região da lesão
R5B	Dia 3	7 minutos após irradiação
R7B	Dia 3	27 minutos (após irradiação, G2 ou após a R3A, G3)
R3C	Dia 7	Fluxo na região da lesão
R3D	Dia 14	Fluxo na região da lesão
R3E	Dia 21	Fluxo na região da lesão

Os fluxos dos animais do grupo 1 foram medidos somente no dia 1 antes e após a lesão e nos dias 14 e 21, originando os registros R1, R3, R3D e R3E. Os fluxos dos animais do grupo 2 foram medidos em todos os momentos indicados na TAB 6.1.

Os fluxos dos animais do grupo 3 foram medidos todos os dias. Neste grupo foram realizadas medições 27 minutos após a inicial de cada dia, correspondendo ao momento semelhante no grupo 2 (27 minutos após a aplicação laser). Estas medições foram executadas a fim de compararmos os valores de F(%) deste grupo com os de momentos semelhantes do grupo 2.

Na seqüência são apresentados os valores de F(%) obtidos nos três grupos estudados, referentes aos momentos (sessões) acima descritas.

Os resultados obtidos são apresentados, num primeiro momento, usando dados descritivos de cada grupo, analisando o comportamento de cada grupo ao longo do tempo, comparando os grupos 1 e 3, visando verificar possíveis efeitos relacionados à utilização do fluxômetro nos parâmetros deste trabalho, bem como comparando os grupos 2 e 3, visando observar o efeito da radiação laser sobre a microcirculação sangüínea nas condições propostas neste estudo.

Num segundo momento, as significâncias estatísticas dos resultados obtidos são discutidas.

Após a apresentação dos resultados, são efetuados comentários sobre os significados dos resultados obtidos, e sugestões para trabalhos futuros.

6.1. Resultados

Os valores de F(%) de cada animal, referentes aos grupos 1, 2 e 3, são apresentados nas TAB. 6.2, 6.3 e 6.4, e gráficos das FIG. 6.1, 6.2 e 6.3, respectivamente. Os valores médios de F(%) dos três grupos também são apresentados nas TAB 6.2, 6.3 e 6.4 e no gráfico da FIG. 6.4.

Conforme justificado, no capítulo Materiais e Métodos, o modelo adotado do processo estudado evidencia as alterações de fluxo decorrentes da lesão, no grupo de controle, e as decorrentes da lesão e irradiação, no grupo que sofreu a irradiação. Assim, seguindo a metodologia adotada, o efeito da variável lesão é verificado no grupo controle (grupo 3), comparando os valores de F(%) de cada sessão em relação ao valor de F(%) no momento inicial, quando $F(\%) = 100\%$. E o efeito da irradiação é verificado comparando os valores de F(%) das sessões semelhantes dos grupos 2 e 3 (laser e controle respectivamente). O efeito do fluxômetro é verificado comparando os

valores de F(%) das sessões semelhantes dos grupos 1 e 3 (controle fluxômetro e controle respectivamente).

As significâncias das variações médias de F(%) de cada sessão em relação ao valor inicial (100%) no grupo 3 foram verificadas usando o teste t para uma população, testando a hipótese nula de que o valor médio de F(%) de cada momento (sessão) seja igual ao valor inicial (100%). Os valores de probabilidade (p) também foram calculados, significando a probabilidade de erro ao ser rejeitada a hipótese nula. Os resultados obtidos são apresentados na TAB. 6.5. Este teste foi usado para verificar se a lesão provocou alterações de F(%) médio neste grupo. Embora esta análise não seja informativa no grupo 2 (pois variações de F(%) de cada momento em relação ao inicial, neste grupo, podem significar lesão ou irradiação), a TAB. 6.5 também mostra os resultados do teste t do grupo 2, visando salientar os resultados obtidos, conforme comentários na seqüência.

A TAB. 6.6 mostra os intervalos de confiança dos valores médios de F(%) dos grupos 1, 2 e 3, ao grau de confiança de 95%, usando a distribuição t.

As significâncias das variações médias de F(%) de sessões semelhantes entre os grupos 1 e 3 e entre os grupos 2 e 3 foram verificadas usando o teste t para duas populações, testando a hipótese nula de que o valor médio de F(%) de sessões semelhantes sejam iguais. Este teste foi usado para verificar se o laser do fluxômetro interferiu no processo (comparação entre grupos 1 e 3) e para verificar se a irradiação com laser alterou F(%) médio no grupo 2. Os resultados obtidos são mostrados na TAB. 6.7 e 6.8, referentes às comparações entre os grupos 1 e 3 e 2 e 3, respectivamente.

As significâncias das variações médias de F(%) de sessões consecutivas R5-R7, R5A-R7A e R5B e R7B do grupo 2 foram verificadas usando o teste t para duas populações emparelhadas, testando a hipótese nula de que o valor médio de F(%) das sessões

consecutivas sejam iguais. Este teste foi usado para verificar se a irradiação laser alterou F(%) médio 20 minutos após a irradiação.

Tabela 6.2 – Valores de F(%) do grupo 1 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 1 a 5 (A1 a A5).

Registros	A1	A2	A3	A4	A5	MÉDIA	Desvio Padrão	Erro Padrão
R1	100	100	100	100	100	100	0	0
R3	102,2	98,9	88,3	102,7	71,2	92,7	13,3	6
R5	--	--	--	--	--	--	--	--
R7	--	--	--	--	--	--	--	--
R3A	--	--	--	--	--	--	--	--
R5A	--	--	--	--	--	--	--	--
R7A	--	--	--	--	--	--	--	--
R3B	--	--	--	--	--	--	--	--
R5B	--	--	--	--	--	--	--	--
R7B	--	--	--	--	--	--	--	--
R3C	--	--	--	--	--	--	--	--
R3D	117,4	97,8	--	194,5	110,8	130,1	43,7	21,9
R3E	92,4	126,4	--	102,7	96,4	104,5	15,2	7,6

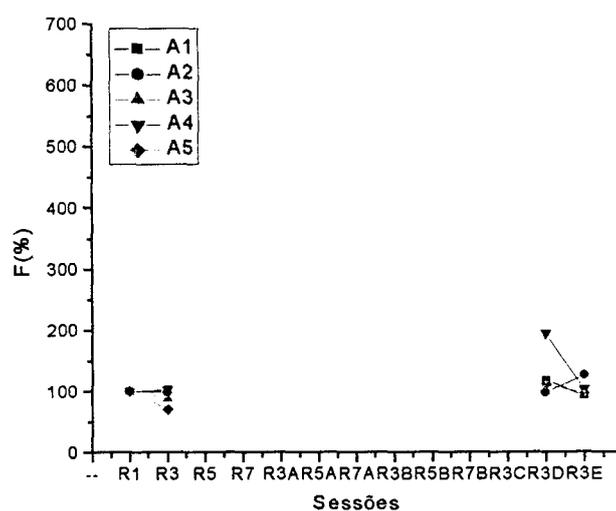


Figura 6.1 – Gráfico dos valores de F(%) do grupo 1 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.

Tabela 6.3 – Valores de F(%) do grupo 2 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 6 a 10 (A6 a A10).

Registros	A6	A7	A8	A9	A10	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
R1	100	100	100	100	100	100	0	0
R3	52,2	60	57,4	68,9	76,2	62,9	9,6	4,3
R5	63,5	61,2	68,9	66	81,1	68,1	7,8	3,5
R7	68,7	120	57,4	70,8	94,3	82,2	25	11,2
R3A	87	50,6	62,3	65,1	58,2	64,6	13,6	6,1
R5A	89,6	116,5	55,7	73,6	50,8	77,2	26,8	12
R7A	76,5	90,6	56,6	71,7	48,4	68,7	16,7	7,5
R3B	120	77,6	34,4	75,5	51,6	71,8	32,3	14,4
R5B	108,7	82,4	47,5	68,9	60,7	73,6	23,3	10,4
R7B	156,5	76,5	56,6	68,9	82,8	88,2	39,4	17,6
R3C	643,5	569,4	241	254,7	252,5	392,2	197,4	88,3
R3D	113	288,2	54,1	34,9	145,1	127,1	100,4	44,9
R3E	80	--	127,9	--	64,8	90,9	32,9	19

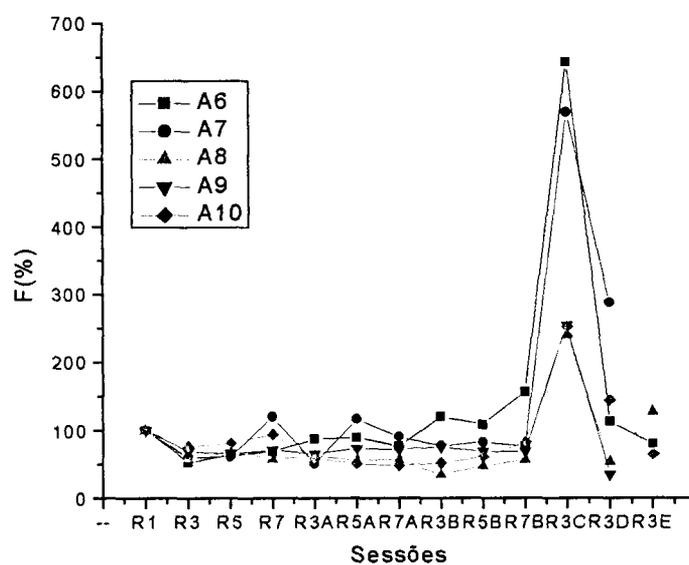


Figura 6.2 – Gráfico dos valores de F(%) do grupo 2 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.

Tabela 6.4 – Valores de F(%) do grupo 3 obtidos nas sessões R1 a R3E, referentes aos animais 12 a 15 (A12 a A15).

Registros	A12	A13	A14	A15	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
R1	100	100	100	100	100	0	0
R3	81,6	100	71	36,4	72,2	26,8	13,4
R5	--	--	--	--	--	--	--
R7	68,4	92,9	71,8	55,4	72,1	15,5	7,8
R3A	70,4	110,2	48,4	53,7	70,7	28	14
R5A	--	--	--	--	--	--	--
R7A	55,1	71,4	73,4	60,3	65,1	8,8	4,4
R3B	61,2	65,3	142,7	73,6	85,7	38,4	19,2
R5B	--	--	--	--	--	--	--
R7B	89,8	--	80,6	63,6	78	13,3	7,7
R3C	307,1	205,1	206,5	324,8	260,9	64	32
R3D	239,8	38,8	75	222,3	144	101,9	50,9
R3E	112,2	107,1	70,2	98,3	97	18,8	9,4

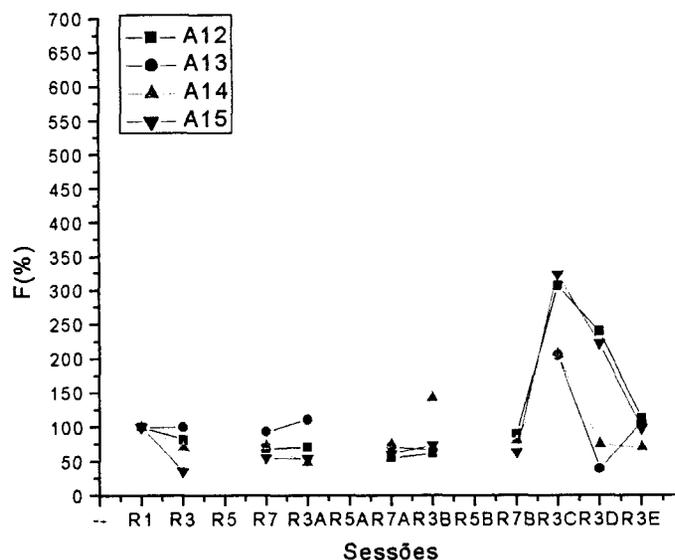


Figura 6.3 – Gráfico dos valores de F(%) do grupo 3 em função dos momentos registrados (R1 a R3E) em escala não linear para evidenciar os momentos.

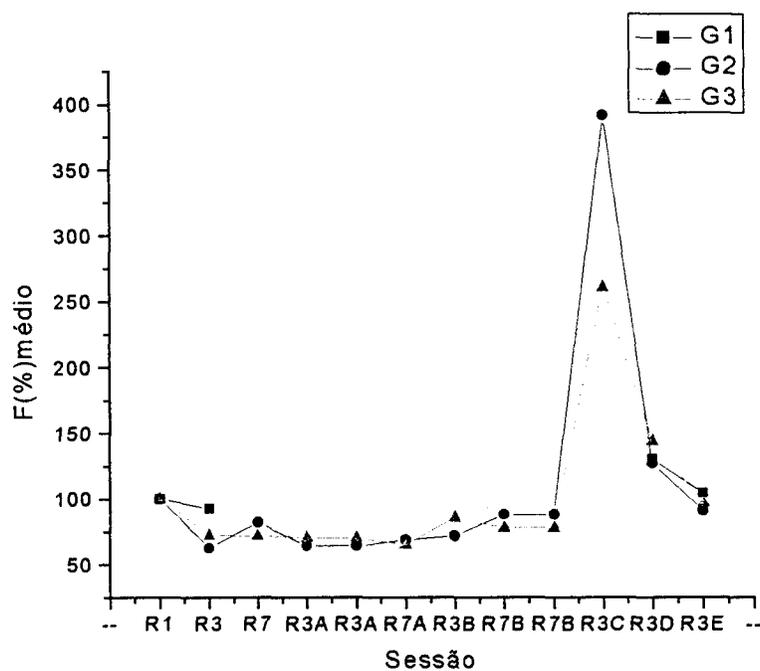


Figura 6.4 – Gráfico dos valores médios de F(%) dos grupos 1, 2 e 3 em função dos momentos registrados em escala não linear para evidenciar os momentos.

Tabela 6.5 – Valores estatísticos (t) e valores de Probabilidade (p), obtidos comparando os momentos R3 a R3E em relação ao inicial (R1) dos grupos 2 e 3.

Registro	Grupo 2		Grupo 3	
	T	P	t	P
R3	-8,65089	9,82E-04	- 2,07501	0,12962
R5	-9,11547	8,03E-04	--	--
R7	-1,58924	0,18721	- 3,59106	0,037
R3A	-5,80484	0,00438	-2,0966	0,12698
R5A	-1,90209	0,12992		
R7A	-4,19464	0,01376	- 7,95573	0,00414
R3B	-1,94945	0,12304	- 0,74507	0,51029
R5B	-2,52804	0,0648	--	--
R7B	-0,66735	0,54108	- 2,86707	0,10317
R3C	3,31032	0,02965	5,02506	0,01518
R3D	0,603	0,57903	0,86314	0,45155
R3E	-0,47995	0,67862	- 0,32235	0,76834

Tabela 6.6 - Intervalo de confiança dos valores médios de F(%) dos grupos 1, 2 e 3, correspondentes ao grau de confiança de 95%.

Registros	Intervalo de Confiança (95%)		
	G1	G2	G3
R1	100	100	100
R3	(76,1 - 109,2)	(51 - 74,8)	(29,7 - 114,8)
R5		(58,4 - 77,8)	
R7		(51,2 - 113,3)	(47,4 - 96,8)
R3A		(47,7 - 81,5)	(26,2 - 115,2)
R5A		(44,0 - 110,5)	
R7A		(48,1 - 89,4)	(51,1 - 79)
R3B		(31,7 - 111,9)	(24,7 - 146,8)
R5B		(44,7 - 102,6)	
R7B		(39,3 - 137,2)	(45 - 111)
R3C		(147,1 - 637,3)	(159 - 362,8)
R3D	(60,6 - 199,7)	(2,4 - 251,7)	(18,2 - 306,1)
R3E	(80,3 - 128,7)	(9,1 - 172,7)	(67,1 - 126,8)

Tabela 6.7 – Valores estatísticos (t) e valores de probabilidade (p) obtidos comparando os momentos semelhantes entre os grupos 1 e 3.

Registro	T	p
R3	-1,50675	0,1756
R3D	0,24965	0,81119
R3E	-0,62083	0,55755

Tabela 6.8 - Valores estatísticos (t) e valores de probabilidade (p) obtidos comparando os momentos semelhantes entre os grupos 2 e 3.

Registro	T	p
R3	0,73232	0,48776
R5	X	X
R7	-0,70282	0,50486
R3A	0,42953	0,68045
R5A	X	x
R7A	-0,39657	0,7035
R3B	0,5902	0,5736
R5B	X	X
R7B	-0,42296	0,68707
R3C	-1,26327	0,24694
R3D	0,24932	0,81027
R3E	0,31439	0,76592

Tabela 6.9 - Valores estatísticos (t) e valores de probabilidade (p) obtidos comparando os momentos consecutivos R5-R7, R5A-R7A e R5B e R7B do grupo 2.

Sessões comparadas	T	P
R5-R7	-1,18524	0,30153
R5A-R7A	1,71554	0,16139
R5B-R7B	-1,5305	0,20064

6.2 - Análise dos Resultados

6.2.1 - Grupo 1: Controle Fluxômetro

Os valores de F(%), referentes aos dias 1, 14 e 21, para este grupo são apresentados na TAB 6.2. Houve durante o período experimental a perda de um dos espécimes deste grupo.

Os gráficos das FIG. 6.1 e 6.4 representam os F(%) de cada espécime e F(%) médio de cada sessão, respectivamente, separados pelos momentos expostos na TAB. 6.1.

Analisando a tabela e os gráficos nota-se a grande variação dos valores de F(%) entre os espécimes, principalmente no 14º dia (R3D). O valor de F(%) médio é discretamente menor que o inicial imediatamente após a lesão (R3), aumentado no dia 14, tendendo ao valor inicial no dia 21.

6.2.2 - Grupo 2: Tratamento Laser

Os fluxos dos animais deste grupo foram medidos em todos os momentos propostos neste estudo. No vigésimo primeiro dia do experimento houve a perda de dois espécimes. A TAB. 6.3 e o gráfico da FIG. 6.2 apresentam os valores de F(%) de cada animal e o gráfico da FIG. 6.4 e a TAB. 6.3 mostram os valores médios de F(%) em cada momento.

Analisando a tabela e o gráfico, observa-se a grande variação dos valores de F(%) entre os espécimes, principalmente nos dias 7, 14 e 21.

Durante as primeiras 48 horas, correspondentes ao período de tratamento da área lesada, não são observadas diferenças acentuadas entre os valores médios de F(%) antes e após a aplicação do laser. O destaque nos gráficos é o acentuado aumento de fluxo no dia 7 seguido de queda no dia 14, retornado a um patamar mais próximo ao valor inicial no dia 21.

Imediatamente após a lesão (R3) e até 48 horas após, em cada sessão os valores de F(%) apresentam acentuadas variações entre animais, mas a ocorrência de valores abaixo do valor inicial predomina em todas as sessões. Os valores médios de F(%) nessas sessões são inferiores ao valor inicial (100%).

Sete dias após a lesão (R3C) os valores de F(%) apresentam elevadas variações entre animais mas sempre seus valores são acima do inicial (entre 241% a 643,5%).

Nas sessões realizadas aos quatorze e vinte e um dias após a lesão (R3D e R3E respectivamente) os valores de F(%) em cada sessão apresentam elevadas variações entre animais, mas seus valores médios variam pouco (acima e abaixo, respectivamente) em relação ao valor inicial.

Os valores do teste t e os valores de probabilidade são mostrados na TAB 6.5, sugerindo que até 48 horas após a lesão, nas sessões R3, R5, R3A, R7A e R5B há evidências suficientes contra a hipótese nula, indicando que os valores médios de F(%) são significativamente inferiores ao inicial (100%). Neste mesmo período, nas sessões R7, R5A, R3B e R7B há poucas evidências de que os valores médios de F(%) sejam diferentes do valor inicial.

Analisando a TAB 6.5, observamos que há evidências adequadas de que sete dias após a lesão (R3C) o valor médio de F(%) é significativamente superior ao valor inicial e que aos quatorze e vinte e um dias após a lesão há poucas evidências de que os valores médios de F(%) sejam diferentes do valor inicial.

Analisando a TAB 6.9 observa-se que não há evidências suficientes indicando alterações significativas de fluxo nos momentos consecutivos R5-R7, R5A-R7A e R5B e R7B.

6.2.3 - Grupo 3: Controle Laser

No grupo Controle Laser, nenhum tratamento foi utilizado na área da lesão. Os fluxos sangüíneos dos animais deste grupo foram medidos

em todos momentos propostos neste estudo. Houve a perda de um espécime no início do experimento. Visando comparar momentos deste grupo com os semelhantes do grupo 2, as medições de 7 e 20 minutos após a irradiação com o laser (no grupo 2) foram substituídas por uma medição única efetuada aos 27 minutos após a inicial, coincidindo com a medição final do grupo laser.

Os valores de F(%) de cada animal são apresentados na TAB. 6.4 e no gráfico da FIG. 6.3. O gráfico da FIG. 6.4 e a TAB. 6.4 mostram os valores médios de F(%) em cada momento.

Analisando a tabela e o gráfico, observa-se grande variação dos valores de F(%) entre os animais, principalmente nos dias 7, 14 e 21, mas os valores médios de F(%) variam pouco nas primeiras 48 horas, apresentando pequeno decréscimo, acentuado acréscimo no dia 7, e queda no dia 14, retornando ao valor próximo ao valor inicial no dia 21.

Analisando a TAB. 6.4, podemos observar que imediatamente após a lesão (R3) e até 48 horas após, embora em cada sessão os valores de F(%) apresentem grandes variações entre animais, a ocorrência de valores abaixo do valor inicial predomina em todas as sessões. Os valores médios de F(%) nessas sessões são inferiores ao valor inicial (100%).

Aos sete dias após a lesão (R3C), os valores de F(%) apresentam elevadas variações entre animais, mas sempre seus valores estão acima do inicial (entre 205,1 a 324,8).

Nas sessões realizadas aos quatorze e vinte e um dias após a lesão (R3D e R3E, respectivamente), os valores de F(%) em cada sessão apresentam elevadas variações entre animais, mas seus valores médios variam pouco (acima e abaixo, respectivamente) em relação ao valor inicial.

Analisando a TAB 6.5, observamos que há evidências adequadas de que houve redução significativa de F(%) médio nas sessões R7 e R7A, e aumento de F(%) médio sete dias após a lesão (R3C), sempre

em relação ao valor inicial. Nas outras sessões não há evidências de que os valores médios de F(%) sejam diferentes do valor inicial.

6.2.4 - Comparação entre o Grupo 1 e Grupo 3

A comparação entre os grupo 1 e 3, conforme já mencionado, tem a função de verificar se a radiação emitida pelo fluxômetro causou algum efeito de biomodulação nas lesões monitorados com uma maior frequência e durante um período de tempo maior.

As TAB. 6.2 e 6.4 apresentam os valores médios e desvios de F(%) dos grupos 1 e 3, respectivamente, e o gráfico da FIG. 6.4 mostra os valores médios de F(%) dos dois grupos.

As alterações de fluxo dos dois grupos são semelhantes ao longo do tempo e a diferença entre os dois é pequena quando comparada com a variação dos valores de F(%) entre os animais.

Os valores descritivos do teste t e os valores p das sessões semelhantes, mostrados na TAB 6.7, indicam que há poucas evidências de que os valores médios de F(%) de todas as sessões semelhantes sejam diferentes.

6.2.5 - Comparação entre o Grupo 2 e Grupo 3

A comparação entre os grupos 2 e 3, conforme já mencionado, tem a finalidade de verificar se, nas condições propostas neste estudo, houve alteração de fluxo sanguíneo nas lesões irradiadas quando comparado ao fluxo das lesões não irradiadas.

As TAB. 6.3 e 6.4 apresentam os valores médios de F(%) e desvios dos grupos 2 e 3 respectivamente. O gráfico da FIG. 6.4 representa o valor médio de F(%) dos dois grupos.

Analisando as tabelas e os gráficos, pode ser observado que as alterações de fluxo dos dois grupos são semelhantes ao longo do tempo, sendo que no sétimo dia experimental o grupo laser apresenta um aumento de fluxo relativamente maior que o controle, porém existe

grande variação entre os valores de $F(\%)$, medida pelos desvios padrões correspondentes.

Os valores descritivos do teste t e os valores p das sessões semelhantes, mostrados na TAB 6.8, indicam que há poucas evidências de que os valores médios de $F(\%)$ entre todas as sessões semelhantes sejam diferentes.

6.3 - Significância dos resultados

Há evidências suficientes indicando variações significativas nos valores médios de $F(\%)$ no grupo 3 imediatamente após a lesão, nas sessões R7 e R7A, indicando decréscimo de fluxo após a lesão, permanecendo abaixo do valor inicial até 48 horas após a lesão.

Há evidências suficientes indicando variações significativas nos valores médios de $F(\%)$ no grupo 3 na sessão realizada aos sete dias após a lesão, indicando acréscimo de fluxo neste momento.

Não há evidências suficientes indicando variações significativas nos valores médios de $F(\%)$ nos outros momentos do grupo 3.

Não há evidências suficientes indicando variações significativas nos valores médios de $F(\%)$ entre os momentos semelhantes dos grupos 1 e 3 e dos grupos 2 e 3.

Os resultados dos testes estatísticos indicam elevadas evidências de alteração de fluxo imediatamente após a lesão no grupo 3 e poucas evidências de alterações um dia após. O mesmo foi observado em outros momentos do grupo 3 e do grupo 2. Este fato indica que a metodologia usada durante as medições foi capaz de detectar variações significativas de fluxo nas condições em que foi realizado o experimento. Mas também pode sugerir que algum parâmetro relevante, talvez desconhecido, não foi controlado. Ou ainda que as variações percentuais de fluxo reais são pequenas até 48 horas após a lesão, mas podem apresentar, proporcionalmente, elevadas variações entre animais. E que as variações percentuais de fluxo reais, embora elevadas no sétimo dia após a lesão, apresentam elevadas variações entre

animais. E que as variações percentuais de fluxo reais apresentam elevadas variações entre animais nos dias 14 e 21 após a lesão.

Os intervalos de confiança dos valores médios de F(%) dos três grupos, apresentados na TAB. 6.6, indicam, sempre que não é possível rejeitar a hipótese de que as variações médias de fluxo sejam iguais, os intervalos dos prováveis valores médios de F(%).

6.4 – Considerações gerais e sugestões para trabalhos futuros

Após a análise dos resultados foram observadas elevadas variações nos valores de F(%) em todos os grupos, algumas das possíveis explicações podem incluir as razões que seguem.

Da variabilidade natural do fluxo sanguíneo nos animais, que não pode ser controlada experimentalmente, resulta a elevada variação dos valores de fluxo medidos entre os animais. Embora o modelo usado (variação percentual de fluxo) seja insensível às variações de fluxo entre animais, existem diferenças espaciais pronunciadas em cada animal, resultando largas variações nas medições.

A resposta a um estímulo lesivo individual de cada animal pode ser outro fator responsável pela variação amostral. Encontram-se descritas reações fisiológicas ocorridas nos animais sob anestesia geral com alterações nos níveis de oxigênio circulante no sangue que podem levar a alterações de fluxo como observaram Kannurpatti *et al.* (2002), em estudo citado anteriormente.

Embora o método usado (variação percentual de fluxo) seja insensível a variações sistêmicas, conforme já comentado, sua validade deve ser investigada quando ocorrem grandes variações sistêmicas de fluxo.

As variações percentuais de fluxo medidas imediatamente após as lesões indicam a diminuição de fluxo na quase totalidade dos espécimes. A diminuição de fluxo era esperada, uma vez que ocorre extravasamento de fluido intravascular após a agressão, causada por um aumento da permeabilidade vascular.

Apesar dos animais do Grupo 1 apresentarem diminuição de fluxo após a lesão, a diminuição foi menor, quando comparada às observadas nos Grupos 2 e 3. Este comportamento pode ser decorrente dos seguintes fatores. Os animais do Grupo 1, denominado Controle fluxômetro, durante todo o período experimental, foram avaliados no período da manhã, enquanto os animais dos grupos 2 e 3, Laser e Controle laser respectivamente, foram monitorados no período da tarde. Embora o método adotado de análise de fluxo (variações percentuais) atenua a sensibilidade dos valores analisados a alterações sistêmicas, o modelo usado pode não ser válido quando há grandes variações sistêmicas (e. g., não linearidades) e quando há alterações locais de fluxo não controladas. Outro fator que poderia ter contribuído para este resultado, pode ser atribuído a um artefato de técnica durante a realização das lesões. No entanto, com o decorrer do experimento verificou-se a formação de lesões com características clínicas semelhantes às dos outros dois grupos, indicando razoável semelhança entre as lesões. Ainda assim, a normalização das lesões é recomendada em estudos futuros, pois dependendo da profundidade da lesão, é conhecido que há grandes variações nos valores de fluxo medidos via fluxômetro laser Doppler em função do grau da lesão.

O tempo de espera entre a realização da lesão e a medição de fluxo, também pode ser responsável pelo resultado obtido, pois é esperado que inicialmente ocorra isquemia na área lesionada, seguida de hiperemia transitória, com posterior diminuição de fluxo causada pelo aumento da permeabilidade vascular. Logo, variações nos tempos decorridos entre as injúrias e as medições, podem ser significantes, alterando os resultados.

Os animais do Grupo 2 foram monitorados nos dias 1, 2 e 3, nos momentos antes da irradiação, sete e vinte e sete minutos após, pois, de acordo com os resultados relatados por Maegawa e colab. (2000) apresentados no capítulo 4, poderiam ocorrer alteração no fluxo sanguíneo imediatamente após a irradiação.

Não foram observadas neste estudo alterações imediatas no fluxo sangüíneo que possam ser atribuídas à radiação laser. Este fato pode ser atribuído ao comprimento de onda utilizado, pois no estudo de Maegawa e colab (2000), foi utilizado radiação laser emitindo em 830nm e de acordo com os relatos de Bradley e colab.(2000), esse comprimento de onda pode ser efetivo para promover alterações imediatas na microcirculação sangüínea dependendo da dose utilizada, enquanto que, o comprimento de onda utilizado neste trabalho (632,8nm), segundo seus resultados não promoveria alterações imediatas na microcirculação sangüínea.

A dose de irradiação pode ser outro fator apontado. Segundo Mester e colab (2000), a dose de 1 J/cm^2 é considerada a dose mínima, para que ocorram efeitos benéficos relativos a biomodulação *in vivo*. Segundo os autores, uma dose mínima deve atingir as áreas onde se espera o efeito biológico. Mas deve ser considerado que a dose efetiva de tratamento e a dose superficial são iguais somente nos casos onde o tecido alvo apresenta lesões superficiais de pele, como neste estudo. Nos casos de lesões profundas, a absorção e o espalhamento da luz nos tecidos devem ser considerados para que a dose mínima atinja o tecido alvo.

A dose de irradiação utilizada neste estudo é bem conhecida na literatura como efetiva nos casos de reparo tecidual, quando o parâmetro analisado é a aceleração no fechamento da lesão, ou a produção de colágeno, como demonstrado nos estudos de Ribeiro (2000) e Silva (2002). Segundo Blot e colab.. (2001), alterações de fluxo são indicadores objetivos de aceleração do processo de reparação tecidual, sendo assim, a mesma dose foi utilizada para avaliar seus efeitos sobre o parâmetro estudado.

A dose usada neste trabalho foi a mínima sugerida como efetiva, para que sejam observados os efeitos de biomodulação acima apontados, apresentando bons resultados na reparação tecidual, principalmente relacionados à quantidade e deposição de colágeno, no

entanto, pode não ser a ideal para que sejam observadas alterações mensuráveis de fluxo, o emprego de diferentes doses dentro dos mesmos parâmetros é recomendável para a verificação da dose-dependência de efeitos relacionados a microcirculação.

Os resultados obtidos nos dias 1 e 2 pós-lesão no grupo 2 indicam, com uniformidade, fluxos mais baixos do que os valores iniciais. Mas a partir do terceiro dia observa-se em alguns espécimes o aumento de fluxo, apresentando valores já próximos ou maiores que os valores iniciais, indicando possivelmente o término do processo inflamatório agudo e o início do processo de regeneração tecidual. Uma vez que o início deste processo varia largamente entre animais, os valores de fluxo medidos também apresentam largas variações.

No sétimo dia experimental neste mesmo grupo foi observado um aumento médio de fluxo de 392,2% em relação ao valor inicial, indicando grande aumento de fluxo observado no tecido de granulação característico desta fase reparatória. O tecido de granulação tem como características histológicas a proliferação de fibroblastos e células endoteliais, com acentuada angiogênese observada através da migração, proliferação e maturação de células endoteliais. Neste momento também ocorre grande variação entre os espécimes, quando os valores percentuais variam entre 241% a 643,5%, provavelmente decorrente das variações fisiológicas de cada animal.

No dia 14 observou-se grande variação nos valores de F(%). A variação não pode ser atribuída exclusivamente a variações fisiológicas, pois foi observada a presença de crosta de tecido necrótico em alguns animais, dificultando o acesso à área de medição (o fluxo medido é sensível às propriedades ópticas do tecido). Nestas condições os fluxos medidos via fluxômetro laser Doppler são ou nulos ou apresentam valores muito baixos. A presença ou ausência de crosta de tecido necrótico não pode ser utilizada como parâmetro na análise da qualidade da reparação tecidual, uma vez que, a movimentação do

animal dentro de seu receptáculo pode promover a remoção mecânica deste tecido.

O comportamento do fluxo médio percentual (F%) dos animais pertencentes ao grupo controle (grupo 3) foi semelhante aos do grupo laser. A maior diferença foi observada no sétimo dia, com 260,9% de variação percentual média de fluxo. Portanto, menor que o aumento percentual médio observado no grupo laser. A variabilidade de resultados de F% também foi menor que a observada no grupo 2, com valores entre 205,1 a 324,8%. Apesar de a variação ser menor do que no grupo laser, ainda pode ser observada grande variação individual de fluxo entre os espécimes. Também foi observada a presença de tecido necrótico em alguns animais deste grupo no 14 dia experimental conforme relatado anteriormente, causando maior variação de valores percentuais de fluxo.

Este aumento do fluxo médio percentual do grupo 2 em relação ao grupo 3 observado no sétimo dia pode estar relacionado com os resultados histológicos observados no estudo de Bisht e colab. (1994), onde a neovascularização das áreas irradiadas foi significativamente diferente do controle nos dias 5 e 7 experimentais.

Segundo Rochkind e colab. (1989) e Kubota e colab. (1991), os efeitos da radiação podem persistir por vários dias após o término da irradiação, sendo possível desta forma observar efeitos benéficos dias após o término da terapia.

Não foram observadas diferenças significativas nos valores médios das variações percentuais de fluxo nos momentos semelhantes dos grupos 1 e 3, e 2 e 3. Este fato decorre das grandes variações de F(%) entre animais, quando comparadas aos respectivos valores médios, provavelmente pelas razões acima apontadas, e as que seguem.

No estudo de Sommer e colab.(2001), os autores relatam que para ocorrer ativação das respostas fisiológicas, a área de aplicação deve ser irradiada no período de tempo mais curto possível, criando uma

distribuição homogênea da densidade de energia com a intensidade de radiação necessária para a observação dos efeitos fisiológicos. A intensidade e a densidade de energia são parâmetros importantes para o sucesso da terapia, porém são independentes biologicamente entre si, não tendo sido encontrado pelos autores uma relação entre eles, após a análise de vários trabalhos publicados e dos resultados encontrados em suas pesquisas.

No presente estudo a radiação emitida pelo fluxômetro, apesar de apresentar alta intensidade, apresenta baixa densidade de energia na área irradiada. Assim, não eram esperadas diferenças entre os grupos 1 e 3.

Os resultados obtidos na comparação entre os grupos 2 e 3, podem ser decorrentes dos seguintes fatores adicionais.

De acordo com Karu (2000), um dado relevante, é o fato das populações serem heterogêneas, bem como as culturas de células, no que concerne à atividade proliferativa, não existe evidência de que todos os indivíduos respondem da mesma forma a irradiação.

A magnitude dos efeitos causados pela LILT em células é dependente do estado funcional das mesmas. Ou seja, é conhecido que células que se encontram em perfeito estado funcional, respondendo de forma ótima ou próxima ao seu máximo a um estímulo, não apresentam efeitos ou os efeitos são mínimos (Karu, 2000; Almeida-Lopes e colab. 2001).

Segundo Karu (2000), alterações no potencial de óxido-redução das células são fundamentais para a ocorrência de efeitos relacionadas à radiação.

As áreas de concentração de estudos sobre os efeitos clínicos da LILT são, reparação tecidual e tratamento de inflamações crônicas. Ambas condições clínicas são caracterizadas pela diminuição da tensão de oxigênio (diminuição da pO_2 , hipóxia) e acidose (diminuição do pH).

Os tecidos normais têm uma pO_2 de aproximadamente 40 mm Hg, enquanto que nos estados de hipóxia esta pressão cai para 0-5 mm

Hg. Em casos de regeneração tecidual em condições normais a hipóxia decorrente de uma agressão ao tecido é transitória, por sua vez as lesões crônicas, são caracterizadas por uma contínua glicólise anaeróbia e por alteração no processo de óxido redução. Quando ocorre a irradiação de lesões em estado agudo os efeitos da irradiação podem ser mínimos ou não existirem, isto ocorre pois, a atividade proliferativa e a reparação da integridade tecidual ocorrem em taxa máxima ou próxima à máxima o que caracteriza um estado de normalidade dos mecanismos de reparação tecidual fisiológicos.

Esta pode ser, segundo a autora, uma das razões que levariam a não observação de efeitos terapêuticos relacionados à irradiação em processos de reparação tecidual em estado agudo nos estudos experimentais.

Desta forma torna-se válida a comparação futura dos resultados obtidos neste trabalho, que teve como objeto de estudo um quadro inflamatório agudo em espécimes saudáveis, com lesões crônicas ou mesmo em espécimes com debilidades fisiológicas.

Lagan e colab. (2001), utilizaram radiação com a finalidade de promover o processo de cicatrização de lesões pós-cirúrgicas. Não foram observados pelos autores efeitos benéficos relacionados à irradiação nesta condição clínica. Porém, em um estudo piloto, os autores utilizaram o mesmo protocolo, obtendo resultados significantes na reparação de úlceras crônicas. Desta forma, segundo os autores, as indicações primárias para a terapia laser em baixa intensidade, seriam condições patológicas que expressem alguma debilidade na resposta fisiológica da reparação tecidual ou ainda em casos onde a reparação ocorra de forma muito lenta. Porém, reforçam ainda que esses achados clínicos não correspondem muitas vezes aos dados encontrados em análise histológica, por diferentes pesquisadores, onde a quantidade de colágeno e a proliferação de vasos sanguíneos, nas regiões irradiadas, em estudos realizados em cobaias, demonstram bons resultados.

Além da dose, comprimento de onda e modo de emissão do laser utilizado neste estudo, o método de irradiação, e o número de irradiações realizadas, poderiam afetar os resultados obtidos. De acordo com Smith (1991), uma vez que a resposta fotobiológica é observada, a dose ótima de irradiação para um determinado comprimento de onda deve ser estabelecida, bem como, o melhor número de sessões de irradiação requerido para o alcance do efeito desejado. Neste estudo foram efetuadas três sessões de irradiação iniciadas logo após o trauma e em seqüências de 24 horas. Este cronograma de irradiações teve a finalidade de observar os efeitos da radiação na fase aguda do processo inflamatório, pois, de acordo com os resultados de Honmura e colab (1992), o laser de GaAIs mostrou-se efetivo no controle do edema atuando sobre a permeabilidade vascular nos momentos iniciais do processo inflamatório.

Diversas variáveis que não foram analisadas neste estudo deixam abertas questões sobre a microcirculação sangüínea e a radiação proveniente do laser de He-Ne, a serem respondidas em estudos futuros.

A comparação entre diferentes doses e métodos de irradiação, o modo de emissão do laser utilizado, a comparação dos efeitos sobre lesões crônicas e agudas, utilização de diferentes comprimentos de onda, além da comparação entre indivíduos saudáveis com indivíduos que apresentem comprometimento do sistema microcirculatório, são alguns dos parâmetros que poderiam ser estudados na tentativa de se evidenciar alterações do fluxo sangüíneo, associadas à radiação laser.

Mais estudos são necessários para que possa haver a validação da utilização clínica deste comprimento de onda, com finalidade de promover modulação do fluxo sangüíneo em áreas lesionadas.

7 – CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir:

1- A técnica de fluxometria laser Doppler é capaz de detectar alterações ocorridas na microcirculação sangüínea decorrentes do processo fisiológico de inflamação e reparação tecidual nas condições propostas neste estudo.

2- Não foram observadas evidências suficientes de que ocorreram alterações significativas no fluxo da microcirculação sangüínea, decorrentes da radiação emitida pelo fluxômetro nestas condições experimentais.

3- Embora a irradiação com laser de Hélio-Neônio, com densidade de energia de $1,15 \text{ J/cm}^2$ feita em três aplicações consecutivas com espaçamento de 24 horas entre elas, tenha apresentado um aumento percentual de fluxo médio no sétimo dia do processo de reparação, em relação aos espécimes não irradiados, não foram observadas evidências suficientes de que ocorreram alterações significativas no fluxo sangüíneo no modelo de estudo proposto.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agaiby, A.D., Ghali, L.R., Wilson, R., Dyson, M., Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes, **Laser Surg Med**, 26(4):357-63, 2000.

Almeida-Lopes, L., Rigau, J., Zângaro, R.A., Guidugli-Neto, J., Jaeger, M.M.M., Comparison Of The Low Level Laser Therapy Effects On Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance And Same Fluence, **Lasers in Surgery and Medicine**, 29:179-184, 2001.

Basford, J.R. Low Intensity Laser Therapy: Still Not an Established Clinical Tool. **Lasers in Surgery and Medicine** 16:331-342, 1995.

Baxter, G.D., Diamantopoulos, C., **Therapeutic Lasers Theory and Practice**, 1 ed., Churchill Livingstone, London, 1994.

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**, 100, pp 43-46, 1994.

Blot, S. I., Monstrey, S.J, The use of laser Doppler imaging in measuring wound-healing progress, **Arch Surg**, 136: 116, 2001.

Bradley, P.F., Pain relief in Laser Therapy, **5th Congress of the International Society for Lasers in Dentistry**, Jerusalem, Israel, Maio, 1996.

Bradley,P., Groth,E., Gursoy,B., Karasu,H., Rajab,A., Sattayut, S., The Maxillofacial Region: Recent Research and Clinical Practice in Low Intensity Laser Therapy (LILT), **Lasers in Medicine and dentistry Basic science and up-to-date clinical applications of Low Energy-level laser therapy**, EMLA, Ed. Vitagraf, Croatia, cap. 14 pp.386-401, 2000.

Brande van den, P., Kemp, K., Coninck, A. and Debing, E., Laser Doppler Flux Characteristics at the Skin of the Dorsum of the Foot in Young and in Elderly Healthy Human Subjects. **Microvascular Research**, 53, 156-162,1997.

Carolan-Rees G, Tweddel AC, Naka KK, Griffith TM – Fractal dimensions of laser Doppler flowmetry time series., **Med.Eng.Phys** Jan;24(1):71-6, 2002.

Chow, R.T., Dose Dilemmas in Low Level Laser Therapy The Effects of Different Paradigms and Historical Perspectives, **Laser Therapy**, vo.13, p. 102-109, 2001.

Cui Z.H., Arakawa H., Kawikova I., Skoogh B.E., Lotvall J., Relationship between systemic blood pressure, airway blood flow and plasma exudation in guinea- pig, **Acta Physiol Scand** , Fev; 165(2) : 121-7, 1999.

Danhof, G., Biological Effects of the Laser Beam, **Lasers in Medicine and dentistry Basic science and up-to-date clinical applications of Low Energy-level laser therapy**, EMLA, Ed. Vitagraf, Croatia, cap. 5 pp.127-133, 2000.

Donnelly, R., Non-invasive methods of arterial and venous assessment, **British Medical Journal**, March, 2000.

Envemeka, C.S., Attenuation and Penetration of Visible 632,8nm and Invisible Infra-Red 904nm Light In Soft Tissues, **Laser Therapy**, vol 13 pp 95-101, 2001.

Flemming K., Cullum N., Laser therapy for venous leg ulcers (Cochrane Review), **The Cochrane Library**, Issue 2, 2002.

Foth, H-J., Meyer, D., Stockel, T., Side Effects Of Laser Tissue Interaction Studied By Laser Doppler Vibrometry.,In: **Fourth Internacional Conference on Vibration Measurements by Laser Techniques**, SPIE, vol 4072, p 392-400, 2000.

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, **Veterinary Surgery**, 26: 114-120, 1997.

Guyton, A.C., **Fisiologia Humana**, Ed. Interamericana, 4 ed.,Rio de Janeiro, 1974.

Halliday, D., Resnick, R., **Física**, 4 ed. Ed. Livros técnicos e Científicos SA, Rio de Janeiro, cap.42, pp 99-100, 1984.

Honmura,A., Yanase,M., Obata,J., Haruki,E., Therapeutic Effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats, **Lasers Surg Med**, 12:441-449, 1992.

Kana, J.S., Hutschenreiter, G., Haina, D., Waidelich, W., Effect of Low-Power Density Laser Radiation on Healing of Open Skin Wounds in Rats, **Arch Surg**, vol 116 pp – 293-296, 1981.

Kannurpatti SS, Biswal BB, Hudetz AG. – Differential fMRI-BOLD signal response to apnea in humans and anesthetized rats, **Magn Reson Med**, May;47(5):864-70, 2002.

Karu T., Laser biostimulation: a photobiological phenomenon, **J Photochemistry and Photobiology**, 3, 638-640, 1989.

Karu, T – Biological limitations of low-power laser effects, **Lasers in Medicine and dentistry Basic science and up-to-date clinical applications of Low Energy-level laser therapy**, EMLA, Ed. Vitagraf, Croatia, 2000.

Karu, T., Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. **Proc. SPIE.** , 2630:2-9, 1995.

Karu,T., **The science of Low-Power Laser Therapy**, Ed. OPA, Amsterdam, 1998.

Kasai, S., Kono, T., Yamamoto, Y., Kotani, H., Sakamoto,T., Mito,M., Effect of Low-Power Laser Irradiation on Impulse Conduction in Anesthetized Rabbits, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, 14(3):107-113, 1996.

Khullar S.M., Brodin, P., Messelt E.B., Haanas, H.R.. The effects of low level laser treatment on recovery of nerve conduction and motor function after compression injury in the rat sciatic nerve, **Eur J Oral Sci**, 103:299-305, 1995.

Kilic E., Bahr M., Hermann D.M. , Efeccts of recombinant tissue plasminogen activator after intraluminal thread occlusion in mice: role of hemodynamic alterations, **Stroke Nov**; 32(11):2641-7, 2001.

Korolevich A.N., Dubina N. S., Vecherinsky, S.I., Influence of low-intensity of laser radiation on degree of oxygenation and speed microcirculation of blood, **Proc. of SPIE**, vol 4159 pp 60-63, 2000.

Kubota, J., Ohshiro T., The effects of diode laser low reactive-level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model, **Laser Therapy**, 1(3):127, 1989.

Lagan, K.M., Clements, B.A., McDonough, S. and Baxter, G.D., Low Intensity Laser Therapy (830nm) in the Management of Minor Postsurgical Wounds: A Controlled Clinical Study, **Lasers in Surgery and Medicine**, 28:27-32, 2001

Lubart, R., Friedmann, H., Lavie, R., Photobiostimulation as a function of different wavelengths, **Laser Therapy**, vol.12 :38-41, 2000.

Maegawa, Y., Itoh, T., Hosokawa, T., Yaegashi, K., Nishi, M., Effects Of Near-Infrared Low-Level Laser Irradiation On Microcirculation, **Lasers in Surg and Med**, 27:427-437, 2000.

Maldonado, E.P., **Interação da Luz Laser com Tecidos Biológicos: Aplicações**, Apostila Mestrado Profissionalizante Lasers em Odontologia Mecanismos de Interação Laser-Tecido, IPEN, São Paulo, 2001.

Mester A., Mester E., Mester A., 2000, Open wound healing – Bed Sores, Ulcus Cruris, Burns – With Systemic Effects of LILT, in **Lasers in Medicine and Dentistry, Basic Science and up-to-date Clinical Application of Low Energy-Level Laser Therapy LLLT, EMLA**, Ed. Vitagraf, Croatia, cap.X, pp227-244, 2000.

Mester E., The biomedical effects of laser application, **Lasers in Surgery and Medicine**, 5:31-39, 1985.

MOOR Company homepage. Disponível em: < <http://www.moor.co.uk> >. Acessado em 20 jan. 2002.

Nogueira, G.E.C., Zezell, D.M., Eduardo, L.R.P., Vieira JR., N.D., Baldochi, S.L., Rossi, W., Desenvolvimento De Um Sensor De Fluxo Sangüíneo Via Técnica Laser Doppler, In: **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, Florianópolis, p. 724-726, 2000.

Núñez, S.C., Cordon, R., Nogueira, G.E.C., Eduardo, C.P., Medição da Potência de Saída do Feixe de Equipamentos Laser em Baixa Intensidade, **Brazilian Oral Research**, vol 16 ,supl. pp 239, 2002.

Obaid, Sacha.; Morris, Donald J.-Laser Doppler Perfusion Imager Use in Incisional Hérvia Repair following Omental Breast Reconstruction, **Plast Reconstr Surg**, 109(6), May, 2002.

Obata J., Yanase, M., Honmura, A., Evaluation of Acute Pain-Relief of Low Power Laser Therapy on Rheumatoid Arthritis by Thermography, **Laser Therapy**, 2:28, 1990.

Parrado, C., Albornoz, F.C., Vidal, L., Pérez de Vargas, I., A quantitative investigation of microvascular changes in the thyroid gland after infrared (IR) laser radiation, **Histol Histopathol**, 14: 1067-1071, 1999.

Qi, Y, Gazelius B, Linderöth B, Lundberg T., Arterial Blood Flow and Microcirculatory Changes in a rat Groin Flap after Thrombosis Induced by Electrical Stimulation of the Artery, **Microvascular Research**, 63, 179-185, 2002.

Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., Enwemeka, C.S., Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats, **Wound Repair Regen**, Mai-Jun; 9(3):248-55, 2001.

Ribeiro, M.S. Interação da radiação laser linearmente polarizada de baixa intensidade com tecidos vivos: Efeitos na aceleração de cicatrização tissular em lesões de pele. **Tese de doutoramento**, IPEN – São Paulo, 2000.

Ribeiro, M.S., Silva, D.F.T., Maldonado, E.P., Rossi, W., Zezzel, D.M., Effects of 1047-nm Neodymium Laser Radiation on Skin Wound Healing, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, 20(1)37-40,2002.

Rochkind, 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, **Laser Surg Med**, 9:174-182, 1989.

Saito, K., Effects of 830nm diode laser irradiation on superficial blood circulation in college sumo wrestlers, **Laser Therapy**, 9(4):187, 1997.

Sasaki, K., Ohshiro, T., Role of Low Reactive-Level Laser Therapy (LLLT) In The Treatment of Acquired and Cicatricial Vitiligo, **Laser Therapy**, pp141-146, 1989.

Schaffer M., Bonel H., Sroka R., Schaffer P. M., Busch M., Reiser M., Duhmke E., Effects of 780 nm diode laser irradiation on blood microcirculation : preliminary findings on time-dependent T 1 – weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI), **J Photochem Photobiol B** Jan; 54 (1) : 55-60, 2000.

Schaldach, B., Roggan, A., Beuthan, J., Muller, G.J.- Laser-Based Medical Diagnostics – State of Art and Future Prospects , **Lasers in Medicine and Dentistry, Basic Science and up-to-date Clinical Application of Low Energy-Level Laser Therapy LLLT, EMLA**, Ed. Vitagraf, Croatia, cap.XXXV,pp.500-501, 2000.

Schindl L., Kainz A., Kern H., Effect of low level laser irradiation on indolent ulcers caused by Buerger's disease; literature review and preliminary report, **Laser Therapy**, 4(1):25, 1991.

Schlager, A., Kronberger, P., Petschke, F., Ulmer, H. , Low Power Laser Light in the healing of Burns: A Comparison Between Two Different Wavelengths (635nm and 690nm) and a Placebo Group, **Lasers in Surgery and Medicine**, 27:39-42, 2000.

Silveira, L.B. Verificação do comportamento de mastócitos na parede não mineralizada da bolsa periodontal supra-óssea submetida à radiação laser de baixa intensidade.**Dissertação de Mestrado**, IPEN/FOUSP, São Paulo, 2000.

Silva, D.F.T., Análise do coeficiente de atenuação e da birrefringência do colágeno em amostras de pele sadia e queimada irradiadas pelo laser de He-Ne linearmente polarizado, **Dissertação de Mestrado**, IPEN, São Paulo, 2002.

Simunovic, Z., Low Level Laser Therapy with Trigger Points Technique: A Clinical Study on 243 Patients, **J Clinical Laser Medicine & Surgery**, 14(4) 163-167, 1996.

Simunovic, Zlatko, Pain and Practical Aspects of its management, **Lasers in Medicine and dentistry Basic science and up-to-date clinical applications of Low Energy-level laser therapy**, EMLA, Ed. Vitagraf, Croatia, cap. XIV, pp 269-299, 2000.

Siposan, D.G., Lukacs, A., Relative Variation to Received Dose of Some Erythrocytic and Leukocytic Indices of Human Blood as a Result of Low-Level Laser Radiation: Na *in Vitro* Study, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, 19(2)89-103,2001.

Smith, K.C., The Photobiological Basis of Low Level Laser Radiation Therapy, Original Article by **John Wiley & Sons. Ltd.**, 1991.

Sommer, A.P., Pinheiro, A.L.B., Mester, A.R., Franke, R-P., Whelan, H.T., Biostimulatory Windows in Low-Intensity Laser Activation: Lasers, Scanners, and NASA's Light-Emitting Diode Array System, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, 19(1)pp-29-33, 2001.

Stadler, I., Evans, R., Kolb, B., Naim, J.O., Narayan, V., Buehner, N., Lanzafame, R.J., In Vitro Effects of Low-Level Laser Irradiation at 660 nm on Peripheral Blood Lymphocytes, **Lasers in Surgery and Medicine**, 27:255-261, 2000.

Stadler, I., Lanzafame, R.J., Evans, R., Narayan, V., Dailey, B., Buehner, N., Naim, J.O., 830-nm Irradiation Increases the Wound Tensile Strength in a diabetic murine model, **Lasers In Surgery And Medicine**, 28:220-226, 2001.

Takahashi, Y., Hitomi, S., Hirata, T., Fukuse, T., Yamazaki, F., Cho, K., Wada, H., Neovascularization Effects with He-Ne Laser in the Rat Trachea, **Thorac. Cardiovasc. Surgeon**, 40,p. 288-291, 1992.

Tuchin, V.V., Light scattering study of tissues; **Physics-Uspekhi**, 40(5) 495-515, 1997.

Tunér J., Hode, L., Low level laser therapy – Clinical Practice and Scientific Background, cap. 3, pp59-60, **Ed. Prima Books**, Sweden, 1999.

Tunér, J., Hode, L., It's All in the Parameters: A Critical Analysis of Some Well- Known Negative Studies on Low- Level Lasers Therapy, **J Clinical Laser Medicine & Surgery**, vol.16 (5): 245-248, 1998.

Walker, J., Relief From Chronic Pain By Low Power Laser Irradiation, **Neuroscience Letters**, 43, 339-344, 1983.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

Aires, M de M. A, **Fisiologia básica**, Ed. Guanabara Koogan S. A. 1 ed. Rio de Janeiro, 1998.

Guidugli-Neto, J., **Elementos da Patologia Geral**, São Paulo: Ed. Santos, 1997.

Hoops, H.C., **Principles of Pathology**, Ed. Meredith Publishing Company, 1 ed. New York, 1964.

Jackson Laboratory (Bar Harbor Me), **Biology of the laboratory mouse, by the staff of Jackson Laboratory**, cap.13 Anatomy by Katharine P. Hummel, Flavia L. Richardson, and Elizabeth Fekete, Ed. Earl L. Green, 2 ed., 1966.

Katchburian E., Arana V., **Histologia e Embriologia Oral**, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1 Ed., 1999.

Pedreira, M.L.G., **Uso de Bombas de Infusão na Terapia Intravenosa em Crianças Internadas em Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos: Contribuições para estudos clínicos e técnicos, Tese de douramento**, UNIFESP-EPM, São Paulo, 1999.

Poirier J., Ribadeau Dumas J.L., **Manual de Histologia**, Roca, 2 ed., 1983.

Robbins, Stanley L, **Patologia Estrutural e Funcional**, 3 ed. Ed .Discos CBS, Rio de Janeiro, 1986.

Shepherd J.T., **Physiology of the circulation in human limbs in health and disease**, W.B.Saunders Company, 1 ed., Philadelphia and London, 1963.

Silva JR, M.R., **Fisiologia da Circulação em Fisiologia básica**, Ed. Guanabara Koogan S. A. , 1 ed. Rio de Janeiro, 1988.

Tramontina, V.A . , Machado, M.A.N., Nogueira Filho, G. R., Kim, S.H. , Vizzioli, M.R., Toledo S., Effect of Bismuth Subgallate (Local Hemostatic Agent) on wound healing in rats. Histological and Histometric Findings, **Braz Dent J**, 13(1):11-16, 2002.



M22649



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Diretoria de Ensino & Informação Científica e Tecnológica
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3816 - 9148
SÃO PAULO - São Paulo - Brasil
[http: //www.ipen.br](http://www.ipen.br)

O Ipen é uma autarquia vinculada à Secretaria de Ciência, Tecnologia e Desenvolvimento Econômico do Estado de São Paulo, gerida técnica, administrativa e financeiramente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência e Tecnologia, e associada à Universidade de São Paulo.