

**Otacílio Luiz Chagas Júnior**

**A INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO AGUDO APÓS IRRADIAÇÃO  
LASER DE BAIXA POTÊNCIA (InGaAIP – 685 nm)**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de DOUTOR em ODONTOLOGIA, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador:

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli

Consultores:

Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

Porto Alegre  
2007

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C433i Chagas Júnior, Otacílio Luiz  
A intensidade do infiltrado inflamatório agudo após  
irradiação laser de baixa potência: InGaAIP - 685 nm /  
Otacílio Luiz Chagas Júnior. – Porto Alegre, 2007.  
80 f. : il.

Tese (Doutorado) – Fac. de Odontologia, PUCRS, 2007.  
Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli.

1. Laser (Odontologia). 2. Irradiação a Laser de Baixa  
Potência. 3. Inflamação. 4. Granulócitos. I. Título.  
II. Pagnoncelli, Rogério Miranda.

CDD 617.52

Bibliotecária Responsável  
Iara Breda de Azeredo  
CRB 10/1379

FOLHA DE APROVAÇÃO

**Otacílio Luiz Chagas Júnior**

**A INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO AGUDO APÓS IRRADIAÇÃO  
LASER DE BAIXA POTÊNCIA (InGaAIP – 685 nm)**

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de DOUTOR em ODONTOLOGIA, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em:

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2007

Banca Examinadora

---

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli - FO/PUCRS

---

Prof. Dr. Aurelício Novaes Silva Júnior - ULBRA

---

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado - IPB/PUCRS

---

Profa. Dra. Maria Martha Campos - FO/PUCRS

---

Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva - FAMED/PUCRS



**À minha família: Marianne, minha esposa, Sr. Otacílio e Sra. Vera Márcia, meus pais, e meus irmãos, Patrícia, Otávio e Olavo.  
Por todo amor, carinho, compreensão, apoio e força!**

Obrigado!

---

*AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli**, meu prezado orientador, não só de pós-graduação, mas da vida profissional e pessoal; amigo com quem pude contar nestes 5 anos. Levarei seus ensinamentos comigo, principalmente a ética, a paciência e a compreensão holística da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, através da **Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa** e do **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pela oportunidade, e pela confiança em mim depositada quando representante discente da Área de Concentração em CTBMF.

Aos queridos **Mestres** das Faculdades de Odontologia e de Medicina da PUCRS que participaram da minha formação técnico-científica como Cirurgião Buco-Maxilo-Facial.

Ao **Prof. Dr. Leão Pereira Pinto**, por mostrar-me o amor à Pesquisa e por sua amizade e apoio incondicionais.

Ao Prof. Dr. **Vinícius Duval**, pela disponibilidade de sempre. Nesta caminhada pelo saber, seus conselhos foram determinantes.

À **CAPES**, pelo financiamento da minha Pós-Graduação.

À minha família em Porto Alegre: **Sr. Araújo, Dona Marli, Ricardo e Jô, Matheus e Shay**; obrigado por tudo.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.



À **Família Mattis: tio Harlei, tia Rose, Leo, Fred e Pri**; obrigado pela amizade, atenção, carinho e apoio em todos os momentos, pela acolhida calorosa ao Rio Grande do Sul.

Aos meus amigos e colegas de Doutorado em CTBMF: **Ana Cláudia Lustosa, Aírton Chaves Jr., Bruna Fronza, Henrique Ramos de Oliveira e Taís Novaes Silva**, com quem compartilho esta vitória; e aos demais amigos e colegas de pós-graduação em Odontologia que aqui estiveram de 2003 a 2007, especialmente a: **José Luiz Pretto e Dubines Ramírez**.

À minha amiga conterrânea, colega de Pós-Graduação, **Dra. Dúcia Caldas Cosme da Trindade**, pela paciência em fazer a leitura da minha tese colaborando para o seu término com importantes considerações.

Aos professores **Dra. Daniela Nascimento Silva e Dr. Rogério Belle de Oliveira** pela grande contribuição na construção desta tese.



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a intensidade do infiltrado inflamatório agudo presente em tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos submetidos à irradiação laser de baixa potência (InGaAlP,  $\lambda$  685 nm) após uma única aplicação. Foram utilizados dezoito ratos machos, linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 gramas, nos quais foram realizadas feridas cirúrgicas padronizadas. Os animais foram separados aleatoriamente em seis grupos, três experimentais e três controles, compostos por quatro e dois ratos, cada grupo, respectivamente. Os grupos experimentais foram irradiados em quatro pontos perilesionais equidistantes, com uma única dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup> por ponto, com potência de 35 mW, frequência de 35 pulsos por segundo e tempo de aplicação por ponto de 17 s. Os grupos controles não foram irradiados. Os animais foram mortos 6, 12 e 24 horas após a irradiação, sendo obtidas peças operatórias que seguiram para processamento laboratorial de rotina, confeccionadas lâminas e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina. O estudo das lâminas foi realizado através da descrição e contagem absoluta dos granulócitos pelo método esteriológico. Os resultados obtidos demonstraram que há uma diminuição no número total de granulócitos, nos grupos experimentais, não significante estatisticamente ( $p > 0,05$ ), quando comparados aos grupos controles. Os resultados obtidos sugeriram que a luz laser é capaz de diminuir a intensidade do infiltrado inflamatório agudo nas primeiras 24 horas após uma única irradiação, no tecido conjuntivo perilesional.

Palavras-Chaves<sup>1</sup>: Irradiação a Laser de Baixa Potência. Inflamação. Granulócitos.

---

<sup>1</sup> Bireme - Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em <http://decs.bvs.br> .



## ABSTRACT

The aim of this work was study the intensity of acute inflammatory infiltrate in connective tissue after low level laser therapy (InGaAlP,  $\lambda = 685$  nm) irradiation. Eighteen male Wistar rats (250 to 300 grams) with standardized surgical wounds were randomly distributed into 6 groups - 3 study groups with 4 rats each, and 3 control groups with 2 rats each. In the study groups, four equidistant spots around the standardized wound were irradiated ( $0.5 \text{ J/cm}^2$ , 35 mW, 35 Hz, 17 seconds). The control groups were not irradiated. The animals were killed at 6, 12 and 24 hours after laser therapy. Biological specimens were harvested and routinely processed; slides were prepared and stained with hematoxiline and eosine. The total number of granulocytes was counted using the stereological method. A non-statistically significant decrease in the total number granulocytes was observed in the all study groups. Our results suggested that one single irradiation with laser light reduced the total number of graunulocytes in the animal model used in this study.

Key words<sup>2</sup>: Laser Therapy, Low level. Inflammation. Granulocytes.

---

<sup>2</sup> MeSH: Medical Subject Headings; disponível em: [www.nlm.nih.gov/mesh](http://www.nlm.nih.gov/mesh)



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Equipamento Laser Theralase®, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos/SP .....	51
<b>Figura 2</b> - Procedimentos para confecção de ferida cirúrgica – Tricotomia <b>(A)</b> ; Marcação com o punch <b>(B)</b> ; Incisão <b>(C)</b> e Ferida cirúrgica <b>(D)</b> .....	53
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático, modificado de Smith et al. (2000), mostrando os pontos de irradiação laser .....	54
<b>Figura 4</b> - Desenho esquemático, modificado de Smith et al. (2000), mostrando a elipse perilesional no dorso do rato .....	55
<b>Figura 5</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos no tecido conjuntivo no grupo Controle 6 h, aumento de 400x .....	59
<b>Figura 6</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos e edema no tecido conjuntivo (setas) no grupo Experimental 6 h, aumento de 400x .....	60
<b>Figura 7</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Controle 12 h, aumento de 400x .....	61
<b>Figura 8</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Experimental 12 h, aumento de 400x .....	61
<b>Figura 9</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Controle 24 h, aumento de 400x .....	62
<b>Figura 10</b> - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Experimental 24 h, aumento de 400x .....	63
<b>Figura 11</b> - Média e Erro Padrão dos grupos .....	64





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Distribuição dos animais nos grupos .....	50
<b>Tabela 2</b> - Quantidade de granulócitos encontrados em cada grupo .....	63
<b>Tabela 3</b> - Sumário dos dados estatísticos .....	64
<b>Tabela 4</b> - Comparação das diferenças das médias entre os grupos .....	64

*LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATPase	Adenosina trifosfatase
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cm <sup>2</sup>	Centímetro(s) quadrado(s)
cm <sup>3</sup>	Centímetro(s) cúbico(s)
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DE	Densidade de energia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECF	Fator quimiotático para eosinófilos
Fig.	Figura
g	Gramas(s)
h.	Hora(s)
HE	Hematoxilina e Eosina
HILT	High-Intensity Laser Therapy
IgE	Imunoglobulina E
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 Beta
LILT	Low-Intensity Laser Therapy
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
M	Molar
ml	Mililitro(s)
mW	Miliwatt(s)
NCF	Fator quimiotático para neutrófilos
mm	Milímetro(s)
nm	Nanômetro(s)
n°	Número
pH	Potencial hidrogeniônico

PAF	Fator de ativação plaquetário
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PMN	Polimorfonucleares
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
QTC-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SLAT	Selective Laser Treatment
SRS-A	Substância de reação lenta de anafilaxia
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TXA <sub>2</sub>	Tramboxano A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Tramboxano B <sub>2</sub>
USA	United States of America
$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
®	Marca registrada
W/cm <sup>2</sup>	Watt(s) por centímetro quadrado
ms	Milisegundo(s)
Hz	Hertz
mW/cm <sup>2</sup>	Miliwatt(s) por centímetro quadrado
J/cm <sup>2</sup>	Joule(s) por centímetro quadrado
J/m <sup>-2</sup>	Joule(s) metro quadrado
Ca <sup>+2</sup>	Cátodo de cálcio
Exp.	Experimental
Contr.	Controle
vs	Versus



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	24
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	27
2.1	INFLAMAÇÃO .....	27
<b>2.1.1</b>	<b>Inflamação Aguda</b> .....	29
<b>2.1.2</b>	<b>Infiltrado inflamatório agudo</b> .....	31
2.2	LASER DE BAIXA POTÊNCIA .....	33
<b>2.2.1</b>	<b>Laser de Baixa Potência: Biomodulação Tecidual</b> .....	35
2.3	LASER DE BAIXA POTÊNCIA E INFLAMAÇÃO AGUDA .....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	48
4.2	DELINEAMENTO DA PESQUISA .....	48
<b>4.2.1</b>	<b>Paradigma e Delineamento</b> .....	48
4.3	PROBLEMA .....	49
4.4	HIPÓTESE .....	49
4.5	AMOSTRA .....	49
<b>4.5.1</b>	<b>Modelo Animal e Organização dos Grupos</b> .....	50
4.6	LASER DE BAIXA POTÊNCIA .....	50
4.7	INSTRUMENTAL CIRÚRGICO E MATERIAL DE CONSUMO .....	51
4.8	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	52
4.9	IRRADIAÇÃO LASER .....	54
4.10	MORTE DOS ANIMAIS .....	55
4.11	INSTRUMENTO E COLETA DOS DADOS .....	56
<b>4.11.1</b>	<b>Obtenção dos Cortes Histológicos</b> .....	56
<b>4.11.2</b>	<b>Análise dos Cortes Histológicos</b> .....	56
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS COLETADOS .....	57
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	59
5.1	ANÁLISE DESCRITIVA .....	59
<b>5.1.1</b>	<b>Grupos 6 horas</b> .....	59
<b>5.1.2</b>	<b>Grupos 12 horas</b> .....	60

<b>5.1.3</b>	<b>Grupos 24 horas</b> .....	62
<b>5.2</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE</b>	
	<b>ÉTICA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS</b> .....	80





## 1 INTRODUÇÃO

---

A Cirurgia Buco-Maxilo-Facial lida diretamente com processos inflamatórios, agudos ou crônicos, de origem infecciosa e traumática, ou originados pelas próprias intervenções cirúrgicas. Dor e edema são as maiores queixas dos pacientes, e estas ocorrem devido aos fenômenos fisiológicos da inflamação, principalmente durante a fase aguda.

A inflamação é uma resposta fisiológica normal que tem função de combater o agente agressor responsável pelo mecanismo de lesão tecidual e/ou celular, podendo este ser de origem física, química e biológica. (CATANZARO, 1991; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; PEREIRA; BURINI, 1991; PEREIRA-PINTO et al., 1997).

Pode-se controlar a resposta inflamatória de forma farmacológica, através de antiinflamatórios, ou com a utilização de medidas não-farmacológicas como acupuntura, fisioterapia ultrassônica, laser de baixa potência, etc. Dentre as intervenções não-farmacológicas para resolução de processos inflamatórios, o laser de baixa de potência surgiu como uma alternativa promissora. (LOPES-MARTINS et al., 2005).

O laser de baixa potência é uma técnica desenvolvida e aplicada à Odontologia, utilizada há décadas em algumas partes do mundo por médicos, dentistas, fisioterapeutas e veterinários. Esta tecnologia pode oferecer muitos benefícios terapêuticos aos pacientes, como a aceleração da cicatrização e alívio da dor. Há muito a ser aprendido sobre os mecanismos, reconhecimento da janela terapêutica, e como usar apropriadamente este fenômeno celular para o alcance dos objetivos do tratamento. (SUN; TUNÉR, 2004).

A palavra laser é um acrônimo para Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (luz amplificada pela emissão de radiação estimulada), sendo

instrumento capaz de levar energia aos tecidos com grande precisão. Os princípios que guiaram o seu desenvolvimento foram postulados em 1917 por Einstein. O primeiro relato *in vivo* do uso da radiação laser em Odontologia foi feito por Goldman em 1965, que utilizou um laser de rubi para irradiar um dente vital. (PINHEIRO; FRAME, 1992).

A irradiação laser como uma modalidade fototerapêutica para indução ou aceleração do processo de reparo foi introduzida por Mester e colaboradores na década de 70 do século XX, mas ainda hoje não é uma terapia estabelecida. (SCHINDL et al., 2000).

Os estudos sobre laser de baixa potência e inflamação são poucos e muito recentes, principalmente quando se trata das células envolvidas na inflamação aguda. Existem estudos que aplicam esta terapia em situações clínicas da Odontologia, como Antunes et al. (2007), que usaram o laser de baixa potência (InGaAIP, 660 nm) na prevenção de mucosite oral em pacientes transplantados. Porém, é importante conhecer os fenômenos biológicos envolvidos no mecanismo de ação da laserterapia para se indicar precisamente o seu uso.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a intensidade do infiltrado inflamatório agudo presente no dorso de ratos submetidos à irradiação laser de baixa potência (InGaAIP, 685 nm).



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 INFLAMAÇÃO

Uma ferida é uma quebra na integridade epitelial da pele e pode ser acompanhada pela ruptura da estrutura e da função das subcamadas do tecido normal. Pode resultar de uma incisão precisa pelo bisturi ou pelo dano comum ao tecido (trauma – contusão, hematoma, laceração ou abrasão, e queimaduras). A continuidade da pele deve ser restaurada porque ela exerce um papel crucial na manutenção da homeostasia. (LEAPER; HARDING, 1998).

Vários estímulos exógenos ou endógenos podem causar lesão celular, e os mesmos também provocam uma reação complexa, no tecido conjuntivo vascularizado, incluindo o plasma, células circulantes, vasos sanguíneos, e constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo, chamada de inflamação. (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A inflamação é basicamente uma seqüência de reações ordenadas, que se iniciam com uma atividade aguda, evoluindo para um processo crônico, alcançando a resolução através da reparação tecidual. A inflamação seria a resposta orgânica mais elementar dos seres vivos que têm sistema vascular, além de ser essencial à continuidade da vida. A mesma pode ser caracterizada como um processo dinâmico, que conduz à cura após a eliminação do agente flogístico. O resultado na rede vascular, em resposta às agressões, provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade e possibilita transmigração celular. (CATANZARO, 1991; SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 1996).

Inflamação ou flogose é classicamente definida como uma reação de defesa do organismo, inespecífica, a princípio local, frente a agentes agressores de natureza física, química ou biológica, e é considerada, fundamentalmente, uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das conseqüências

desta. O processo inflamatório pode ser dividido em duas fases: aguda e crônica. A primeira é relativamente curta, durando minutos, horas ou alguns dias, e tem como característica, exsudação de líquido e proteínas plasmáticas, causando edema, e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos. A segunda é mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. Basicamente, seja a inflamação aguda ou crônica, envolve a microcirculação, o sangue e o tecido conjuntivo. (CATANZARO, 1991; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; PEREIRA-PINTO et al., 1997; SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 1996).

As células inflamatórias aparecem no local da lesão cerca de seis horas após o desencadeamento inicial dessa, com as margens da ferida contendo fagócitos, sendo que nas próximas 24 horas com predomínio de polimorfonucleares. (PEREIRA; BURINI, 1991).

A inflamação pode ser dividida em fase inicial e tardia dependendo do tempo e duração da resposta e do tipo de célula inflamatória envolvida. A fase inflamatória inicial dura de 1 a 2 dias e inicia-se com a ativação do sistema imunológico pelas vias clássica e alternativa da cascata do sistema complemento. Isso leva à infiltração da ferida pelos neutrófilos granulócitos (leucócitos polimorfonucleares) que são atraídos para o local da ferida dentro de 24 a 48 horas após a lesão por inúmeros quimiotáticos como:

- Fragmentos protéicos da matriz extracelular;
- Fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ );
- Componentes do sistema complemento (C3a e C5a);
- Peptídeos formil-metionina, produtos bacterianos.

Dentro de um curto tempo, os leucócitos polimorfonucleares aderem-se às células endoteliais na periferia dos vasos sanguíneos (marginação) e começam a moverem-se ativamente através da parede vascular (diapedese). Uma vez no sítio inflamatório, eles fagocitam a bactéria e outras partículas estranhas ao organismo, liberando enzimas degradantes e radicais livres derivados de oxigênio. A principal

função do leucócito polimorfonuclear é minimizar a contaminação bacteriana da ferida, assim prevenindo a infecção, e participar do processo cicatricial nas próximas fases. (LEAPER; HARDING, 1998).

Muito do conhecimento sobre inflamação é baseado em estudos realizados na pele, músculo e cavidade pleural. Há muitas evidências de que existem diferenças importantes, nos diferentes órgãos, em relação aos fenômenos vasculares. Aplicar os resultados de estudos sobre inflamação na pele para a inflamação dos outros órgãos é questionável e pode não ser adequado. É razoável assumir que os mediadores com um importante papel na pele também devem ter importância em outros órgãos. (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

### **2.1.1 Inflamação Aguda**

A resposta inflamatória aguda está estreitamente interligada ao processo de reparo, servindo para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo, movimentando uma série de eventos responsáveis pela cicatrização e reconstituição do tecido danificado. (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Ela pode ocorrer sem o envolvimento evidente do sistema imune. Sua duração e a intensidade devem ser cuidadosamente reguladas para controlar o dano tissular e facilitar os mecanismos de reparo deste tecido necessários para a cicatrização. (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

Inflamação aguda refere-se à resposta que começa de maneira abrupta e em pouco tempo. Assim uma inflamação aguda está associada à uma agressão súbita. Aguda também se refere a um tipo específico de resposta, envolvendo reação exsudativa durante a qual fluido, proteínas do soro e leucócitos deixam a corrente sangüínea e dirigem-se para o local da agressão. (TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

Macroscopicamente, a inflamação é manifestada pelo rubor, calor, edema, e dor, os quais são o resultado da vasodilatação capilar e aumento da permeabilidade. Essas mudanças vasculares “abrem os portões” entre os vasos sanguíneos e a ferida e facilitam o extravasamento de proteínas séricas dentro da lesão. Em nível celular, essas mudanças fisiológicas são complexas e um processo altamente regulado envolve o sistema nervoso, citocinas, quimiocinas, e fatores de crescimento. A vasodilatação capilar e o aumento da permeabilidade são estimulados por vários fatores, e, em muitos casos, ambos os fenômenos são influenciados pelo mesmo fator. O papel do sistema nervoso é demonstrado na inflamação pela vasodilatação e o aumento da permeabilidade que seguem a estimulação antidrômica dos nervos sensitivos. Os mastócitos produzem um número de mediadores vasoativos, como a histamina e os leucotrienos C4 e D4, os quais estimulam a vasodilatação. A histamina também estimula indiretamente a vasodilatação pelo aumento da produção das prostaglandinas. As cininas, pela produção da cascata da coagulação, também aumentam a permeabilidade capilar. A trombina não só participa da hemostasia pela ativação plaquetária como também contribui no processo inflamatório pela estimulação do aumento da permeabilidade. Os fatores C3a e C5a do sistema complemento também têm um duplo papel pela estimulação vasodilatadora e na quimiotaxia para células inflamatórias circulantes que entram no local da lesão através da diapedese e perpetuam o processo inflamatório. As células polimorfonucleares (PMNs) são as primeiras células inflamatórias a chegarem no local da ferida cutânea. Muitos fatores de crescimento e citocinas, como o PDGF, interleucina IL-8, entre outros, atraem os polimorfonucleares para ferida. A presença dos PMNs em feridas não infectadas é relativamente curta, com um pico populacional entre 24 e 48 horas. Os PMNs podem produzir muitas citocinas proinflamatórias, como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e fator de necrose tumoral (TNF). (BAUM; ARPEY, 2005).

Seqüência dos eventos da resposta inflamatória, segundo Gartner e Hiatt (2003):

- a) A histamina causa vasodilatação e aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos na vizinhança.

- b) Componentes do complemento extravasam dos vasos sanguíneos e são cindidos por proteases neutras formando agentes inflamatórios adicionais.
- c) O fator quimiotático para eosinófilos atrai eosinófilos para o local da inflamação. Estas células fagocitam complexos antígeno-anticorpo, destroem quaisquer parasitos presentes e limitam a resposta inflamatória.
- d) O fator quimiotático para neutrófilos atrai neutrófilos para o local da inflamação. Estas células fagocitam e matam microorganismos, quando presentes.
- e) Os leucotrienos  $C_4$ ,  $D_4$  e  $E_4$  aumentam a permeabilidade vascular. Eles são vários milhares de vezes mais potentes que a histamina, em seus efeitos vasoativos.
- f) O fator ativador de plaquetas aumenta a permeabilidade vascular.
- g) O tromboxano  $A_2$  é um poderoso mediador agregador de plaquetas e também causa vasoconstrição. Ele é rapidamente transformado em tromboxano  $V_2$ , sua forma inativa.
- h) A bradicinina é um poderoso dilatador vascular, que causa aumento da permeabilidade vascular. Ela também é responsável pela sensação de dor.

### **2.1.2 Infiltrado inflamatório agudo**

A resposta inflamatória a agentes nocivos tem estágios diferentes. Cada estágio é distinguido pela composição característica das células constituintes do infiltrado inflamatório. A maioria dos danos resulta em tecido lesivo levando à ativação do Sistema Complemento pela via alternativa. Os eventos que aumentam a liberação



de diferentes proteases teciduais, os diferentes tipos de polissacarídeos ou processos que promovam a coagulação sangüínea com geração de trombina e plasmina, resultam na ativação do fator C3 complemento e sua clivagem em C3a e C3b. O último ativa C5 que é dividido em C5a e C5b. O fator C5a tem mostrado ser um potente liberador de grânulos contidos nos mastócitos. (PARWARESCH et al., 1985).

A degranulação dos mastócitos, desta maneira, segue imediatamente o tecido lesivo não-específico e a ativação do Sistema Complemento em outros eventos inflamatórios iniciais. A histamina liberada pelos mastócitos tem um papel decisivo na hiperemia regularmente associada aos estágios iniciais da inflamação. Este mecanismo ativo resulta em edema inflamatório. Enquanto essa fase da inflamação é principalmente governada pelos transmissores não-celulares, durante o próximo estágio, neutrófilos e monócitos atraídos posteriormente pelos leucotrienos mastocitários, como fator quimiotático para neutrófilos (NCF), aparecem na área da inflamação. (PARWARESCH et al., 1985; ZHONG; ZHEN, 1991).

O infiltrado inflamatório agudo é a população celular mais envolvida na fase inicial da inflamação, sendo constituído por células leucocitárias oriundas do sangue: neutrófilos, eosinófilos e basófilos, ditos granulócitos, por conterem grânulos evidentes em seu citoplasma, ou ainda, polimorfonucleares, devido à forma de seus núcleos. A intensidade do infiltrado inflamatório pode ser determinada pela quantidade de granulócitos existente. (PEREIRA-PINTO et al., 1997).

Os granulócitos deixam a corrente sangüínea, entram nos tecidos, e fagocitam e degradam as bactérias, imunocomplexos e tecido necrótico através das etapas: marginação, adesão, migração, quimiotaxia, opsonização, fagocitose, degranulação, degradação ou morte. Na inflamação aguda, os neutrófilos são os primeiros que saem dos vasos em um número significativo. A infiltração do neutrófilo no tecido atinge o pico nas primeiras 6 horas de uma resposta inflamatória. (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002; TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

Os neutrófilos atuam contra microorganismos, constituindo-se na maioria das vezes, na primeira linha de defesa celular contra a invasão bacteriana no organismo.

O eosinófilo tem como funções fagocitar e destruir determinados complexos antígeno-anticorpo e limitar e circunscrever o processo inflamatório. Estes também fagocitam bactérias, porém mais lentamente que os neutrófilos. Os basófilos, assim como os mastócitos, são degranulados pela formação do complexo antígeno-anticorpo em sua superfície, o que sugere seu envolvimento nas reações alérgicas. (SIQUEIRA JÚNIOR; DANTAS, 1996; TROWBRIDGE; EMLING, 1996).

A resposta celular da fase inflamatória é caracterizada pelo influxo de leucócitos na área da lesão. No estágio inflamatório inicial, neutrófilos e monócitos são as células predominantes. Logo após a lesão, neutrófilos e monócitos começam a migrar dos capilares para o local agredido, sendo os PMNs os primeiros a chegar e em grande número. Os PMNs são recrutados pelos fatores quimiotáticos liberados durante a hemostasia e pelos mastócitos. Os fatores quimiotáticos gerados durante o processo de coagulação, como a calicreína, fibrinopeptídeos liberados do fibrinogênio, e produtos da degradação da fibrina, também servem para regular a expressão de importantes moléculas de adesão intracelular. As substâncias liberadas pelos mastócitos, como fator de necrose tumoral, histamina, proteases, leucotrienos, e citocinas, representam fontes adicionais de sinais quimiotáticos para o recrutamento de leucócitos. Os fatores de crescimento PDGF e TGF- $\beta$  também são potentes fatores quimiotáticos para leucócitos. Uma vez no local da ferida, receptores de integrina encontrados na superfície celular dos neutrófilos aumentam a interação da matriz extracelular. Isso permite aos PMNs realizarem suas funções de matadores e fagócitos de bactérias e proteínas da matriz danificadas no leito da ferida. (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

## 2.2 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Uma das mais significantes descobertas da ciência no século passado foi o laser. Ele envolve novas e incalculáveis perspectivas no campo das pesquisas biológicas e aplicações nos mais diversos campos da saúde. A laserterapia tornou-

se uma realidade em muitos países. Seu emprego, por profissionais da área odontológica e médica, tem crescido constantemente. (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Os lasers são classificados de acordo com muitos critérios. A mais ampla classificação é aquela que divide os lasers em dois grandes grupos, de acordo com a sua ação terapêutica em lasers cirúrgicos e os lasers clínicos. Os lasers podem ser também classificados de acordo com seu funcionamento, em contínuo ou pulsátil, e ainda com a natureza do seu meio ativo em sólidos, gasosos, ou semicondutores. Como exemplo de meio ativo sólido cita-se o laser rubi; de meio gasoso, o CO<sub>2</sub> e o He-Ne; meio líquido (laser com corante ou *dye laser*), o rodamina e o cumarina; semi-sólidos, o YAG e os de neodímio. Os lasers semicondutores são os de arseneto de gálio (AsGa), arseneto de gálio-alumínio (AsGaAl) e fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP). Os lasers mais comuns são variações do gálio: arseneto de gálio-alumínio ou alumínio-arsênio (AsGaAl), que emite um espectro na faixa do infravermelho, ou o fosfeto arseneto de gálio-índio (InGaAsP), que emite espectro visível de luz vermelha ( $\lambda=600-680$  nm) com potência entre 10 e 50 mW. (GENOVESE, 2000; WALSH, 1997).

Também é utilizada a seguinte classificação: os lasers cirúrgicos ou HILT (High-Intensity Laser Therapy), os lasers não-cirúrgicos, terapêuticos, LILT (Low-Intensity Laser Therapy), ou ainda, laser de baixa potência, em inglês LLLT (Low-Level Laser Therapy), e os SLAT (Selective Laser Treatment). (PINHEIRO; FRAME, 1992).

Os parâmetros fundamentais do protocolo de irradiação laser essencial para comparação dos dados são os seguintes: comprimento de onda, frequência, potência de saída, diâmetro do spot, tempo de irradiação, intensidade, dose, e intervalos de tratamento. O tamanho do spot e o tempo de exposição são de importância significativa porque eles determinam a intensidade e a dose e, portanto, as respostas celulares para a incidência da luz. Atermicidade e reações fotoquímicas são a base do laser de baixa potência, ocorrendo com densidades de potência entre

$10^{-2}$  e  $10^0$  W/cm<sup>2</sup> e densidades de energia entre  $10^{-2}$  e  $10^2$  J/cm<sup>2</sup>. (SCHINDL et al., 2000).

O comprimento de onda depende do meio ativo que também determina a afinidade ou não do laser com o tecido-alvo (BRUGNERA JÚNIOR et al., 2003). A escolha do comprimento de onda determina a profundidade de penetração do laser nos diferentes tecidos (KNAPPE; FRANK; ROHDE, 2004).

### **2.2.1 Laser de Baixa Potência: Biomodulação Tecidual**

As funções terapêuticas no campo da biomodulação do processo inflamatório são geralmente desenvolvidas no espectro vermelho e infravermelho da luz, de  $\lambda$  600 nm a  $\lambda$  900 nm, aproximadamente. (TUNÉR; CHRISTENSEN, 2003).

A atuação do laser de baixa potência ocorre no campo da biomodulação, descrita também como bioestimulação. Muitas vezes encontram-se as duas terminologias na literatura desenvolvidas como sinônimos. Biomodulação seria a nomenclatura mais apropriada, visto que, esta terapia poderia tanto estimular o processo biológico, atrasar o processo de reparação, como suprimi-lo, intencionalmente ou não, trabalhando na dependência do fenômeno biológico desejado. (BASFOR, 1995; BELKIN, SCHWARTZ, 1989; SCHINDL et al., 2000; TUNÉR; CHRISTENSEN, 2003).

À biomodulação atribui-se o aumento do alcance dos efeitos biológicos, desde o crescimento epitelial e fibroblástico, estimulação da síntese de colágeno, aumento da capacidade de fagocitose e de liberação de endorfina. (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

Densidades de energia diminutas poderiam não provocar efeitos observáveis, enquanto que altas doses eventualmente acarretariam na diminuição das funções

celulares. Foi estabelecido, em relação ao uso “*in vivo*” do laser, que potências menores que 4 mW não proporcionariam, nos tecidos, efeitos biológicos, independentemente do tempo total de irradiação. Em relação à quantidade de energia, observou-se que, para a promoção de efeitos biológicos, deveriam ser privilegiadas doses de no mínimo  $1 \cdot 10^4 \text{ J/m}^2$  e no máximo  $4 \cdot 10^4 \text{ J/m}^2$ , pois dosimetrias mais elevadas poderiam acarretar na inibição da resposta celular. (SOMMER et al., 2001).

A terapia com laser de baixa potência envolve a irradiação de 1 a 4  $\text{J/cm}^2$  no local de tratamento, com potência estabelecida entre 10 mW a 90 mW. Felizmente, a irradiação laser e a óptica tecidual foram estudadas extensivamente. As características da irradiação laser – coerência, colimação, e monocromaticidade – foram examinadas em detalhes. Em particular, a coerência e colimação não foram cruciais já que elas foram rapidamente degradadas pelo espalhamento como um raio passa através do tecido. Apoiando sua relativa falta de importância está o fato que tanto os diodos laser quanto a luz não-coerente podem alterar os processos biológicos. Monocromaticidade, contudo, pareceu ser uma característica importante. Estudos laboratoriais suportaram o conceito que a irradiação laser pode modificar os processos celulares na dependência do comprimento de onda, de comportamento não-térmico. Outra hipótese é que a intensidade suficiente para produzir esses efeitos nas células poderia ser distribuída para as uniões superficiais e tecidos tipicamente tratados com laserterapia. (BASFOR, 1995).

Os mecanismos básicos da interação tecido – irradiação do laser de baixa potência, ainda não estão esclarecidos. Os mecanismos de ação da irradiação ultravioleta foram investigados intensivamente, e serviram de parâmetro para várias hipóteses bem estabelecidas na indução de efeitos fotobiológicos nas células pela luz visível e luz infravermelha de baixa intensidade. Basicamente, dois tipos de reações podem ser distinguidos em fotobiologia: primárias (induzidas pela luz) e secundárias (não-esclarecidas). Pelo menos quatro diferentes explicações têm sido propostas para responder a questão de como a irradiação do laser não-cirúrgico pode interagir com células vivas. A teoria de Olson afirma que a absorção primária da luz pelas enzimas mitocondriais resultam no aquecimento local ocasionado pelo

aumento da vibração molecular; a teoria de Karu explica que a luz laser induz efeitos estimulantes e inibitórios, respectivamente, sendo o resultado da absorção laser pelas flavinas e citocromos na cadeia respiratória mitocondrial, principalmente para alterações de transferência de elétrons na oxi-redução aí existente; a teoria de Lubart relata que a existência de oxigênio simples fotoinduzido pelas porfirinas endógenas é outro caminho provável; a teoria de Smith, uma modificação da teoria de Karu, mostra que próximo à radiação infravermelha em um caminho adicional poderia ativar diretamente os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana celular pelas modificações fotofísicas, desta maneira induzindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e a proliferação celular. Provavelmente, dois ou mais destes caminhos podem ser influenciados simultaneamente pela irradiação laser e contribuir para as respostas biológicas observadas. A alteração do pH intracelular, que é relatado para a ativação das ATPases e seguido pelas mudanças nos níveis de cálcio intracelular, é o caminho comum para o sinal de transdução e amplificação de todas as reações primárias. Uma mudança no estado de oxi-redução em direção a oxidação leva ao aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e à estimulação do metabolismo celular, uma vez que a redução leva ao esgotamento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e, assim, a inibição do metabolismo. Altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular são necessários para estimular vários processos biológicos como a síntese de DNA e RNA, mitose celular, e secreção proteica. Ainda, altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  podem levar a inibição do metabolismo celular. (SCHINDL et al., 2000).

A estimulação mitocondrial foi proposta por Karu (1989). Fotorreceptores podem fazer parte da cadeia respiratória mas a fotosensibilidade não é específica para a luz laser. É possível que a luz monocromática possa modificar a proliferação celular. A concentração de cAMP muda nas células após elas serem irradiadas em 638,8 e 760 nm. A autora propôs que a luz do laser de baixa potência, visível, pode estimular as células para aumentarem sua proliferação. A fotorecepção, ocorrendo em nível mitocondrial, pode intensificar o metabolismo respiratório e as propriedades eletrofisiológicas da membrana, desta maneira, mudando a fisiologia celular. Afirmou ainda que a biomodulação laser é um fenômeno fotobiológico e que não é necessária a coerência da luz. Os fotoceptores primários são componentes da cadeia respiratória. Isto explica a universalidade dos efeitos do laser de baixa potência. Os componentes da cadeia respiratória podem ser os

fotoceptores no caso da estimulação do metabolismo celular, bem como inibidores dependendo da dose de energia. Em baixas doses, a irradiação causa regulação da oxi-redução do metabolismo celular; em altas doses o dano é prevalente. O quantum de luz é somente um gatilho para a regulação do metabolismo celular. Isto explica as baixas doses e intensidades necessárias. A magnitude do efeito de bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Isto explica por que o efeito de bioestimulação não é sempre possível. Os efeitos terapêuticos do laser de baixa potência podem ser explicados pelo aumento da proliferação do  $G_0$  e  $G_1$  celular ou pelas mudanças na atividade fisiológica das células ativadas.

Foram descritos alguns dos fenômenos que estão associados aos bioefeitos da laserterapia de baixa potência:

- a) Os efeitos requerem um limiar de exposição à irradiação. O limiar é específico para qualquer combinação tecidual com o comprimento de onda;
- b) Os efeitos apresentam estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas;
- c) Altas energias, dentro de limites específicos para cada combinação laser-tecido, ocasionam prejuízo;
- d) Os efeitos são dose-dependentes. Esta relação não é simples, mas é relatada para a maioria das irradiações e parâmetros teciduais;
- e) Foi visto que a irradiação coerente não é requerida para obter esses efeitos e uma pequena faixa de irradiação não-coerente apropriada é suficiente para produzir a maioria ou todos eles;
- f) A irradiação direta do tecido alvo não é sempre requerida. A irradiação transcutânea penetra profundamente para produzir efeitos suficientes em muitos casos;

g) A irradiação local pode ter efeitos sistêmicos.

Enfatizaram que embora o fenômeno associado ao laser de baixa potência, os seus bioefeitos estão longe de ser esclarecidos, apesar de existir. Por razões médicas, científicas e de segurança, e também para evitar charlatanismo, esses bioefeitos deveriam ser investigados por equipes multidisciplinares de físicos, biólogos e cirurgiões. (BELKIN; SCHWARTZ, 1989)

Rochkind et al. (1989) estudaram o efeito sistêmico do laser de baixa potência em ratos. Para tal fim utilizaram um laser de comprimento de onda de 632,8 nm com potência útil de 16 mW e diferentes densidades de energia por um período de 21 dias. Afirmaram que os efeitos sistêmicos encontrados são relevantes nos termos de aplicação de irradiação do laser de baixa potência, tanto na clínica quanto em pesquisas. Concluíram que a irradiação do laser de baixa potência exerce pronunciados efeitos sistêmicos na pele e nos tecidos subjacentes, e que esses efeitos persistem muito tempo depois de uma única aplicação.

Kolárová, Ditrichová e Wagner (1999) afirmaram que o conhecimento dos parâmetros ópticos da pele é importante para todas as espécies de fototerapia. Analisaram a penetração da luz laser e provaram diferentes propriedades ópticas de espécimes in vitro de pele normal e tecido granular de úlceras da pele de humanos. Os resultados demonstraram percentagem de incidência de luz penetrando as camadas individuais em diferentes localizações na superfície da pele, que é um fator decisivo para a seleção da dose de irradiação.

Melo et al. (2001) estudaram as propriedades ópticas de diferentes tecidos de ratos com respeito a variação da intensidade e distribuição espacial da luz. Testaram principalmente o comprimento de onda de 630 nm, mas também os de 514nm e 670nm. Os valores obtidos proveram bons dados sobre a distribuição de luz nos tecidos, quando irradiados com laser não difuso. Para todos os tecidos, foi observada uma distribuição esférica da luz e decomposição exponencial. Estes resultados são úteis para várias aplicações do laser para bioestimulação fototerapêutica.



Lucas et al. (2002) investigaram se a evidência dos estudos celulares e em animais com respeito ao processo cicatricial não foi equivocadamente a favor do laser de baixa potência, o que implicaria que esses modelos deveriam ser adequados para prever a resposta do tratamento em pacientes, ou que os dados dos experimentos celulares e animais foram inconclusivos, o que significaria que os estudos clínicos foram baseados em evidências insuficientes. Realizaram uma revisão sistemática sobre estudos celulares e animais que utilizaram o laser de baixa potência no processo cicatricial através de artigos que foram identificados pela busca no Medline, Embase, e SPIE (Sociedade Internacional de Engenharia Óptica). Avaliaram se os estudos mostraram efeito benéfico no tratamento ativo ou não. Trinta e seis estudos foram incluídos e continham 49 parâmetros de resultados dos quais 30 reportaram um efeito positivo da irradiação laser e 19 não. Onze estudos apresentaram dados exatos sobre o efeito do tratamento ativo e dos controles. O efeito do tamanho da amostra sobre 22 resultados avaliados destes estudos foi -1,05 (95% Intervalo de confiança: -1.67 to -0.43) a favor do laser de baixa potência. A qualidade metodológica dos estudos foi pobre. A análise profunda dos resultados mostrou que o tamanho da amostra não foi significativa em estudos com altos escores de qualidade metodológica [0.06 (95% Intervalo de confiança: -0.42 to 0.53)]. Resumindo, os dados dos estudos celulares e experimentais em animais revisados por esses autores falharam ao não mostrar evidência para substanciar a decisão de realizar estudos com laser de baixa potência em um grande número de pacientes. Concluíram que este tipo de fototerapia não deve ser considerada um tratamento adjuvante para o proposto.

### 2.3 LASER DE BAIXA POTÊNCIA E INFLAMAÇÃO AGUDA

Albertini et al. (2007) investigaram histologicamente os efeitos da irradiação do laser vermelho com dois diferentes comprimentos de onda (660 nm – modelo Laser Unit<sup>®</sup>, Kondortech, e 684 nm – modelo Theralase<sup>®</sup>, DMC) em edema de pata de rato induzido pela carragenina. Foram utilizados 32 ratos machos Wistar distribuídos aleatoriamente em 4 grupos. Um grupo recebeu injeção de solução

salina estéril, enquanto que a inflamação foi induzida pela injeção de carragenina subplantar (1 mg/pata) nos outros três grupos. Foram utilizados lasers vermelhos de aplicação contínua com comprimentos de onda 660 e 684 nm, respectivamente, com potência média de saída de 30 mW, e doses de irradiação de 7,5 J/cm<sup>2</sup>. Os grupos lasers 660 e 684 nm desenvolveram menor edema, estatisticamente significativa (p<0,01), quando comparados ao grupo controle 4 horas após a indução da inflamação. Similarmente, ambos os grupos apresentaram um número de células inflamatórias significativamente menor nos tecidos conjuntivo e muscular subplantares em relação ao grupo controle. Concluíram que ambos comprimentos de onda (660 e 684 nm) de laser vermelho de baixa potência foram efetivos na redução do edema e na migração de células inflamatórias quando a dose de 7,5 J/cm<sup>2</sup> foi utilizada.

Markovic e Todorovic (2007) compararam a efetividade do laser de baixa potência e dexametasona após extração de terceiros molares inferiores impactados sob anestesia local. Utilizaram 120 pacientes saudáveis divididos em 4 grupos com 30 indivíduos cada. O grupo 1 recebeu irradiação de laser de baixa potência (GaAlAs, 637 nm) imediatamente após a cirurgia (densidade de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> com aplicação contínua, potência de 50 mW, e comprimento de onda de 637 nm); o grupo 2 também foi irradiado e recebeu injeção intramuscular de 4 mg de dexametasona no músculo pterigóide medial; o grupo 3 recebeu irradiação laser de baixa potência complementada pela injeção de 4 mg de dexametasona no músculo deltóide, seguida pela injeção da mesma dose intraoralmente 6 horas após a cirurgia, e o grupo 4 (controle) recebeu somente as recomendações usuais pós-operatórias (bolsas de gelo, dieta macia, etc.). Os resultados demonstraram que a irradiação laser de baixa potência com o uso local de dexametasona (grupo 2) obteve uma redução do edema pós-operatório, estatisticamente significativa, quando comparado aos outros grupos. Não foram observados efeitos adversos tanto da irradiação laser quanto do uso da medicação. Concluíram que a irradiação laser de baixa potência após extrações de terceiros molares inferiores inclusos pode ser recomendada para minimizar o edema e seu efeito é aumentado pela injeção simultânea intramuscular de dexametasona.

Aimbire et al. (2006) avaliaram a ação do laser de baixa potência (GaAs:Al, 650 nm, modelo Theralase<sup>®</sup>, DMC) sobre a redução dos níveis dose-dependentes de TNF $\alpha$  na inflamação aguda. Utilizaram dois estudos controlados com 35 ratos Wistar randomicamente divididos em 5 grupos com 7 animais cada. Instilaram intrabronquialmente, em um dos lobos pulmonares de cada rato, anti-soro de coelho para ovalbumina seguida por injeção intravenosa de 10 mg de ovalbumina em 0,5 ml para indução de lesão pulmonar aguda. O primeiro estudo serviu para definir o perfil de tempo da atividade do TNF $\alpha$  para as primeiras 4 horas, enquanto que o segundo estudo comparou 3 diferentes doses para um grupo controle e um grupo clorpromazina no tempo onde a atividade do TNF $\alpha$  estava aumentada. Os ratos nos grupos laser de baixa potência foram irradiados durante 5 minutos no local da lesão por um laser de Arseneto de Gálio-Alumínio (Ga-Al-As) de 650 nm. Encontraram que houve um tempo de atraso antes do aumento da atividade do TNF $\alpha$  após a injeção de ovalbumina. Os níveis de TNF $\alpha$  aumentaram de  $\leq 6,9$  unidades/ml nas primeiras 3 horas para 62,1 unidades/ml em 4 horas. Uma dose de laser de baixa potência de 0,11 Joules administrada com uma densidade de potência de 31,3 mW/cm<sup>2</sup> em 42 segundos reduziu significativamente o nível de TNF $\alpha$  de 50,2 unidades/ml,  $p < 0,001$ , quando comparado ao controle. Concluíram que o laser de baixa potência pode reduzir a expressão de TNF $\alpha$  após lesão pulmonar imunocomplexa aguda em ratos, mas a dose de irradiação parece ser crítica para redução da liberação do TNF $\alpha$ .

Lopes-Martins et al. (2005) investigaram o efeito do laser de baixa potência (InGaAlP, modelo Dermolaser<sup>®</sup> AD2040), de comprimento de onda de 650 nm, na pleurisia inflamatória aguda. Um modelo experimental clássico de pleurisia foi utilizado numa amostra de 40 ratos Balb, randomicamente divididos em 5 grupos. A inflamação foi induzida pela carragenina (0,5 g/cavidade) administrada através de injeções intratorácicas. Quatro grupos receberam o agente inflamatório, e um recebeu injeções de solução salina estéril. Em 1, 2, e 3 horas após as injeções, a irradiação laser foi realizada, com a mesma potência (2,5 mW), mas diferentes tempos de irradiação. As densidades de energia em cada sessão de tratamento foram 0 J/cm<sup>2</sup> (placebo), 3 J/cm<sup>2</sup>, 7,5 J/cm<sup>2</sup>, 15 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. A análise celular total e diferencial após 4 horas da indução da pleurisia mostrou uma redução significativa da migração celular inflamatória para todos os grupos tratados com laser ativo. Entretanto, 4 horas após a injeção, a mais significativa ( $p < 0,001$ ) redução da

migração de leucócitos foi vista no grupo 7,5 J/cm<sup>2</sup>, com 2,7 x 10<sup>6</sup> leucócitos, enquanto que no grupo controle 7,9 x 10<sup>6</sup> leucócitos. Concluíram que o laser de baixa potência administrado de 1 a 3 horas após a indução de pleurisia inflamatória reduz significativamente a mensuração da migração celular inflamatória.

Viegas (2005) avaliou a ação do laser de baixa potência, com dois diferentes comprimentos de onda, na modulação das reações de inflamação tecidual, quando aplicado durante a fase inflamatória do reparo de lesões de tecidos moles, e a qualidade histológica do processo cicatricial ao final de 7 dias. Grupos tratados com o antiinflamatório meloxicam e grupos sem tratamento foram utilizados como parâmetros de comparação neste trabalho. Feridas de 8 mm de diâmetro foram confeccionadas na região dorsal de 64 ratos (*Wistar*), com auxílio de um *punch*. Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com a terapia pós-operatória instituída. O grupo A constituiu o controle. O grupo B recebeu tratamento com meloxicam (1 mg/ 0,1 ml), no pós-operatório imediato e em 48 horas. O grupo C foi irradiado com laser vermelho de InGaAlP ( $\lambda$ 685 nm) e o grupo D, com laser infravermelho de GaAlAs ( $\lambda$ 830 nm), nos mesmos períodos da aplicação do meloxicam. As irradiações foram realizadas em quatro pontos perilesionais equidistantes, no modo contínuo, pontual, potência de 35 mW, totalizando a energia de 4 J por sessão. Os animais foram mortos em 12, 36, 72 horas e 7 dias após o procedimento cirúrgico. A análise microscópica deste trabalho, realizada por estudo de lâminas coradas por hematoxilina e eosina não indicou um efeito antiinflamatório do laser não ablativo. Os resultados obtidos nos grupos irradiados com diferentes comprimentos de onda foram semelhantes. Pequenas diferenças foram constatadas. A análise dos níveis do mRNA de IL-1 $\beta$  não indicou uma diminuição das reações inflamatórias nos grupos irradiados, quando comparados aos animais tratados com meloxicam e ao controle. Afirmou que o laser de baixa potência não minimiza as reações de inflamação tecidual, porém apresenta efeitos que favorecem o reparo dos tecidos lesados.

Albertini et al. (2004) investigaram o efeito do laser de baixa potência no processo inflamatório agudo em ratos. Induziram edema na pata dos ratos com injeção subplatar de carragenina, medindo o volume da pata antes da aplicação e 1, 2, 3 e 4 horas após a

injeção utilizando um hidropletismômetro. Para investigar o mecanismo de ação do laser de Ga-Al-As (modelo Dermolaser<sup>®</sup> AD2040, 650 nm) no edema inflamatório, estudos paralelos foram realizados usando ratos adrenalectomizados ou ratos tratados com diclofenaco sódico. Diferentes protocolos de irradiação foram empregados para densidades de energia, tempo de exposição e repetição de aplicação específicos. Os ratos foram irradiados com o laser de Ga-Al-As durante 80 segundos por hora. A densidade de energia que produziu um efeito antiinflamatório foi 1 e 2,5 J/cm<sup>2</sup>, reduzindo o edema em 27% (P < 0,05) e 45,4% (P < 0,01), respectivamente. A densidade de energia de 2,5 J/cm<sup>2</sup> produziu efeitos antiinflamatórios similares aos do diclofenaco sódico em uma dose de 1 mg/kg. Nos animais adrenalectomizados, a irradiação laser falhou em inibir o edema. Os resultados encontrados sugeriram que a irradiação laser de baixa potência possivelmente exerce efeitos antiinflamatórios pela estimulação da liberação dos hormônios corticosteróides adrenais.

Chagas Júnior (2004) avaliou, por meio de contagem absoluta utilizando o método esteriológico, a quantidade de mastócitos após irradiação do laser de baixa potência (InGaAlP,  $\lambda$  685 nm, modelo Theralase<sup>®</sup>, DMC) no dorso de ratos. Os resultados obtidos demonstraram que nas primeiras 6 e 12 horas após a irradiação laser, houve uma diminuição no número total de mastócitos, estatisticamente significativa, quando comparados aos grupos controles, porém, após 24 horas não existiram diferenças no número de mastócitos entre os grupos experimental e controle. Baseados nos resultados obtidos com a aplicação da luz laser  $\lambda$  685 nm, concluiu que a luz laser é capaz de diminuir o número total de mastócitos após uma única irradiação.

Pugliese et al. (2003) realizaram ferimentos cutâneos padronizados no dorso de 72 ratos Wistar e, em seguida, aplicação pontual do raio laser de baixa potência do tipo Arseneto de Gálio-Alumínio (Ga-Al-As, 670 nm, potência de 9 mW) com diferentes densidades de energia. Os animais foram sacrificados com 24, 48 e 72 horas e aos 5, 7 e 14 dias. Procederam à análise das secções teciduais coradas por hematoxilina-eosina, sírius vermelho e orceína. Observaram, que nos grupos submetidos à terapia a laser, houve maior redução do edema e infiltrado inflamatório.



### **3 OBJETIVO**

---

O objetivo deste trabalho foi estudar a intensidade do infiltrado inflamatório agudo presente em tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos submetidos à irradiação laser de baixa potência após uma única aplicação, através da descrição do processo inflamatório agudo, quantificação dos granulócitos e comparação dos resultados dos grupos experimentais com os dos grupos controles.





## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos estabelecidos de acordo com o capítulo XIV, art. 94-99, das Normas de Pesquisa em Saúde da PUCRS e do Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 01, de 13 de Junho de 1998, e em observância da Lei 6688, de 08 de Maio de 1979. Foi submetida à análise pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e aprovada em 29 de Junho de 2007 sob o protocolo nº 0094/05 (ANEXO A).

### **4.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA**

#### **4.2.1 Paradigma e Delineamento**

Esta pesquisa foi realizada junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), como parte integrante da linha de pesquisa “Laser em Odontologia”.

Foi desenvolvida dentro do paradigma tradicional, no delineamento de estudo experimental verdadeiro, pós-teste com grupo controle (CAMPBELL, 1979).

### 4.3 PROBLEMA

Há alterações na intensidade do infiltrado inflamatório agudo no tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos quando submetidos à irradiação laser de baixa potência após uma única aplicação?

### 4.4 HIPÓTESE

A irradiação laser de baixa potência aumenta a intensidade do infiltrado inflamatório agudo no tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos após uma única aplicação.

### 4.5 AMOSTRA

A amostra foi do tipo probabilística, obtida de forma aleatória simples. O experimento foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CDCT, da Coordenação de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS, no ano de 2007.

A seleção da amostra obedeceu a alguns critérios de exclusão, não sendo incluídos animais:

- a) fêmeas, com o intuito de não gerar uma variável em relação ao gênero;
- b) com massa corpórea menor que 250g e maior que 400g;

c) com idade superior ou inferior a três meses de vida, pois a idade poderia interferir na capacidade de resposta biológica.

#### 4.5.1 Modelo Animal e Organização dos Grupos

Foram utilizados 18 ratos machos pesando entre 250 e 300 gramas da espécie *Rattus norvegicus*, ordem Rodentia, linhagem Wistar, os quais foram escolhidos de forma aleatória simples dentre 100 animais, e distribuídos aleatoriamente em seis grupos, três experimentais e três controles. Cada grupo experimental foi composto por quatro ratos, e cada controle por dois (tab. 1).

**Tabela 1** - Distribuição dos animais nos grupos

<b>GRUPOS</b>	<b>ANIMAIS</b>
Controle 6 h.	2
Experimental 6 h.	4
Controle 12 h.	2
Experimental 12 h.	4
Controle 24 h.	2
Experimental 24 h.	4

Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

#### 4.6 LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Foi utilizado o aparelho laser de modelo Theralase<sup>®</sup>, fabricado pela DMC Equipamentos – São Carlos – SP/Brasil, de meio ativo InGaIP (Índio – Gálio – Iodo – Fósforo), emissor laser visível, com  $\lambda = 685 \text{ nm}$ , área do feixe de  $2 \text{ mm}^2$ , divergência de  $1,5^\circ$ , cedido pelo fabricante.



**Figura 1** - Equipamento Laser Theralase<sup>®</sup>, DMC Equipamentos Ltda., São Carlos/SP  
 Fonte: DMC Equipamentos (2007)

#### 4.7 INSTRUMENTAL CIRÚRGICO E MATERIAL DE CONSUMO

Os instrumentais cirúrgicos utilizados foram:

- Cabo de bisturi n.º 3 (Duflex);
- Pinça Adson Brown (Quinelato<sup>®</sup>);
- Pinça hemostática (Quinelato<sup>®</sup>);
- Punch de Panarello<sup>3</sup>.

Os materiais de consumo utilizados no experimento foram:

- Agulhas estéreis;
- Campo cirúrgico estéril descartável de TNT (tecido não tecido);

<sup>3</sup> Punch metálico de 8 mm de diâmetro, milimetrado e demarcado sua superfície externa em 1, 2, e 3 mm de altura, confeccionado para o experimento de Panarello (2003).

- Formol 10% tamponado;
- Gaze estéril;
- Lâminas de bisturi (BD<sup>®</sup>) número 15;
- Lâminas e lamínulas para microscopia.
- Luvas de procedimento médias (Satari<sup>®</sup>);
- Luvas Cirúrgicas n.º 7,5 (Madeitex<sup>®</sup>);
- Seringa estéril descartável de 10ml (Injex<sup>®</sup>);
- Solução de digluconato de clorexidina a 2%;
- Soro fisiológico/Solução de cloreto de sódio 0,9% (Texon<sup>®</sup>).

#### 4.8 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral, conduzida por Médico Veterinário<sup>4</sup> responsável, disponibilizado pela Coordenação de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS. Após a pesagem em balança de precisão, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina<sup>5</sup> 50mg/Kg (0,05ml/100g) e Cloridrato de Xilazina<sup>6</sup> 5mg/Kg (0,025ml/100g), via intraperitoneal.

Após a confirmação da anestesia dos animais, os animais foram tricotomizados na porção superior de dorso, com auxílio de aparador elétrico de pelos<sup>7</sup>, sendo lavados com solução fisiológica 0,9% e secos com gaze estéril. Foi realizada anti-sepsia da região com solução de digluconato de clorexidina a 2%, seguida pela colocação de um campo cirúrgico de TNT, fenestrado, estéril, com dimensões de 20 X 20cm, utilizado como barreira para controle de infecção.

---

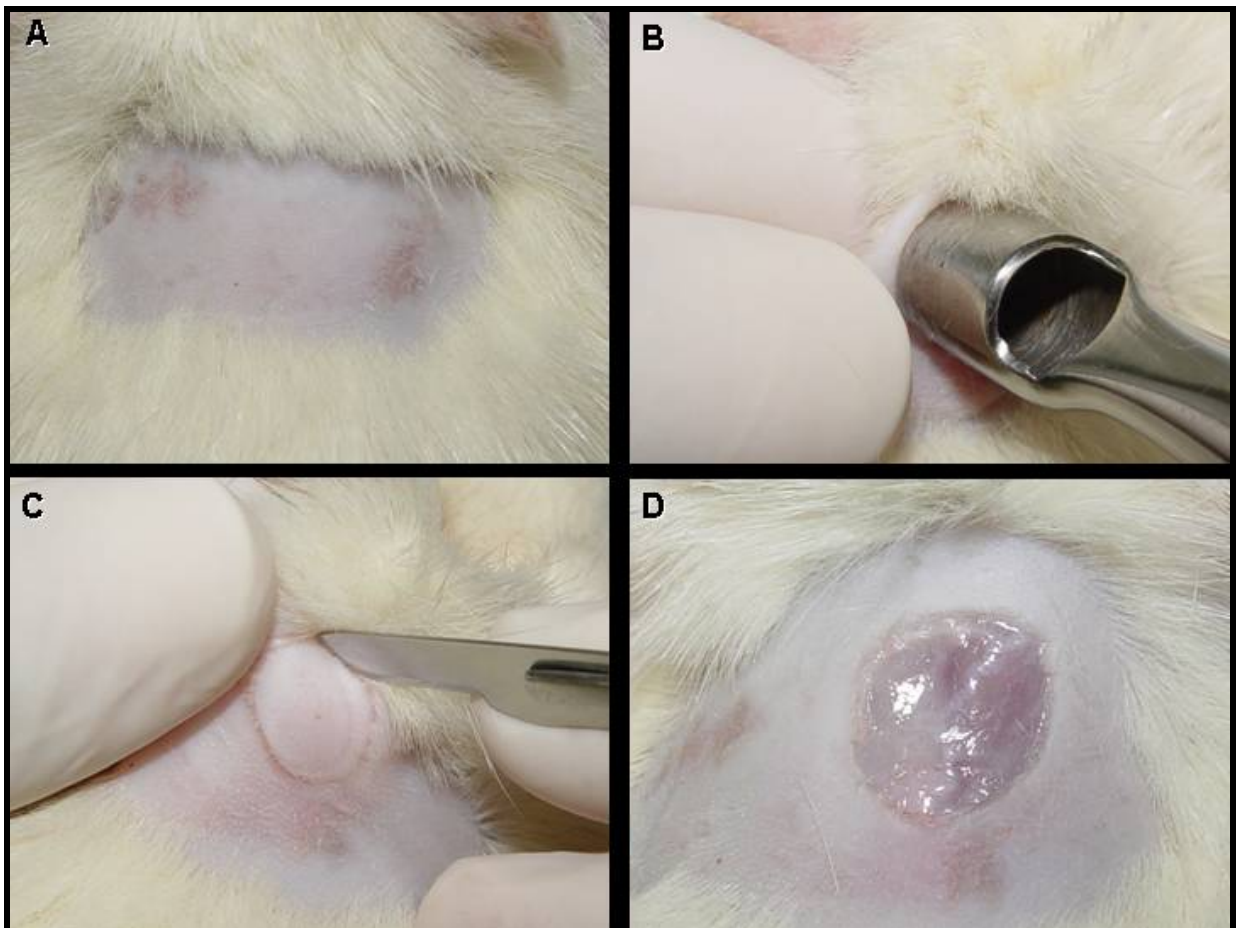
<sup>4</sup> Dra. Luisa Maria Gomes de Macedo Braga- Médica Veterinária, inscrita no Conselho Regional de Medicina Veterinária/Sessão Rio Grande do Sul pelo número RS02393VP.

<sup>5</sup> Dopalen<sup>®</sup>, AgribRANDS Brasil Ltda, [www.vetbrands.com.br/bulas/Bula\\_Dopalen.pdf](http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Dopalen.pdf)

<sup>6</sup> Anasedan<sup>®</sup>, AgribRANDS Brasil Ltda, [www.vetbrands.com.br/bulas/Bula\\_Anasedan\\_Pet.pdf](http://www.vetbrands.com.br/bulas/Bula_Anasedan_Pet.pdf)

<sup>7</sup> Aparador Elétrico de Barba e Bigode. Panasonic<sup>®</sup> - ER389K

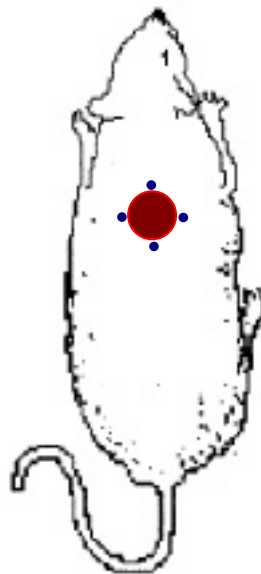
A confecção da ferida cirúrgica seguiu o protocolo estabelecido por Panarello (2003): o punch foi posicionado perpendicularmente à superfície da pele da região tricotomizada, promovendo assim movimentos giratórios para facilitar penetração da lâmina de bisturi a uma profundidade de 1 mm. Após isso, a área demarcada pelo punch foi dissecada, com auxílio de lâmina de bisturi nº 15, mentado em cabo de bisturi nº 3, e pinça de Adson Brown, removendo delicadamente a pele, resultando em uma lesão com 1 mm de profundidade e 8 mm de diâmetro, que proporcionou uma área cruenta de aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^2$  e com volume de  $0,05 \text{ cm}^3$ . O sangramento não foi interrompido ou removido, permitindo a hemostasia espontânea das feridas (fig. 2).



**Figura 2** - Procedimentos para confecção de ferida cirúrgica – Tricotomia (A); Marcação com o punch (B); Incisão (C) e Ferida cirúrgica (D)  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

## 4.9 IRRADIAÇÃO LASER

Antes de cada aplicação, a ponteira do laser foi calibrada no próprio aparelho, seguindo as instruções do fabricante. Todos os ratos dos grupos experimentais foram irradiados com o mesmo protocolo de irradiação, estabelecido por Panarello (2003) que correspondeu a uma única aplicação de forma pontual, pulsátil, com frequência de 35 pulsos por segundo, potência de 35 mW e  $DE = 0,5 \text{ J/cm}^2$  por ponto, tempo de 17 segundos, totalizando uma dose total de  $2 \text{ J/cm}^2$  e tempo total de 68 segundos por animal. A aplicação foi realizada imediatamente após a realização da lesão, transcutaneamente nas bordas da ferida em quatro pontos equidistantes demarcados (fig. 3). Os ratos dos grupos controle não foram irradiados, mas foram manipulados.

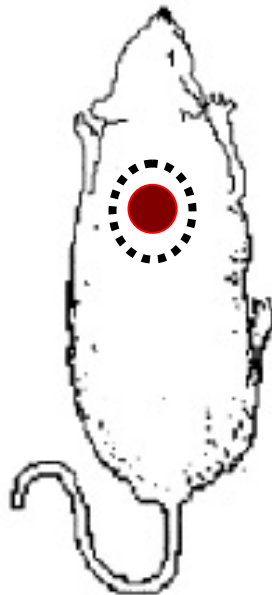


**Figura 3** - Desenho esquemático, modificado de Smith et al. (2000), mostrando os pontos de irradiação laser  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

Após os procedimentos cirúrgicos e aplicação laser os animais foram recolocados em gaiolas individuais, mantendo-se o isolamento prévio, evitando o canibalismo típico após procedimentos desta natureza. Os ratos foram mantidos em ambiente ventilado, aquecido e longe de estímulos auditivos, com água “*ad libidum*” e dieta padrão (ração específica, Nuvilab®), além da rotina de limpeza das gaiolas diariamente.

#### 4.10 MORTE DOS ANIMAIS

A morte dos animais seguiu a distribuição por grupos: 6, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico. Os animais foram submetidos à inalação continuada de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), dentro de câmara plástica, disponível no laboratório da FEPPS, ocasionando morte por parada cardiorespiratória, respeitando a Declaração dos Direitos dos Animais. (GOLDIN, 1995). Após a morte de cada animal, foi retirada uma peça elíptica com margem de segurança envolvendo a lesão (fig. 4).



**Figura 4** - Desenho esquemático, modificado de Smith et al. (2000), mostrando a elipse perilesional no dorso do rato  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

As peças foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado, por um período de 24 horas, em frascos individualizados e separados por grupos. Após fixação, o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Patologia Bucodental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. As peças foram seccionadas ao meio e incluídas na superfície de corte em parafina, confeccionando-se os blocos.



## 4.11 INSTRUMENTO E COLETA DOS DADOS

### 4.11.1 Obtenção dos Cortes Histológicos

Dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos com 5 $\mu$ m de espessura, e em seguida montados em lâminas histológicas. Para cada lâmina foram obtidas as duas partes da lesão que seguiram para coloração pela técnica da hematoxilina e eosina (HE), no Laboratório de Patologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

### 4.11.2 Análise dos Cortes Histológicos

Para a análise dos cortes histológicos foi utilizada a microscopia óptica de luz, objetivando a contagem celular dos granulócitos e descrição do infiltrado inflamatório agudo, através do método esteriológico (GUNDERSEN et al., 1988), utilizando um sistema composto por microscópio Axioskop 40<sup>®</sup> (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Oberkochen, Alemanha). A eleição das regiões perilesionais seguiu a orientação de Weidner (1995), atribuindo “hot spots”, ou seja, elegendo-se áreas de maior expressividade das células inflamatórias. Foram capturadas imagens de 3 “hot spots” por lâmina com objetiva de 400x através da câmera CoolSnapPro color<sup>®</sup> (Media Cybernetics<sup>®</sup> inc, Silver Spring, USA) acoplada ao microscópio óptico e conectada a um computador Pentium IV (Dell<sup>®</sup> Computer Corporation, Boston, USA) que continha o sistema computadorizado de captura de imagens Image-Pro<sup>®</sup> Plus, versão 4.5.1.22 (Media Cybernetics<sup>®</sup> Inc, Silver Spring, USA), do laboratório do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, totalizando 54 imagens capturadas. As células foram contadas através da ferramenta “Measure”, opção Count/Size, modo manual

do Image-Pro<sup>®</sup> Plus, por um examinador previamente calibrado por patologista experiente<sup>8</sup>. Para cada lâmina foi realizada a média aritmética dos “hot spots”.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS COLETADOS

Tendo como variável independente a irradiação laser de baixa potência, e como variável dependente o infiltrado inflamatório agudo, os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise de variância método paramétrico (One-way ANOVA), com pós-teste de Tukey-Kramer, através do software GrafPad InStat<sup>®9</sup>.

---

<sup>8</sup> Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva, Médico Patologista, Professor de Patologia Médica da Faculdade de Medicina da PUCRS.

<sup>9</sup> Versão 3.05, 32 bit para Windows 95/NT, criado em 27 de Setembro de 2000 pela GrafPad Software, Inc., San Diego, CA, USA.



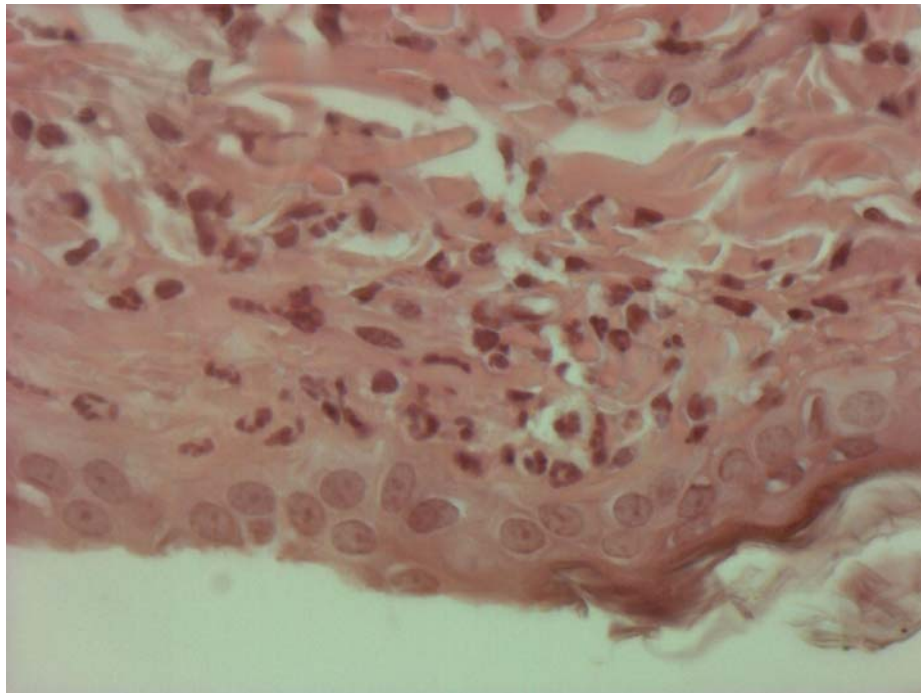
## 5 RESULTADOS

---

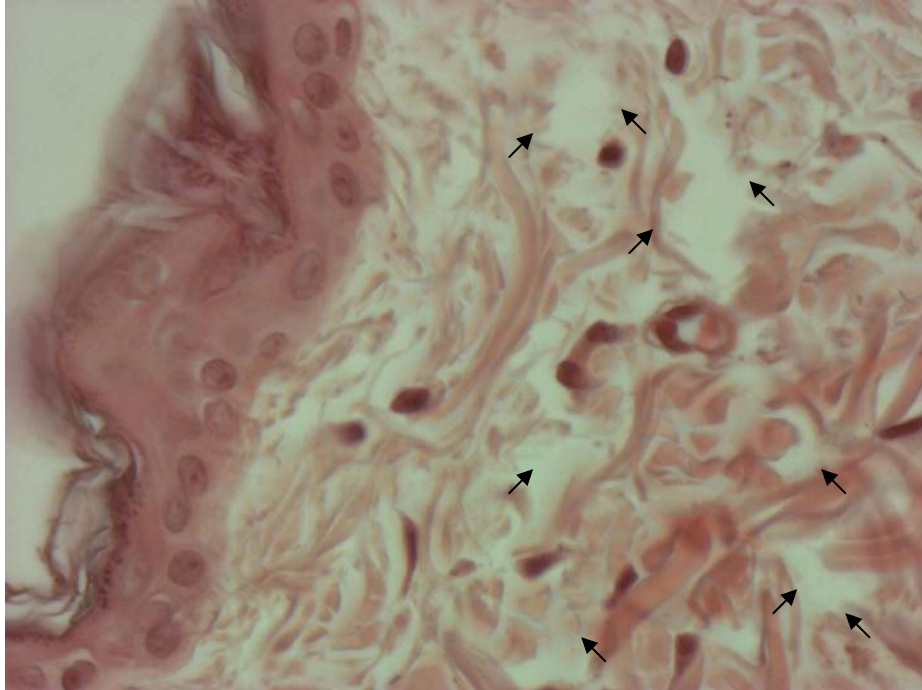
### 5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

#### 5.1.1 Grupos 6 horas

Observou-se à microscopia óptica de luz um maior número de granulócitos perilesionais presentes no tecido conjuntivo no grupo controle quando comparado ao grupo experimental. Notou-se também presença de edema no tecido conjuntivo, principalmente no grupo irradiado. Os granulócitos estavam dispersos no tecido conjuntivo sem sinais de concentração celular em áreas específicas. (figuras 5 e 6).



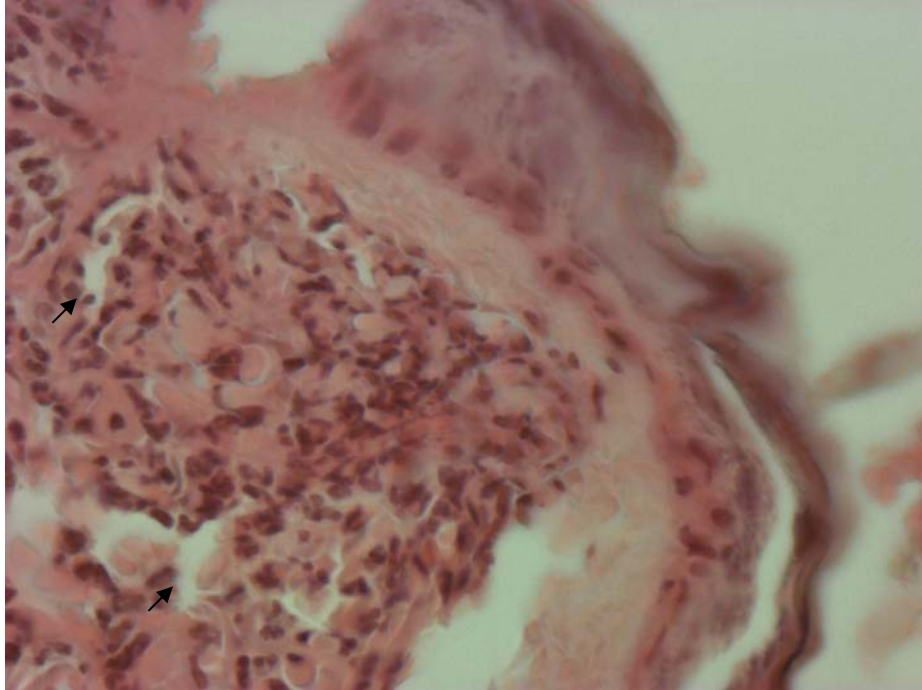
**Figura 5** - Coloração HE mostrando os granulócitos no tecido conjuntivo no grupo Controle 6 h, aumento de 400x  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)



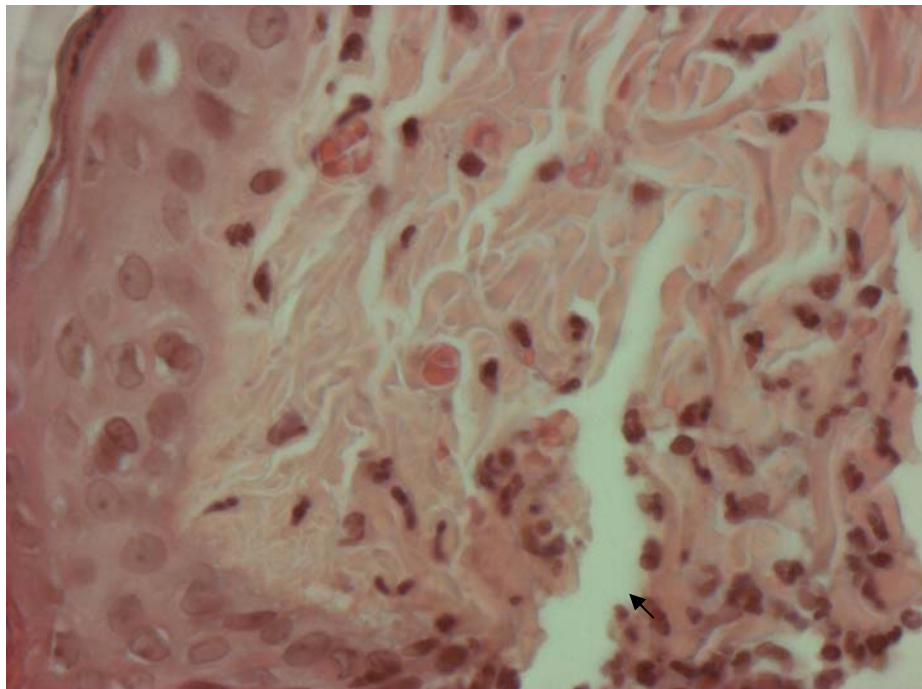
**Figura 6** - Coloração HE mostrando os granulócitos e edema no tecido conjuntivo (setas) no grupo Experimental 6 h, aumento de 400x  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

### 5.1.2 Grupos 12 horas

Percebeu-se um aumento progressivo da disponibilidade dos granulócitos no grupo controle quando comparado ao grupo irradiado e comparando também com os grupos 6 horas. A presença de vasos sanguíneos dilatados não foi observada. (figuras 7 e 8).



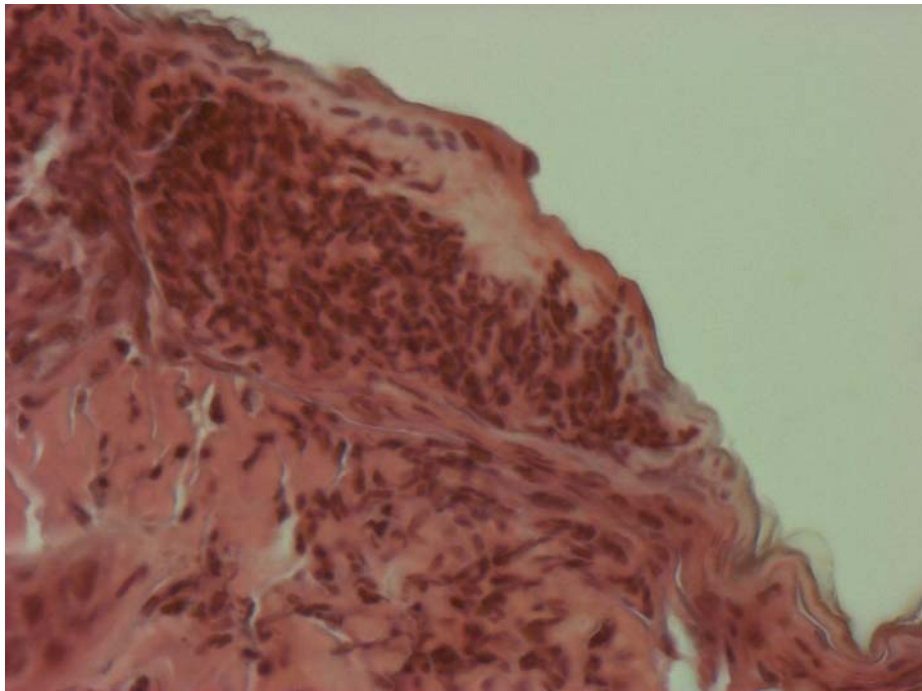
**Figura 7** - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Controle 12 h, aumento de 400x  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)



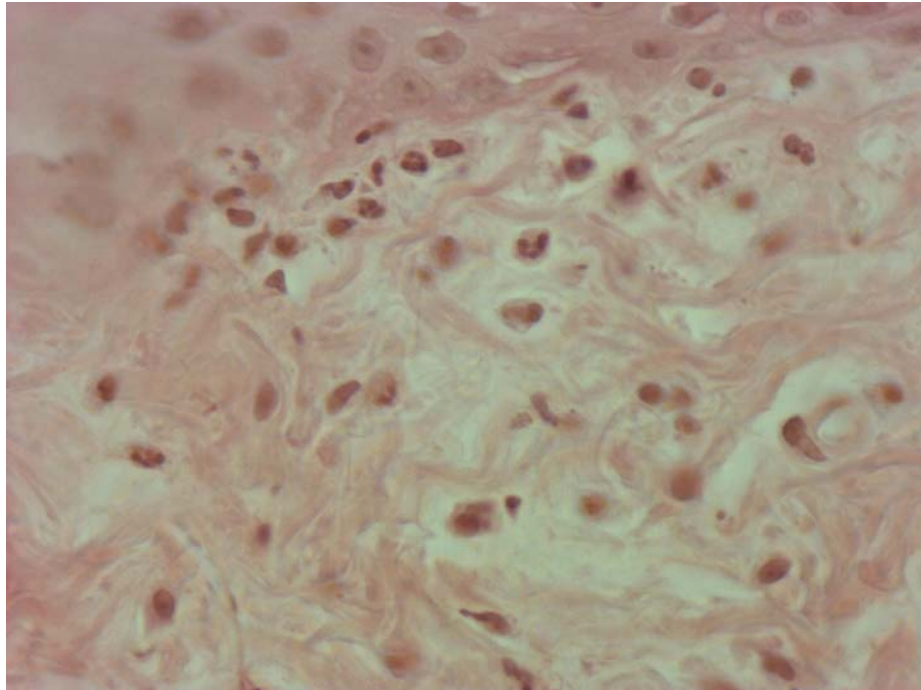
**Figura 8** - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Experimental 12 h, aumento de 400x  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

### 5.1.3 Grupos 24 horas

Assim como nos grupos 6 e 12 horas, os granulócitos, do grupo controle 24 horas, continuaram aumentando em número quando comparados aos do grupo experimental. No grupo irradiado, os granulócitos apresentam-se em meio a cordões de fibras colágenas. (figuras 9 e 10).



**Figura 9** - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Controle 24 h, aumento de 400x  
Fonte: Dados da Pesquisa (2007)



**Figura 10** - Coloração HE mostrando os granulócitos no grupo Experimental 24 h, aumento de 400x  
 Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

**Tabela 2** - Quantidade de granulócitos encontrados em cada grupo

<b>Controle 6 h.</b>	<b>Exp. 6 h.</b>	<b>Controle 12 h.</b>	<b>Exp. 12 h.</b>	<b>Controle 24 h.</b>	<b>Exp. 24 h.</b>
44	21	111	77	104	52
113	23	126	78	191	88
	36		84		102
	109		151		129

Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

Análise de Variância (ANOVA One-way): O valor de  $p$  foi 0,1371, considerado não significante. A variação entre as médias das colunas não foi estatisticamente significante para um índice de significância de 95%,  $p \leq 0,05$ . (tabela 3).



Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas: se o valor de  $q$  fosse maior que 4,751 então o valor de  $p$  seria menor que 0,05. (tabela 4).

**Tabela 3** - Sumário dos dados estatísticos

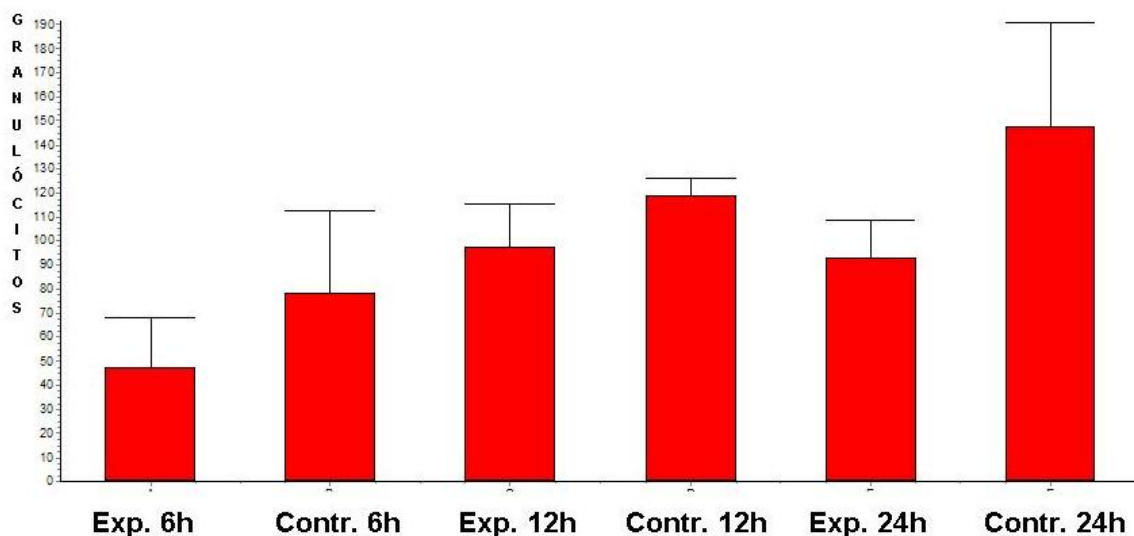
<b>Grupo</b>	<b>N° de Animais</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Exp. 6h	4	47,250	41,700
Contr. 6h.	2	78,500	48,790
Exp. 12h.	4	97,500	35,800
Contr. 12h.	2	118,50	10,607
Exp. 24h.	4	92,750	32,056
Contr. 24h.	2	147,50	61,518

Fonte: Dados da Pesquisa (2007)

**Tabela 4** - Comparação das diferenças das médias entre os grupos

<b>Comparação</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>q</b>	<b>Valor de p</b>
Exp. 6h. vs Contr. 6h.	- 31,250	1,302	$p > 0,05$
Exp. 12h. vs Contr. 12h.	- 21,000	0,8752	$p > 0,05$
Exp. 24h. vs Contr. 24h.	- 54,750	2,282	$p > 0,05$

Fonte: Dados da Pesquisa (2007)



**Figura 11** - Média e Erro Padrão dos grupos

Fonte: Dados da Pesquisa (2007)



## 6 DISCUSSÃO

---

Dentre as intervenções não-farmacológicas para resolução de processos inflamatórios e álgicos, o laser de baixa de potência surgiu como uma alternativa promissora. Dois possíveis mecanismos têm sido propostos para explicar os efeitos benéficos vistos nos estudos clínicos com laser de baixa potência. O primeiro possível mecanismo para ação do laser de baixa potência é um efeito modulatório dose-dependente no metabolismo fibroblástico e deposição colágena. O segundo possível mecanismo tem sido pouco estudado, o efeito específico do comprimento de onda, mas ainda conhece-se pouco sobre esta questão para se fazer afirmações. (Lopes-Martins et al., 2005).

Para o estudo tanto do processo inflamatório quanto o de reparo, muitos tipos de laser de baixa potência (HeNe; GaAlAs, InGaAlP) com diferentes comprimentos de onda e regimes terapêuticos foram utilizados, bem como o modelo animal estudado, o tipo de inflamação induzida e o período de morte dos animais pós-irradiação, o que levam à dificuldade em comparar os resultados e na formulação de uma teoria do seu mecanismo de ação.

Na tentativa de minimizar estes aspectos, este trabalho seguiu o modelo animal e de indução inflamatória já estabelecidos dentro da linha de pesquisa "Laser em Odontologia", nesta Faculdade, os quais foram utilizados por Panarello (2003), Chagas Júnior (2004) e Viegas (2005). Da mesma forma, os critérios de irradiação laser propostos por Schindl et al. (2000): comprimento de onda, frequência, potência de saída, diâmetro do spot, tempo de irradiação, intensidade, dose, e intervalos de tratamento foram bem descritos, o que foi observado também nos trabalhos de Albertini et al. (2007), Aimbire et al. (2006), Lopes-Martins et al. (2005) e Albertini et al. (2004). A dosimetria e a potência empregadas encontraram-se na faixa recomendada por Basford (1995) para se obter efeitos biomoduladores com o laser de baixa potência.

Trowbridge e Emling (1996) afirmaram que existem diferenças importantes, nos diferentes órgãos, em relação aos fenômenos vasculares e que aplicar os resultados de estudos sobre inflamação na pele para a inflamação dos outros órgãos seria questionável e não seria adequado. Viegas (2005), Chagas Júnior (2004) e Pugliese et al. (2003) trabalharam com pele de rato, tendo os dois primeiros autores induzido inflamação de forma mecânica (punch), e o último de forma química (carragenina). Já Aimbire et al. (2006) e Lopes-Martins et al. (2005) trabalharam com pulmão de rato, e Albertini et al. (2007 e 2004) com pata de rato. Isto demonstrou a dificuldade ao se comparar os resultados obtidos. Aimbire et al. (2006) avaliaram mediadores químicos da inflamação, Albertini et al. (2007) usaram método de avaliação volumétrica do edema e HE, e Albertini et al. (2004) usaram o método de avaliação volumétrica do edema.

Apesar de Markovic e Todorovic (2007) terem trabalhado com irradiação laser de baixa potência em humanos após procedimento de cirurgia bucal, concorda-se com Lucas et al. (2002), o qual recomendou estudos seqüenciais para confirmação dos resultados obtidos com os estudos celulares e em animais, como por exemplo o aumento e pareamento da amostra a ser estudada para obtenção de uma estatística mais fundamentada, antes da extrapolação para o uso desta terapia em humanos.

Chagas Júnior (2004) encontrou uma maior degranulação mastocitária nas primeiras 12 horas após aplicação laser de baixa potência (InGaAIP, 685 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>, 35 mW, 35 p.p.s), o que acarretaria em um maior recrutamento das células leucocitárias, devido ao conteúdo dos grânulos dos mastócitos, mediadores químicos da inflamação, tais como a histamina, um potente vasodilatador, fator quimiotático para eosinófilos (ECF) e fator quimiotático para neutrófilos (NCF), como propuseram Gartner e Hiatt (2003). Porém, a hipótese aqui formulada, baseada nos achados de Chagas Júnior (2004), de que a irradiação laser de baixa potência aumentaria a intensidade do infiltrado inflamatório agudo no tecido conjuntivo perilesional do dorso de ratos após uma única aplicação, não foi confirmada, pois o fenômeno esperado para os granulócitos não ocorreu, existindo diminuição em número absoluto, como observado na tabela 2, para o mesmo protocolo de irradiação laser (InGaAIP, 685 nm, 2 J/cm<sup>2</sup>, 35 mW, 35 p.p.s). A presença do edema

(figura 6) corroborou os resultados de Chagas Júnior (2004) comprovando a existência da histamina no interstício, bem como, em Viegas (2005) nas primeiras 12 horas após a irradiação laser. O estudo de Viegas (2005) também concluiu que a irradiação laser de baixa potência não minimiza as reações de inflamação tecidual.

Assim como Pugliese et al. (2003) que obtiveram uma diminuição no infiltrado inflamatório quando trabalharam com um laser de baixa potência (GaAIs, 670 nm, potência de 9 mW) com densidades de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> e 8 J/cm<sup>2</sup> em feridas padronizadas em dorsos de ratos, os resultados aqui obtidos sugerem a atuação do laser sobre estas células.

Ainda Pugliese et al. (2003) encontraram um menor edema nos grupos irradiados quando comparados aos controles, discordando indiretamente dos achados de Viegas (2005) e Chagas Júnior (2004). Isso talvez se deva ao tempo de observação após indução da lesão, que em Chagas Júnior (2004), como no corrente trabalho, foi de 6, 12 e 24 horas, em Pugliese et al. (2003) foi de 24, 48 e 72 horas e 5, 7 e 14 dias, e em Viegas (2005) de 12, 36, 72 horas e 7 dias após o procedimento cirúrgico.

Viegas (2005) e Chagas Júnior (2004), trabalharam com o mesmo equipamento laser de baixa potência de emissão de luz vermelha, o Theralase<sup>®</sup>, de meio ativo InGaAlP, de comprimento de onda de 685 nm, com potência útil de 35 mW, e densidades de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> e 2 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente, obtendo resultados semelhantes do ponto de vista inflamatório em dorso de ratos, na observação de 12 horas após procedimento cirúrgico. Albertini et al. (2007) também utilizaram o equipamento citado anteriormente, porém com uma dose de irradiação de 7,5 J/cm<sup>2</sup> e potência de 30 mW, encontrando diminuição de edema e de infiltrado celular em patas de rato, 4 horas após da indução inflamatória. Sítios e induções inflamatórias diferentes, dorso de ratos e patas de ratos, respectivamente, diferentes protocolos para o mesmo aparelho laser, indicam a dificuldade de controle de variáveis ao se trabalhar com irradiação laser de baixa potência. Deve-se observar além disso, as considerações de Rochkind et al. (1989) onde afirmaram que a irradiação do laser de baixa potência exerce pronunciados efeitos sistêmicos na pele

e nos tecidos subjacentes, e que esses efeitos persistem muito tempo depois de uma única aplicação.

Ao analisar os resultados (figura 11), nota-se que nos grupos experimentais existiu uma tendência de curva normal de Gauss, apesar de não terem sido estatisticamente significantes. Comparando com o progressivo aumento celular dos grupos controles (figura 11), sugere-se uma antecipação do processo inflamatório agudo total, corroborando os achados da literatura vigente, que o laser acelera o processo cicatricial. E ainda o menor erro padrão obtido nos grupos 12 horas, sugere uma característica de comportamento celular mais homogeneia, aproximando-se dos resultados de Chagas Júnior (2004), onde obteve uma maior degranulação mastocitária no grupo experimental 12 horas, com diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle. Seria necessário o aumento e pareamento da amostra para confirmação desta tendência, bem como outros períodos de observações. Neste caso, pode-se aproveitar os resultados de Viegas (2005) para observação de 36 horas, onde encontrou o infiltrado inflamatório do grupo irradiado semelhante ao do grupo controle, confirmando a antecipação da fase inflamatória celular.

Apesar de os resultados não terem sido estatisticamente significantes, pôde-se observar a diferença do comportamento do infiltrado inflamatório nos grupos experimental e controle (tabela 2, figura 11). A observação deste dado confrontando com os resultados de Chagas Júnior (2004) sugere que para um mesmo protocolo de irradiação, no mesmo modelo animal, ocorreram fenômenos biológicos celulares distintos. Analisando a tabela 3, percebe-se que mesmo a amostra não estando pareada, as médias de granulócitos encontradas nos grupos irradiados foi menor do que a encontrada nos grupos controle, mostrando o efeito do laser sobre estas células. Comparando com os resultados de Chagas Júnior (2004), obtidos com mastócitos, pode-se inferir que para cada tipo celular a irradiação laser tem um efeito, o que dificulta ainda mais o conhecimento do mecanismo de ação desta terapia, concordando com a afirmação de Belkin e Schwartz (1989), onde relataram que os efeitos do laser de baixa potência são dose-dependentes e que seu entendimento está longe de ser esclarecido.

A teoria de Karu (1989), até o momento, é a mais aceita pela literatura vigente, na tentativa de explicar o mecanismo de ação da luz laser de baixa potência em nível celular. A fotorrecepção ocorrendo nas mitocôndrias pode intensificar o metabolismo respiratório e as propriedades eletrofisiológicas da membrana, mudando a fisiologia celular. Partindo desta premissa, infere-se que a luz laser agindo nos granulócitos altera seu processo de diapedese, ou muda a conformação do exoesqueleto da membrana celular impedindo o mecanismo de adesão, ou acarreta o mesmo que os mastócitos – degranulação, ou ainda atua diretamente na matriz extracelular o que poderia explicar a menor presença do infiltrado inflamatório mesmo com maior disponibilidade de mediadores químicos, os subprodutos da degranulação mastocitária.

A partir deste trabalho, poder-se-á aprofundar os estudos de inflamação dentro da linha de pesquisa “Laser em Odontologia”, aplicando outras colorações para cada tipo celular ou mediador químico envolvido, como técnicas do tipo imunohistoquímica, biologia molecular (PCR, QTC-PCR, etc), etc.





## **7 CONCLUSÃO**

---

Com base nos resultados obtidos com a aplicação da luz laser de baixa potência (InGaAlP,  $\lambda$  685 nm), no protocolo de irradiação utilizado, para este modelo animal, sugere-se que:

- a) A luz laser é capaz de diminuir o número total de granulócitos, após uma única irradiação.



## REFERÊNCIAS

AIMBIRE, F. et al. Low-level laser therapy induces dose-dependent reduction of  $\text{tnf}\alpha$  levels in acute inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery**, New Rochele, v. 24, n. 1, p. 33-37, Feb. 2006.

ALBERTINI, R. et al. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, Lausanne, v. 89, n. 1, p. 50-55, Nov. 2007.

\_\_\_\_\_. Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan-induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, Lausanne, v. 74, n. 2-3, p. 101-107, May 2004.

ANTUNES, H. S. et al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. **Blood**, Washington, DC, v. 109, n. 5, p. 2250-2255, Mar. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

\_\_\_\_\_. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

\_\_\_\_\_. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 16, n. 4, p. 331-342, 1995.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, Malden, v. 31, n. 6, p. 674-686, June 2005.

BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. New biological phenomena associated with laser radiation. **Health Physics**, New York, v. 56, n. 5, p. 687-690, May 1989.

BRUGNERA JÚNIOR, A. et al. **Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica**. São Paulo: Santos, 2003.

CAMPBELL, D. T. **Delineamentos experimentais e quase-experimentais de pesquisa**. São Paulo: EPU, 1979.

CATANZARO, G. S. A: **A patologia básica da cavidade oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

CHAGAS JÚNIOR, O. L. **Avaliação da ação do laser ( $\lambda=685$  nm) sobre os mastócitos: contagem absoluta através do método esteriológico**. 2004. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DMC Equipamentos. **Thera lase**. 2007. Disponível em: <[http://www.dmc-dental.com.br/site/template.asp?ss=produtos\\_detalhe&idp=23&classif=7](http://www.dmc-dental.com.br/site/template.asp?ss=produtos_detalhe&idp=23&classif=7)>. Acesso em: 18 jun. 2007.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GENOVESE, W. J. **Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia**. São Paulo: Lovise, 2000.

GOLDIN, J. R. **Pesquisa em saúde: normas, leis e diretrizes**. 2. ed. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. **KUBY imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 96, n. 5, p. 379-394, May 1988.

KARU, T. I. Photobiology of low-power laser effects. **Health Physics**, New York, v. 56, n. 5, p. 691-701, May 1989.

KNAPPE, V.; FRANK, F.; ROHDE, E. Principles of lasers and biophotonic effects. **Photomedicine and Laser Surgery**, New Rochele, v. 22, n. 5, p. 411-417, Oct. 2004.

KOLÁROVÁ, H.; DITRICHOVÁ, D.; WAGNER, J. Penetration of laser light into the skin in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 24, n. 5, p. 231-235, May 1999.

LEAPER, D. J.; HARDING, K. G. **Wounds: biology and management**. Oxford: Oxford University, 1998.

LI, J; CHEN, J; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 25, n. 1, p. 9-18, Jan./Feb. 2007.

LOPES-MARTINS, R. A. B. et al. Spontaneous effects of low-level laser therapy (650 nm) in acute inflammatory mouse pleurisy induced by carragenan. **Photomedicine and Laser Surgery**, New Rochele, v. 23, n. 4, p. 377-381, Aug. 2005.

LUCAS, C. et al. Wound healing in cell studies and animal model experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified? A systematic review. **Lasers in Medical Science**, London, v. 17, n. 2, p. 110-134, 2002.

MARKOVIC, A.; TODOROVIC, Lj. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing oedema after third molar surgery: a clinical trial. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Copenhagen, v. 36, n. 3, p. 226-229, Mar. 2007.

MELO, C. A. S. et al. Characterization of light penetration in rat tissues. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 19, n. 4, p. 175-179, Aug. 2001.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, 1985.

PANARELLO, A. F. **Avaliação da potência e intensidade do laser não ablativo no processo de inflamação e reparo de tecidos moles**. 2003. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PARWARESCH, M. R. et al. Tissue mast cells in health and disease. **Pathology, Research and Practice**, Stuttgart, v. 179, n. 4/5, p. 439-461, Mar. 1985.

PEREIRA, P. C. M.; BURINI, R. C. Resposta do hospedeiro à infecção: 1 - sistema de defesa e mediadores químicos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 65, n. 4, p. 403-410, jul./ago. 1991.

PEREIRA-PINTO, L. et al. **Patologia básica**: sinopse. Natal: PROIN/EDUFRN, 1997.

PINHEIRO, A. L. B.; FRAME, J. W. Laser em odontologia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 40, p. 327-332, set./out. 1992.

PUGLIESE, L. S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 307-313, Oct./Dec. 2003.

ROCHKIND, S. et al. Systemic effects of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, New York, v. 9, n. 2, p. 174-182, Feb. 1989.

SCHINDL, A. et al. Low-intensity laser therapy: a review. **Journal of Investigative Medicine**, Thorofare, v. 48, n. 5, p. 312-326, Sept. 2000.

SOMMER, A. P. et al. Biostimulation windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, New York, v. 19, n. 1, p. 29-33, Jan. 2001.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Inflamação**: aspectos biodinâmicos das respostas inflamatória e imunológica. Rio de Janeiro: Pedro Primeiro, 1996.

SMITH, P. D. et al. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. **The Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 92, n. 1, p. 11-17, July 2000.

SUN, G.; TUNÉR, J. Low-level laser therapy in dentistry. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 48, n. 4, p. 1061-1076, Oct. 2004.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. **Inflamação**: uma revisão do processo. 4. ed. São Paulo: Quintessence, 1996.

TUNÉR, J.; CHRISTENSEN, P. H. **Low level lasers in dentistry**. Disponível em: <[http://www.laser.nu/llt/Laser\\_therapy\\_%20in\\_dentistry.htm](http://www.laser.nu/llt/Laser_therapy_%20in_dentistry.htm)>. Acesso em: 7 jun. 2003.

VIEGAS, V. N. **Modulação das reações inflamatórias com laser não ablativo ( $\lambda 685$  e  $\lambda 830\text{nm}$ ) durante o reparo de lesões de tecidos moles**: estudo microscópico e dos níveis do mRNA de interleucina-1 $\beta$ . 2005. Dissertação (Mestrado em Odontologia)–Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry: part 1: soft tissue applications. **Australian Dental Journal**, Sydney, v. 42, n. 4, p. 247-254, Aug. 1997.

WEIDNER, N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, The Hague, v. 36, n. 2, p. 169-180, 1995.

ZHONG, F. C.; ZHEN, Z. J. Localization and quantification of histamine in injured skin as parameters for the timing of wounds. **Forensic Science International**, Lausanne, v. 51, n. 2, p. 163-171, Oct. 1991.





**ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*


---

Porto Alegre 02 de julho de 2007

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob n°:** 0094/05  
**Intitulado:** A intensidade do infiltrado inflamatório agudo após irradiação laser de baixa potência: um estudo relacional  
**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli  
**Pesquisadores Associados:** Otacílio Luiz Chagas Júnior  
**Nível:** Doutorado

Foi *aprovado* pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 29 de junho de 2007.

  
**Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS