

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

“Estudo comparativo da ação do laser He-Ne e de mediadores vasoativos (noradrenalina e histamina) na microcirculação de mesentério de ratos”

Purnima Prakki

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

São José dos Campos, SP

2003

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

“Estudo comparativo da ação do laser He-Ne e de mediadores vasoativos (noradrenalina e histamina) na microcirculação de mesentério de ratos”

Purnima Prakki

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, como complementação dos créditos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro

São José dos Campos, SP

2003

P921e

Prakki, Purmina

Estudo comparativo da ação do laser He-Ne e de drogas vasoativas (noradrenalina e histamina) na microcirculação de mesentério de ratos, in vivo, nos quadros de inflamação / Purnima Prakki. São José dos Campos: UniVap, 2003.

p.54: il.; 31cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

1. Laser terapia 2. Microcirculação 3. Inflamação. I. Zângaro, Renato Amaro, Orient. II. Título

CDU: 615.84

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data: 12 de maio de 2003

“Estudo comparativo da ação do laser He-Ne e de mediadores vasoativos (noradrenalina e histamina) na microcirculação de mesentério de ratos”

Purnima Prakki

Banca Examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins (UNIVAP)

Orientador: Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (UNIVAP)

Membro Externo: Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha (UNESP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D

São José dos Campos, 12 de maio de 2003

*Dedico este trabalho ao Marcos, pela cumplicidade e confiança;
aos meus pais, por serem capazes de abdicarem às suas vidas
em favor das de suas filhas e
às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos,
por tudo que sou.*

Agradeço o Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap pela oportunidade de elaborar este trabalho; o Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro, orientador do trabalho; as Profs. Renata Amadei Nicolau e Cláudia Maria Oliveira e a Prof. Dra. Emília Ângela Loschiavo Arisawa, pelo apoio e confiança; o Prof. Dr. Wellington Ribeiro; a Secretaria do IP&D e a Biblioteca Setorial; os alunos, funcionários e professores desta universidade.

Resumo

Vários estudos clínicos utilizando laser de baixa potência em quadros inflamatórios comprovaram a eficiência desse dispositivo de forma a demonstrar efeitos de vasodilatação, aumento de permeabilidade e aceleração de fluxo sanguíneo e linfático da microcirculação do local aplicado, porém poucos estudos quantitativos foram realizados. O objetivo deste trabalho foi quantificar a reação vascular em mesentério de 20 ratos Wistar, *in vivo*. Esses animais foram divididos em dois grupos sendo que no primeiro aplicamos as substâncias

vasoativas e no segundo o laser. A noradrenalina foi aplicada topicamente no mesentério exposto na dose de 10 µg. A histamina foi aplicada 90 segundos após, na dose de 50 µg. No segundo grupo irradiamos o local com laser He-Ne, com densidade de energia de 1 J/cm² e potência de 1 mW. As regiões estudadas foram monitoradas por sistema de digitalização de imagens (câmera CCD e programa *Qwin*), acoplados a um microscópio de fluorescência invertido, para posterior mensuração das áreas dos vasos, comparando-as entre si. Os dois mediadores promoveram o efeito esperado: a noradrenalina provocou vasoconstrição vascular com diminuição da área dos vasos em 15 % (P<0.001) em média e a histamina dilatou o calibre vascular com aumento da área dos vasos em 14 % (P<0.001) em média. O laser provocou uma dilatação no calibre dos vasos aumentando a área desses em média 10% (P<0.001), demonstrando que o laser He-Ne nessa dosimetria exerce um efeito direto sobre a microcirculação, assim como os mediadores químicos. A importância deste trabalho está em contribuir para a identificação dos reais efeitos da luz laser nos vasos sanguíneos, sugerindo a uso desta técnica de forma mais controlada pelos profissionais da saúde, em associação ou até em substituição a drogas antiinflamatórias tradicionalmente utilizadas.

Palavras chaves: laser terapia, microcirculação, inflamação e reatividade vascular.

Abstract

Low level laser therapy has been used as an important tool to minimize inflammatory process. Many clinical studies demonstrated that it causes increase in blood flow and vascular permeability and dilatation in vascular and lymphatic microcirculation, although few quantitative studies have been done. The aim of this work was to quantify vascular reactivity in mesenteric microcirculation of 20 Wistar rats, *in vivo*. These animals were divided into two groups, in the first one we used quimical solution applications and in

the other laser applications. We used 10 µg noradrenalin solution and after 90 seconds 50 µg of histamine administrated topically in the exposed mesentery. In the second group we irradiated He-Ne laser with 1 mW power and energy density of 1 J/cm². All groups were accompanied and photographed with a CCD camera and *Qwin* software installed in a microscope, for forward measurement of the vessels` areas. The first group results were somewhat expected. Noradrenalin caused a reduction of 15 % (P<0.001) on the average of the vessels` areas and histamine increased the vessels` areas in 14 % (P<0.001) on the average. Laser promoted dilatation of the vessels and as a consequence increased the vessels` area in 10 % (P<0.001) on the average. This study is important to identify the real effects of laser therapy on blood vessels, permitting a more controlled use of it by the health professionals, in association or even in substitution to anti-inflammatory drugs.

Key-words: laser therapy, microcirculation, inflammation and vascular reactivity.

Sumário

1. Introdução.....	
.....1	
1.1. Inflamação.....	
.....2	
1.2. Microcirculação.....	
.....4	

1.3. Laser	de	baixa
potência.....		8
1.3.1. Aspectos		
Gerais.....		8
1.3.2. Aplicações		
clínicas.....		14
2. Proposição.....		
.....		15
3. Justificativa.....		
.....		17
4. Material		e
Métodos.....		19
4.1. Animais.....		
.....		20
4.2. Cirurgia.....		
.....		21
4.3. Laser		e
Irradiação.....		22
4.3.1. Determinação	do	tempo
exposição.....		22
4.4. Captação		de
imagens.....		24
4.5. Processamento		de
imagens.....		25
5. Resultados.....		
.....		26
6. Discussão.....		
.....		36
7. Conclusão.....		
.....		42

8. Referências

Bibliográficas.....	44
---------------------	----

Lista de Figuras

1. Desenho esquemático da microcirculação.....	5
2. Gráfico da relação entre variação de pressão e fluxo sanguíneo.....	6
3. Imagem eletromiográfica da vilosidade intestinal de coelhos.....	7
4. Figura da distribuição de pequenos vasos no intestino de ratos.....	8
5. Figura do rato posicionado no microscópio de fluorescência, após a cirurgia para exposição do mesentério.....	21
6 Figura da microcirculação.....	21
7 . Foto do aparelho laser de He-Ne utilizado no experimento.....	22
8 Foto do microscópio posicionado com o spot de laser incidente coincidindo com a objetiva.....	23

9	Foto do equipamento montado para a captação das imagens no mesentério dos ratos.....	24
10	Foto da microcirculação observada durante o experimento.....	25
11	Quadro dos resultados obtidos no grupo dos irradiados.....	30
12	Quadro dos resultados obtidos no grupo das drogas.....	31
13	Gráfico dos resultados obtidos no grupo dos irradiados.....	32
14	Gráfico dos resultados obtidos no grupo das drogas.....	32
15 (a)	Microcirculação antes da aplicação das drogas.....	33
15 (b)	Microcirculação após a aplicação da noradrenalina.....	33
15 (c)	Microcirculação após a aplicação da histamina.....	33
16 (a)	Microcirculação antes da aplicação das drogas.....	34
16 (b)	Microcirculação após a aplicação da noradrenalina.....	34
16 (c)	Microcirculação após a aplicação da histamina.....	34
17 (a)	Microcirculação antes da irradiação do laser.....	35
17 (b)	Microcirculação após a irradiação do laser.....	35
18	(a) Microcirculação antes da irradiação do laser.....	35

18	(b) Microcirculação após a aplicação do laser.....	35
18	Curva de Arndt-Shultz.....	39

Lista de abreviaturas e símbolos

He-Ne – hélio e neônio

µg - micrograma

J – joule

mW – miliwatt

% - porcentagem

TLBP – terapia laser de baixa potência

nm – nanômetros

As-Ga-Al – arsenieto de gálio e alumínio

PgE2 – prostaglandina tipo E2

W – watt

ATP – adenosina trifosfato

MLV – musculatura lisa vascular

mm/Hg – milímetro de mercúrio

PAF – fator ativador de plaquetas

µm - micrômetros

mm/s – milímetro por segundo

DP – densidade de potência

P – potência

t – tempo

DE – densidade de energia

x - vezes

CCI – campo controle irradiado

CI – campo irradiado

CCD – campo controle drogas

CN – campo com noradrenalina

CH – campo com histamina

Ca⁺² – íon de cálcio

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação local e de defesa dos tecidos vascularizados com a finalidade de reparo, podendo, porém acarretar dor, edema e perda de função na região afetada (ROBBINS et al., 1986). Pode ser desencadeada por fatores infecciosos, traumáticos, físicos e químicos sendo bastante uniforme na sua expressão, devido à liberação de mediadores químicos (FLOREY, 1970; HURLEY, 1972; RYAN; MANJO, 1977; GARCIA-LEME, 1989).

Podemos dividir a inflamação nos padrões crônico e agudo. A primeira tem uma maior duração e histologicamente é caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos, pela proliferação de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo. A segunda é uma resposta imediata, inespecífica e representa a ação de vasos presentes na região. É caracterizada pela alteração no calibre vascular e aumento de permeabilidade vascular (CHANDRASSOMA & TAYLOR, 1993).

No momento em que o tecido sofre agressão ocorre degradação dos fosfolipídios constituintes da membrana celular em ácido aracdônico, que possui meia vida curta, sendo metabolizado em duas vias, a da lipoxigenase e da ciclooxygenase. A via do lipoxigenase dá origem aos leucotrienos, responsáveis pela quimiotaxia de células inflamatórias, e as lipoxinas, responsáveis pelo aumento de calibre vascular na microcirculação. A via da ciclooxygenase dá origem as prostaciclina, outro agente vasodilatador, e as prostaglandinas, que causam dor e febre e também aumento de calibre e permeabilidade vascular (GILMAN et al. 1987).

Um dos primeiros efeitos vasculares da inflamação é a vasoconstrição local com a finalidade de evitar grandes perdas sangüíneas. Posteriormente o local é invadido principalmente por neutrófilos e mastócitos. Essas células liberam mediadores químicos

que vão provocar vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e reação de hipersensibilidade. Com a vasodilatação ocorre lentificação da circulação devido à perda de líquido intravascular para o interstício. A estase sangüínea proporciona a marginação de leucócitos, facilitando desta forma a saída dessas células para o local agredido (ALI et al.1997).

A perda de líquido e proteínas para o interstício reduz a pressão oncótica intravascular em relação à pressão extravascular levando a um maior extravasamento de líquido e a seu acúmulo, levando a formação do edema (ROBBINS et al., 1986).

Os mediadores químicos liberados na inflamação exercem funções determinadas em fases específicas do processo. Podem originar-se do plasma como é o caso das cininas (essas também podem ter origem tecidual) e das frações do complemento ou podem ser formados e secretados por células como ocorre com prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, radicais peróxidos, linfocinas entre outros (YOSHIKAI, 2001).

A reação vascular aguda, vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular resultam de uma liberação seqüencial de mediadores de baixo peso molecular como histamina, serotonina e bradicinina (DI ROSA, 1972).

O aumento da permeabilidade é mediado pela histamina, que está estocada nos grânulos dos mastócitos como um complexo heparina-proteína-histamina. Os mastócitos estão espalhados pelo tecido conjuntivo e estrategicamente localizados perto das vênulas das superfícies mucosas. A histamina é liberada pela degranulação do mastócitos. Para que ela tenha ação deve ligar-se aos receptores do sub-tipo H1, H2 e H3 das células endoteliais, provocando contração dessas células, produzindo *gaps* (espaços intracelulares) que possibilitam a passagem de substâncias (CORRÊA & MARTINS, 2001.). A histamina é o primeiro mediador a atuar, mas sua ação é transitória, pois é inativada de forma rápida. Além da função descrita a histamina atua sobre a musculatura lisa das vias aéreas e do sistema gastrointestinal contraindo-a e provocando a produção de muco. As causas que desencadeiam a liberação da histamina são: trauma mecânico, energia radiante, radiação ultravioleta, toxinas bacterianas, componentes do sistema complemento e certas enzimas proteolíticas liberadas pelas células como peptídeos básicos dos neutrófilos e agentes alérgenos (CHANDRASSOMA & TAYLOR, 1993).

Já a serotonina é liberada pelo Fator Ativador de Plaquetas (PAF). O PAF, fosfocolina-acetil-glucérol-éter, é sintetizado a partir dos fosfolipídios da membrana por ativação das fosfolipases. Este mediador, além de estimular as plaquetas, causa vasoconstrição, broncoconstrição e em concentrações extremamente baixas induz dilatação e aumento de permeabilidade venular com potências de 100 para 10.000 em relação a histamina (CHANDRASSOMA & TAYLOR, 1993).

A histamina e a serotonina, liberadas pelos mastócitos e pelas plaquetas, podem ser identificadas no início do processo inflamatório. No ser humano, a histamina é mais importante que a serotonina, e ambas causam vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular (GREAVES & WALL, 1996). Os níveis de histamina diminuem rapidamente dentro de uma hora após o início da inflamação (CLOUGH et al. 1998).

O sistema vascular periférico tem, portanto uma grande importância na regulação da inflamação merecendo considerações a seu respeito.

1.2. MICROCIRCULAÇÃO

O sistema circulatório tem a função de oferecer aos tecidos do corpo sangue suficiente para suprir suas necessidades de oxigênio e nutrientes. A subdivisão deste sistema responsável por essas ações é a microcirculação, composta *grossa modo* por arteríolas, capilares e vênulas, como pode ser observado no esquema da fig. 1 (KROGH, 1919).

As arteríolas, parte aferente da microcirculação, possuem diâmetro de 5 a 100µm e são interpostas por camada muscular espessa, uma adventícia fina e uma única camada endotelial. Podem conectar-se diretamente com os capilares (5 a 10µm) ou, em alguns tecidos específicos, podem ser intermediadas pelas metarteríolas (10 a 20µm), que servem de conexão direta às vênulas eliminando a passagem pela trama capilar. Uma rede ampla de vasos de diferentes comprimentos, que variam de 0.5 a 1mm, é formada pelos capilares a nível tecidual. Possuem uma camada única de células endoteliais que permitem a ocorrência de trocas rápidas com o interstício (JOHNSON, 1983).

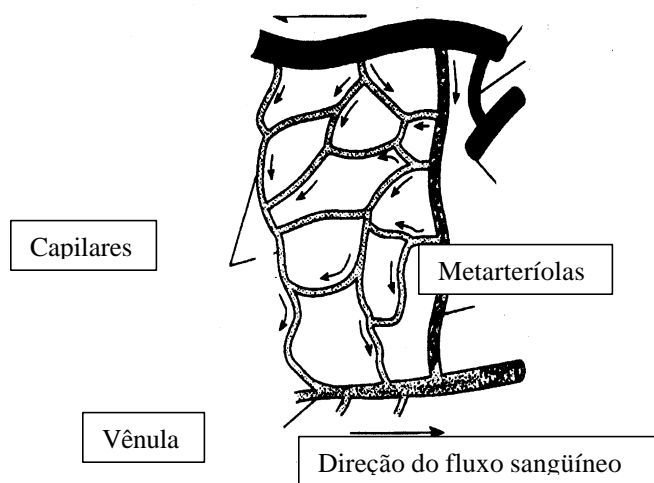


Figura1: Desenho esquemático da microcirculação. As setas indicam a direção do fluxo sanguíneo, que é contrário nas vênulas e arteríolas.

A densidade capilar e o fluxo de sangue são variáveis de acordo com a necessidade metabólica do tecido. A velocidade média do sangue nesses vasos é de 1mm/s, podendo modificar rapidamente através da reatividade vascular dos pré-capilares (JOHNSON, 1983). Esse efeito pode originar-se de fatores externos, controlados pela musculatura lisa dos vasos, ou pode, também, ser influenciado por alterações neuronais e humorais (DULIN & KLITZMAN, 1980).

Durante muito tempo acreditou-se que o endotélio era uma fina camada celular que servia de passagem para água e pequenas moléculas e para retenção de células sanguíneas e proteínas. Porém, atualmente sabe-se que ela participa nas reações musculares dos vasos sanguíneos, sendo este papel fundamental para as atividades vasculares (KUO et al. 1990).

A prostaciclina, formada no endotélio através da degradação do ácido aracdônico, promove relaxamento da musculatura vascular e impede a agregação plaquetária. Outros agentes foram testados *in vitro* para a função de reatividade vascular, como a histamina, acetilcolina, bradicinina e serotonina (FENG & HEDNRE, 1990). Sabe-se que todos esses mediadores promovem a liberação de óxido nítrico, que é um fator de relaxamento derivado do endotélio. O endotélio pode, ainda, liberar endotelina, um vasoconstritor potente que

afeta o tônus vascular e a pressão sangüínea. Esse mediador está envolvido com patologias sistêmicas como: hipertensão pulmonar, doença cardíaca congestiva, arteriosclerose e insuficiência renal (FURCHGOTT & VANHOUTTE, 1989).

A circulação periférica sofre influência do sistema nervoso central e das condições locais dos tecidos que a envolve (HILTON & SPYER, 1980; HIRST & EDWARDS, 1989).

A presença local das arteríolas, também chamadas de vasos de resistência, promove drenagem sangüínea via capilar. A musculatura lisa vascular (MLV) constitui uma grande parte das paredes dos vasos de resistência e tem responsabilidade nestes efeitos (JOHNSON, 1983).

A MLV é formada por pequenas células, mononucleadas e de forma oval, arranjadas de modo circular ao redor das arteríolas. A camada endotelial se projeta para dentro da musculatura em vários pontos surgindo junções mioendoteliais, levando-nos a acreditar numa interação funcional entre as duas estruturas. Quando há uma alteração na osmolaridade, favorecendo a passagem de fluidos para o interior dos vasos, a musculatura lisa contrai para impedir um aumento excessivo no calibre. Da mesma forma, a MLV relaxa com a diminuição da volemia (BERNE; LEVY, 1997).

Jones e Berne, em 1964, realizaram um experimento onde variavam de forma abrupta a pressão de preparados musculares, partindo de uma pressão inicial de 100mm/Hg.

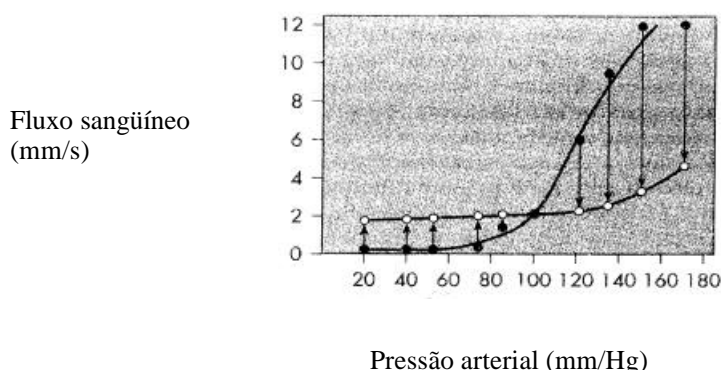


Figura. 2: Variação do fluxo sangüíneo sob diferentes pressões arteriais (JONES & BERNE, 1964).

Para uma variação de 20 a 120mm/Hg o fluxo permanecia relativamente constante, comprovando a ação espontânea da MLV.

Outra forma de controle da reatividade capilar e de seu fluxo dá-se através da via sistêmica, que se instala por intermédio da ação das catecolaminas, principalmente a adrenalina e a noradrenalina (BERNE & LEVY, 1997).

A adrenalina, quando presente em pequenas quantidades, determina uma vasodilatação (efeito beta-adrenérgico). Em grandes quantidades, enseja uma vasoconstrição (efeito alfa-adrenérgico). Já a noradrenalina causa unicamente constrição vascular (efeito alfa-adrenérgico) (HILTON & SPYER, 1980; HIRST & EDWARDS, 1989).

Em certas regiões do organismo, a microcirculação adquire características específicas que estão relacionadas com a atividade de cada tecido.

A circulação visceral consiste no suplemento sangüíneo ao trato gastrintestinal, fígado, baço e pâncreas. A porção intestinal é irrigada pelas artérias celíaca, mesentéria superior e inferior. A mesentéria superior é a maior ramificação da aorta conduzindo 10% de todo débito sangüíneo cardíaco (GRANGER et al. 1989).

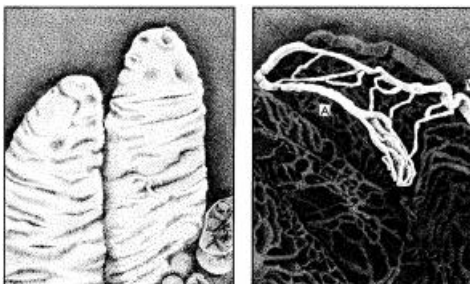


Figura. 3: Esquerda: imagem eletromiográfica da vilosidade intestinal de coelhos. Direita: microcirculação da vilosidade. A: arteríola e V: vênula. (GANNON et al.,1981).

Outras pequenas artérias mesentéricas dão origem as arteríolas, principais vasos das vilosidades. Estas arteríolas se subdividem em duas arteríolas de distribuição (AD) que irão irrigar toda a rede capilar da vilosidade.

A direção do fluxo sangüíneo das veias e dos capilares tem sentido contrário ao das arteríolas. Esse mecanismo facilita a absorção de água e sódio e a difusão de oxigênio. A regulação neuronal é praticamente simpática ocasionando constrição quando excitada,

resposta mediada pelos receptores alfa-adrenérgicos, numerosos nesta porção do sistema circulatório (DONALD & SHEPHARD, 1980).

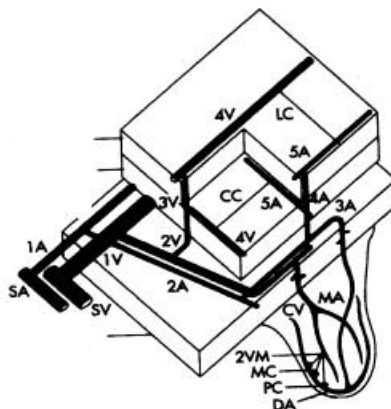


Figura 4: Distribuição de pequenos vasos no intestino de ratos. SA-pequenas artérias; SV-pequenas veias; 1A a 5A-arteríolas de primeira a quinta ordem; 1V a 4V-vênulas de primeira à quarta ordem; LC e CC-capilares em músculos longitudinais e circulares; MA-arteríola principal; CV-veia de coleta; DA-arteríolas de distribuição; 2VM-vênula mucosal de segunda ordem, PC-esfíncter pré-capilar e MC-capilar da mucosa (BOHLEN ; GORE, 1976).

1.3. LASER DE BAIXA POTÊNCIA

1.3.1. ASPECTOS GERAIS DO LASER

O laser (Light Amplification of Stimulated Emission of Radiation) possui características especiais que o diferem da luz comum como monocromaticidade, direcionalidade e coerência conferindo-lhe propriedades terapêuticas específicas assim como vantagens em procedimentos cirúrgicos (FERNANDO et al. 1993). Podem ser classificados em lasers de alta e baixa potência. Os primeiros têm finalidade cirúrgica sendo utilizados para corte, vaporização e coagulação. Enquanto que os de baixa potência

são utilizados na regularização de processos fisiológicos, como a inflamação, a cicatrização e a produção de energia (ATP) (ALMEIDA-LOPES, 1999).

A terapia com laser de baixa potência (TLBP) é uma denominação genérica que define a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminosos monocromáticos e de intensidade relativamente baixa ($<1\text{W}$) para o tratamento de afecções e lesões. É uma potência considerada demasiadamente baixa para produzir qualquer aquecimento detectável nos tecidos irradiados. Assim, a TLBP é uma modalidade terapêutica atérmica e sua finalidade é induzir a fotobiomodulação (KITCEN & BASIN, 1998), utilizando lasers que emitem radiação no vermelho e infravermelho. Esses comprimentos de onda variam de 600 a 1000 nm e são pouco absorvidos pelos tecidos, sendo, portanto bem transmitidos na pele e mucosa (RIGAU, 1996). Os dois meios comumente usados são hélio-neônio, que emitem radiação em 632,8 nm e os semicondutores de arsenieto de gálio e alumínio que emitem entre 630 e 950 nm (KITCEN & BASIN 1998).

O laser pode interagir com o tecido de quatro formas: refletindo, transmitindo, espalhando ou absorvendo a luz incidente. O tipo de interação que produz um efeito terapêutico nos tecidos é a absorção, que se resume na captação de fótons pelas moléculas. Para que esse fenômeno ocorra é necessário um comprimento de onda específico que ao ser irradiado num determinado tecido terá como principal processo de interação a absorção. Esse é um importante conceito para a TLBP, pois essa especificidade determina o tipo de célula que irá absorver preferencialmente a radiação incidente e, conseqüentemente, a sua profundidade de penetração. Nesse caso, o mecanismo para a absorção da luz é classificado como fotoquímico e, em muitos casos, pode resultar em um efeito fotobiológico (TERRIBLE et al. 1992). A luz em comprimentos de onda específicos é prontamente absorvida por uma série de biomoléculas, como a melanina e a hemoglobina, limitando a profundidade de penetração dos fótons a alguns milímetros (TERRIBLE et al. 1992; KITCEN & BASIN, 1998).

Desde os anos 60 diferentes lasers de baixa potência de energia têm sido aplicados em patologias específicas (SCAFFER et al. 2000).

Além do comprimento de onda, outros fatores influenciam os resultados da aplicação do laser em tecido vivo, como a densidade de energia e a densidade de potência. O laser terapêutico inicialmente era utilizado com a potência de 1 mW porque os

equipamentos antigos não eram capazes de produzir potências superiores. Com a evolução técnica desses aparelhos passaram a utilizar potências de 10 a 30 mW, com a manutenção da densidade de energia entre 1 e 4 J/cm², diminuindo assim o tempo de tratamento (BASFORD, 1995).

Em 1969, muito antes da disseminação da técnica de bioestimulação por luz no ocidente, iniciou-se a realização de trabalhos experimentais e em clínica com esse objetivo.

Apesar do mecanismo de bioestimulação permanecer obscuro, Passarella et al. (1984), sugerem que a mitocôndria deva ser a organela alvo da irradiação laser.

Olson et al. (1981), sugere que o efeito primário é a absorção da luz pelas organelas celulares, especialmente a mitocôndria. Karu (1988), em seus trabalhos, notou que esse processo é mediado não somente pela organela, mas pelos componentes da cadeia respiratória, tais como as flavinas e citocromos, resultando numa aceleração da transferência de elétrons em partes da cadeia respiratória.

A energia captada pelas células através da absorção de fótons é utilizada nas reações de oxi-redução da cadeia respiratória, que rotineiramente ocorrem no organismo, otimizando as atividades celulares. Essas ações determinam alterações fotodinâmicas em cascatas de reações nos processos fisiológicos com conotação terapêutica (FUNK et al., 1992; LOEVSHALL & ARENHOLT-BINDSLEV, 1994; LUBART et al. 1992). Portanto, é essencial sabermos a quantidade de energia fornecida ao tecido irradiado, pois, se um grande número de fótons é disponibilizado às células suas cadeias de reações irão saturar e o processo, em cascata da respiração, terá atividade reduzida.

Esses processos podem se manifestar de três modos. O efeito primário ou imediato é um aumento do metabolismo celular (BOLTON et al. 1995; KARU et al. 1989; LIEVENS, 1988), por exemplo, através da síntese de endorfinas e diminuição da liberação de transmissores nociceptivos como a bradicinina e a serotonina. O efeito secundário ou indireto é o aumento de fluxo sanguíneo (KUBOTA & OHSHIRO, 1989; SCHENK, 1985) e da drenagem linfática (LIEVENS, 1986; LIEVENS, 1988; LIEVENS, 1990; LIEVENS, 1991), que ocasionará uma ação mediadora do laser na inflamação. E por fim a instalação de efeitos terapêuticos gerais (MESTER et al. 1977; TRELLES, 1986; TUNÉR & HODE, 1996).

Apesar de seu mecanismo não estar totalmente descoberto, muitas afirmações foram feitas com relação à efetividade da terapia a laser como as ações no crescimento e regeneração celular, efeito antiinflamatório e de redução de edema, revascularização, redução da formação de fibrose e estimulação nervosa. A sua utilização tem sido favorável por ser uma terapia asséptica, não térmica, isenta de dor e de fácil manipulação (ANTIPA et al. 1993).

Trabalhos clínicos realizados comprovaram que esta terapia resulta em alívio da dor miofacial de pontos de gatilho da cabeça e pescoço (SATTAYUT et al. 1994). Da mesma forma Naveh et al. (1991) e Shimizo et al. (1995), obtiveram uma redução no nível de produção das prostaglandinas E2 em tecidos distendidos, mediante a aplicação do laser de As-Ga-Al em baixa potência. Sattayut et al. (1994) afirmaram que a redução de PgE2 em resposta a irradiação pode ser um dos mecanismos pelo qual se processa o efeito analgésico da terapia a laser.

Karu (1988), utilizou em seu experimento o laser de semicondutores As-Ga-Al com comprimento de onda de 820 nm e potência de 40 mW em cultura de células. O resultado obtido foi uma redução na concentração de ATP, atribuído às altas concentrações iniciais de ATP na célula tornando importante constatar o estado inicial do tecido.

Em análises sequenciais descobriu-se que a resposta celular é fraca ou isenta quando o potencial para redução celular é ótimo ou próximo de ótimo, e forte quando o potencial de redução é menor e está deslocada para um estado de menor redução. Essas constatações confirmam que a bioestimulação não é um fenômeno geral, mas sim, que ocorre apenas em circunstâncias especiais (ADAM et al. 1993).

Em outro trabalho, irradiou-se a tireóide por 15 dias com laser de 904 nm e 3,12 J/cm². Nas primeiras 24 horas após o tratamento não havia muitas alterações a nível celular, existia, porém, um edema no estroma. Houve uma dilatação nos capilares incorrendo num aumento de permeabilidade vascular (BENEDICENTI et al. 1984).

Trelles et al. (1988a) pesquisaram os níveis de histamina no sangue e na língua de ratos, utilizando uma densidade de potência de 2,4 J/cm² e potências que variavam de 4 a 50 mW. Alterações marcantes não foram encontradas no sangue dos diferentes grupos irradiados. Porém na língua constatou-se um incremento de 30 % de histamina com a

potência de 50 mW e um aumento de 100 % com a potência de 4 mW, em relação ao grupo controle. Outros trabalhos realizados pelos mesmos autores analisados a nível ultraestrutural revelaram uma importante degranulação de mastócitos após irradiação em língua, utilizando os mesmos parâmetros do trabalho anterior.

O trabalho de Sayed et al. (1990) também comparou a degranulação de mastócitos em pele sã e pele lesionada sob o efeito do laser terapêutico. Utilizaram uma densidade de energia de $10,8 \text{ J/cm}^2$ identificando um aumento no número de mastócitos nos dois grupos, todavia a degranulação só ocorreu na pele lesionada.

Rochkind et al. (1989) compararam a cicatrização de feridas em dorso de animais. Cada animal sofreu duas lesões por queimadura e foram divididos em dois grupos: um controle e outro que recebeu irradiação em apenas uma das feridas. No grupo tratado, a ferida irradiada e a não irradiada cicatrizaram ao mesmo tempo e muito antes das feridas do grupo controle. Este trabalho sugere, portanto a intervenção dos mediadores químicos liberados localmente tendo também eficiência sistêmica.

Esses resultados nos revelam a atuação da radiação de baixa potência na atividade dos mastócitos e nos mediadores que essas células liberam. Esta terapia exerce uma atividade importante de biomodulação na primeira fase da inflamação, tanto na permeabilidade vascular como na liberação de substâncias que influem na regulação e migração linfocitária (VAN NESTE, 1991; REICH et al. 1991).

A drenagem edematosa e a regulação do processo inflamatório são ocasionadas basicamente pela ação do laser na microcirculação sangüínea e linfática. No sistema venoso, o mecanismo deste efeito opera-se fundamentalmente nos esfíncteres dos circuitos capilares terminais, que tem por função controlar a circulação de sangue nos tecidos (BENEDICENTI, 1982; BENEDICENTI et al. 1984; MIRO et al. 1984).

Scaffer et al. (2000) avaliaram o efeito da biomodulação do laser de baixa potência na pele da planta do pé através de ressonância magnética. Obtiveram como resultado aumento da permeabilidade capilar, aumento do fluxo sangüíneo e vasodilatação da região

irradiada. Eles não notaram aumento local da temperatura e concluíram que a biomodulação é um efeito não térmico (RIGAU, 1996; BENEDICENTI, 1982).

Fulga et al. (1994) obtiveram sucesso ao usar a terapia com laser na redução das respostas inflamatórias. Foram analisados dois grupos de ratos com inflamação experimental. O primeiro grupo foi submetido ao tratamento com laser por seis dias e o outro grupo foi mantido como controle. Notou-se que no grupo irradiado 85 % da inflamação havia desaparecido e inexistia qualquer sinal de necrose, enquanto que no grupo controle a regressão foi de 23 % e 8 em 10 animais desenvolveram áreas de necrose.

Lievens (1988) realizou um trabalho sobre cicatrização de feridas medindo nível de edema local e regeneração do sistema linfático e venoso. Ele concluiu que no grupo tratado com laser de baixa potência o edema havia desaparecido em 8 dias, enquanto que nos outros grupos o edema persistiu. Seis meses depois, foi constatado que a permeabilidade vascular e linfática nos locais que receberam a aplicação do laser eram 50 % superior nos grupos tratados com laser.

STEG et al. (1988) estudaram a reação do endotélio da aorta em coelhos, *in vitro*, sob efeito do laser de Argônio. Foram realizadas 175 exposições, em 19 amostras, com potências variando de 0,01 a 6 W. Nas amostras que receberam energia maior que 1 W, houve contração dos segmentos vasculares que se interrompeu tão logo a irradiação foi cessada, e o exame microscópico das amostras evidenciou injúria térmica. Nos segmentos irradiados com 0,01 W ou menos ocorreu relaxamento dos vasos (vasodilatação), que também cessou com a interrupção da luz.

Em estudos com pacientes portadores de problemas inflamatórios pulmonares observou-se um aumento da permeabilidade capilar e formação de edema na fase inicial da doença, causando compressão e desarranjo das células endoteliais e conseqüente hipóxia e fibrose tecidual. O uso do laser nesses pacientes minimizou a inflamação e regulou o processo fibroblástico que produz a reparação no local (POLOSUKHIN, 1999). Segundo Scaffer et al. (2000), este fenômeno ocorre devido à ação dos lasers de baixa potência na cadeia respiratória das mitocôndrias, pela absorção de luz por citocromos, resultando no aumento do calibre e fluxo vascular dos brônquios.

A irradiação in vivo de células tem um efeito bioestimulador com aumento do consumo de oxigênio e glicose celular. De acordo com Miró et al. (1984), a vasodilatação e o aumento da microcirculação são resultados de um aumento do metabolismo tissular e da normalização da homeostase.

1.3.2. APLICAÇÕES CLÍNICAS

O laser de baixa potência tem sido empregado freqüentemente em múltiplas especialidades médicas e odontológicas.

Na clínica odontológica existe uma grande variedade de aplicações sendo freqüentemente usada para a bioestimulação óssea, em casos de implantes e cirurgia oral menor; para a diminuição da dor e do edema no caso de pós-operatórios; em úlcera aftosa recorrente, herpes, nevralgias, hipersensibilidades dentinárias e ativação e recuperação de quadros de paralisia e parestesia (ALMEIDA-LOPES, 1997; ALMEIDA-LOPES, 1998^a).

Em medicina utiliza-se esta terapia para melhorar a cicatrização no tratamento de queimados e de pacientes que receberam algum tipo de enxerto ou retalho, ativando a vascularização dessa região. É também utilizado para tratamento de dores agudas e crônicas, como artrite reumatóide, tendinites e dores de coluna; pós-operatórios diversos e em fisioterapias por profissionais que trabalham em medicina do esporte, devido ao seu emprego com sucesso em quadros de distensões e contraturas musculares (TUNÉR & HODE, 1996).

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

A proposta desse trabalho é quantificar a alteração vascular da microcirculação de ratos, *in vivo*, após a aplicação do laser de He-Ne, comparando-a com a ação da noradrenalina (vasoconstritor), e da histamina (vasodilatador), através da medição da área dos vasos dos campos observados. A visualização da microcirculação é feita em microscópio de fluorescência invertido e as imagens captadas através de sistema de digitalização de imagens, com uma câmera CCD e um computador. A análise quantitativa é realizada com auxílio do programa de imagens *Qwin*.

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

A Terapia com Laser de Baixa Potência tornou-se uma prática nas áreas médicas e sua utilização tem beneficiado os usuários proporcionando maior conforto e mais rapidez na progressão de processos fisiopatológicos do organismo. A motivação em realizar este trabalho está em equipar e aprimorar as técnicas que permitam a visualização e análise de microestruturas, *in vivo*, neste instituto, podendo observar a dinâmica dos processos biológicos no instante em que eles ocorrem. A partir dessas observações contribuiremos para o conhecimento do efeito do laser de baixa potência na microcirculação, podendo esse ser um dado importante para o uso desse dispositivo no alívio dos sintomas inflamatórios e nos processos de reparação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

O experimento foi realizado com a utilização de 20 ratos *Wistar* var: *albinus norvegicus* machos pesando entre 200 e 250 g anestesiados com Zoletil^{®*}, na dose de 0,1 ml/100 g.

Os ratos foram divididos em dois grupos de 10 animais. O primeiro grupo foi submetido à aplicação do laser e no segundo foram utilizadas os mediadores. Primeiramente aplicamos a noradrenalina e depois a histamina, seguindo o modelo da análise da reatividade vascular com a utilização de histamina e noredrenalina de Fortes et al. (1984 1983). A histamina além da vasodilatação tem efeito contrário à noradrenalina sendo, por isso, aplicada no mesmo animal.

Ao utilizar como parâmetro de comparação um grupo com a aplicação de mediadores químicos queríamos identificar o potencial das estruturas vasculares frente a um estímulo sabidamente eficaz. Utilizamos concentrações altas de histamina e noradrenalina, para obtermos os efeitos máximos, para posteriormente enquadrar o efeito do laser nesses resultados.

Os dois grupos tiveram como controle o próprio mesentério antes da aplicação dos agentes físicos e químicos. A comparação dos resultados entre os grupos resumiu-se na comparação das médias dos dados obtidos, como veremos nos tópicos a seguir.

4.2. CIRURGIA

O primeiro grupo teve seu mesentério exposto após a indução da anestesia. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 5 cm na região abdominal atingindo a porção

* Zoletil 50: cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan 1:1. Ind. VIRBAC.

peritoneal. O mesentério foi, então, exteriorizado pelo seu tracionamento e leves compressões na região abdominal. Em seguida, o animal foi posicionado sobre uma placa de vidro devidamente acoplada a um microscópio de fluorescência invertido (*LEICA DMIL, Modelo: 090-135.002*) (Fig. 5). Com um aumento de 40x encontrava-se um campo onde a microcirculação pudesse ser visualizada de forma nítida (Figura 6).

Todo este processo foi realizado no tempo de 5 a 12 minutos. Nesse momento, capturava-se a primeira imagem dos vasos no tamanho e velocidade de fluxo natural.



Mesentério exposto
(sobre placa de vidro)



Figura 5

Figura 6.

Figura 5: Rato posicionado no microscópio de fluorescência invertido, após a cirurgia de exposição do mesentério.

Figura 6: Um exemplo de campo selecionado para o experimento após a cirurgia de exposição do mesentério e visualização com auxílio do microscópio de fluorescência.

4.3. LASER E IRRADIAÇÃO

O laser utilizado foi o He-Ne (Figura 7), com densidade de energia (DE) de 1 J/cm^2 e potência (P) de 1 mW, valores estes preconizados para terapia a laser de baixa potência. A área do feixe medido foi de $0,2 \text{ cm}^2$. A partir desses dados determinamos as outras variáveis para este experimento da seguinte forma:



Figura 7: O aparelho laser de He-Ne (632,8 nm) utilizado no experimento.

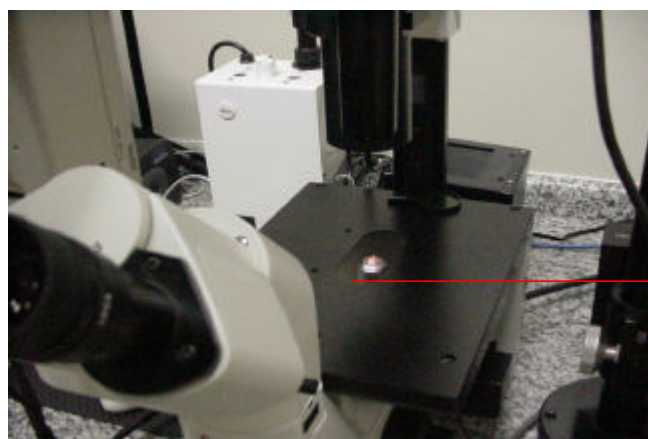
4.3.1. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO (t) PARA A DOSE PRECONIZADA NESSE TRABALHO

$DE = P / A \cdot t$, utilizamos a DE e P preconizados pela literatura para TLBP.

$$1 \text{ J/cm}^2 = 0,001 \text{ W} / 0,2 \text{ cm}^2 \cdot t$$

$$t = 200 \text{ segundos ou 3 minutos}$$

Onde DE é densidade de energia; P é a potência; A é a área do feixe e t é o tempo de irradiação.



Spot laser sobre a objetiva

Figura 8: Coincidência do *spot* laser com a objetiva.

O mesentério foi irradiado de forma pontual exatamente no local observado no microscópio. Isso foi conseguido coincidindo o ponto focal da objetiva sobre o mesentério com o *spot* laser (Fig. 8). Foram submetidos a essa metodologia até três campos por animal. O intestino é formado por muitas alças para que todo comprimento intestinal caiba na região peritonial. Cada campo foi obtido de uma alça diferente do intestino, tomando-se o cuidado de expor uma por vez, evitando, dessa forma, um possível efeito cumulativo do laser. Após a irradiação capturava-se uma nova imagem, dessa vez com as alterações vasculares induzidas, a fim de realizar a comparação.

No primeiro grupo obtivemos duas imagens por campo irradiado. Uma antes e outra após a irradiação. No segundo grupo, por sua vez, cada campo originou três imagens. A primeira antes da utilização dos mediadores, a segunda após a aplicação da noradrenalina e a terceira após a aplicação da histamina.

O segundo grupo passou pelos mesmos procedimentos descritos pelo primeiro até a aquisição da primeira imagem. Nesses ratos, porém, aplicou-se em cada campo uma dose de 10 µg noradrenalina, topicamente. Após 90 segundos, tempo máximo para a constatação do efeito, obtínhamos uma segunda imagem do mesentério. A região foi lavada com soro fisiológico, removendo-se o excesso de líquido com gases. Aplicou-se, na seqüência, uma dose de 50 µg histamina, topicamente. Aguardou-se o tempo de 120 segundos, para assim, adquirir a terceira e última imagem. Nesse grupo, também foram utilizados no máximo três campos por animal, cada qual em uma alça diferente do intestino.

Durante todo o experimento, a região do mesentério exposta foi mantida úmida com a irrigação constante de soro fisiológico. Todos os animais foram sacrificados logo após o procedimento com uma overdose de anestésico.

4.4. CAPTAÇÃO DE IMAGENS

A aquisição das imagens foi feita através de uma câmera CCD (*JVC, Modelo: TK-CI480E*) acoplada ao microscópio e conectada a um computador (Fig. 9). Com a visualização das imagens na tela do computador, através do software de imagens *Qwin*

Standard versão 2.5 (*LEICA-Image Processing and Analysis System*), é possível alterar o tamanho da moldura, congelar e gravar imagens captadas pela câmera e principalmente realizar vários tipos de análises das estruturas presentes nas imagens. É um programa especialmente desenvolvido para o estudo de tecidos biológicos.

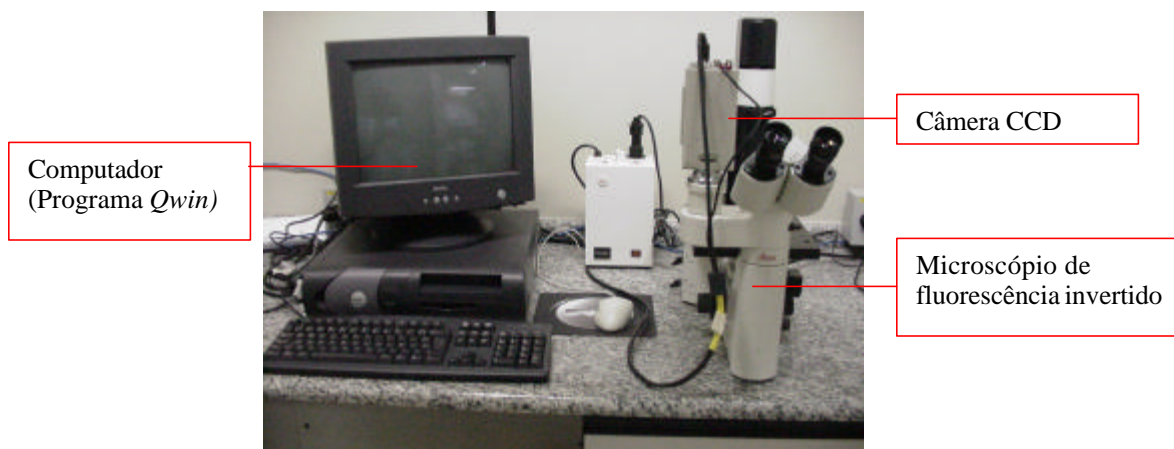


Figura 9: Equipamento montado para a captação das imagens em mesentério de ratos. À direita o microscópio de fluorescência invertido com a câmera CCD acoplada e a esquerda o computador conectado a câmera contendo o software *Qwin*.

3.5. PROCESSAMENTO DAS IMAGENS

Foram medidas as áreas dos principais vasos presentes no campo através de um delineamento manual e uma conseqüente medida automática, com o auxílio do mesmo programa *Qwin*. Extraímos três medidas para cada campo, minimizando, desta forma, o erro no delineamento, totalizando desta forma 30 medidas antes da irradiação, 30 medidas após a irradiação, 30 medidas antes da aplicação das drogas, 30 medidas após aplicação da noradrenalina e 30 medidas após a aplicação da histamina.

Obtivemos as medidas das áreas dos vasos antes e depois da irradiação, no caso do primeiro grupo, e no caso do segundo grupo, a medição das áreas antes e depois da utilização de cada mediador químico.



Figura 10: Exemplo de foto da microcirculação obtida nos experimentos

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os vinte animais utilizados para este trabalho foram divididos em dois grupos, da seguinte forma:

1. Grupo 1: Grupo dos animais submetidos a irradiação do laser He-Ne
 - 1.1. CCL: campo controle irradiado. Grupo dos campos prévios à irradiação.
 - 1.2. CI: campo irradiado. Grupo dos campos após a irradiação
2. Grupo 2: Grupo dos animais submetidos a aplicação dos mediadores, noradrenalina e histamina.
 - 2.1. CCM: campo controle mediadores. Grupo dos campos prévios à aplicação dos mediadores químicos
 - 2.2. CN: campo com noradrenalina. Grupo dos campos após a aplicação da noradrenalina.
 - 2.3. CH: campo com histamina. Grupo dos campos após a aplicação da histamina.

No primeiro grupo, para um total de 10 animais, obtivemos 30 campos controle e 30 campos irradiados correspondentes. No segundo grupo, o número de animais foi o mesmo, porém só foi possível a análise de 27 campos, resultando em 81 imagens (27 controle, 27 com noradrenalina e 27 com histamina). Os dados obtidos de um dos animais foram desprezados porque esse mesentério sofreu dilaceração durante a manipulação, com extravasamento de sangue, impossibilitando a análise.

Após a análise detalhada de cada campo obtivemos os quadros 11 e 12. No primeiro quadro estão os valores das áreas dos vasos obtidos após a mensuração do grupo 1 e no segundo quadro estão os valores das áreas dos vasos obtidos após a mensuração do grupo 2. A última coluna da tabela 11 representa a variação em porcentagem das áreas antes e depois da aplicação do laser e o último número, em destaque no final da tabela, é a média dessas porcentagens. Da mesma forma, a última e a penúltima coluna da tabela 12 são as variações em porcentagem das áreas antes e depois da aplicação da noradrenalina e da

histamina, respectivamente. Os valores finais em destaque são as médias dessas porcentagens.

Analisando os resultados do grupo das substâncias vasoativas observamos que a noradrenalina provocou diminuição na área dos vasos de 15,11%, em média. Uma análise visual, *in vivo*, ou mesmo das imagens demonstram que além da contração vascular essa droga causou diminuição do fluxo sanguíneo, chegando em alguns casos a interromper a circulação. Esse resultado confirma o potencial inerente a microcirculação de reduzir o calibre vascular mediante um estímulo adequado para tal (Tabela 12 e Gráfico 14). A contração vascular era notada no máximo 30 segundos após a aplicação da droga. A imagem, portanto, era obtida decorrido esse tempo ou no momento em que o suprimento sanguíneo era interrompido.

Por outro lado, a histamina promoveu aumento na área dos vasos, pela dilatação vascular em média 14,26%, quando comparados à situação inicial (Tabela 12 e Gráfico 14). Essa droga, aplicada posteriormente a constatação do efeito de constrição da noradrenalina, teve efeito contrário da primeira promovendo aumento do calibre vascular para diâmetros maiores que os controle, além da retomada da aceleração do fluxo sanguíneo. Da mesma forma foi possível, com isso, identificar a capacidade da microcirculação em reagir mediante um estímulo para dilatação vascular. Esses resultados podiam ser observados após no máximo 90 segundos da aplicação do agente químico, sendo esse o momento em que a última imagem era obtida.

A aplicação do laser gerou aumento na área dos vasos dos campos observados de 10,46%, em média, também em comparação à condição inicial de cada campo (Tabela 11 e Gráfico 13). Porém a análise visual não foi suficiente para notarmos aumento do fluxo sanguíneo. A dilatação vascular foi medida em imagens realizadas imediatamente após a irradiação laser.

Além da análise da área dos vasos medimos o volume de sangue contido pra um comprimento de vaso pré-determinado de 100 μ m, chamado de H. Para obtenção desses valores foi preciso determinar o diâmetro da sessão transversal dos vasos. Essas medidas foram obtidas através do programa *Qwin* e estão listados nos quadros 15 e 16, para o grupo controle laser e para o grupo controle dos mediadores químicos, respectivamente.

Medimos, então, o volume médio de sangue no campo controle do grupo laser utilizando o valor médio dos diâmetros dos vasos desse grupo, resultando em $11.626,55\mu\text{m}^3$.

Quando irradiamos o laser e esse diâmetro varia em 10 %, temos um volume maior de sangue circulando por esse local, cujo valor é $14.095,46\mu\text{m}^3$. Podemos notar que o volume de sangue médio após a irradiação teve um acréscimo de 21,2 %, apesar da variação do calibre ser apenas de 10 %.

O mesmo ocorreu no outro grupo. O volume de sangue médio do campo controle foi de $9.864,63\mu\text{m}^3$ e após a aplicação da noradrenalina e da histamina esse volume variou para $7.114,49\mu\text{m}^3$ e $12.821,28\mu\text{m}^3$, respectivamente. Podemos notar uma variação de volume de 27,9 % e de 29,9 %, para a noradrenalina e para histamina, nessa ordem.

Esses valores indicam que um aumento ainda que discreto no calibre vascular provocam uma variação de significativa de volume de sangue que chega ao local analisado, evidenciando a importância desses agentes vasoativos nas alterações da microcirculação (Gráfico 17).

Esses dados nos mostram que os vasos sanguíneos têm a capacidade elástica de variar a sua área aumentando ou diminuindo-na dependendo do estímulo aplicado. O laser teve a capacidade de alterar a área vascular dilatando-na em 10%, o que nos levaria a considerar que o laser de He-Ne, nos parâmetros utilizados neste trabalho, tem um potencial similar ao da histamina e contrário ao da noradrenalina.

A terapia com laser de baixa potência tem a capacidade de aumentar o volume de sangue que circula no local aplicado, otimizando as atividades celulares desse local, pela disponibilização de nutrientes e células de defesa, além da eliminação de restos necróticos e resíduos metabólicos.

CCL (áreas em μm^2)	CI (áreas em μm^2)	Var. da área CCL-CI (%)
3036,98	3165,42	104,23
3411,15	3867,59	113,38
3095,2	3176,96	102,64
3270,57	4128,64	126,24
4490,64	4716,04	105,02
2010,05	2050	101,99
6713,22	6868,75	102,32
7269,37	7546,65	103,81
4191,4	4090,69	97,60
4150,89	4654,22	112,13
4312,19	3659,54	84,86
975,65	913,78	93,66
1029,02	916	89,02
7675,88	8154,85	106,24
2992,75	3161,71	105,65
5834,17	6298,66	107,96
3074,31	3697,11	120,26
1534,63	1574,47	102,60
1581,13	1683,06	106,45
1972,88	1764,13	89,42
4876,34	5298,77	108,66
2600,5	2809,8	108,05
6980,33	6927,29	99,24
2313,79	2385,76	103,11
3919,28	4181,08	106,68
606,93	668,19	110,09
830,38	882,26	106,25
762,41	817,67	107,25
4708,88	5264,81	111,81
9739,09	11218,66	115,19
2778,68	2582,47	92,94
618,65	1787,22	288,89
3336,73	3738,13	112,03
3563,42	3777,33	110,47

Aplicando-se teste de significância ANOVA teremos:

c. cont. laser vs. var. área (%) 41.000 *** $P < 0.001$

campo irradiado vs. var. área (%) 58.000 *** $P < 0.001$

Quadro 11. Valores das áreas dos vasos sangüíneos antes e depois da aplicação do laser e sua variação em porcentagem (%).

áreas em μm^2)	N (áreas em μm^2)	H (áreas em μm^2)	Var. da área CD-N (%)	Var. da área CD-H (%)
2014,77	1743,04	2120,53	86,51	121,66
3520,6	3725,96	4007,07	105,83	113,82
1769,4	1364,8	1962,11	77,13	110,89
1707,92	1549,45	2173,69	90,72	127,27
9107,13	7651,02	8076,72	84,01	88,69
3959,46	3856,03	4626,92	97,39	116,86
3504,12	1792,71	4509,29	51,16	128,69
3838,16	4046,85	5896,54	105,44	153,63
2176,29	1236,55	2841,15	56,82	130,55
1804,3	1594,34	2243,05	88,36	124,32
10820,77	10052,43	13552,11	92,90	125,24
1627,41	1643,17	1899,58	100,97	116,72
6739,35	4026,99	5755,38	59,75	85,40
5707,05	4344,1	4900,76	76,12	85,87
2867,4	2120,81	2990,19	73,96	104,28
7186,64	6676,82	7679,65	92,91	106,86
2489,41	2709,09	3128,52	108,82	125,67
3169,64	2859,46	2994,02	90,21	94,46
2379,77	1732,67	3323,45	72,81	139,65
3715,48	2886,04	5066,08	77,68	136,35
4976,33	4934,44	5687,35	99,16	114,29
5595,13	5121,76	5503,19	91,54	98,36
2067,87	1713,08	2638,45	82,84	127,59
1830,83	1460,39	1764,13	79,77	96,36
1778,28	1318,34	1851,91	74,14	104,14
4103,67	3370,95	3606,89	82,14	87,89
3586,13	3334,66	4287,89	92,99	119,57
3853,37	3291,26	4262,48	84,89	114,26

Aplicando-se teste de significância ANOVA teremos:

c.contr.drogas vs. var. área C-N 84.000 *** $P < 0.001$

c.contr.drogas vs. var. área C-H 57.000 *** $P < 0.001$

c. norad vs. var. área C-N 58.000 *** $P < 0.001$

c. histamina vs. var. área C-N 101.00 *** $P < 0.001$

c. histamina vs. var. área C-H 74.000 *** $P < 0.001$

Quadro 12. Valores das áreas dos vasos sanguíneos antes e depois da aplicação dos mediadores e sua variação em porcentagem (%).

Área dos vasos do grupo laser antes e depois da irradiação
Mean and Standard Error

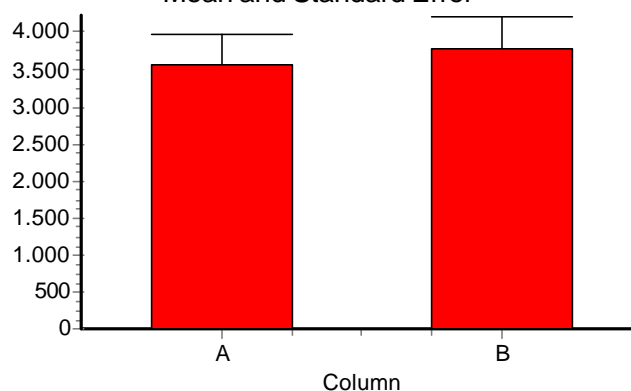


Gráfico 13: Comparação entre as médias das áreas dos vasos dos campos controle irradiado (CCI=A) e campo irradiado (CI=B), do grupo 1.

Valores das áreas dos vasos do grupo dos mediadores químicos
Mean and Standard Error

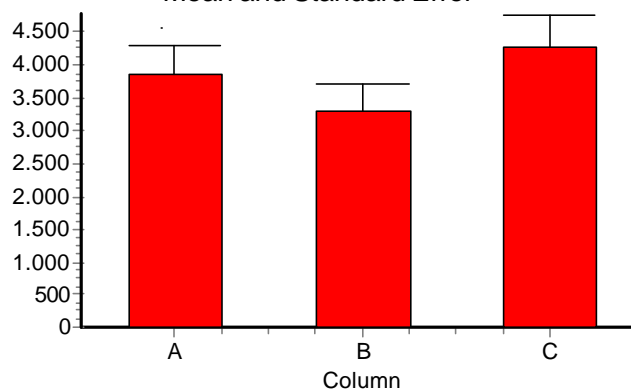


Gráfico 14: Comparação entre as médias das áreas dos vasos dos campos controle mediadores (CCM=A), campo com noradrenalina (CN=B) e campo com histamina (CH=C), do grupo 2.

1. 10.58
2. 25.23
3. 12.54
4. 11.75
5. 13.84
6. 9.21
7. 13.55
8. 11.49
9. 8.74
10. 10.18
11. 8.55
12. 17.95
13. 12.62
14. 10.92
15. 11.65
16. 7.11
17. 6.74
18. 10.38
19. 12.38
20. 12.62
21. 14.16
22. 10.99
23. 10.18
24. 8.14
25. 13.65
26. 13.31
27. 19.25
28. 19.46
29. 10.95
30. 16.93
média: 12,17 μ m
raio: 6,085 μ m
H= 100 μ m

Quadro 15: Diâmetro do maior vaso dos campos controle do grupo laser (μ m)

1. 11.87
2. 6.56
3. 7.65
4. 10.01
5. 10.43
6. 7.90
7. 11.46
8. 15.06
9. 8.14
10. 8.95
11. 7.73
12. 11.40
13. 18.32
14. 8.55
15. 8.55
16. 15.06
17. 9.61
18. 10.11
19. 7.78
20. 14.75
21. 12.02
22. 8.93
23. 11.53
24. 18.41
25. 12.30
26. 16.38
27. 13.11
média: 11,21 μ m
raio: 5,605 μ m
H= 100 μ m

Quadro 16: Diâmetro do maior vaso dos campos controle do grupo de mediadores químicos (μ m)

Onde H, é o comprimento do vaso, previamente padronizado.

Medida do volume médio de sangue dos vasos do grupo laser antes e depois da irradiação.

Medida de volume médio de sangue dos campos controle do grupo laser ($V_m(ccl)$):

$$V_m(ccl) = \delta \cdot r^2 \cdot H$$

$$V_m(ccl) = 3,14 \cdot (6,085\mu m)^2 \cdot 100\mu m$$

$$V_m(ccl) = \mathbf{11.626,55\mu m^3}$$

Medida de volume médio de sangue dos campos irradiados do grupo laser ($V_m(ci)$):

$$V_m(ci) = \delta \cdot r^2 \cdot H, \text{ neste caso } r = 6,085\mu m + 10\% = 6,7\mu m$$

$$V_m(ci) = 3,14 \cdot (6,7\mu m)^2 \cdot 100\mu m$$

$$V_m(ci) = \mathbf{14.095,46\mu m^3}$$

Medida do volume médio de sangue dos vasos do grupo mediadores químicos antes e depois da aplicação

Medida de volume médio de sangue dos campos controle do grupo mediadores químicos ($V_m(ccm)$):

$$V_m(ccm) = \delta \cdot r^2 \cdot H$$

$$V_m(ccm) = 3,14 \cdot (5,605\mu m)^2 \cdot 100\mu m$$

$$V_m(ccm) = \mathbf{9.864,63\mu m^3}$$

Medida de volume médio de sangue dos campos histamina do grupo mediadores químicos ($V_m(ch)$):

$$V_m(ch) = \delta \cdot r^2 \cdot H, \text{ onde } r = 5,605\mu m + 14\% = 6,39\mu m$$

$$V_m(ch) = 3,14 \cdot (6,39\mu m)^2 \cdot 100\mu m$$

$$V_m(ch) = \mathbf{12.821,28\mu m^3}$$

Medida de volume médio de sangue dos campos noradrenalina do grupo mediadores químicos ($V_m(cn)$):

$$V_m(cn) = \pi \cdot r^2 \cdot H, \text{ onde } r = 5,605 \mu m - 15 \% = 4,76 \mu m$$

$$V_m(cn) = 3,14 \cdot (4,76 \mu m)^2 \cdot 100 \mu m$$

$$V_m(cn) = \mathbf{7.114,49 \mu m^3}$$

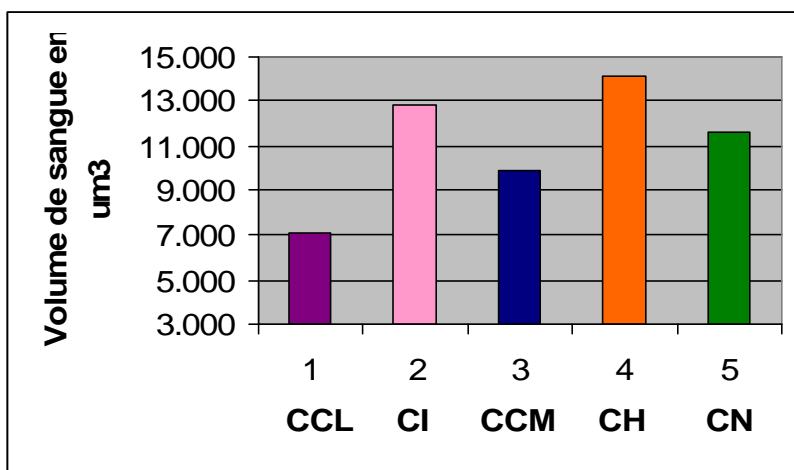


Gráfico 17: Média dos volumes de sangue dos campos dos dois grupos.

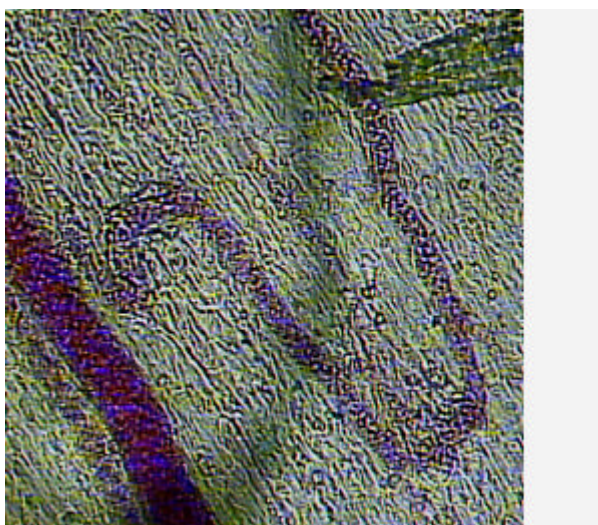


Figura 18a



Figura 18b

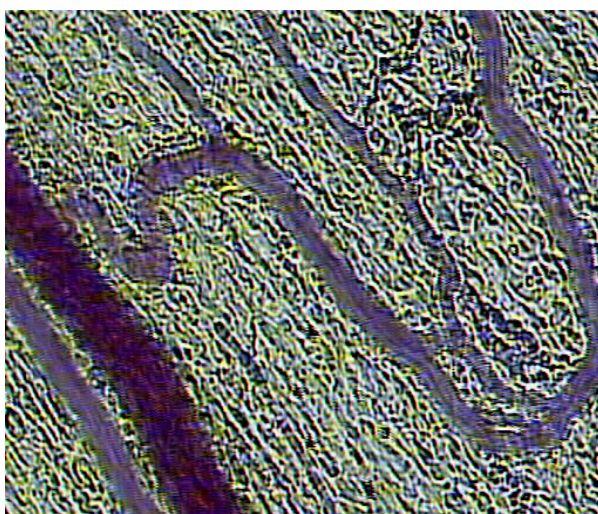


Figura 18c

As imagens correspondem a um campo da microcirculação de um animal que foi submetido à aplicação das drogas. A Figura 18a mostra os vasos na sua conformação natural (controle). A figura 18b mostra a contração após o efeito da noradrenalina e a figura 18c é o mesentério após a aplicação da histamina, mostrando a dilatação vascular. Aumento de 40x.

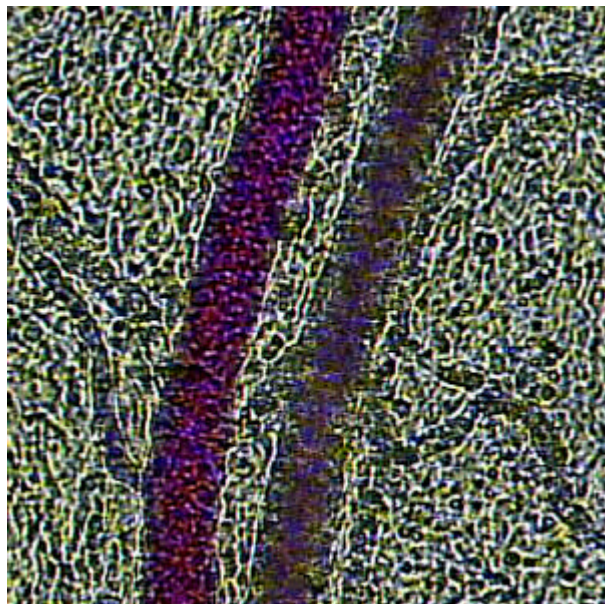


Figura 19a

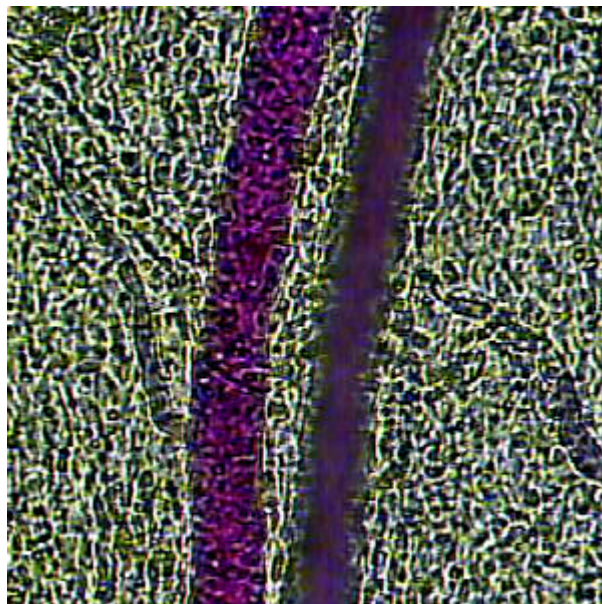


Figura 19b

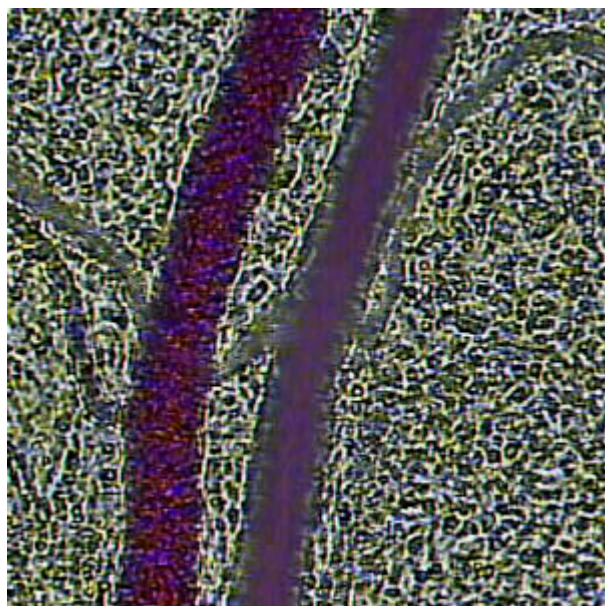


Figura 19c

Outro exemplo de imagens que correspondem a um campo da microcirculação de um animal que foi submetido à aplicação das drogas. A Figura 19a mostra os vasos na sua conformação natural (controle). A figura 19b mostra a contração após o efeito da noradrenalina e a figura 19c é o mesentério após a aplicação da histamina, mostrando a dilatação vascular. Aumento de 40x.

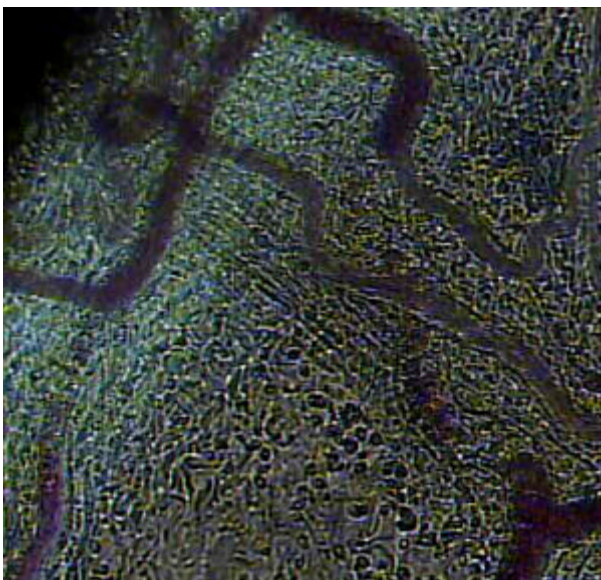


Figura 20a

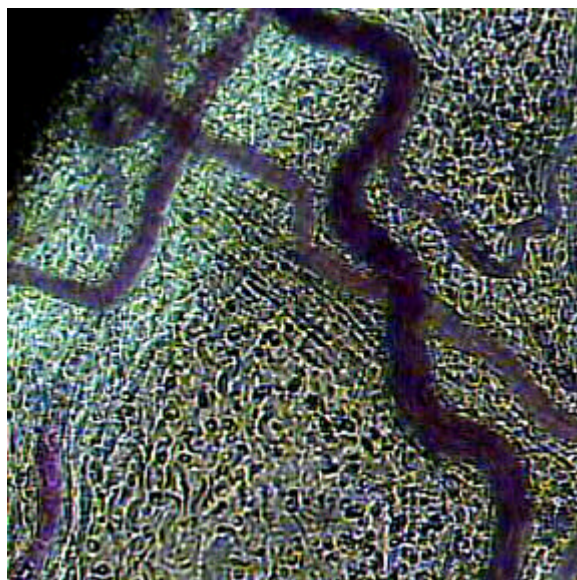


Figura 20b

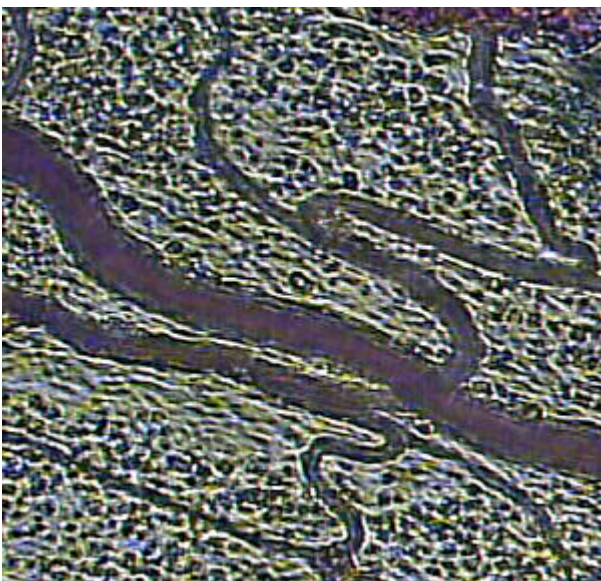


Figura 21a

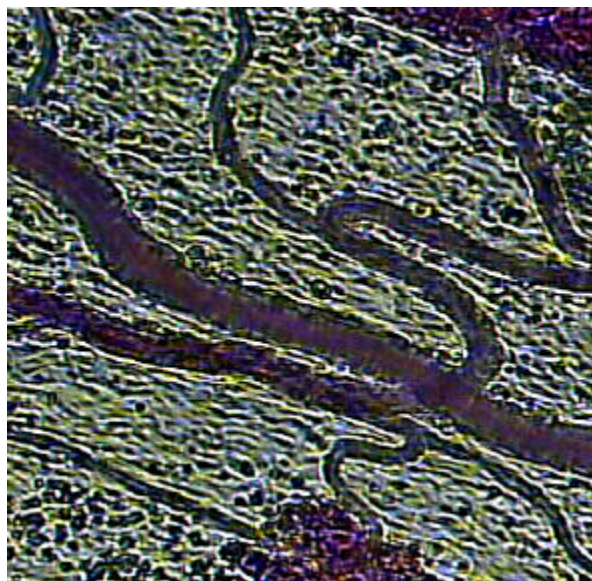


Figura 21b

As imagens acima foram obtidas de dois campos diferentes da microcirculação de animais submetidos à irradiação do laser de He-Ne. As figuras 20a e 21a correspondem à conformação dos vasos antes da irradiação e as figuras 20b e 21b correspondem a conformação vascular depois da irradiação.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O laser de baixa potência tem sido amplamente utilizado no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e em processos de reparação, devido à capacidade de modular os fenômenos naturais de organismos vivos. A inflamação, mesmo fazendo parte da defesa dos tecidos vascularizados, produz desconforto para o paciente por induzir dor e edema decorrentes da liberação de mediadores químicos e dos efeitos vasculares subseqüentes. O tratamento analgésico e antiinflamatório têm tido sucesso com os mecanismos atérmicos da aplicação do laser de baixa potência (AMANO, 1994; HONMURA, 1993; NISHIDA, 1990; CAMPANA, 1998), tornando a inflamação menos traumática para o paciente.

No presente experimento o laser de He-Ne teve ação diretamente sobre a estrutura vascular causando vasodilatação, sendo possível medir através de um programa de imagens o aumento desse calibre. Esses efeitos de biomodulação foram primeiramente descritos por Mester et al. (1977) que mostraram o efeito dos lasers de Argônio e de He-Ne na cicatrização de feridas pelo aumento de colágeno, de leucócitos e da angiogênese. A ação do laser sobre os vasos também foi descrita por Lievens (1991), demonstrando que feridas irradiadas com laser de baixa potência tinham após seis meses uma permeabilidade vascular e linfática 50% superior aos grupos não irradiados. Essa resposta vascular é similar a encontrada por STEG e cols., 1988, que detectaram aumento de calibre vascular quando irradiaram aortas, *in vitro*, com potências inferiores a 0,1 W. Miró et al. (1984); Benedicenti (1982), irradiaram a região mesentérica de ratos com laser de arsenieto de gálio e notaram o mesmo efeito. Para esses autores a circulação nos capilares aumentou provavelmente pelo relaxamento dos esfíncteres pré-capilares, permitindo uma maior vazão sangüínea para a porção pós-capilar. Mayayo & Trelles (1984), observaram o mesmo fenômeno ao irradiar mucosa anal de ratos, região altamente vascularizada.

A aplicação da radiação sobre a microcirculação de ratos gerou um aumento de 10% da área dos vasos nesse trabalho. Esse resultado nos faz crer que o aumento do aporte sangüíneo nessa região é que possibilita a aceleração do reparo tecidual e a ocorrência de efeitos antiinflamatórios e analgésicos, uma vez que o sangue está intimamente ligado a esses processos. Colls (1981), de forma similar, define a vasodilatação da microcirculação

como efeito indireto da aplicação do laser de baixa potência, pela biomodulação que ocorre no metabolismo celular, beneficiando a troficidade local através do aumento do aporte de oxigênio e eliminação dos catabólitos. Esses efeitos favorecem a migração de elementos defensivos, evidenciando o efeito da radiação sobre os processos inflamatórios.

Comparando os resultados deste trabalho com os encontrados na literatura podemos dizer que o laser tem uma capacidade de modulação das atividades celulares, que, nesse caso, induz alterações metabólicas na musculatura lisa que circunda os vasos e nos esfíncteres pré-capilares, relaxando-os e permitindo a passagem de uma maior quantidade de sangue para os tecidos.

Os lasers mais comumente usados para essa terapia apresentam radiação com comprimentos de onda entre 630 e 1300 nm, faixa de luz conhecida como janela espectral para tecidos biológicos (KITCHEN; PARTRIDGE, 1991). O laser de arsenieto de gálio, arsenieto de gálio e alumínio e hélio-neônio são os principais exemplos de lasers que emitem radiação nessa janela espectral. O laser de He-Ne, escolhido para a realização deste experimento, emite radiação na faixa do vermelho e sua limitação é a baixa penetração em tecidos biológicos, quando comparados a lasers que emitem radiação na região do infravermelho próximo (750-950 nm), apesar disso este aspecto não foi um fator negativo para a obtenção do efeito de vasodilatação uma vez que o tecido irradiado havia sido previamente exposto, possibilitando a absorção da energia aplicada. Nasu et al. (2000), usaram técnicas histoquímicas para demonstrar que os níveis de cálcio presentes nas células endoteliais e nas células da musculatura lisa de safenas sofrem redução, gerando o efeito de relaxamento dos vasos sanguíneos. Isso evidencia o efeito de atuação do laser de He-Ne, que mesmo não possuindo alta penetração em tecidos, induz queda nos níveis de Ca^{2+} em toda trama microcirculatória da região aplicada.

As densidade de energia e potência utilizadas neste trabalho foram, 10 mW/cm^2 e 1 J/cm^2 e estão de acordo com trabalhos clínicos que estabeleceram faixas de operação de $0,01$ a 100 mW/cm^2 e $0,1$ a 10 J/cm^2 (TRELLES, 1989; ROCHKIND, 1989; TERRIBLE, 1992; WEI YU, 1994; BOLTON, 1995). Esses dois parâmetros possuem uma grande margem de valores possíveis para a ocorrência da biomodulação, pois a distribuição de radiação depende do coeficiente de absorção de cada estrutura e não só da área, mas também do volume irradiado. Quando densidades de energia muito pequenas são aplicadas,

não há efeito fotobiológico, por outro lado quando é depositada uma grande quantidade de energia sobre um tecido podemos induzir a inibição desse efeito, demonstrando que é fundamental o estabelecimento de uma dose ideal de energia para uma determinada resposta tecidual. Esse fundamento deu origem à curva de Arndt-Schultz (SOMMER et al., 2001), que mostra a intensidade do efeito de biomodulação com a aplicação de diferentes densidades de energia sobre um tecido vivo (Figura 22).

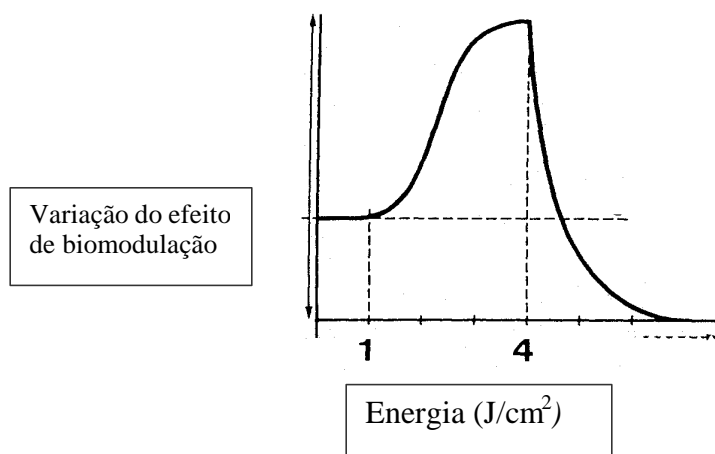


Figura 22: Mostra a intensidade do efeito de biomodulação mediante a aplicação de diversas densidades de energia.

Alguns fatores presentes sobre a ferida podem impedir a absorção de parte da energia depositada sobre o tecido, como a presença de coágulo, exudato e restos necróticos. Este fato impede a transferência de energia para as células viáveis responsáveis pela reparação do local injuriado. Naveh et al. (1991), descreveram a ação do laser de He-Ne na inibição da produção de prostaglandinas E2 e leucotrienos B4 em nervos lesados de cobaias, com potências de 15 mW. Shimizo et al. (1995), encontraram o mesmo resultado ao utilizar laser de As-Ga-Al, com potências de 60 mW. Esses autores concluíram que a radiação do laser de baixa potência provoca alteração do metabolismo do ácido aracdônico reduzindo os níveis de mediadores químicos liberados por esta cascata, amenizando os efeitos nocivos da inflamação. Potências dessa magnitude poderiam inibir o efeito vasodilatador, pois a irradiação com excesso de energia poderia interromper os processos de oxi-redução das células envolvidas.

A terapia com laser de baixa potência é conhecida por induzir efeitos fotobiológicos sem causar aquecimento tecidual, portanto o efeito de dilatação vascular não pode ser atribuído ao calor depositado sobre os vasos. Maegava et al. (2000), utilizaram laser de arsenieto de gálio e alumínio com potências de 0,64 e 3,82 W/cm², em microcirculação de ratos, para a avaliação dos efeitos de dilatação vascular e aumento de temperatura local. Eles obtiveram vasodilatação ao empregar as duas potências, porém somente a segunda promoveu aumento local de temperatura, variando de 0,8^o C a 1^o C. Todavia, a ausência da radiação e a irrigação local com PBS aquecido, elevando a temperatura vascular para os mesmos valores obtidos utilizando laser com potência de 3,82 W/cm², não foram suficientes para promover a vasodilatação. Um dos prováveis mecanismos do aumento do calibre vascular e aumento da microcirculação em locais inflamados seria a alteração no metabolismo das células endoteliais, permitindo o seu relaxamento. Terapia laser produz relaxamento inclusive da musculatura lisa (STEG, 1988), presente sobre os vasos, permitindo que a pressão intravascular cause um aumento nesses calibres. Outro mecanismo descrito por Olson et al. (1981) seria a absorção da luz pela mitocôndria gerando uma aceleração na cascata da cadeia respiratória e otimizando as funções celulares. Karu (1988), porém, sugere que componentes da cadeia respiratória, como flavinas e citocromos, possuem coeficiente de absorção elevado para os comprimentos de onda na região do vermelho e infravermelho, captando os fótons emitidos pelo laser.

Os mediadores químicos utilizadas nesse trabalho, noradrenalina e histamina, também foram eficazes para provocar a contração e a dilatação vascular. Esses efeitos, mediante a aplicação tópica em mesentério de ratos, *in vivo*, foi demonstrada por Fortes et al. (1983, 1984). A histamina responsável pela dilatação vascular promoveu aumento de 14%, em média, nas áreas dos vasos analisados, permitindo afirmar que o laser, com a dosimetria empregada neste experimento, possui uma capacidade similar a da histamina, ou seja, produzindo um aumento de 10%, em média, nas áreas dos vasos estudados. Alguns autores demonstraram que o laser de baixa potência poderia induzir o aumento nos níveis de histamina extracelular, causando o efeito dilatador. Trelles et al. (1988), utilizaram laser de He-Ne em língua de ratos e notaram um aumento nos níveis locais de histamina. Em outro trabalho observaram que a irradiação em língua de ratos resultou em aumento de calibre vascular devido a maior degranulação de mastócitos. Sayed et al. (1990),

quantificou o aumento no número de mastócitos e na sua degranulação ao irradiar pele lesionada com diferentes comprimentos de onda (660, 820, 870, 880, 940, 950 nm).

A noradrenalina, por sua vez, reduziu a área dos vasos, em média 16%, promovendo sobre a microcirculação um efeito contrário ao induzido pelo laser. Este fato apenas confirmou o efeito dessa droga, porém sua utilização foi relevante para demonstrarmos a capacidade elástica da microcirculação, tanto para a dilatação como para a contração.

Clinicamente essas alterações vasculares podem ser benéficas para o tratamento de patologias microvasculares ou em pós-operatórios. Carrilo et al. (1990), na tentativa de demonstrar a eficiência dessa técnica na redução de edema pós-operatório, compararam a ação de antiinflamatórios não esteroidais e o laser de He-Ne, em extrações de terceiros molares impactados. A porcentagem de trismo (intimamente ligada com edema) nos grupos tratados com laser e com ibuprofeno foram significativamente inferiores à quantidade encontrada no grupo placebo. Outro trabalho, realizado por Fernando et al. (1993), não identificou diferenças significativas ao usar laser ou placebo nas extrações de terceiros molares, após um período de três dias. O laser operando na região do infravermelho (820 nm) e potência de 30 mW foi utilizado para irradiar o interior de alvéolos dentários por 132 segundos com densidade de energia de 4 J/cm². Para Carrilo et al. (1990) a ausência de resposta mediante a radiação ocorreu devido a baixa energia empregada, e sugere que se aumente o tempo de exposição em cada alvéolo com a finalidade de aumentar a energia empregada.

Os resultados obtidos evidenciam a importância deste tipo de radiação em processos fotobiológicos. O laser de baixa potência tem um efeito de biomodulação que resulta em aumento do calibre vascular e aumento do fluxo sanguíneo nas áreas aplicadas. O desenvolvimento dessa pesquisa permitiu a constatação do efeito do laser de He-Ne sobre a microcirculação e tornou possível a quantificação do aumento da área vascular ocorrido. A continuidade deste trabalho prevê a utilização de outras dosimetrias para o laser e de outros mediadores químicos, no intuito de obtermos uma curva dose-resposta, possibilitando a otimização de tratamentos clínicos.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que:

- O laser de He-Ne com densidade de potência de e densidade de energia de induz a dilatação vascular da microcirculação
- A dilatação vascular resultante da aplicação do laser aumenta a área dos vasos de um determinado campo em 10%, na média.
- A histamina aplicada topicamente na dose 50 μg de induz dilatação vascular da microcirculação, aumentando em média 14% a área dos vasos de um determinado campo.
- A noradrenalina aplicada topicamente na dose 10 μg de induz contração vascular da microcirculação, reduzindo em média 15% a área dos vasos de um determinado campo.
- O laser de He-Ne, nos parâmetros utilizados neste experimento, possui um potencial similar ao da histamina em produzir vasodilatação da microcirculação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, R.; MESTER, M. D.; KLARA BARABAS, M. D. Nd phosphate-glass laser in low power applications (biostimulation). *Medical Applications of Laser*, p.401-406, 1993.

ALI, H. et al. Mechanisms of inflammation and leucocyte activation. *Medical Clinics of North America*, v.8, n.1, 1997.

ALMEIDA-LOPES, L. Laser. *J Brás Odontol Clin*, v.1, n.4, p.3-5, 1997.

ALMEIDA-LOPES, L. Aplicações clínicas do laser não cirúrgico. In: BRUGNERA, A. Jr.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998^a.p.99-120.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de genhiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

AMANO, A. K. et al. Histological studies on the reumathoid synovial membrane irradiated with a low energy laser. *Laser in Surgery and Medicine*, v.15, p.290-294, 1994.

ANTIPA, C.; DONA, D.; PODOLENU, A. Use of pulsed laser therapy (Ga-As) in combined treatment of posttrumatic swellings and some dermatological disorders. *Medical Applications of Laser*, p.401-406, 1993.

ATAKA, I.: Studies of Hd:YAG low power laser irradiation on stellate ganglion. In: **Lasers in dentistry**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p.271.

BASFORD, J. R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. *Lasers Surg. Med.*, v.16, p. 331-342, 1995.

BENEDICENTI, A. La Valutazione Dell'effetto Della Luce Laser 904nm Nella Circolazione Ematica in vivo. *Atlante de Laser Terapia*. Cuneo, Ed. Langa Grafica, p.71-83, 1982

BENEDICENTI, A.; VERRANDO, M; CHERLONE, F.; BRUNETTI, O. Effect of 904nm laser on microcirculation and arteriovenous circulation as evaluated using telethermography imaging. *Parodontol. Stomatol. (nuova)*, v. 23 , n.2, p. 167-178, 1984.

BOHLEN, H. G. & GORE, R. W. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculation studies. *Microvascular Res*, v.11, p.103-110, 1976.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. The direct effect of 860nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human fibroblasts in vitro. *Laser Therapy*, v. 7, p.55-60, 1995.

CAMPANA, V. R. et al. Effect of diclofenac sodium and He-Ne laser irradiation on plasmatic fibrinogen levels in inflammatory process. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v.16, n.3, p.317-320, 1998.

CARRILLO, J. S. et al. A randomized double-blind clinical trial on the effectiveness of He-Ne laser in the prevention of pain, swelling and trismus after removal of impacted third molars. *Internacional Dental Journal*, v.40, p.31-36, 1990.

CHANDRASSOMA, P. & TAYLOR, C.: Patologia Básica. São Paulo: Prentice Hall do Brasil, p.31-41, 1993.

COLLS, J.: *La terapia laser, hoy*. Barcelona: Centro de documentación Laser, p. 39-70, 1981. APUD

CORRÊA, F. I.; MARTINS, R. A. B. L. **Comparação do efeito antiinflamatório dos lasers de baixa potência AsGa e AsGaAl em modelo experimental de edema de pata em ratos e peritonite em camundongos induzidos por carragenina, LPS e 48/80.** 2001.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)- Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

CLOUGH, G. F.; BENNET, A. R.; CHURCH, M. K. Effects of H1 antagonists on the cutaneous vascular response to histamine and bradykinin: a study using scanning laser Doppler imaging. *British Journal of dermatology*, v.138, p.806-814, 1998.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. PARENTE, L. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and leucocyte emigration. *J Pharm Pharmacol*, v.24, p.575-577, 1972.

DONALD, D.E. & SHEPHERD, J.T. Autonomic regulation of the peripheral circulation, *Annu Rev Physiol*. v.42, p.429, 1980.

DULIN, B.R.; KLITZMAN, B. Local control of micro vascular function: role in tissue oxygen supply, *Annu Rev Physiol* v.42, p.373, 1980.

FENG, Q. & HEDNER, T. Endothelium derived relaxing factor (EDRF) and nitric oxide II. Physiology, pharmacology and pathophysiological implications, *Clin Physiol*, v.10, p. 503, 1990.

FERNANDO, S.; HILL, C.M.; WALKER, R.: A randomized double blind comparative study of low level laser therapy following surgical extraction of lower third molar teeth. *British J Oral Maxillofac Surg*, v.31, p.170-172, 1993.

FLOREY, H.W. Inflammation. In: FLOREY, H.W. (Ed.) **General Pharmacology**. 4ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1970, p.22-123.

FORTES, Z. B.; GARCIA LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Influence of diabetes on the reactivity of mesenteric microvessels to histamine, bradykinin and acetylcholine. *Br. J Pharmacol*, v.78, p. 39-48, 1983.

FORTES, Z. B.; GARCIA LEME, J.; SCIVOLETTO, R. Vascular reactivity in diabetes mellitus: possible role of insulin on the endothelial cell. . *Br. J Pharmacol*, v.83, p.635-643, 1984.

FULGA, C.; FULGA I. G.; PREDESCU, M. Effect of laser therapy on experimental inflammation in rats. *Ram J Intern Med*, v.32, n.3, p.227-233, 1994.

FUNK, O.J.; KRUSE, A.; KIRCHNER, H. Cytokine productions after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *J Photochem Photobiol B: Biol*, v.16, p.347-355, 1992.

FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium derived relaxing and contracting factors, *FASEB J*, 3:2007, 1989.

GANNON, B. J.; GORE, R. W.; ROGERS, P. A. W. Circulation. *Biom Res*, v.2, p.235, 1981.

GARCIA-LEME, J. **Hormones and Inflammation**. Boca Raton: BRC Press, 1989.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T. W.; MURAD, F. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1987.

GORE, R.W.; BOHLEN, H. G. Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi. *Am J Physiol*, v. 233, n.6, p.H685-H693, 1977.

GRANGER, D.N.; KVIETYS, P.R.; KIRTHUIS, R.J, PREMEN, A.J. *Microcirculation of the intestinal mucosa*. In: **Handbook of physiology**, Section 6: *The gastrointestinal system-motility and circulation*, Bethesda, (Md): American Physiological Society.1989.v.II.

GREAVES, M. W.; WALL, P. D.: Pathophysiology of itching. *Lancet*, v.348, p.938-40, 1996.

HILTON ,S.M.; SPYER, K.M. Central nervous regulation of vascular resistance, *Annu Rev Physiol*, v.42,p.399, 1980.

HIRST GDS, EDWARDS FR: Sympathetic neuroeffector transmmition in arteries and arterioles, *Physiol Rev*, n.69, p. 546, 1989.

HONMURA, A. et al. Analgesic effect of GaAlAs diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers in Surgery and Medicine*, v.13, p.463-469, 1993.

HURLEY, J.V. **Acute inflammation**. London: 1972.

JOHNSON, P.C. *The myigenic response*. In **Handbook of physiology**, Section 2: The cardiovascular system-vascular smooth muscle, Bethesda (Md): American Physiological Society. 1983, v.II.

JONES, R. D.; BERNE, R.M. Circulation. *Cir Res*, v.14, p.126, 1964

KARU, T.I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.*, v.2, p. 53-74, 1988.

KARU, T.; RYABYKH, T.P.; FEDOSEYEVA, G.E., PUCHKAVA, N.I. Helium-Neon laser induced respiratory burst of phagocytes cells. *Lasers Surg Med*, v.9, p.585-588, 1989.

KITCHEN, S.; BASIN, S. *Eletroterapia de Cleyton*. São Paulo: Manole, 1998. p.191-210.

KITCHEN, S. S.; PARTRIDGE, C. H. A review of low intensity laser therapy: parts 1, 2 and 3. *Physiotherapy*, v.17, n.3, p.166-170, 1991.

KROGH, A. . The number and distribution of capillaries in muscle with calculation of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J Physiol*, v.52, p.409, 1919.

KUBOTA, J. & OHSHIRO, T. The effects of diode laser low reactive laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. *Laser Therapy*, v.1, n.3, p.127, 1989.

KUO, L.; DAVIS, J.J.; CHILIAN, W.M. Endothelium dependent flow induced dilatation of isolated coronary arterioles, *Am J Physiol*, n.259, p.H1063, 1990.

LARSON, R.; HENSON, P.M. Mediators of Inflammation. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 1, p. 335-359, 1983.

LIEVENS, P. The influence of "Laser Irradiation" on the motricity of lymphatic system and in the wound healing process laser. IN: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICAL AND SURGERY: **Proceedings...** Bologna: Monduzzi, 1986. P. 171-174.

LIEVENS, P. Effects of the laser treatment on the lymphatic system and wound healing. *J Eur Med Laser Ass*, v.1, n.2, p.12, 1988.

LIEVENS, P. C. The effect of a combined He-Ne an I.R. laser treatment on the regeneration of the lymphatic system during the process of wound healing. *Laser News*, v.3, n.3, p.3-9, 1990.

LIEVENS, P.C. The Effect of I.R. Laser Irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Med Sci*, v.6, p.189-191, 1991.

LOEVCHALL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucous fibroblast in vitro. *Lasers Surg Med*, v. 14, p. 347-354, 1994.

LUBART, R.; WOLLMAM, Y.; FRIEDMANN, H.; ROCHKIND, S.; LAULICHT, I. Effects of visible and near infrared lasers on cell cultures. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, v. 12, p.305-310, 1992.

MAEGAWA, Y. et al. Effects of ear infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*, v.27, p.427-437, 2000.

MAYAYO, E. & TRELLES, M. A. Irradiación laser experimental de la mucosa anal en el ratón de laboratorio. *Inv. Clin. Laser I.*, v.4, p.28, 1984.

MIRÓ, L.; COUPE, M.; CHARRAS, C.; JAMBON, C. E CHEVALIER, J.M. Estudio capilaroscopio de la acción de un láser As-Ga sobre la microcirculación. *Inv. Clinica Laser*, v.1, p. 9-14, 1984.

MESTER, E.; NAGYLUKSKAY, S.; TISZA, S.; MESTER, A. Wundheilung und regeneration. Neuere untersuchugen über die wirkung der laserstrahlen auf die undheilung - -Immunologische effect. *Z Exper Chirurg*, v.10, p.301, 1977.

NASU, T. Effects of zinc ions Ca^{2+} uptake during histamine-induced contraction in guinea-pig taenia coli. *Fundam Clin Pharmacol*, v.14, n.6, p.569-575, 2000.

NAVEH, N. et al. Argon laser irradiation of rabbits eyes-changes in prostaglandine E2 levels. *Prostaglandines*, v.41, p.143-155, 1991.

NISHIDA, J. et al. Histological evaluation of the effect of He-Ne laser irradiation on the synovial membrane in rheumatoid arthritis. *Jap J Rheumatol*, v.2, p.251-260, 1990.

OLSON, J. N.; SHIMMERLING, W.; TOBIAS, C. A. Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res*, v.204, p.436-440, 1981.

PASSARELLA, S. et al. Increase in foton electrochemical and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by He-Ne laser. *Febs Letters*, v.175, n.1, p.95, 1984.

POLOSUKHIN, V. V. Ultra structural study of the destructive and repair processes in pulmonary inflammation and following endobronchial laser therapy. *Virchows Arch*, v.1, p.13-19, 1999.

REICH, J.D. et al. The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. *J Am Acad Dermatol*, v.25, n.1, p.40-46, 1991.

RIGAU, J. **Accion de la luz laser a baja intensidad en la modulacion de la funcion celular. Reus**, 1996. *Tese (Doutorado em Histologia)- Faculdade de Medicina i Ciencia de la Salut*. Univ. Rovira i Virgili.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p.39-82.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLAREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D.G. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers Surg Med*, v.9, p. 174-182, 1989.

RYAN, G.; MANJO, G. Acute inflammation, a review. *Am J Phatol.*, v.86, p.185-210, 1977.

SATTAYUT, S.; HUGHES, F.; BRADLEY, P. 820 nm gallium aluminum arseniede laser modulation of prostagladine E2 production in interleucine I stimulated myoblasts. *Laser Therapy*, v.11, n.2, p.88-95, 1999

SAYED, S. O. & DYSON, M. Comparison of the effect of multi-wavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and of each individual diode on mast cells number and degranulation in intact and injured skin. *Lasers Surg Med*, v.10, n.6, p.59-68, 1990.

SCAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; SCAFFER, P. M.; BUSH, M.; REISER, M.; DÜHMKE, E. Effects of 780nm diode laser irradiation on blood microcirculation: preliminary finding on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Photoch Photobio*, v.54, p.55-60, 2000.

SCHENK, P. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von oralen Schleimhautepithelien nach Bestrahlung mit dem Helium-Neon-Laser. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichts Chir*, v.9, p.278, 1985.

SHIMIZO, N. et al. Inhibition of prostaglandine E2 and interleukin 1-beta production by low-power laser irradiation in stretched periodontal ligaments cells. *J Dental Res*, v.74, p.1382-1388, 1995.

SOMMER, A. P. et al. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*, v.19, n. 1, p.29-33, 2001.

STEG, P.G. et al. Effect of argon laser irradiation on rabbit aortic smooth muscle: evidence for endothelium independent contraction and relaxation. *Cardiovascular Research*, v.22, p.747-753, 1988.

TRELLES, M. A. Herpes genital y láser de baja potencia. *Inv Clin Laser II*, v.3, p.120, 1986.

TRELLES, M. A. et al. Histamine and low power laser. *J Bloodless Med Surg*, v.6, n.1, p. 15-16, 1988^a.

TRELLES, M. A. et al. The action of low reactive level laser therapy (LLLT) on mast cells: a possible pain relief mechanism examined. *Laser Therapy*, v.1, p.27-30, 1989.

TERRIBLE, W. M. V. Experimental wound healing with coherent and non-coherent radiation. *Laser Technol*, v.2, n.3, p.121-134, 1992.

TUNÉR, J.; HODE, L. **Laser therapy in dentistry and medicine**. Stockholm: Prima Books, 1996.

VAN NESTE, D.: Skin response to histamine. *Acta Dermatol Venereol* (Stoch), v.71, p.25-28, 1991.

WEI, Y.U.; NAIM, J. O.; LANZAFAME, R. J. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *J Photochem Photobiol B: Biol*, v.59, n.2, p.167-170, 1994.

YOSHIKAI, Y.: Roles of prostaglandins and leucotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection –current opinion in infectious diseases, v.14, n.3, p.257-263, 2001.