

FABIANO SOUSA BARBOSA

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA GÁLIO-ALUMÍNIO-
ÍNDIO-FÓSFORO NA INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

FABIANO SOUSA BARBOSA

**EFEITO DA LASERTERAPIA DE BAIXA POTÊNCIA GÁLIO-ALUMÍNIO-
ÍNDIO-FÓSFORO NA INFLAMAÇÃO GRANULOMATOSA EXPERIMENTAL
EM CAMUNDONGOS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Estrutural, para obtenção do título de
“Magister Scientiae”.

APROVADO EM: 16 de maio de 2008

Prof. Marcelo José Vilela
(Co-orientador)

Prof. Gustavo Pereira Benevides
(Co-orientador)

Prof. Sergio Luis Pinto da Matta

Prof. Carla Cilene Matos Silva

Prof. Clovis Andrade Neves
(Orientador)

DEDICO

A meus pais Helena e Manoel e a meu tio Paulo Barbosa, pois iluminaram meu caminho com a luz mais intensa que encontraram: o Estudo.

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares que, mesmo à distância, são minha fonte de apoio e incentivo.

À Vanessa, minha querida e amada esposa, cuja paciência, dedicação e carinho mostraram-se incansáveis, sou grato por sua cumplicidade e qualificada colaboração científica.

Ao estimado professor Clóvis Andrade Neves, mestre, orientador e companheiro participativo de todas as etapas deste estudo, cujo peculiar zelo e cuidado primoroso ficaram marcados neste trabalho.

Ao professor Marcelo Vilela, importante mestre com quem tive a oportunidade de conviver nestes últimos dois anos, agradeço por sua dedicada participação na confecção desta obra.

Ao professor Gustavo Benevides pelas valiosas sugestões no momento da redação deste manuscrito.

Aos professores Sergio da Matta e Carla Cilene pela disponibilidade ao aceitar o convite para compor a banca avaliadora deste estudo.

Ao professor Helvécio Póvoa pela fundamental participação na primeira fase do experimento.

Ao amigo Simão Pedro pela simpatia e apoio nesta caminhada.

Aos amigos Eustáquio Oliveira e Rafael Gonzalez, monitores que compartilharam na logística desta pesquisa, mantendo a ordem, limpeza e boas condições de trabalho nos laboratórios da FAMINAS.

Aos funcionários do Laboratório 305 da Faculdade de Minas/Muriaé: Wander Luiz, Eliezer, Maria Aparecida, Emílio e Guilherme.

À professora Silvia Pompolo pela gentileza em ceder seu laboratório e materiais para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa.

Ao amigo Alex pela pronta disponibilidade e gentil colaboração com esta pesquisa.

À amiga Lamara pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho.

À amiga Mariana Lana pelas horas desprendidas para auxiliar-me na tradução para língua inglesa.

Aos amigos Célber Limonge e Cristina Boock pela incansável prestatividade.

Aos amigos André Chediek e Tiago Rezende por se mostrarem sempre solícitos a ajudar-me.

Aos meus contemporâneos amigos da Biologia Celular e Estrutural pela força compartilhada nesses dois anos.

Enfim, meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. A pele.....	01
1.2. Processo inflamatório.....	02
1.3. Laser.....	08
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivo específico.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das etapas do estudo.....	17
Figura 2. Procedimento cirúrgico.	18
Figura 3. Aparelho Laser de Baixa Potência utilizado neste estudo.....	19
Figura 4. Irradiação pelo Laser.....	20
Figura 5. Grades circulares do aplicativo <i>Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetcs)</i> sobre a imagem.....	21
Figura 6. Número de polimorfonucleares (PMN) encontrado nas lamínulas em função do tempo.....	23
Figura 7. Fotomicrografia das Células Inflamatórias em lamínulas inseridas no dorso de camundongos.....	24
Figura 8. Número de Macrófagos/fibroblastos (MAC) encontrado nas lamínulas em função do tempo.....	25
Figura 9. Número de células gigantes (CG) encontrado nas lamínulas em função do tempo.....	26
Figura 10. Número de Linfócitos (LINF) encontrado nas lamínulas em função do tempo.....	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Quadro com frequências absolutas dos elementos celulares analisados.....	48
Anexo 2. Tabela de distribuição das médias dos elementos celulares por tempo de estudo para os grupos teste e controle	51
Anexo 3. <i>Outputs</i> das análises dos elementos celulares em função do tempo e da irradiação por laser, utilizando o programa estatístico <i>R Development Core Team</i>	53

RESUMO

BARBOSA, Fabiano Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Maio de 2008. **Efeito da laserterapia de baixa potência Gálio-Alumínio-Índio-Fósforo na inflamação granulomatosa experimental em camundongos.**

Orientador: Clóvis Andrade Neves. Co-orientadores: Marcelo José Vilela e Gustavo Pereira Benevides.

O laser de baixa potência é uma modalidade terapêutica, cujos efeitos ainda se encontram em processo de avaliação. O presente estudo teve por objetivos identificar os efeitos do laser terapêutico de baixa potência Ga-Al-In-P 660 nanômetros na dinâmica do processo inflamatório granulomatoso em camundongos machos *Swiss* albino ao analisar morfológicamente o padrão de migração das células inflamatórias em lamínulas de vidro inseridas na hipoderme do dorso de camundongos em diferentes tempos de irradiação. Foram utilizados 40 camundongos adultos machos da linhagem *Swiss albino*; divididos em dois grupos distintos: Teste (T), submetidos à irradiação, e Controle (C), não submetidos à terapia laser. Ambos os grupos foram subdivididos em cinco subgrupos com quatro indivíduos cada, de acordo com o tempo de sacrifício em dias. Após 24 horas do implante das lamínulas deu-se início, nos animais do grupo T, a irradiação diária de intensidade 3 J/cm^2 e potência média de 30 mW, por meio da técnica pontual; durante até trinta dias consecutivos e ininterruptos respeitando-se o tempo de sacrifício de cada subgrupo. A análise morfológica foi pautada na avaliação dos componentes celulares, identificando e quantificando a presença de polimorfonucleares (PMN), macrófagos/fibroblastos, linfócitos e células gigantes de corpo estranho. Pudemos notar que a quantidade das células estudadas não mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os grupos experimental e controle. O uso do laser terapêutico não mostrou efeitos significativos na dinâmica de migração celular. Novas pesquisas deverão ser realizadas no sentido de identificar possível ação do laser na dinâmica de migração das células inflamatórias.

ABSTRACT

BARBOSA, Fabiano Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2008. **Effects of low level laser therapy Gallium-Aluminum-Indian-Phosphor on the experimental granulomatous inflammation process in albinic mice.** Orientador: Clóvis Andrade Neves. Co-orientadores: Marcelo José Vilela and Gustavo Pereira Benevides.

Low level laser therapy (LLLT) is a therapeutic strategy in which its effects are still in a continuous process of evolution. The aim of the present study was to identify the effects of LLLT Ga-Al-In-P 660nm on the dynamics of a granulomatous inflammatory process in male swiss albinic mice. The migration pattern of inflammatory cells in glass coverslips inserted into their dorsal region in the hypodermis, at different times of application was analyzed morphologically. The analysis included 40 male adults mice split into two different groups: Test (T), treated with laser therapy, and Control (C), without any intervention. Both groups were divided into 5 sub-groups with four individuals in each, according to the time they had been sacrificed. 24 hours after the implant of the glass coverslips, the treatment in the T group started, consisting of one daily irradiation with three J/cm^2 of intensity and 30mW of power with the punctual technique. The morphological analysis was based in an evaluation of cell components, identifying and characterizing the presence of polymorphonucleated leucocytes, macrophage/fibroblast, lymphocytes and multinucleated giant cells. The polymorphonucleated leucocytes sustained the same pattern in both groups, same results were observed in macrophage/fibroblast and multinucleated giant cells. The laser therapy did not show any significant difference in the dynamic of the granulomatous inflammatory process. New researches needed to identify the possible effects of LLLT the migration dynamics of inflammatory cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A pele

A pele recobre toda a superfície do corpo e constitui um dos maiores órgãos do corpo humano (ROSS *et al.*, 2008). Representa aproximadamente 16% do peso corporal e desempenha múltiplas funções como, proteção do organismo contra perda de água e lesões ocasionadas pelo atrito, além de constituir importante barreira física contra invasão do organismo por patógenos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

É constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, formada por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que possui, do plano mais interno para a superfície, as camadas basal, constituída por células prismáticas; espinhosa, constituída por células poligonais; granulosa, constituída por células poligonais achatadas com núcleo central e citoplasma rico em grânulos de queratino-hialina; lúcida, constituída por uma delgada camada de células achatadas eosinófilas e hialinas; córnea, de espessura variada e constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. A outra camada constituinte da pele é a derme, uma porção conjuntiva de origem mesodérmica sobre o qual se apóia a epiderme que possui duas camadas de limites pouco distintos, a papilar constituída por tecido conjuntivo frouxo e a reticular, camada mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Imediatamente abaixo e em continuidade com a derme, encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo que não faz parte da pele (DAO e KAZIN, 2008).

1.2. Processo inflamatório

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos, tais como agentes infecciosos, isquemias, interações antígeno-anticorpo, lesões químicas ou lesões por agentes físicos (BRASILEIRO FILHO, 2006; GIL *et al.*, 2006). Pode-se conceituar inflamação como uma resposta do tecido agredido, caracterizada por alterações vasculares, celulares e da matriz extracelular, bem como por adaptações do tecido conjuntivo vizinho, onde proteínas do soro e células específicas adentram o tecido lesado (HANSSON *et al.*, 2006; KAWAI e AKIRA, 2006). A inflamação é decorrente de um agente lesivo, suficientemente intenso para provocar fenômenos de transformações celulares e teciduais (BALBINO *et al.*, 2005). Contudo, a resposta inflamatória excessiva pode levar à graves danos teciduais, descompensação fisiológica, disfunções orgânicas sistêmicas e até mesmo indução ao óbito (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo (COTRAN *et al.*, 2007), por isso inicia-se imediatamente após a lesão, sendo uma reação inata do organismo ao trauma lesivo. A lesão pode provocar ruptura dos vasos sanguíneos, com conseqüente extravasamento de sangue, plasma e fluidos teciduais para a área lesada (BAXTER *et al.*, 1991; BALBINO *et al.*, 2005).

O tempo de duração e a intensidade do agente lesivo determinam diferentes graus ou fases de transformação nos tecidos. Segundo Guidugli-Neto (1997) são cinco as fases do processo inflamatório: 1) a fase irritativa, onde as modificações morfológicas e funcionais dos tecidos agredidos promovem a liberação de mediadores químicos, desencadeantes das demais fases; 2) a fase vascular que corresponde às alterações hemodinâmicas da circulação e de permeabilidade no local da agressão; 3) a fase exsudativa, caracterizada pela formação de exsudato plasmático e celular oriundo do aumento da permeabilidade vascular, onde os leucócitos são os elementos celulares mais característicos; 4) a fase degenerativa-necrótica, caracterizada pela presença de

células com alterações degenerativas reversíveis ou não, derivadas da ação direta do agente agressor ou das modificações funcionais e anatômicas conseqüentes das três fases anteriores e, por fim, 5) a fase produtiva-reparativa, caracterizada pela diminuição dos mediadores inflamatórios com conseqüente diminuição dos fenômenos vasculares, reabsorção do exsudato pela fagocitose das células exsudadas que sofreram apoptose, e do retorno de alguns fagócitos para circulação linfática e sangüínea. Nesta fase é desencadeada a reparação da lesão tecidual que ocorreu durante o processo onde os elementos celulares predominantes são os linfócitos e os macrófagos ativados que sofrem várias modificações morfológicas e funcionais.

Para McNally e Anderson (2002), a resposta inflamatória pode ser dividida em duas principais categorias, aguda e crônica, de acordo com o tempo e o curso patológico.

A inflamação aguda é de duração relativamente curta, considerada imediata por se desenvolver no instante após a ação do agente lesivo, e inespecífica por ser qualitativamente a mesma, independentemente da causa que a provoque; suas alterações correspondem às fases irritativa, vascular e exsudativa. Este tipo de inflamação é caracterizado por alterações vasoativas que promovem a exsudação de fagócitos do sangue para as margens da lesão, o que é demarcado pela presença majoritária de células polimorfonucleadas, principalmente neutrófilos que promovem a fagocitose dos agentes contaminantes e fragmentos teciduais produzidos pelo ferimento (KAWAI e AKIRA, 2006; COTRAN *et al.*, 2007).

Os neutrófilos medem de 10-20 micrômetros de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. Em seu citoplasma, contém grânulos de dois tipos: azurófilos, denominados lisossomos verdadeiros, e contém catepsina G, mieloperoxidase, elastase, collagenase, lisozima, proteínas catiônicas microbicidas, defensinas e hidrolases; e grânulos específicos que contém lisozima e lactoferrina. (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

Os distúrbios inflamatórios crônicos ocorrem pela persistência do agente agressor ou por alguma interferência no curso normal do reparo tecidual. São caracterizados por duração prolongada, semanas, meses ou anos, onde o dano e o reparo tecidual ocorrem simultaneamente (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação crônica é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, o que determina posteriormente as fases proliferativa e reparativa, marcadas pela proliferação de vasos sanguíneos e substituição do tecido normal (alvo) por acúmulo anormal de tecido conjuntivo, levando à instalação de fibrose que pode interferir diretamente na funcionalidade tecidual (MARIANO, 1995). O processo inflamatório crônico promove intensa quimiotaxia de monócitos do tecido sanguíneo, que no tecido alvo se diferenciam em macrófagos, células que possuem alta capacidade fagocítica, contém núcleo fusiforme e citoplasma rico em lisossomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (LAMPRECHT e GROSS, 2004; BRASILEIRO-FILHO, 2006). Os macrófagos representam um papel central na imunidade mediada por célula, promovem a fagocitose e possuem funções reguladoras e de células apresentadoras de antígeno (BRASILEIRO-FILHO, 2006). Além dos macrófagos, a fase inflamatória crônica é também caracterizada pela presença de linfócitos, plasmócitos e fibroblastos no estroma envolvido, aumentando os elementos celulares às margens da lesão, o que favorece a neovascularização (COTRAN *et al.*, 2007).

Os linfócitos são particularmente importantes nas inflamações crônicas, embora sua participação nas inflamações agudas também seja relevante. Quando ativados, produzem citocinas e regulam a atividade de outras células, como por exemplo, a ativação e proliferação dos macrófagos (BRASILEIRO-FILHO, 2006).

O fibroblasto é a célula mais comum do tecido conjuntivo, possui prolongamentos citoplasmáticos irregulares, seu núcleo é grande, de forma ovóide, com citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e o aparelho de Golgi bem desenvolvido. São células ativas, com alto metabolismo e elevada

expressão de componentes da matriz extracelular (SANADA *et al.*, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A matriz extracelular (MEC) é o tecido que está entre as células conduzindo os vasos sanguíneos e linfáticos, tem como principais funções a sustentação e a integração dos tecidos subjacentes. Seus componentes incluem moléculas que são fundamentais para a ancoragem, estimulação e movimentação das células no seu interior e para as interações célula-matriz e célula-célula, pois a matriz extracelular é o veículo para os fatores de crescimento, hormônios e moléculas de adesão como as moléculas de adesão intracelular (ICAM) ou as moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1). Na sua porção não-fibrilar predomina um material amorfo, gelatinóide, constituído predominantemente por glicosaminoglicanos (principalmente o ácido hialurônico), proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, entre essas estruturas circula o líquido intersticial que tem importante papel na integração de todo o organismo vivo (MEREDITH, 1993; ANDRADE, 2005). Nesse líquido circulam os nutrientes e o oxigênio, e nele são eliminados os produtos resultantes do catabolismo celular (ANDRADE, 2005). O colágeno do tipo I é a proteína mais abundante da MEC, outro importante componente é a fibronectina, uma importante proteína de adesão que possui domínios de ligação ao colágeno e outros domínios associados aos fibroblastos, participando no processo de regeneração e reparo tecidual; ainda na MEC há a presença de laminina, um complexo de adesão de proteínas com papel demarcado na formação e manutenção da estrutura vascular e celular durante o reparo tecidual (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O equilíbrio de todo o tecido conjuntivo é dinâmico e a todo o momento este tecido é alterado de acordo com a demanda, principalmente às exigências físicas (ANDRADE, 2005).

Os macrófagos do tecido conjuntivo são fusiformes, com núcleos ovóides e cromatina condensada, e no tecido conjuntivo são quase tão numerosos quanto os fibroblastos com os quais podem ser confundidos quando observados em microscopia de luz (SANADA *et al.*, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Quando há persistência do agente agressor, os macrófagos sofrem mudanças conformacionais, com divisões nucleares sem divisão de seu

citoplasma, e outra apresentação morfológica que pode existir concomitante com a anterior é quando se fundem dando origem às células gigantes multinucleadas o que caracteriza outro tipo de resposta inflamatória: a reação inflamatória granulomatosa (CIPRIANO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2005).

A resposta inflamatória granulomatosa é um tipo especial de inflamação crônica caracterizada pela predominância das células do sistema mononuclear fagocítico na forma de macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas, porém outros tipos celulares também são encontrados, especialmente os linfócitos e fibroblastos. Este tipo de inflamação é demarcadamente presente em diversas doenças de caráter infeccioso, tóxico, alérgico, neoplásico e em enfermidades auto-imune, mas pode também ser de etiologia desconhecida (WILLIAMS e WILLIAMS 1983; CIPRIANO *et al.* 2003).

As células gigantes são denominadas células gigantes de Langhans, células gigantes de corpo estranho, células multinucleadas e células gigantes de inflamação (McINNES e RENNICK, 1988; BOGSAN *et al.*, 2005). Por convenção, de acordo com Mariano (1995), nesse experimento a denominaremos como células gigantes.

A primeira descrição das células gigantes foi relatada em tumores de vertebrados por Müller (1838); mais tarde, em 1855, Rokitansky relatou a presença dessas células em tecido tuberculoso, seguidos por Robin (1858) e Virchow e Langhans (1868) que demonstraram essas células nos processos inflamatórios e neoplásicos (HARRIS, 1970, *apud* BOGSAN *et al.*, 2005). As células gigantes possuem alta capacidade secretora de enzimas, apresentando o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de Golgi bem desenvolvidos, além de apresentar grande quantidade de vesículas secretoras em seu citoplasma (WILLIAMS e WILLIAMS, 1983; McINNES e RENNICK, 1988; SUTTON e WEISS, 1966). Apesar de sua alta capacidade fagocítica de partículas ser atestada, Papadimitriou *et al.* (1973) e Mariano e Spector (1974) sugeriram que a formação de células gigantes resultaria em um mecanismo celular mais eficiente para

combater determinados parasitas. Embora sugestiva, esta hipótese ainda não foi totalmente confirmada ou refutada (BOGSAN *et al.*, 2005).

A implantação de lamínulas de vidros no tecido subcutâneo do dorso de camundongos é capaz de induzir um processo de inflamação do tipo granulomatosa (BOGSAN *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006). Neste processo os componentes celulares são ativados tanto pelo trauma da implantação, quanto pela presença do corpo estranho o que desencadeia um agregado celular sobre a superfície da lamínula, onde posteriormente ocorre a formação de granulomas, caracterizados como pequenos aglomerados organizados de células inflamatórias, onde os macrófagos se agrupam e formam pregas interdigitantes entre si e adquirem morfologia semelhante às células epitelióides (MARIANO e SPECTOR, 1974; FERNANDES *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2006).

Alguns estudos experimentais sugeriram que as células gigantes em lesões induzidas com lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de ratos, eram formadas pela fusão das células mononucleares do infiltrado inflamatório (GILLMAN e WRIGHT, 1966; RYAN e SPECTOR, 1970; MARIANO e SPECTOR, 1974). Há uma miríade de discussões quanto aos possíveis mecanismos de formação dessas células: através da fusão de macrófagos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (RYAN e SPECTOR, 1970; POSTLETHWAITE *et al.*, 1984; KREIPE *et al.*, 1988; MÖST *et al.*, 1997); com utilização de diferentes citocinas (WEINBERG *et al.*, 1984; NAGASAWA *et al.*, 1987; McINNES e RENNICK, 1988; ENELOW *et al.*, 1992a, 1992b; KAZAZI *et al.*, 1994; FAIS *et al.*, 1994, 1997; McNALLY e ANDERSON, 1995); com interferon-gama (CHAMBERS, 1978; TAKASHIMA *et al.*, 1993); e com anticorpos específicos contra macrófagos (CHAMBERS, 1978; McINNES e RENNICK 1988; HASSAN *et al.*, 1989). Estudos mais recentes indicam que sua origem dá-se a partir da fusão de macrófagos, porém os mecanismos dessa fusão ainda permanecem obscuros (CIPRIANO *et al.*, 2003; SANADA *et al.*, 2003; BOGSAN *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2005).

1.3. Laser

O termo “laser” é um acrônimo para “*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*”. O fenômeno físico da emissão estimulada foi proposto pela primeira vez por Albert Einstein em 1916, tornando-se objeto constante de estudo a partir de então (LUCAS *et al.*, 2002). Em 1950, Townes, Gordon e Zeiger constroem um primeiro protótipo de utilização da emissão estimulada propondo a possibilidade de se modular a radiação laser (TATARUNAS *et al.*, 1998). Na década de 60, Maiman produziu o primeiro feixe de luz laser de Rubi, desde sua concepção os lasers encontraram uma aplicação imediata na medicina e particularmente na cirurgia; a cirurgia oftálmica foi a primeira especialidade a obter êxito com a aplicação do laser (NIEMZ, 1996). Ao final desta década, no início dos anos 70, as aplicações médicas do laser eram atribuídas aos fenômenos fototérmicos e fotoablativos com o tecido; assim os lasers desempenharam um importante papel para cortar, soldar e mesmo destruir tecidos como alternativas aos bisturis metálicos e também para ablação de tumores e remoção de tatuagens (BAXTER, 1994; NIEMZ, 1996).

O trabalho inicial da terapia laser começou na Europa Oriental, sendo principalmente baseado nos resultados de Mester *et al.* (1985) desenvolvidos nas décadas de 60 e 70. Nestas décadas o laser chegou a ser uma modalidade terapêutica popular no oriente europeu, onde foi relatado um grande número de aplicações em humanos e em modelos animais para tratamento de osteoartrite, tendinites e reparo de feridas experimentais (BAXTER *et al.*, 1991; OHSHIRO e FUJINO, 1993). Posteriormente, em 1988, com a introdução de fotodiodos compactos o tratamento com laser não lesivo e bioestimulador, recebeu por Ohshiro e Calderhead, o nome de terapia laser de baixa frequência - *Low Level Laser Therapy* (LLLT); que designa, genericamente, a aplicação terapêutica de lasers e diodos superluminosos monocromáticos de intensidade baixa, dosagem inferior a 35 j/cm^2 para o tratamento de afecções e lesões dos tecidos biológicos (KITCHEN e PARTRIDGE, 1991; BAXTER, 1994). Desde então, as pesquisas com laser vêm demonstrando sua eficiência no tratamento de doenças como

osteoartrite, tendinite, miopatias, quadros álgicos, reparo tecidual e controle do processo inflamatório. Aliado à portabilidade e acurácia do equipamento, o laser vem sendo indicado para essas intervenções ambulatoriais.

A primeira interação do laser com a pele ocorre na superfície do estrato córneo, onde uma pequena parte da radiação incidente sofre refração (PARRISH e DEUTSCH, 1984). A penetração da energia gerada pelo aparelho de Ga-Al-In-P é capaz de atingir camadas mais internas como fâscias e tecido muscular (KARINA e SANFELICE, 2005). A penetrabilidade da radiação nos tecidos é determinada principalmente pelo comprimento de onda e, de maneira secundária, pela potência do aparelho (MESTER *et al.*, 1985). Ocorrerá a absorção da radiação quando um fóton de luz interage com um átomo ou molécula, em que a diferença em termos de energia das bandas de valência da estrutura alvo (átomo) equivale à energia transportada pelo fóton (NIEMZ, 1996). Isto gera um fóton de determinada energia quântica e, portanto, com um comprimento de onda específico. Apenas algumas estruturas alvo serão capazes de absorver a radiação luminosa. Dessa forma, para uma determinada molécula, apenas um nível de energia quântica, e, portanto, um comprimento de onda específico pode ser passível de absorção (KITCHEN, 2003). Estes fenômenos são designados de espectro de absorção para a molécula. Portanto a absorção é específica para o comprimento de onda e esta especificidade de absorção determina qual o tipo de tecido irá absorver a radiação incidente, e conseqüentemente a profundidade de penetração do laser (BAXTER, 1994; KITCHEN, 2003).

A luz laser é tipicamente produzida pela emissão espontânea da radiação, nestas circunstâncias, os átomos e moléculas que compreendem o emissor central são estimulados pela energia elétrica, de modo que os elétrons deslocam-se para as órbitas superiores. Assim que estejam em tais órbitas, os elétrons tornam-se instáveis, caindo espontaneamente dentro de curto período de tempo para níveis de energia inferiores e desta forma liberam essa energia em forma de fótons de luz (BAXTER, 1994). As propriedades do fóton emitido são determinadas pela diferença nos níveis de energia através dos quais o elétron

excitado decresceu, pois a diferença de energia será exatamente a mesma da energia quântica do fóton, sendo que esta energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda (KING, 1990). O comprimento de onda é efetivamente determinado pela diferença nas bandas de valência, onde as moléculas produzem faixas típicas de comprimentos de onda ou espectros de emissão, quando devidamente estimuladas (BAXTER *et al.*, 1991; KITCHEN, 2003). A radiação laser emite ondas na mesma frequência e é condicionada, pelo arranjo de espelhos, para que essa radiação seja emitida na mesma direção; isto caracteriza que o feixe laser, em geral, possua mais potência que outras radiações ópticas não modificadas ou estimuladas (KITCHEN e PARTRIDGE, 1991). O laser é uma radiação eletromagnética, onde os campos correm juntos através do espaço sem a necessidade de um meio condutor. Logo a radiação não é apenas um movimento de ondas, mas sim agregados de energia quântica proporcionais à frequência e inversamente proporcionais ao comprimento de onda. As características que identificam e diferenciam a luz laser das outras ondas luminosas são: monocromaticidade, colimação e coerência (TUNÉR e HODE, 1998; KITCHEN, 2003).

A monocromaticidade indica que a luz emitida pelo laser possui um único comprimento de onda que oscila na mesma frequência e, conseqüentemente, manifesta uma única cor, diferente da luz branca que é formada pela composição de várias cores, correspondendo a uma frequência determinada. A monocromaticidade é citada por Colls (1985) como uma das principais características da radiação laser, e Kitchen (2003) a consideram como sendo o atributo mais importante da luz laser, relacionando-o à interação fotobiológica e aos efeitos terapêuticos específicos. A energia eletromagnética estimula fotorreceptores ou cromóforos que apenas responderão a uma faixa de luz específica, gerando desta forma os efeitos fotobiológicos (KITCHEN, 2004).

Segundo Lucas *et al.* (2002), e Tunér e Hode, (1998), a colimação se refere ao alto grau de paralelismo do feixe laser, o que mantém a potência óptica do aparelho “agrupada” em uma área relativamente pequena durante distâncias

consideráveis, quase sem divergência da radiação emitida. De acordo com Parizzoto (1998) e Laakso *et al.* (1993) a coerência da radiação se refere à sincronia das ondas de luz no tempo e no espaço. Proporciona à radiação uma via unidirecional para a qual todas as ondas se direcionam em planos paralelos entre si, de forma ordenada e na mesma fase, e desta forma se mantêm por longas distâncias (KARU, 1996). Wilden e Karthein (1998) descrevem que os cromóforos são formados pela interação da luz com alguns componentes da cadeia respiratória, de diferentes tamanhos e formas, os quais vão atuar ou ressonar com uma estimulação específica ou energia de radiação. Desta forma poderão transferir a estimulação funcionalmente para os diferentes processos e componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Dependendo de seu comprimento de onda, a radiação eletromagnética na forma de luz pode estimular macromoléculas, iniciar mudanças na conformação de proteínas e transferir energia aos elétrons.

Os lasers são produzidos de acordo com a natureza do material interposto na superfície refletora do emissor do aparelho, normalmente denominado canhão ou caneta. Há potencialmente milhares de tipos de lasers, cada um com um comprimento de onda específico, logo com características e conseqüentemente alvos únicos (PRENTICE, 2004). Os meios de produção de lasers incluem cristal, vidro, semicondutores, corantes líquido e gasoso (COLLS, 1985). O laser Hélio-Neônio (632,8 nm), é descrito por melhores resultados nos processos de migração celular e reparo tecidual (RIGAU *et al.*, 1994; MANTEIFEL *et al.*, 1997; BATANOUNY *et al.*, 2002). Pela proximidade da emissão de fótons e por ser mais portátil, o aparelho gerador de laser de baixa potência utilizado nesse estudo foi o Gálio-Alumínio-Índio-Fósforo (Ga-Al-In-P), pois também trata-se de uma modalidade de última geração que consiste na produção de irradiação laser na porção vermelha do espectro eletromagnético com comprimento de onda de 660 nanômetros (GUIRRO e GUIRRO, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2005; KARINA e SANFELICE, 2005).

Os lasers de baixa intensidade, como o utilizado nesse experimento, geram efeitos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos que afetam não só tecido onde ocorre a aplicação como também as regiões circundantes (TUNÉR e HODE, 1998; CATÃO, 2004). Os efeitos fotobiológicos podem ser discriminados em curto ou longo prazo. O primeiro refere-se àqueles efeitos observados poucos minutos após a irradiação pelo laser como o aumento considerável da taxa respiratória celular, aumento da síntese de ATP e aumento do metabolismo celular. Já o segundo se refere aos efeitos observados horas ou dias após a irradiação, que incluem aumento da proliferação celular, efeitos analgésicos e antiinflamatórios (KARU *et al.*, 1996; TUNÉR e HODE, 1998; CATÃO, 2004). De acordo com Baxter *et al.* (1991) essa propriedade é pautada na absorção do laser em biomoléculas capazes de serem excitadas pelos fótons. A energia liberada durante as reações de transferência de elétrons é usada para bombear prótons através da membrana mitocondrial interna, assim, o espaço intra-membrana fica carregado positivamente e a matriz carregada negativamente e, essa força protomotiva é usada para favorecer a síntese de ATP (KARU, 1996; WILDEN e KARTHEIN, 1998).

Os efeitos antiinflamatórios da LLLT têm sido avaliados clinicamente em lesões inflamatórias músculo-esqueléticas e na síndrome miofascial. Alguns autores como Ceccherelli *et al.* (1989), Klein e Bjorn (1990) e Jagielski (1993) utilizando em seus estudos os lasers He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm e potência de 30mW e intensidades variadas de 3 a 5J/cm² e As-Ga com comprimento de onda de 904 nm e potência de 15 W com intensidade de 6J/cm² observaram diminuição do processo inflamatório e alívio do quadro algico de forma duradoura em seus pacientes. Enquanto que Devor (1990), Gam, *et al.*, (1993) e Goats *et al.* (1996), afirmam não encontrar diferenças significativas do processo inflamatório e quadro algico de pacientes portadores de artrite reumatóide ou síndrome miofascial quando submetidos ao laser As-Ga-Al, com comprimento de onda variável entre 780 e 870 nm e potência entre 60mW e intensidades entre 4 a 9J/cm².

Prentice (2004) descreveu que a LLLT seria capaz de proporcionar analgesia por diminuir a síntese de prostaglandinas, histamina e heparina, substâncias inflamatórias, secretadas no local agredido. O possível aumento da micro-circulação local sugere diminuição da isquemia tecidual e facilitação da remoção de substâncias inflamatórias da área lesada, diminuindo o edema (KARU *et al.*, 1996).

As alterações resultantes da ação laser nos processos inflamatórios são objetos ávidos de estudos e seus mecanismos de ação ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns autores como Goats *et al.* (1996), Karu *et al.* (1996) e Tunér e Hode (1998) e iniciaram estudos demonstrando sua efetividade, porém os experimentos “*in vitro*” e clínicos ainda não esclareceram totalmente seus efeitos. Há uma controvérsia de informações e parâmetros científicos na literatura sobre a ação do laser Ga-Al-In-P, portanto um número maior de estudos para elucidar e/ou ratificar mecanismos de ação, respostas biológicas e parâmetros ideais de sua aplicação tornam-se necessários.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar os efeitos do laser terapêutico de baixa potência Ga-Al-In-P 660 nanômetros em um processo inflamatório granulomatoso produzido experimentalmente em camundongos machos *Swiss* albino.

2.2. Objetivo específico

Analisar o padrão de migração de células inflamatórias em lamínulas de vidro inseridas na hipoderme do dorso de camundongos, submetidos à diferentes protocolos de irradiação com laser terapêutico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo obteve pareceres favoráveis dos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e da Faculdade de Minas – FAMINAS/Muriaé, local de realização do experimento.

O delineamento experimental consta da análise da ação do laser de baixa potência sobre a dinâmica da migração celular em lamínulas de vidro de 13 milímetros de diâmetro introduzidas no tecido subcutâneo de camundongos. Foram utilizados 40 camundongos adultos machos da linhagem *Swiss albino* com idade superior a 60 dias e peso entre 30 a 40 gramas, procedentes do Biotério da Universidade Federal de Viçosa – CCBS/UFV.

Primeiramente os animais foram divididos em dois grupos distintos: Teste (T), submetidos à irradiação pelo Laser Ga-Al-In-P, e Controle (C), não submetidos à irradiação. Posteriormente cada grupo, C e T foram subdivididos em cinco subgrupos com quatro indivíduos cada, de acordo com o tempo de sacrifício em dias, designados: T₃, T₇, T₁₅, T₃₀, T₄₅, e C₃, C₇, C₁₅, C₃₀, C₄₅ (Fig. 1).

Todos os animais foram alocados em gaiolas individuais, devidamente identificadas, com ciclo de doze horas claridade/escuridão e temperatura controlada a 22°C (+/- 2°C), recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o experimento.

Previamente a realização do procedimento cirúrgico de implante da lamínula, os animais foram anestesiados, por via inalatória, em câmara contendo algodão embebido em éter, de acordo com as orientações recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2007).

Os animais foram posicionados em decúbito ventral (esternal) para os procedimentos de tricotomia, desinfecção de seu dorso e antisepsia com utilização de álcool iodado. Imediatamente realizou-se o ato cirúrgico para o

implante da lamínula de vidro no tecido subcutâneo de cada indivíduo, esse procedimento consistiu na realização de uma incisão retilínea na pele, ao nível dos corpos vertebrais torácicos craniais no sentido cranio-caudal, que teve em média 1,0 (um) centímetro de comprimento, realizada com bisturis estéreis (*Nipro* do Brasil). Em seguida o tecido subcutâneo foi divulsionado, com utilização de tesouras de pontas finas, com o objetivo de criar uma bolsa profunda onde foi inserida a lamínula (Fig. 2). Cada indivíduo, de ambos os grupos, teve uma única lamínula de vidro inserida na hipoderme de seu dorso. A incisão foi fechada com três pontos de sutura usando agulha AT 20 mm e fio de *nylon* sintético não absorvível (*MEDSUTURE*).

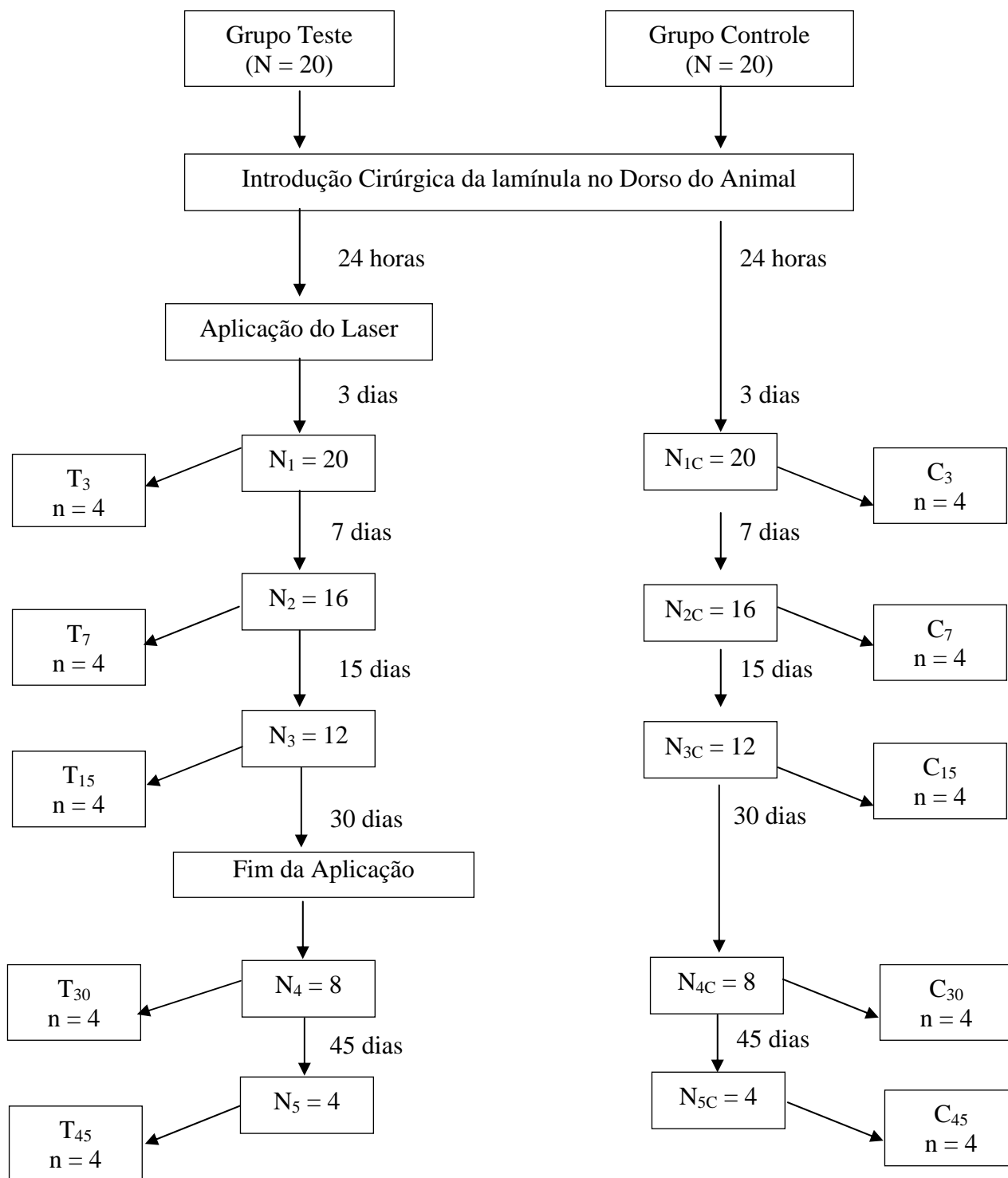


Figura 1. Fluxograma das etapas do estudo.



Figura 2. Procedimento cirúrgico. Observar sutura após implante da lamínula.
Fonte: Autor (F.S. B)

Posteriormente ao ato cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais devidamente identificadas, no mesmo local em que se encontravam no pré-operatório, sob as mesmas condições ambientais.

Para condução dos experimentos terapêuticos utilizou-se um aparelho gerador de raios laser Ga-Al-In-P (Fig.3), vermelho visível, com comprimento de onda 660 nanômetros de emissão contínua e potência média de 30 mW, modelo *LASERPULSE* (IBRAMED, Brasil).



Figura 3. Aparelho Laser de Baixa Potência utilizado neste estudo.
Fonte: Autor (F.S. B)

Decorridas 24 horas após o implante das lamínulas deu-se início, nos animais do grupo teste, a irradiação diária de intensidade 3 J/cm^2 através da técnica pontual (Fig. 4); durante até trinta dias consecutivos e ininterruptos de acordo com o tempo de sacrifício dos indivíduos de cada subgrupo. Ressaltando que o subgrupo T_{45} foi irradiado do primeiro ao trigésimo dia após o implante das lamínulas, permanecendo por mais 15 dias sem irradiações a fim de observar o curso da inflamação granulomatosa. As aplicações do laser foram realizadas sempre pelo mesmo pesquisador (F.S.B.) no turno diurno.

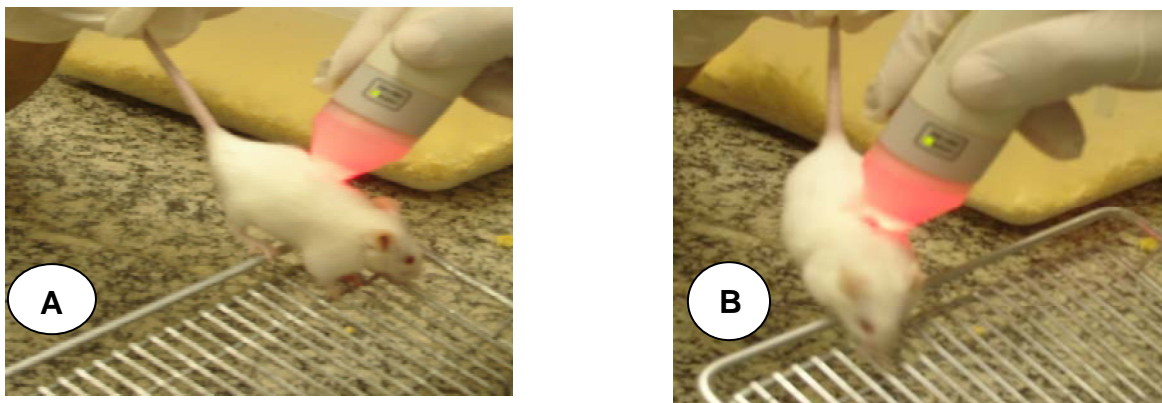


Figura 4. Irradiação pelo laser. A - Canhão incidindo sobre a lamínula implantada na hipoderme do camundongo; B - Incidência do canhão em ângulo reto, perpendicular ao dorso do camundongo.

Fonte: Autor (F.S. B)

Expirados os tempos de irradiação de cada subgrupo, tanto os animais do grupo controle quanto os do grupo teste, foram sacrificados em câmara de CO₂. As lamínulas foram retiradas do dorso de cada indivíduo, lavadas em PBS (*Phosphate Buffer Saline*), fixadas em formol a 2% durante cinquenta minutos e conservadas em álcool etílico 70% até o momento da coloração. Em uma lamínula limpa e seca, devidamente identificada, foram aplicadas duas gotas de bálsamo do Canadá e, sobre ela, a lamínula de vidro a ser analisada com o material biológico voltado para baixo e coberta com uma lamínula de vidro retangular.

A análise morfológica foi pautada pela avaliação dos componentes celulares, identificando e quantificando a presença de neutrófilos (polimorfonucleares), macrófagos/fibroblastos, linfócitos e células gigantes de corpo estranho, contadas a partir de uma grade com 180 intersecções criadas no aplicativo *Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetcs)* e aplicada sobre cada imagem (Fig. 5). De cada lamínula foram obtidas cem imagens com resolução de 2048 X 1536 *pixels*, com objetiva de 20x. Para o processamento e coloração das lamínulas foi utilizada a técnica de Hematoxilina – Eosina (HE) conforme rotina do laboratório. Para ratificar a presença e diferenciação de macrófagos, utilizou-se a técnica de histoquímica para fosfatase ácida (BANCROFT e STEVENS, 1996) na

lamínula retirada do dorso de um animal do grupo controle e de um animal do grupo teste.

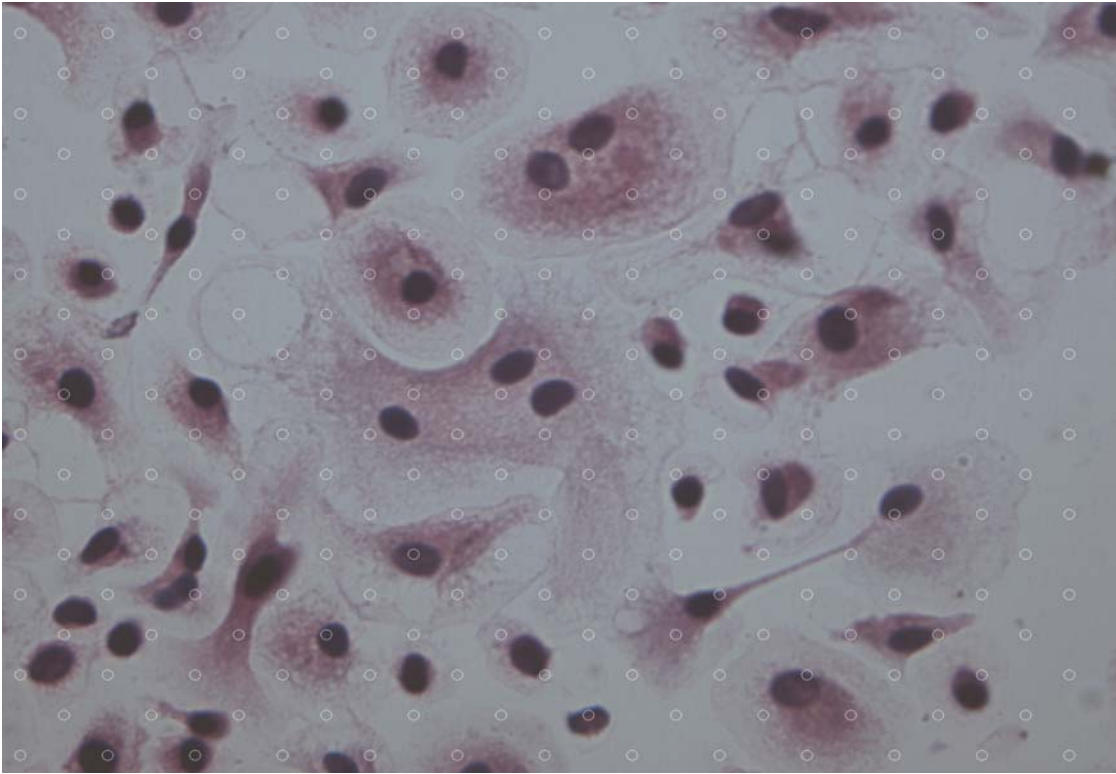


Figura 5. Grades circulares do aplicativo *Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetcs)* sobre a imagem. O círculo, quando incidente sobre um elemento celular (seja núcleo ou citoplasma), é marcador para sua contagem. Fonte: Autor (C.A.N)

A análise das lamínulas e a captação das imagens deu-se através do microscópio óptico BX-60 (Olympus) acoplado a uma câmara fotográfica digital modelo QColor 3 (Olympus). O computador utilizado possui microprocessador Pentium III com 1GB de RAM e sistema operacional *Windows XP Professional (Microsoft)*.

Para avaliar diferenças entre os grupos foi utilizada a modelagem linear generalizada usando procedimentos de covariância, com o número de dias após introdução da lamínula como variável X_1 e a aplicação ou não do laser como variável X_2 . A variável Y correspondeu ao número dos elementos celulares

avaliados, polimorfonucleares (PMN), linfócitos, macrófagos/fibroblastos e células gigantes; sendo feita uma análise para cada componente de Y , X_1 e X_2 . Posteriormente procedeu-se à análise de resíduos para verificar o ajuste do modelo à distribuição de probabilidades usada e à equação estimada. Foi realizada a regressão linear, sendo verificada a condição de normalidade suficiente para sustentar a análise de resíduo realizada.

Nas análises utilizou-se o programa estatístico *R Development Core Team* (2008). Admitiu-se nível de significância de 95%.

4. RESULTADOS

Os elementos celulares analisados no presente estudo mostraram diferença estatisticamente significativa em ambos os grupos em relação ao tempo; enquanto que entre os animais tratados e não tratados essa diferença não foi observada. As figuras 6, 8, 9 e 10 demonstram a curva do número de células encontrado nas lamínulas inseridas na hipoderme dos camundongos em função do tempo.

Ao analisar os PMN (Fig.6) observa-se que a curva do gráfico mostra inicialmente grande número destes elementos, cuja queda brusca observa-se do terceiro até o sétimo dia. A partir de então há uma estabilidade linear até o 45º dia, com tendência de queda. A aplicação do laser não alterou este padrão.

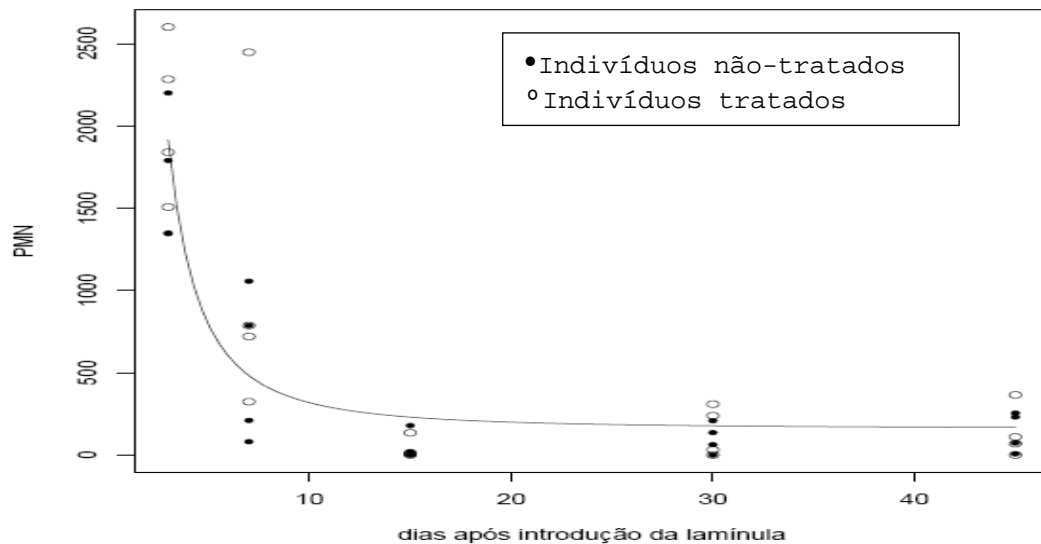


Figura 6. Quantificação de polimorfonucleares (PMN) nas lamínulas em função do tempo. Cada ponto corresponde a um camundongo. As células variaram em relação ao tempo, porém o laser não alterou esse padrão.

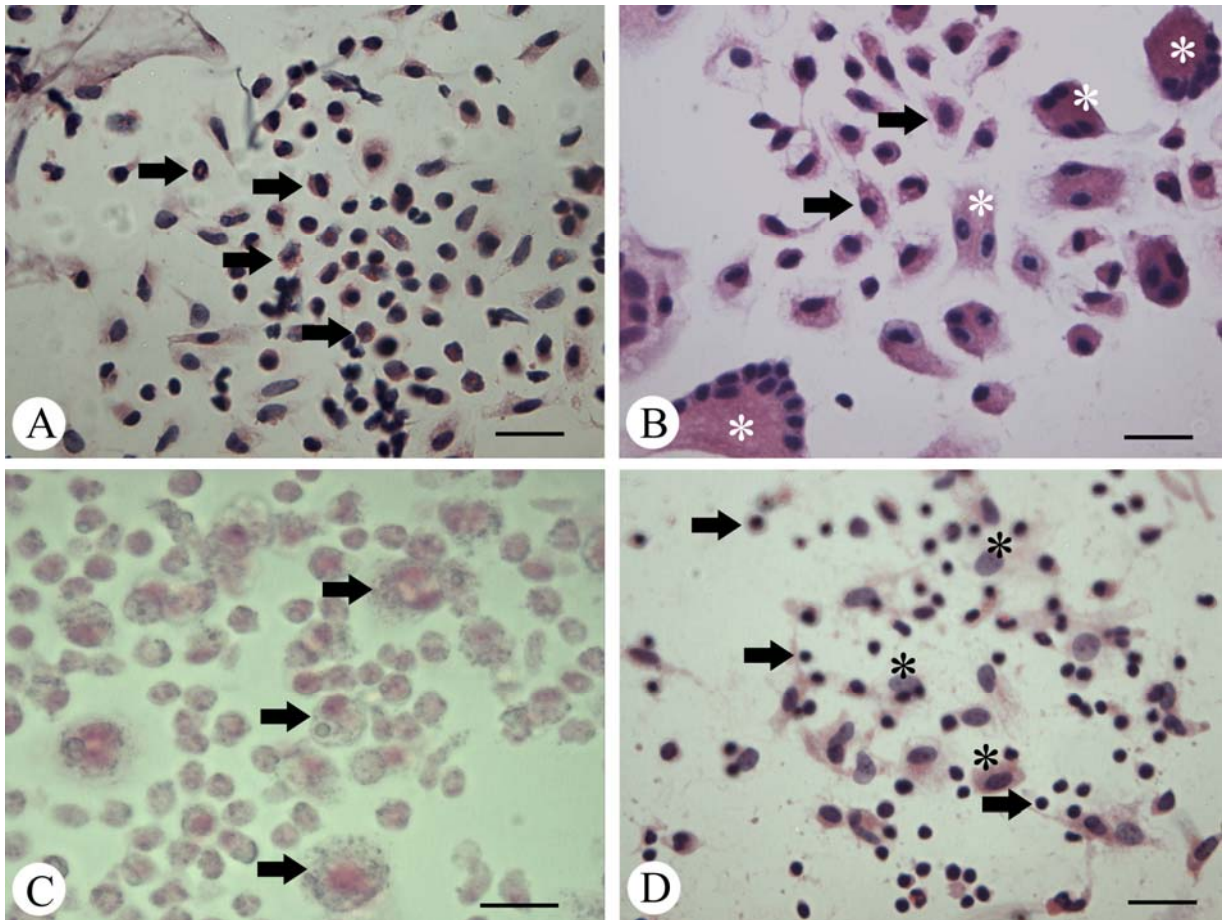


Figura 7. Fotomicrografias de células inflamatórias em lamínulas inseridas no dorso de camundongos. A) Subgrupo T₃ com predominância de polimorfonucleares (setas). Coloração: hematoxilina e eosina. B) Subgrupo T₁₅ evidenciando macrófago/fibroblasto (setas) e células gigantes (*). Coloração: hematoxilina e eosina. C) Subgrupo T₇ submetido à técnica de fosfatase ácida. Setas apontam grandes macrófagos. Contra-coloração: *nuclear fast red*. D) Subgrupo T₃ com predominância de linfócitos (setas) e macrófagos/fibroblastos (*). Coloração: hematoxilina e eosina. Todas as barras correspondem a 20µm. Fonte: Autor (C.A.N).

A figura 7 demonstra as fotomicrografias de células inflamatórias em lamínulas inseridas no dorso de camundongos em diferentes tempos. As lamínulas coradas com HE não possibilitaram a distinção inequívoca entre macrófagos e fibroblastos. A técnica para identificação da atividade de fosfatase ácida permitiu a identificação de macrófagos, que se apresentavam com morfologia semelhante aos fibroblastos (Fig. 7C).

Em relação a macrófagos/fibroblastos (Fig.8), nota-se uma curva ascendente até o 25º dia aproximadamente, mantendo um platô no período de 25-30 dias, a partir de então, uma curva descendente é observada. Os grupos controle e teste seguiram o padrão da curva e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles.

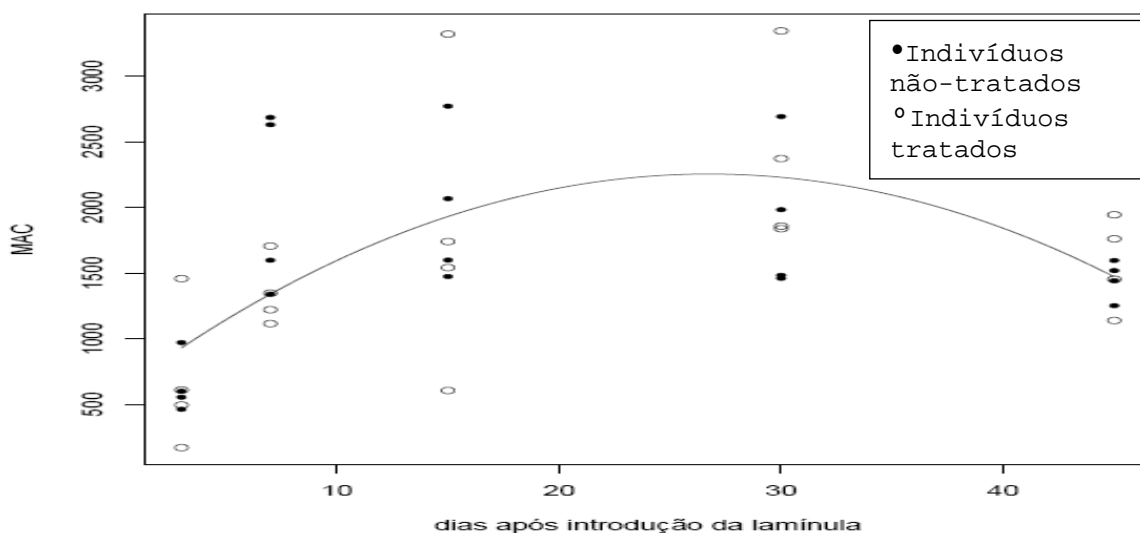


Figura 8. Quantificação de Macrófagos/fibroblastos (MAC) encontrado nas lamínulas em função do tempo. Cada ponto corresponde a um camundongo. Os grupos tratado e não-tratado apresentaram o mesmo padrão de curva.

As células gigantes (Fig.9) mostraram valores iniciais mais baixos em relação aos demais elementos celulares analisados, com curva ascendente até o 30º dia. Manteve-se uma leve estabilidade e posteriormente um pequeno decréscimo. As células gigantes tiveram sua máxima formação após o ápice do número de macrófagos, 25-30 dias, sugerindo que um número aumentado de

macrófagos poderia induzir ao maior número de células gigantes através de fusão.

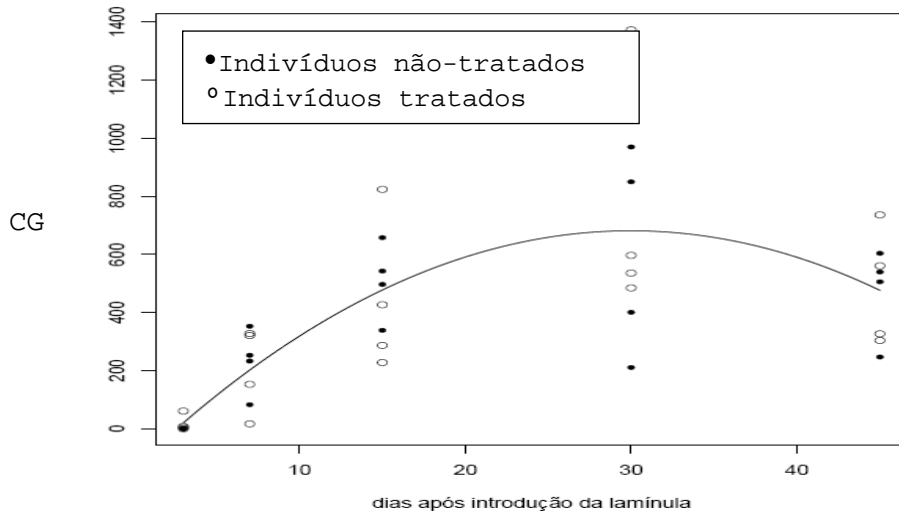


Figura 9. Quantificação de células gigantes (CG) nas lamínulas em função do tempo. Cada ponto corresponde a um camundongo. Houve uma curva ascendente até o 30º dia, seguido de leve estabilidade e pequeno decréscimo.

Quanto aos linfócitos (Fig.10) nota-se uma tendência linear de decréscimo. Nos tempos iniciais observa-se um intervalo bem evidenciado entre os valores máximo e mínimo destes elementos quanto aos dias analisados. A partir do 30º dia esse valores parecem estar mais próximos, dados esses comprovados pelos valores do desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos teste e controle.

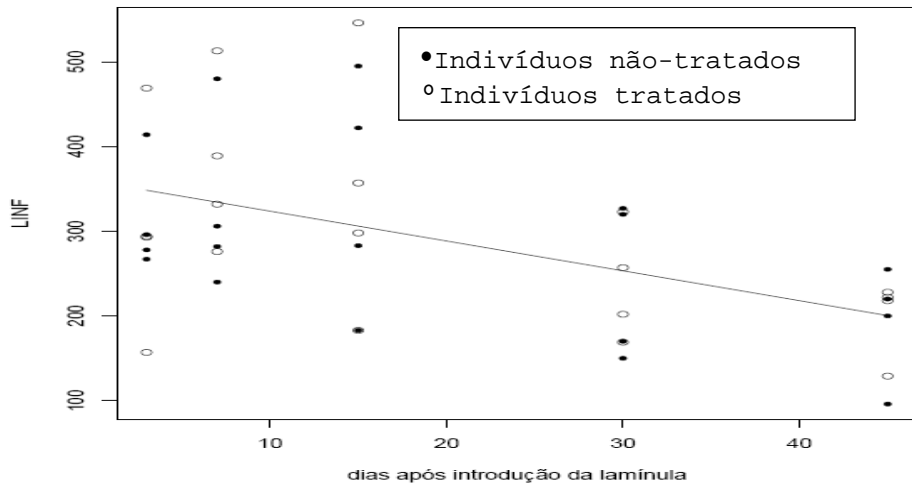


Figura 10. Quantificação de Linfócitos (LINF) encontrado nas lamínulas em função do tempo. Cada ponto corresponde a um camundongo. Observa-se tendência linear de decréscimo dos valores destas células.

5. DISCUSSÃO

Camundongos são amplamente utilizados em pesquisas que visam à compreensão dos mecanismos biológicos que possam servir preliminarmente de parâmetros para aplicação de seus resultados em humanos (KASHYAP *et al.*, 1995; KOEKE, 2003), portanto, faz-se justificada a utilização deste modelo animal no presente estudo para analisar a ação do laser no processo de inflamação crônica granulomatosa.

Para o espectro infravermelho, segundo Anneroth *et al.* (1988) a dose recomendada em laserterapia para promover o aumento no número de macrófagos/fibroblastos e conseqüentemente de fibras colágenas, o incremento vascular e a re-epitelização em feridas experimentais no dorso de ratos deve se situar entre 1 e 5 J/cm². Tatarunas *et al.* (1998) relataram que o laser As-Ga mostrou-se um bom adjuvante no processo cicatricial de feridas cutâneas em gatos domésticos e doses baixas, de 2 J/cm², mostraram-se mais vantajosas que doses de 4 J/cm². Em relação aos *lasers* de baixa potência na faixa de luz vermelha, Giordano *et al.* (2001) utilizaram He-Ne com intensidade de 6 J/cm² em fraturas de tíbia de ratos e observaram que a irradiação não acelerou o processo de consolidação óssea em relação aos animais não-tratados. Cafalli *et al.* (1993) compararam os lasers He-Ne e As-Ga em cartilagens de coelhos com dosagem de 4 J/cm² para ambos e observaram que o aparelho de espectro vermelho apresentou melhor resultado de reparo tecidual. Soares *et al.* (1989) utilizaram laser He-Ne com 3 J/cm² em feridas circulares experimentais em região dorsal de ratos e compararam-no a um grupo placebo. O grupo tratado irradiado apresentou maior re-epitelização, maior contração de feridas, maior concentração de fibroblastos e fibras colágenas. Autores que estudaram tanto a faixa infravermelha quanto vermelha do laser apontam que as menores doses abreviaram o processo inflamatório e favoreceram o reparo tecidual. Por isso, neste experimento, utilizou-se a dose de 3 J/cm² no espectro vermelho.

Os polimorfonucleares (PMN), como ilustrado na Fig.7 A, são elementos celulares predominantes na fase inflamatória aguda, sendo importantes para a fagocitose de agentes contaminantes e fragmentos produzidos pelo ferimento, além de conferirem a primeira linha de defesa contra agentes lesivos (KAWAI e AKIRA, 2006). Porém, a perpetuação destas células pode retardar as demais fases do processo inflamatório (HENDERSON *et al.*, 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; SCHRAMM e THORLACIUS, 2004). Ricevuti *et al.* (1989), em estudo *in vitro*, utilizando o laser He-Ne, afirmaram que a terapia laser é capaz de mobilizar mais rapidamente os fagócitos polimorfonucleares nas três primeiras horas e que, a partir das 72 horas, sua migração seria inibida. Entretanto, Honmura *et al.* (1992) afirmaram que o laser As-Ga inibe a quimiotaxia no momento inicial da lesão. No presente estudo, utilizando o laser Ga-Al-In-P, observou-se, do 3º ao 7º dia, uma tendência de queda desses elementos celulares; declínio este característico da gênese do fenômeno inflamatório e observado em ambos os grupos sem diferença estatística.

A diferenciação morfológica entre fibroblastos e macrófagos é difícil de ser realizada com microscopia de luz (SANADA *et al.*, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). No presente estudo optou-se por não fazer esta diferenciação, contudo a presença de abundante quantidade de macrófagos com grande variação de tamanho e forma foi confirmada pela técnica histoquímica para detecção da atividade de fosfatase ácida.

Rigau *et al.* (1994), em um estudo utilizando laser He-Ne em cultura de fibroblastos, observaram aumento da sobrevivência das células tratadas em relação ao grupo controle não irradiado. O mesmo foi observado por Young *et al.* (1989) com os lasers de 660 e 820 nm, na dosagem de 2 e 4 J/cm² para cada um deles, em macrófagos. Contudo os mesmos autores observaram que o laser com comprimento de 870 nm e mesma dosimetria parecia inibir esse fenômeno. Os resultados demonstrados por Rigau *et al.* (1994) e Young *et al.* (1989) em seus experimentos indicam que o tratamento com diferentes lasers e dosimetrias podem alterar o comportamento destas células. Houreld e Abrahamse (2008) em

estudo para analisar os efeitos do laser na proliferação de fibroastos e na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos utilizaram diferentes tipos de laser. O grupo irradiado com He-Ne (633 nm), com 5 J/cm², obteve fechamento completo da ferida e maior proliferação de fibroastos quando comparado aos demais grupos: os submetidos ao He-Ne (633 nm) com 16 J/cm²; e aos expostos à irradiação do Diodo 820 nm e Neodímio - Ítrio - Alumínio - Granada (Nd -YAG) 1064 nm. Resultados similares quanto aos efeitos do laser foram também descritos por Vinck *et al.* (2003). A curva observada neste estudo referente à dinâmica destes elementos celulares, ao longo do tempo, foi similar entre os grupos. Com a metodologia aplicada no presente estudo, o laser não interferiu na dinâmica de migração de macrófagos/fibroblastos, diferentemente do que foi citado em outros experimentos (Young *et al.*, 1989; Rigau *et al.*, 1994). Rigau *et al.* (1994) utilizando laser de 633 nm com intensidade de 4 j/cm² e Young *et al.* (1989) utilizando o mesmo tipo de laser com intensidades diferentes (2,4,6 e 8 J/cm²) relatam um notório predomínio de macrófago/fibroblasto do grupo teste em relação ao controle no momento inicial da lesão e que a manutenção de valores elevados durante o tratamento poderia, pela ação dessas células, diminuir o tempo necessário para a cicatrização e reparo tecidual. No presente estudo foi utilizado o laser Ga-Al-In-P 660 nm com intensidade de 3 J/cm²; quanto à proliferação, não houve diferença estatisticamente significativa entre testes e controles.

Papadimitriou *et al.* (1973) utilizaram o implante de filme plástico (*Melinex*) como modelo de indução de inflamação granulomatosa no tecido subcutâneo de ratos. Após dois dias do implante observaram pouca presença de células epitelióides multinucleadas no infiltrado inflamatório; que só foram notadas após três dias nas lamínulas implantadas no dorso de ratos (Mariano e Spector, 1974). Três dias parece ser o tempo mínimo para a transformação dos macrófagos típicos em células gigantes multinucleadas (Sutton e Weiss, 1966). Nossos resultados, como os de Papadimitriou *et al.* (1973), apontaram a presença de poucas células gigantes no terceiro dia do experimento, e não foi possível inferir

ação do laser sobre essas células visto não ter havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Batanouny *et al.* (2002), em estudo sobre a ação do laser He-Ne com dosagem de 3 J/cm^2 , na capacidade mitogênica em cultura de linfócitos, observaram proliferação dessas células após quatro dias de irradiação. Manteifel *et al.* (1997) em experimento similar também observaram que o laser He-Ne (633 nm) com 5 J/cm^2 seria capaz de induzir o aumento do número de linfócitos. Em outro estudo, também em cultura, os linfócitos quando submetidos à terapia laser Ga-Al-As de 820 nm e dosimetria de 3 J/cm^2 foram capazes de proliferarem; enquanto que em densidades maiores de energia (6 e 8 J/cm^2), esta proliferação seria inibida (Agaiby *et al.*, 2000). Neste experimento utilizamos o laser Ga-Al-In-P de 660 nanômetros com 3 J/cm^2 de densidade de energia e observamos equivalência entre os grupos quanto ao número de linfócitos nos diferentes intervalos de tempo analisados.

Bogsan *et al.* (2005) e Cipriano *et al.* (2003) descrevem que os linfócitos, presentes de maneira difusa na inflamação granulomatosa, estão associados à indução da formação de células gigantes e promoção da aceleração do processo de reparo tecidual. Os resultados do presente experimento mostram uma direção contrária, pois o maior aumento na formação das células gigantes (Figs. 9 e 10) foi observado exatamente quando o número de linfócitos alcançou seus menores índices indicando que a formação das células gigantes, possivelmente, não seja dependente da alta concentração de linfócitos.

Longo *et al.* (1987) realizaram um estudo com o laser-diodo de Ga-Al-As (904 nm) com uma aplicação diária, durante um período de cinco dias, com intensidade de 3 J/cm^2 em feridas experimentais no dorso de ratos e observaram menor processo inflamatório, maior regeneração epitelial e cicatrização aumentada nas feridas irradiadas, quando comparados ao grupo não irradiado. Diferentemente, Al-Watban e Zhang (1995) e Gonçalves e Parizzoto (1998) relatam haver necessidade de intervalo de tempo maiores entre as aplicações do laser constituindo-se, portanto, uma janela terapêutica para alcance dos efeitos

biológicos desejados. Supondo que o tempo entre as sessões seria um dos fatores de interferência na ação da terapia laser, é possível que intervalos de tempo maiores entre as aplicações refletisse diferentes resultados no presente estudo.

Nesses parâmetros de aplicação, com a dosimetria e o tempo utilizados, o laser Ga-Al-In-P não mostrou diferenças estatisticamente significativas na dinâmica de migração das células inflamatórias analisadas. Neste estudo não realizamos o teste de reflexão da luz laser na lamínula inserida no dorso do animal, e tampouco a análise de variação de temperatura da lamínula durante o tratamento com laser, esses fatores podem ter influenciado diretamente no processo de migração celular e conseqüentemente em nossos resultados. Entretanto, faz-se importante a análise de outras variáveis biológicas e procedimentos da aplicação do laser para avaliar os possíveis efeitos da radiação na migração celular e demais fatores envolvidos nestes processos.

6. CONCLUSÕES

- O implante de lamínulas de vidro no dorso de camundongos mostrou-se um bom modelo para indução de resposta inflamatória granulomatosa, confirmando dados da literatura;
- Na metodologia utilizada, com laserterapia de baixa potência Ga-Al-In-P 660 nanômetros, com intensidade de 3 J/cm^2 e aplicações diárias, os elementos celulares analisados não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados e não tratados, enquanto que ao longo do período de tempo do experimento, sua concentração variou, mostrando diferença estatisticamente significativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, ZA. Regressão da fibrose hepática. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(6):514-520 (2005).

AGAIBY, A; GHALI, L.; WILSON, R.; DYSON, M. Laser modulation of angiogenic factor production by T-lymphocytes. *Lasers Surg Med*, 26:357-363 (2000).

AL-WATBAN, FAH; ZHANG, Z. Stimulative and inhibitory effects of low incident levels of Argon laser energy on wound healing. *Laser Ther*, 7: 11-18 (1995).

ANNEROTH, G; HALL, G; RUDEN, H; ZETTERQVIST, L. The effects of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 26: 12-17 (1988).

BALBINO, CA; PEREIRA, LM; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farmac*, 41(1):65-69 (2005).

BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. Theory and Practice of Histological Techniques. (4. ed). Churchill Livingstone, New York. 1996.

BATANOUNY, M.; KORRAA, S.; FEKRY, O. Mitogenic potential inducible by He:Ne laser in human lymphocytes *in vitro*. *J Photochem and Photobiol B Biol* 68:1-7 (2002).

BAXTER, GD; BELL, AJ; ALLEN, JM; RAVEY, J. *Low level laser therapy. Physiotherapy.* 77:171-178 (1991).

BAXTER, G. D. *Therapeutic lasers: theory and practice.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

BOGSAN, CSB; BRITO, RRN; PALOS, MC; MORTARA, RA; ALMEIDA, SR; LOPES, JD; MARIANO, M. B-1 cells are pivotal for *in vivo* inflammatory giant cell formation. *Int J Experim Pathol* 86(4):257 (2005).

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia Geral.*(7.ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CAFALLI, FAZ; BORELLI, V; HOLZCHUH, MP; FARIAS, EC; CIPOLA, WWV; COUTINHO NETO, AC; LIVANI, B; XAVIER, CRM. Estudo experimental dos efeitos da radiação laser de baixa energia na regeneração osteocartilagínea em joelhos de coelhos. *Rev Bras Ortop* 28(9): 673-678 (1993).

CAMARGO, VM; COSTA, J; ANDRÉ, ES. Estudo comparativo entre dois tipos de raio laser de baixa potência e seus respectivos efeitos sobre a regeneração nervosa periférica. *Fis Mov* 19(2):127-134 (2006).

CATÃO, MHCV. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clínica odontológica na estomatologia *Rev Bras Patol Oral* 3(4):214-218 (2004).

CECCHERELLI, F; ALTAFINI, G; AVILA, A. Diode laser in cervical myofascial pain: a double-blind study versus placebo. *Clinic J of Pain.* 5:301-304 (1989).

CHAMBERS, T.J. Multinucleated giant cells. *J. Pathol.* 126:125–148 (1978).

CIPRIANO, IM; MARIANO, M; FREYMÜLLER, E; CARNEIRO, CRW. Murine macrophages cultured with IL-4 acquire a phenotype similar to that of epithelioid cells from granulomatous inflammation. *Inflam* 27 (4):201-211 (2003).

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br>> Acesso em: 02/Maio/2007.

COLLS, J. La terapia laser hoy. Barcelona: Edición Centro de Documentación Láser,1985.

COTRAN, RS; KUMAR, V; COLLINS, SL. Robbins: Patologia estrutural e funcional. (7.ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

DAO HJ.; KAZIN RA. Gender differences in skin: A review of the literature. *Clin. Exp. Derm.* 85:71-77 (2008).

DEVOR, M. What's in a laser beam for pain theory? *Pain.* 43:139-141 (1990).

ENELOW, RI.; SULLIVAN, GW.; CARPER, HT.; MANDELL, GL. Cytokine-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. *J. Infect. Dis.* 166: 664–668 (1992a).

ENELOW, RI.; SULLIVAN, GW.; CARPER, HT.; MANDELL, GL. Induction of multinucleated giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferongamma: comparison with other stimulating factors. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 6:57–62 (1992b).

FAIS, S.; BURGIO, VL.; CAPOBIANCHI, MR.; GESSANI, S.; PALLONE, F.; BELARDELLI, F. The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol Today.* 18: 522–527 (1997).

FAIS, S.; BURGIO, VL.; SILVESTRIM, M.; CAPOBIANCHI, MR.; PACCHIAROTTI, A.; PALLONE, F. Multinucleated giant cells generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation. *Lab. Invest.* 71: 737–744 (1994).

FERNANDES, BCTM; AMENDOIRA, MRR; FREIRE RB. Dinâmica populacional de células mielóides durante o curso da inflamação crônica em camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii*. *Cienc Rural.* 35(6): 1379-1385 (2005).

GAM, AN; THORSEN, H; LONNBERG, F. The effect of low intensity laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. *Pain.* 52: 63-66 (1993).

GIL, CD; COOPER, D; ROSIGNOLI, G; PERRETTI, M; OLIANI, SM. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and -3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflamm. Res.* 55: 99-107 (2006).

GILLMAN, T.; WRIGHT, LJ. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. *Nature* 209:263-265 (1966).

GIORDANO, V; KNACKFUSS, IG; GOMES, RC; GIORDANO, M; MENDONÇA, RG; COUTYNHO, F. Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Ortop.* 36(5):174-178 (2001).

GOATS, CG; FLETT, E; HUNTER, JA; STIRLING. A low intensity laser and phototherapy for rheumatoid arthritis. *Physiot.* 82 (5): 311-320 (1996).

GONÇALVES, G; PARIZOTTO, NA. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. *Rev. Bras. Fisiot,* 3: 5-13 (1998).

GUIDUGLI-NETO, J. Elementos de Patologia Geral. São Paulo: Santos, 1997.

GUIRRO, E.; GUIRRO, R. Fisioterapia dermatofuncional (3.ed). São Paulo: Manole, 2004.

HANSSON, GK; ROBERTSON, AKL; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1:297-329 (2006).

HASSAN, NF.; KAMANI, N.,; MESZAROS, MM.; DOUGLAS, SD. Induction of multinucleated giant cell formation from human blood-derived monocytes by phorbol myristate acetate in *in vitro* culture. *J. Immunol.* 143:2179–2184 (1989).

HENDERSON, RB; JOSIE, AR.; MATHIES, M.; HOGG, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*. 102 (1): 328-335 (2003).

HONMURA, A.; YANASE, M.; OBATA, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. *Laser Surg Med*, 12: 441-449 (1992).

HOURELD, NN.; ABRAHAMSE, H. Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med. Sci.* 23:11–18 (2008).

JAGIELSKI, J. Experimental use of laser as one of the methods of physiotherapeutical treatment. *Lasers Surg Med*. 15:124-127 (1993).

JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. (10.ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KARINA, M; SANFELICE, AE. Estudo dos efeitos do laser GaAlInP no processo de cicatrização de feridas induzidas em ratos. *FisioBrasil*. 74: 8-13 (2005).

KARU, T; PYATIBRAST, L; KALENDO, G; ESENALIEV, R. Effects of monochromatic low-intensity light and laser irradiation on adhesion of cells *in vitro*. *Lasers Surg and Med*. 18: 171-177 (1996).

KASHYAP, A; BEEZHOLD, D; WEISEMAN, J. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. *Am Surg*, 61: 486-491 (1995).

KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infections. *Nature Immunol*, 7:131-137 (2006).

KAZAZI, F.; CHANG, J.; LOPEZ, A.; VADAS, M.; CUNNINGHAM, AL. Interleukin 4 and human immunodeficiency virus stimulate LFA-1-ICAM-1-mediated aggregation of monocytes and subsequent giant cell formation. *J Ge. Virol*. 75(10): 2795–2802 (1994).

KING, PR. Low level laser therapy: a review. *Physiot Theor Pract*. 6:127-138 (1990).

KITCHEN, S. Eletroterapia Prática baseada em evidência. (11.ed). São Paulo: Manole, 2003.

KITCHEN, SS; PARTRIDGE, CJ. A review of Low level laser therapy. Part I: Background, physiological effects and hazards. *Physiot*. 77: 161-163 (1991).

KLEIN, G; BJORN, E. Low energy laser treatment and exercise for chronic back pain: double – blind controlled trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil*. 71: 34-37 (1990).

KOEKE, PU. Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento do tendão de rato em processo de reparo tecidual. [Dissertação de Mestrado] Instituto de Engenharia e Biociência, Universidade de São Paulo, 2003. 152p.

KREIPE, H; RADZUN, HJ; RUDOLPH, P; BARTH, J; HANSMANN, ML; HEIDORN, K; PARWARESCH, MR. Multinucleated giant cells generated in vitro. Terminally differentiated macrophages with down-regulated c-fms expression. *Am J Pathol.* 130(2):232-43(1988).

LAAKSO, L; RICHARDSON, C; CRAMOND, T. Factors affecting low level laser therapy. *Aust Physiot.* 33:95-99 (1993).

LAMPRETECH, P; GROSS, W. Wegener`s Granulomatosis. *Herz.* 29:47-56 (2004).

LONGO, L.; EVANGELISTA, S.; TINACCI, G.; SESTI, AG. Effects of diods-laser silver arsenide-aluminium (GaAlAs) 904 nm on healing of experimental wounds. *Laser Surg Med.* 7(5): 444-447 (1987).

LUCAS, C; CRIENS-POUBLONG, LJ; COCKRELL, CT; HAAN, RJ. Wound healing in cell studies and model animal experiments by low level laser therapy; were clinical studies justified? A systematic review. *Lasers Med Sucl.* 17: 110-134 (2002).

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. *J Photochem Photobiol B: Biol* 38: 25-30 (1997).

MARIANO, M. The experimental Granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev. Inst. Med.Trop.* 37 (2): 161-176 (1995).

MARIANO, M.; SPECTOR, WG. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *J. Pathol.* 113: 119 (1974).

McINNES, A; RENNICK, DN. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med*,167: 598-611 (1988).

McNALLY, AK.; ANDERSON, JM. β_1 and β_2 Integrins Mediate Adhesion During Macrophage Fusion and Multinucleated Foreign Body Giant Cell Formation. *American J Pathol.* 160(2): 621-630 (2002).

McNALLY, AK.; ANDERSON, JM. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.* 147: 1487–1499 (1995).

MEREDITH, JE.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Am. Soc Cell Bio.* 4: 953-961 (1993).

MESTER, E.; MESTER, A; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. *Laser Surg Med.* 5:31-39 (1985).

MÖST, J.; SPÖTL, L.; MAYR, G.; GASSER, A.; SARTI, A; DIERICH, MP. Formation of multinucleated giant cells *in vitro* is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Blood*, 89: 662-671 (1997).

NAGASAWA, H.; MIYAURA, C.; ABE, E.; SUDA, T.; HORIGUCHI, M. Fusion and activation of human alveolar macrophages induced by recombinant interferon-gamma and their suppression by dexamethasone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 916–921(1987).

NIEMZ, MH. *Laser-Tissue Interactions: Fundamentals and Applications.* (3.ed). New York: Springer, 1996.

OLIVEIRA, AV; FRÖNER, TM; SOARES, LB. O uso do laser GaAlInP no processo de cicatrização de úlcera de decúbito: Relato de caso. *FisioBrasil.* 74: 23-26 (2005).

OHSHIRO, T; FUJINO, T. Laser applications in plastic and reconstructive surgery. *Keio J. Med.* 42(4):191-195 (1993).

PAPADIMITRIOU, JM; SFORCINA, D; PAPAELIAS, L. Kinetics of multinucleate giant cell formation and their modification by various agents in foreign body reaction. *Am J Pathol,* 73(2): 349-362 (1973).

PARIZOTTO, NA. Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho. [Tese de doutorado]. Faculdade de Engenharia e computação. Universidade Estadual de Campinas, 1998. 181p.

PARRISH, J; DEUTSCH, T. Laser photomedicine. *IEEE, J quant electr.* QE-20; 12:1386-96 (1984).

POSTLETHWAITE, AE; SMITH, GN; MAINARDI, CL; SEYER, JM; KANG, AH. Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules. *J. Immunol.* 132:2470-7 (1984).

PRENTICE, WE. Modalidades terapêuticas para fisioterapeutas. (2.ed). Porto Alegre: Artmed, 2004.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, 2008.

RICEVUTI, G. *et al.* *In vivo* and *in vitro* He-Ne laser effects on phagocyte functions. *Inflamm*, 13(5): 507-527 (1989).

RIGAU, J; SUN, C; TRELLES, M; BERNES, M. Effects of the 633 nm laser on the behaviour and morphology of primary fibroblast culture. *SPIE*, 2630(41):38-42 (1994).

ROSS, R.; DIGIOVANNA, JJ.; CAPALDI, L.; ARGENYI, Z.; FLECKMAN, P.; ROBINSON, B. Histopathologic characterization of epidermolytic hyperkeratosis: a systematic review of histology from the National Registry for Ichthyosis and Related Skin Disorders. *J. Invest. Derm.* 59(1):86-90 (2008).

RYAN, GB.; SPECTOR, WG. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. *Proc. R. Soc.*, 175: 269-292 (1970).

SANADA, JT. *et al.* Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. *J. Appl. Oral Sci.*, 11(3):209-215 (2003).

SCHRAMM, R; THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids. *Inflamm. Res.* 53: 644-652 (2004).

SHERWOOD, ER.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anesthesiol.* 18: 385-405 (2004).

SCHINDL, A.; SCHINDL, M.; SCHON, H.; KNOBLER, R.; HAVELEC, L.; SCHINDL, L. Low-intensity laser irradiation improves skin circulation in patients with diabetic microangiopathy. *Diabetes care*, 21:580-584 (1998).

SOARES, JH; TARDIVO, JP; GOLDENBERG, S; KATZ, S; MOURA, LAR. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o laser de Hélio-Neônio. *Acta Cir. Bras.* 4(2): 56-60 (1989).

SUTTON, JS.; WEISS, L. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. *J Cell Biol*, 28: 303-331 (1966).

TAKASHIMA, T.; OHNISHI, K.; TSUYUGUCHI, I.; KISHIMOTO, S. Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-

stimulated human blood monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J. Immunol.* 150: 3002–3010 (1993).

TATARUNAS, AC.; MATERA, JM.; DAGLI, MLZ. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico: utilização do laser de baixa potência GaAs (904 nm). *Acta Cir. Bras.* 13(2):127-132 (1998).

TUNÉR, J; HODE, L. It's all in parameters: a critical analysis of some well-know negative studies on low level laser therapy. *J Clin Laser Med Surg.* 16(5): 245-248 (1998).

VINCK, E; CAGNIE, BJ.; CORNELISSEN, MJ.; DECLERCQ, HA.; DIRK, CC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 18: 95–99 (2003).

WEINBERG, JB.; HOBBS, MM.; MISUKONIS, MA. Recombinant human gamma-interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 :4554–4557 (1984).

WILDEN, L; KARTHEIN, R. Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. *J Clin Laser Med Surg* (1998).

WILLIAMS, GT; WILLIAMS, JW. Granulomatous inflammation: a review. *J Clin Pathol.* 36:723-733 (1983).

YOUNG, S; BOLTON, P; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C.
Macrophage responsiveness to light therapy. *Laser Surg Med*, 9: 497-505 (1989).

ANEXOS

Anexo 1. Quadro com frequências absolutas dos elementos celulares analisados

C₃	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2108 Células)	134 9	296	463	–
Animal 2 (1835 Células)	150 7	157	171	–
Animal 3 (2623 Células)	179 0	278	555	–
Animal 4 (3195 Células)	228 4	293	610	08

T₃	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2215 Células)	134 5	267	601	02
Animal 2 (2634 Células)	184 0	294	495	05
Animal 3 (3585 Células)	220 0	414	971	–
Animal 4 (4589 Células)	260 1	469	1458	61

C₇	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2761 Células)	105 6	282	1340	83
Animal 2 (3334 Células)	787	513	1706	328
Animal 3 (3544 Células)	81	480	2630	353
Animal 4 (4088 Células)	244 8	276	1347	17

T₇	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
----------------------	---------	----------------	-----------	-------------------

Animal 1 (3945 Células)	787	240	2685	233
Animal 2 (2198 Células)	324	332	1221	321
Animal 3 (2367 Células)	210	306	1598	253
Animal 4 (2377 Células)	720	389	1115	153

C₁₅	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (1937 Células)	21	495	1599	543
Animal 3 (4698 Células)	08	546	3320	824
Animal 4 (2375 Células)	179	183	1474	339
Animal 5 (2519 Células)	135	357	1740	287

T₁₅	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2851 Células)	04	283	2067	497
Animal 2 (2249 Células)	12	268	1542	427
Animal 3 (3851 Células)	–	422	2771	658
Animal 5 (1017 Células)	–	183	606	228

C₃₀	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2493 Células)	63	170	1460	970
Animal 2 (3108 Células)	31	169	2372	536
Animal 4 (2919 Células)	208	327	1983	401
Animal 5 (2834 Células)	309	202	1838	485

T₃₀	PM	LINFÓCIT	MAC / FIB	CÉL.
-----------------------	----	----------	-----------	------

	N	OS		GIGANTES.
Animal 1 (1980 Células)	136	150	1483	211
Animal 2 (4974 Células)	–	257	3344	1373
Animal 3 (3862 Células)	–	320	2692	850
Animal 4 (3017 Células)	239	323	1858	597

C₄₅	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (2588 Células)	231	255	1596	506
Animal 2 (3018 Células)	110	228	1944	736
Animal 3 (2578 Células)	255	200	1519	604
Animal 4 (2652 Células)	365	222	1761	304

T₄₅	PM N	LINFÓCIT OS	MAC / FIB	CÉL. GIGANTES.
Animal 1 (1602 Células)	07	96	1252	247
Animal 2 (1753 Células)	69	218	1139	327
Animal 3 (2275 Células)	73	220	1442	540
Animal 4 (2143 Células)	–	129	1453	561

Anexo 2. Tabela de distribuição das médias dos elementos celulares por tempo de estudo para os grupos teste e controle

	PMN	Linfócito	M/F	CG
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
Tempo				
3				
Teste	1996,50 (478)	361 (86)	881,25 (389)	17 (26)
Controle	1732,50 (367)	256 (59)	449,25 (175)	2 (3)
Tempo				
7				
Teste	510,25 (256)	316,75 (55)	1654,75 (642)	240 (62)
Controle	1093 (888)	387,75 (113)	1755,75 (543)	195,25 (152)
Tempo				
15				
Teste	4 (5)	296,50 (88)	1746,50 (816)	452,50 (159)
Controle	85,75 (75)	395,15 (145)	2033,25 (773)	498.25 (218)
Tempo				
30				
Teste	93,75 (104)	262,50 (72)	2344,25 (748)	757,75 (436)
Controle	152,75 (116)	217 (67)	1913,25 (337)	598 (227)
Tempo				

45

Teste	37,25 (35)	165,75 (56)	1321,50 (137)	418,75 (139)
Controle	240,25 (93)	226,25 (20)	1705 (169)	537,50 (163)

PMN = Polimorfonucleares; M/F = Macrófago/Fibroblasto; CG = Células gigantes.

DP = Desvio-padrão

Anexo 3. *Outputs* das análises dos elementos celulares em função do tempo e da irradiação por laser, utilizando o programa estatístico R *Development Core Team*

Polimorfonucleares (PMN)

	D	Deviance	D	Resid	F	Pr(>F)
	f	Resid	f	Dev		
I(dias^	1	17960372	3	6773782	100.7	4.164e-12
_2)			8		141	***
Tratame	1	175562	3	6598219	0.984	0.3275
nto			7		5	

Signif.codes 0 (***) 0.001 (**) 0.01 (*) 0.05 (.) 0.1 () 1

Linfócitos

	D	Deviance	D	Resid	F	Pr(>F)
	f	Resid	f	Dev		
I(dias^	1	119936	3	350972	12.73	0.001014 **
_2)			8		62	
Tratame	1	2544	3	348428	0.270	0.606325
nto			7		2	

Signif.codes 0 (***) 0.001 (**) 0.01 (*) 0.05 (.) 0.1 () 1

Macrófagos (MAC)

	D	Deviance	D	Resid	F	Pr(>F)
	f	Resid	f	Dev		
I(dias^	1	6550262	3	1373962		0.0001980
_2)			8	3		***
Tratame	1	3331	3	1373629	0.008	0.9260812
nto			7	2	7	

Signific.codes 0 (***) 0.001 (**) 0.01 (*) 0.05 (.) 0.1 () 1

Células gigantes (CG)

	D	Deviance	D	Resid	F	Pr(>F)
	f	Resid	f	Dev		
I(dias^	1	980046	3	1546032	22.83	0.0002826
_2)			8		87	***
Tratame	1	1210	3	1544822	0.028	0.8676
nto			7		2	

Signific.codes 0 (***) 0.001 (**) 0.01 (*) 0.05 (.) 0.1 () 1