

**ANTÔNIO MÁRCIO TEIXEIRA MARCHIONNI**

**INFLUÊNCIA DO LASER AsGaAl ( $\lambda$ 670nm) E DA  
DEXAMETASONA NA CRONOLOGIA DO  
REPARO CUTÂNEO**



**PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**SALVADOR**

**2008**

**ANTÔNIO MÁRCIO TEIXEIRA MARCHIONNI**

**INFLUÊNCIA DO LASER AsGaAl ( $\lambda$ 670nm) E DA  
DEXAMETASONA NA CRONOLOGIA DO  
REPARO CUTÂNEO**

**Tese apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba e Universidade Federal da Bahia em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor – área de concentração Laser na Odontologia**

**Orientadores: Professora Doutora Silvia Regina de Almeida Reis**

**Professor Doutor Antônio Luiz Barbosa Pinheiro**

**SALVADOR**

**2008**

M316 Marchionni, Antônio Márcio Teixeira  
Influência do laser GaAIIAs ( $\lambda 670\text{nm}$ ) e da dexametasona na cronologia do reparo cutâneo / Antônio Márcio Teixeira Marchionni. - Salvador, 2008.

86 p. : il.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Regina de Almeida Reis.

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia / Universidade Federal da Paraíba, 2008.

1. Lasers. 2. Dexametasona. 3. Inflamação. 4. Cicatrização de feridas. 5. Fototerapia. 6. Odontologia. I. Universidade Federal da Bahia. II. Universidade Federal da Paraíba. III. Reis, Silvia Regina de Almeida. IV. Pinheiro, Antônio Luiz Barbosa. V. Título.

CDU 616.314:621.375.826

***DEDICATÓRIA***

## **DEDICATÓRIA**

### **À Deus**

“O Senhor Deus disse a Moisés: Fale com Arão e com seus filhos e diga-lhes que abençoem o povo de Israel do seguinte modo:

“Que o Senhor os abençoe e os guarde; que o Senhor os trate com bondade e misericórdia;

Que o Senhor olhe para vocês com amor e lhes dê a paz”.

E Deus disse: Assim, Arão e os seus filhos pedirão as minhas bênçãos para o povo de Israel, e eu os abençoarei”. (números, 6, 22-27).

Dedico esta vitória a Deus que sempre tem misericórdia de mim e me abençoa em todas as missões.

### **À minha esposa Priscila Marchionni**

À Priscila, primeira pessoa que dedico esta conquista, por ter vivido comigo todos os instantes deste doutorado. Foi quem mais intensamente suportou os momentos insuportáveis e vibrou as alegrias alcançadas. A você, minha querida, reitero meu amor e sonho viver muitos outros momentos de aprendizagem e vitórias.

### **Aos meus pais, Giulio e Lúcia Marchionni**

A vocês que sempre foram exemplos de persistência e dedicação. Ao observar pessoas tão empreendedoras como vocês, me empolgo e observo claramente que a juventude e a alegria de viver é fruto dos nossos sonhos e realizações.

**AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

### **À Virgem Maria Mãe de Deus**

“Quando acabou o vinho, a mãe de Jesus lhe disse: O vinho acabou”. (João, 2, 3). Assim como nas bodas de Caná, tenho certeza que Nossa Senhora intercede por mim em todas as situações. Muitos foram os momentos que solicitei sua interseção durante a realização deste curso e por isto agradeço seu carinho de Mãe amorosa.

### **Aos Profs<sup>o</sup>. Drs. Silvia Reis e Miguel Setúbal,**

Assim como a estrela de Davi guiou os magos para a visita ao Menino Jesus, algumas são as estrelas que o Senhor determinar para guiar e iluminar nossa vida. Tenho certeza, Miguel e Silvia, que vocês são estrelas em minha vida, sempre me oferecendo o melhor. Obrigado por todo apoio e orientações.

**Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio Luiz Barbosa Pinheiro,** grande liderança no curso de doutorado em Laser da UFBA. Muito obrigado pelos ensinamentos e pelo convívio.

**À Prof<sup>a</sup>. Dra. Aparecida Marques,** obrigado pela agradável companhia e pelos ensinamentos transmitidos nas aulas e nas conversas informais.

**Aos colegas Fernando Habib e Sabrina Kívia,** entre as conquistas alcançadas neste curso de doutoramento, estão as amizades destes dois colegas que se mostraram grandes seres humanos e irmãos zelosos. À vocês, muito obrigado pelo convívio destes anos.

**Aos colegas, Carolina Carvalho, Nicole Ribeiro, Priscila Chagas, Márcio Lisboa, Ana Paula Cavalcante, Cristina Nascimento e Lívia Prates,** muito obrigado pelo aprendizado que obtive nos seminários e no convívio. Obrigado

ainda pela sincera amizade que construímos ao longo deste período e pelos alegres e prazerosos dias que estivemos juntos nas viagens do curso.

**Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Jean Nunes**, obrigado pelas aulas e a constante disponibilidade em atender nossas solicitações.

**À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Ramalho**, obrigado pelo aprendizado adquirido em suas aulas e pela amizade sempre presente.

**À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Cangussu**, professora que não mediu esforços no sentido de ajudar e muito contribuiu na realização do estudo estatístico deste trabalho.

**À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Pereira Viana**, diretora da Faculdade de Odontologia sempre presente no Centro de Laser e grande incentivadora do aperfeiçoamento da nossa formação.

**Aos Professores do Programa Integrado de Pós-Graduação em Odontologia UFPB – UFBA, Área de Concentração-Laser**, Doutores: Aldo Brugnera Júnior, André Carlos de Freitas, Chukuka Enwemeka, Cláudia Roberta Leite de Figueiredo, Cristina Pacheco Soares, Fátima Zanin, Lino João da Costa, Maria Carméli Correia Sampaio, Maria José P. Ramalho, Marília G. de Oliveira, Newton Soares da Silva, Ricardo Cavalcanti Duarte, e Viviane de Almeida Sarmiento, pelo muito que contribuíram em nossa formação.

**À Profs<sup>a</sup>. Drs<sup>a</sup>. Gabriela Martins e Alena Medrado**, integrantes de um grupo maravilhoso. Obrigado pelo apoio, pelas aulas ministradas para mim a fim de permitirem que eu cumprisse minhas obrigações no doutorado.

**Ao Prof. Dr. Urbino Tunes**, obrigado pela presença amiga e pelo apoio em todos os momentos que necessitei de auxílio.



**Aos colegas professores do Curso de Odontologia da EBMSp**, pelo constante incentivo na realização de uma carreira acadêmica.

**Ao PET**, que de forma amigável e sincera me ofereceu abrigo e todos os recursos de sua estrutura para que eu pudesse estudar nos momentos em que tive que permanecer na faculdade.

**À disciplina de Ortodontia**, obrigado pelo acolhimento em muitos momentos de estudo.

**Às minhas irmãs, Viviane e Flaviani**, obrigado pelo companheirismo e cumplicidade. Agradeço também pelos irmãos Darlan e Roberto. Obrigado ainda por Felipe e Thiago que são como luzes irradiando alegria no meio de nossa família.

**Roberto, Marise, Roberto Filho, Thais, Raimundo e Gabriela, vovó Floriceia *In memória***, a esta minha família que tão carinhosamente me acolhe e fortalece. Agradeço por todo o apoio e pela mão forte que sempre é estendida a qualquer momento.

**Evaristo e Alice Andrade**, alguns são os pais que conquistamos ao longo da nossa caminhada. Gratidão é apenas um pequeno sentimento que tenho diante do imenso carinho que sinto por vocês. Espero estar sempre muito próximo do convívio desta família.

**Eliene Pinho**, presença amigável que muito me auxiliou na administração do consultório. Com sua ajuda e delicada forma de se comunicar com os pacientes foi possível atendê-los nas horas vagas.

**Aos estagiários e ex-estagiários do Centro de Laser da FOUFBA**, especialmente, Fernando Presídio, Gardênia Matos, Eliane Pires, Juliana Lacerda e Juliana Monteiro, pela seriedade e dedicação de todos vocês.



## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1. Ferida cutânea.....	27
2.2. Processo de reparo cutâneo.....	28
2.3. Laser de baixa potência.....	31
2.3.1. Aspectos básicos.....	31
2.3.2. Interação laser / tecido.....	33
2.4. Controle medicamentoso das feridas.....	39
2.4.1. Dexametasona.....	40
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo geral.....	45
3.2. Objetivos específicos.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1. Aspectos éticos.....	47
4.2. Animais.....	47
4.3. Manejo dos animais.....	47

4.4. <i>Procedimento cirúrgico</i> .....	47
4.5. <i>Grupos experimentais</i> .....	48
4.6. <i>Processamento histológico</i> .....	49
4.7. <i>Imuno-histoquímica</i> .....	50
4.8. <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i> .....	51
4.9. <i>Análise semi-quantitativa</i> .....	51
4.10. <i>Análise estatística</i> .....	53
5. RESULTADOS.....	54
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÃO.....	77
8. REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO.....	88

***LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS, FIGURAS E TABELAS***

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

°C.....	Graus centígrados
®.....	Marca registrada
g.....	Gramas
mg.....	Miligrama
Kg.....	Quilograma de peso
mg/kg.....	Miligrama por quilograma de peso
mm.....	Milímetros
%.....	Porcentagem
J.....	Joule
J/cm <sup>2</sup> .....	Joule por centímetro quadrado
AsGaAl.....	Arseneto de gálio alumínio
mW.....	Milliwatt
W/cm <sup>2</sup> .....	Watt por centímetro quadrado
mW/cm <sup>2</sup> .....	Milliwatt por centímetro quadrado
nm.....	Nanômetros
$\lambda$ .....	Comprimento de onda
cm <sup>2</sup> .....	Centímetro quadrado
ml.....	Mililitro
$\mu$ m.....	Micrômetros
kV.....	Quilovolt
AsGa.....	Arseneto de gálio
Hz.....	Hertz
P.....	Potência
DP.....	Densidade de potência

DE.....	Densidade de energia
HeNe.....	Helium Neon
>.....	Maior que
<.....	Menor que
≤.....	Menor ou igual a
RNAm.....	Ácido ribonucléico mensageiro
COX-2.....	Ciclooxigenase dois
TNF-α.....	Fator de Necrose Tumoral-α (Tumor necrose factor-α)
TGF-β.....	Fator de Crescimento Transformador-β (Transforming growth factor-β)
FGF.....	Fator de Crescimento de Fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Administração intraperitoneal dos medicamentos e soro fisiológico. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 47
- Figura 2. Realização da cirurgia com “punch” de 6 mm. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 47
- Figura 3. Aparelho de laser diodo semiconductor de GaAlAs. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 48
- Figura 4. Aplicação do laser sobre a lesão. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 48
- Figura 5. Remoção do tecido após morte dos animais. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 49
- Figura 6. Secção do tecido para encaminhar à microscopia. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 49
- Figura 7. Região cicatricial com presença moderada de células inflamatórias e intensa de edema. Grupo controle, 24 horas. (HE, Escala= 0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 56
- Figura 8. Discreta presença de células inflamatórias e edema. Grupo laser, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala= 0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 56
- Figura 9. Tecido conjuntivo com discreta presença de edema e componente matricial escasso. Grupo dexametasona, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 56
- Figura 10. Presença moderada de edema. Grupo laser associado à dexametasona, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 56
- Figura 11. Distribuição discreta de fibras colágenas. Grupo controle, 5º dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 62
- Figura 12. Fibras colágenas mais expressas e com padrão organizacional mais acentuado. Grupo laser, 5º dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 62
- Figura 13. Discreta presença de fibras colágenas esparsamente distribuídas. Grupo dexametasona, 5º dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 63



Figura 14. Moderada presença de fibras colágenas em meio a vasos dilatados. Grupo laser associado à dexametasona, 5<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 63

Figura 15. Células actino-positivas na região cicatricial. Grupo laser, 7<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Streptoavidina Biotina, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 67

Figura 16. Distribuição discreta de imunomarcção para actina- $\alpha$  de músculo liso. Grupo laser associado à dexametasona, 7<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Streptoavidina Biotina, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 67

Figura 17. Miofibroblastos exibindo contatos focais (\*), com núcleos de contorno irregular e presença de indentações (setas). Eletromicrografia, 4.400X. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 69

Figura 18. Miofibroblasto em detalhe, evidenciando-se ao longo da membrana, corpos densos (setas). Eletromicrografia, 7.000X. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008). 69

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Critério usado para análise da microscopia óptica	51
Tabela 2. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de edema na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	54
Tabela 3. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de células polimorfonucleares na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	55
Tabela 4. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de células mononucleares na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	59
Tabela 5. Percentual dos animais com intensa, moderada, discreta ou ausência histológica de colágeno na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	61
Tabela 6. Distribuição do percentual de animais cujas imunomarcações exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de actina- $\alpha$ de músculo liso na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	65
Tabela 7. Distribuição do percentual de animais cujas imunomarcações exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de desmina na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).	66

***RESUMO***

## **RESUMO**

O reparo tecidual inicia-se com a inflamação e tem continuidade com a presença de células secretoras e contráteis. Intervenções terapêuticas, como a fototerapia e a dexametasona, podem interferir neste processo biológico. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a influencia destes dois agentes sobre o processo inflamatório e cicatricial. Foram realizadas feridas cutâneas padronizadas em 80 ratos, *wistar*, distribuídos em quatro grupos. O grupo controle isento de terapêutica. O grupo laser com a aplicação da radiação do laser diodo de AsGaAl, 9mW,  $\lambda 670\text{nm}$ ,  $0,031\text{W/cm}^2$  e  $4\text{J/cm}^2$ , em dose única após a cirurgia. O grupo dexametasona submetido à administração de 2mg/kg deste medicamento 1 hora antes da cirurgia e o grupo com associação de ambas as terapias submetido aos mesmos parâmetros descritos anteriormente. Após a morte dos animais o tecido foi corado com HE e avaliou-se edema, células polimorfonucleares e mononucleares. Com o sítius vermelho analisou-se a matriz de colágeno. Foram utilizadas também a imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de transmissão para avaliar os miofibroblastos. As mudanças nos achados das variáveis foram analisadas de forma semi-quantitativa. Os resultados demonstraram que o laser e a dexametasona atuaram de forma semelhantes atenuando a inflamação aguda. A síntese de colágeno e a expressão de miofibroblastos foi mais intensa no grupo laser, do que no grupo dexametasona com diferenças estatisticamente significativas em alguns períodos ( $p \leq 0,005$ ). Na associação das terapias, a expressão do colágeno e de células actino- $\alpha$  e desmimo positivas foram menos expressivas do que o grupo tratado apenas com o laser. Assim, o laser foi eficiente em reduzir o edema e as células polimorfonucleares e acelerar o reparo tecidual, agindo como um bioestimulador, mesmo na presença da dexametasona.

Descritores: Laser, dexametasona, inflamação, reparo tecidual

***ABSTRACT***

## **ABSTRACT**

Tissue healing begins with inflammation and ends up with the presence of secretory and contractile cells. Interventions such as low level laser therapy and dexamethasone, can act at this biological process. This study aimed to evaluate the interference of these two agents on inflammatory and healing mechanism including myofibroblasts. Standard skin wounds were performed at 80 Wistar rats, distributed into four groups. The first group was the control, free of therapy. The laser group received the application of GaAlAs diode laser, 9mW, 670nm, 0,031W/cm<sup>2</sup> 4J/cm<sup>2</sup>, on a single dose after surgery. The dexamethasone group was submitted to administration of 2mg/kg of this drug, 1 hour before surgery, and, finally, the last group received a combination of laser and dexamethasone treatments, at the same parameters previously described. After animal death, tissue was examined using the histology stained by HE, to evaluate swelling, polymorphonuclear and mononuclear cells. The collagen matrix was reviewed by sirius red. Immuno-histochemistry and transmission electron microscopy were also used to assess myofibroblasts. The changes in the findings of the variables were analyzed in a semi-quantitative way. The results showed that the laser and dexamethasone therapies acted in a similar manner to weaken acute inflammation. Collagen synthesis and myofibroblasts expression were more intense at laser group than dexamethasone, with a significant difference in some periods. At combination of therapies, the expression of collagen, actin and desmin positive cells were less expressive than the group treated with laser only. Laser treatment was effective in reducing swelling and polymorphonuclear cells, as well as accelerating tissue repair, acting as a bioestimulador, even in the presence of dexamethasone.

Key words: Laser, dexamethasone, inflammation, wound healing



## **1 - INTRODUÇÃO**

O reparo tecidual é um processo dinâmico e interativo entre diversos agentes bioquímicos e celulares. Inicialmente ocorre ativação, migração e proliferação de células inflamatórias que surgem com o desenvolvimento de processos exsudativos associados, fundamentalmente, a presença de células polimorfonucleares. Esta fase exudativa é a resposta inflamatória aguda e aparece sempre que há uma agressão tecidual. Em seguida surgem as células mononucleares, vasos e fibras formando o tecido de granulação (BLAKYTNY *et al.*, 2006). Neste microambiente, surgem os fibroblastos, que preenchem a lesão, através da produção do colágeno e de outras proteínas matriciais.

Outras células participam do reparo tecidual, atuando na síntese protéica e determinando ao tecido o fenômeno da contração. Estas células se apresentam com filamentos musculares e são caracterizadas como miofibroblastos. Em virtude destas características, o miofibroblasto exerce força sobre a matriz colagênica e assim apresenta uma ação central na contração da ferida (GARRETT *et al.*, 2004).

Medicamentos antiinflamatórios são utilizados na clínica odontológica, com a finalidade de reduzir a sintomatologia gerada pela fase aguda do processo inflamatório. Glicocorticóides, como a dexametasona, são muito utilizados em doenças inflamatórias, processos alérgicos e após procedimentos cirúrgicos, em virtude dos seus efeitos sobre a resposta imune. Este medicamento inibe a produção de citocinas, ativação, proliferação e sobrevivência das células T. Além disto, atua na diminuição da migração celular, da resposta vascular aos estímulos agressivos, bloqueia a liberação de prostaglandinas e leucotrienos através da inibição da fosfolipase A2 (MOORE



*et al.*, 2005). Diante deste variado mecanismo de atividades sobre o processo inflamatório, a dexametasona inibe também a atividade de fatores de crescimento e compromete a função secretora dos fibroblastos (WEN *et al.*, 2002; WEN *et al.*, 2003; GRAS *et al.*, 2001). Conseqüentemente, haverá uma menor síntese de colágeno e inibição do reparo tecidual (TALAS *et al.*, 2003; MARCHIONNI *et al.*, 2001).

A fotobioestimulação, por sua vez, tem demonstrado otimizar a cicatrização em lesões teciduais. Há muitos trabalhos evidenciando que o laser em baixa potência apresenta ação reguladora sobre a resposta inflamatória, reduz a sintomatologia dolorosa e estimula o reparo tecidual (KANDOLF-SEKULOVIC *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2005). Esta atuação, entretanto, depende dos tipos de luz e dos protocolos utilizados (POSTERN *et al.*, 2005; GULSOY *et al.*, 2006). Elevados níveis de energia aplicados sobre o tecido também pode inibir os eventos bioquímicos e celulares (PINHEIRO *et al.*, 2005). Assim, muitos estudos ainda necessitam ser realizados com o intuito de demonstrar as melhores indicações para os diferentes tipos de lasers.

Apesar de estar demonstrado que o laser de GaAlAs aumenta a expressão de miofilamentos celulares (PINHEIRO *et al.*, 2005; MEDRADO *et al.*, 2003), existe escassez de estudos científicos objetivando caracterizar as possíveis interferências da fotobiomodulação na expressão de miofibroblastos, associados a antiinflamatórios durante o reparo cutâneo. Este estudo tem o objetivo de verificar de que forma a terapia a laser em associação com a dexametasona poderá atuar como um recurso fotobioestimulador sobre o reparo tecidual, especialmente sobre os miofibroblastos e sobre as células que sintetizam elementos fibrilares.

**2 - REVISÃO DA LITERATURA**

## **2 - REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 – Ferida cutânea**

Uma das primeiras decisões a ser tomadas quando se pretende realizar um estudo com animais, utilizando o modelo experimental de lesões cutâneas, é a forma da ferida. Normalmente são realizados desenhos circulares, quadrados ou simplesmente incisões cirúrgicas. Este último dará origem a cicatrizes lineares e promoverá um fechamento por união primária ou cicatriz por primeira intenção (MAWAKI, *et al.* 2007).

As lesões quadradas ou circulares são utilizadas quando se deseja uma cicatrização mais lenta, com formação de maior quantidade de tecido de granulação, também conhecida como união secundária ou por segunda intenção. O período de fechamento entre estas duas feridas são semelhantes quando realizadas lesões de iguais tamanhos. Nas lesões quadradas, entretanto, a partir do terceiro dia da realização da ferida, ocorre um arredondamento com o desaparecimento dos ângulos. Por volta do 11º dia, contudo, esta área reaparece com uma intensa fibrose e confere à cicatriz uma forma estrelar (MAWAKI, *et al.* 2007).

O padrão histológico, por sua vez, confirma que as feridas quadradas apresentam uma fibrose nos ângulos que se forma precocemente. Nestas áreas ocorre ainda uma escassa presença de miofibroblastos, os quais se concentram nas margens paralelas das feridas e realizam uma contração aproximando principalmente estas áreas e favorecendo à formação da cicatriz estrelar. As feridas circulares, entretanto, apresentam um padrão mais uniforme com uma distribuição padronizada dos miofibroblastos ao longo das margens

das feridas e um fechamento sem regiões de fibroses precoces (MAWAKI, *et al.* 2007).

## **2.2 - Processo de reparo cutâneo**

O processo cicatricial cutâneo é dinâmico e envolve a ação integrada de uma variedade de tipos celulares, elementos da matriz extracelular e de mediadores solúveis como as citocinas. Este evento requer a interação de muitos tipos de células, incluindo células inflamatórias, fibroblastos, miofibroblastos, ceratinócitos e células endoteliais, assim como o envolvimento dos fatores de crescimento (BLAKYTNY *et al.*, 2006; McGRORY *et al.*, 2004; CHANSON *et al.*, 2004; MUTSAERS *et al.*, 1997).

A cicatrização de um tecido cutâneo lesado inicia-se com a formação do coágulo, seguida pela instalação da inflamação, angiogênese, formação do tecido de granulação, contração da ferida, reepitelização, formação da cicatriz e finalmente pela remodelação do tecido (ISHIDA *et al.*, 2004). O dano aos vasos sanguíneos durante a injúria tecidual causa o rompimento endotelial e a exposição sanguínea ao colágeno, evento que promove a agregação plaquetária. As plaquetas ligadas ao colágeno tornam-se ativadas e liberam proteínas responsáveis pela vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e migração das células inflamatórias. (BLAKYTNY *et al.*, 2006; MUTSAERS *et al.*, 1997).

Inicia-se, assim, a inflamação que é, fundamentalmente, uma resposta protetora com objetivo de livrar o organismo da causa inicial da lesão e dos tecidos necróticos. Sem inflamação, as infecções prosseguiriam livres e as feridas ficariam abertas permanentemente. A reação inflamatória, por outro lado, é potencialmente lesiva, medida que também promove agressão tecidual,

dá origem a reações de hipersensibilidade e é causa de doenças crônicas de origem auto-imune.

Inicialmente os neutrófilos, células polimorfonucleares, são as primeiras células a serem recrutadas para o local da injúria e, por sua vez, também liberam citocinas e fatores de crescimento que atraem e estimulam a proliferação e ativação de outras células. A atividade neutrofílica participa no debridamento da ferida, mas também tem ação destrutiva para os tecidos circunjacentes intactos (MUTSAERS *et al.*, 1997). Esta etapa caracteriza a fase exsudativa do processo inflamatório e clinicamente manifesta-se com edema e sintomatologia dolorosa ao paciente (CHANSON *et al.*, 2004).

A dor é ocasionada pela agressão direta às terminações nervosas no tecido e pelas citocinas pró-inflamatórias que surgem no local da ferida. O aparecimento da sintomatologia dolorosa e do edema coincide, por exemplo, com a elevação do nível de RNAm para a cicloxigenase-2 (COX-2), enzima tecidual que dá origem à prostaglandinas como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (SIMON *et al.*, 1999).

A função do neutrófilo de fagocitar tecido necrótico e bactérias é continuada pelos monócitos. Estas células secretam citocinas e fatores de crescimento juntamente com as células endoteliais e ceratinócitos, dando início a formação do tecido de granulação (McGRORY *et al.*, 2004; CHANSON *et al.*, 2004). Estão presentes, neste momento, citocinas pro-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (Il-1 $\alpha$ , Il-1 $\beta$ ), interleucina-2, entre outros (CHANSON *et al.*, 2004). O TGF- $\beta$  estimula os fibroblastos a produzir colágeno e fibronectina, levando ao início da fase proliferativa, caracterizada pelo predomínio dos processos de angiogênese, fibroplasia e reepitelização

(BRAUN *et al.*, 2002; SCHWARTZ *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 1999). Outro mediador secretado é o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) que atua sobre a proliferação, diferenciação e migração dos fibroblastos, queratinócitos e no recrutamento de células inflamatórias, bem como na neovascularização no tecido de granulação (BRAUN *et al.*, 2002).

Os fibroblastos misturam-se com os capilares neoformados para compor o tecido de granulação inicial (CHANSON *et al.*, 2004). Enquanto o colágeno, secretado pelos fibroblastos, acumula-se no tecido de granulação, a densidade dos vasos sanguíneos diminui (SCHWARTZ *et al.*, 2005; ISHIDA *et al.*, 2004). Neste ambiente forma-se a matriz extracelular, com a presença de fibrina, fibronectina, colágeno, que fornecem a integridade estrutural (MIDWOOD *et al.*, 2004) e proteínas transmembranas que também apresentam função quimiotática e de ativação celular (SCHAFFER *et al.*, 2006).

Simultaneamente a estes eventos, ocorre o fechamento da ferida (BLAKYTNY *et al.*, 2006). A aquisição, pelos fibroblastos, de um fenótipo contrátil, com características ultraestruturais, semelhantes aos das células musculares lisas, demonstrou ser um dos mecanismos de contração das feridas. Esta célula foi denominada de miofibroblasto por apresentar filamentos de músculo liso, expresso bioquimicamente como  $\alpha$ -actina de músculo liso e desmina (KANDA *et al.*, 2003).

Foi observado que existem populações de miofibroblastos com variados graus de diferenciação em células de músculo liso (SKALLI *et al.*, 1989). Através de imuno-marcadores foi encontrado quatro fenótipos principais de miofibroblastos, a vimentina (V), a vimentina e a desmina (VD), a vimentina e actina alfa (VA) e a vimentina/desmina e actina alfa (VDA). Dentre estas

expressões de músculo liso, a actina alfa é o mais comum, seguido pela desmina (GABBIANI, 1999; SERINI *et al.*, 1999.).

Em virtude destas características, o miofibroblasto exerce força sobre a matriz extracelular e assim apresenta uma ação central na contração da ferida (GARRETT *et al.*, 2004). Os fatores de crescimento TGF- $\beta$  e FGF também apresentam importante função no processo de diferenciação e ativação destas células (KANDA *et al.*, 2003). Após o fechamento e preenchimento da ferida, ocorre a fase final do processo de reparo, considerada, fase de maturação (CHANSON *et al.*, 2004).

### **2.3 - Laser em baixa potência**

#### **2.3.1 – Aspectos básicos**

Os processos inflamatórios e não infecciosos são tradicionalmente tratados através de antiinflamatórios esteróidais (AIEs) e não esteróidais (AINEs). Entretanto, terapias físicas como estimulação elétrica, acupuntura e também o laser em baixa intensidade vêm ganhando espaço como alternativas na aplicação sobre processos inflamatórios e de reparo tecidual. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos nesta área, em virtude dos menores efeitos adversos ocasionados por estas terapias físicas em comparação com as medicamentosas.

A luz tem sido utilizada como agente terapêutico por séculos. Na Grécia antiga a luz do sol era utilizada na helioterapia, ou seja, exposição do corpo a luz solar para restaurar a saúde (BASFORD 1995). Partindo do pressuposto que a luz pode curar doenças, a luz laser vem sendo usada cada dia mais pelas áreas biomédicas, inclusive pela Odontologia. A

radiação laser atualmente é considerada como um agente terapêutico com capacidade de interferir sobre as diferentes fases do processo de reparo.

A palavra laser é um acrônimo para “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (amplificação da luz estimulada pela radiação). O laser é uma radiação eletromagnética não ionizante que se propaga em movimento ondulatório. O comprimento de uma onda é a distância entre duas cristas ou entre dois vales sucessivos, correspondendo à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa. É comumente medido em nanômetros (nm). A frequência, medida em Hertz (Hz), é a quantidade de ondas que passam por um determinado ponto durante o período de um segundo. O comprimento de onda é a característica mais importante para determinar a maior ou menor absorção da luz pelos tecidos. (NICOLA *et al.*, 2002).

Em contraste com a luz visível comum, que é composta de múltiplos comprimentos de ondas incoerentes, a radiação laser é monocromática, coerente e colimada (CONLAN *et al.*, 1996). A monocromaticidade é a capacidade de emitir luz com um único comprimento de onda. A coerência é a característica das ondas de apresentarem uma única direção. Enquanto a colimação é a baixa divergência dos raios ao longo do tempo e do espaço (BRUGNERA e PINHEIRO, 1998).

A produção do raio laser ocorre através de um meio ou substância que é amplificada e levada ao estado ativo através de uma excitação. Essas substâncias podem ser sólidas, gasosas, líquidas ou semi-condutoras. Os atuais aparelhos laser em baixa potência têm utilizado cristais semi-condutores como meio ativo e produzido luz de diferentes comprimentos de



ondas e potências. A potência de saída (P) do aparelho de laser é medida, normalmente, em Watts (W). A densidade de potência (DP) ou irradiância é a potência óptica de saída do laser, em Watts, dividida pela área de saída do feixe de luz na ponta do dispositivo de aplicação do aparelho, medido em  $\text{cm}^2$ . O tempo de exposição é outro fator muito importante, uma vez que se multiplica o tempo de exposição, em segundos, pela irradiância, é obtida a fluência ou densidade de energia (DE) em  $\text{J}/\text{cm}^2$ . O controle da irradiância determina a dosimetria da luz a ser aplicada sobre os tecidos (GENOVESE, 2007).

### **2.3.2 – Interação laser / tecido**

A radiação laser em baixa potência, com densidade de potência de 0,01 a  $1\text{W}/\text{cm}^2$ , atua sobre os tecidos como reações não térmicas, mas ocasiona efeitos fotoquímicos (SCHAFFER *et al.*, 2000). Esta atuação é possível em função de moléculas fotorreceptoras distribuídas nas células como as flavoproteínas, porfirinas, citocromo, tirosina e asparagina. Uma vez que estas moléculas recebam uma radiação com específico comprimento de onda, elas são capazes de provocar variações no metabolismo celular (KARU, 1999, AMAT *et al.*, 2005). O laser em baixa potência age, principalmente, sobre as membranas mitocondriais, gerando aumento da síntese de ATP e, desta forma, bioestimulando o metabolismo celular.

Tendo em vista este estímulo energético celular induzido pela fotobioestimulação, o laser em baixa potência tem sido empregado clinicamente em processos inflamatórios e cicatriciais (AIMBIRE *et al.*, 2006). Sua atuação na inflamação tem sido contestada por alguns estudos, que não demonstraram efeito antiinflamatório da fototerapia em cultura de células

irradiadas com laser de GaAs ( $\lambda 904\text{nm}$ ), densidade de energia de 0,3, 3 e  $9\text{J}/\text{cm}^2$  (BOUMA *et al.*, 1996). Entretanto, estudos mais recentes evidenciaram que a fotoestimulação é efetiva em atuar sobre a prostaglandina  $E_2$ , ( $\text{PGE}_2$ ) atividade demonstrada através da observação de que o laser de GaAsAl com potência de 30W, densidade de energia de  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$  e comprimentos de onda de 660 e 684nm, diminuiu a expressão da COX-2, enzima que se degrada e dá origem a  $\text{PGE}_2$  (ALBERTINI *et al.*, 2007). A atuação do laser de He-Ne com  $\lambda 632,8\text{nm}$ , 12mW e  $2,5\text{J}/\text{cm}^2$  em um período de 80 segundos, também foi eficiente em inibir a  $\text{PGE}_2$  fato que foi considerado como responsável pelo efeito analgésico e antiedematogênico (FERREIRA *et al.*, 2005). Mostrando ainda o efeito do laser de AsGaAl, ( $\lambda 637\text{nm}$ , 50mW,  $4\text{J}/\text{cm}^2$ ) sobre o edema, foi observado significativa redução deste sinal clínico quando comparado com o grupo controle em pós-operatório de remoção de terceiro molar em humanos (MARKOVIC *et al.*, 2007).

O laser também foi efetivo em reduzir o TNF- $\alpha$  no processo inflamatório. Foi observado que o laser de AsGaAl com 650nm, 0,11J,  $31,3\text{mW}/\text{cm}^2$  e tempo de aplicação de 42 segundos, reduziu o TNF- $\alpha$  em modelo de inflamação aguda no pulmão (AIMBIRE *et al.*, 2006). A mesma dosimetria foi utilizada em outro modelo experimental analisando o músculo diafragma e os mesmos efeitos de redução do TNF- $\alpha$  foram observados (AIMBIRE *et al.*, 2006). Em experimento avaliando processo inflamatório na gengiva de ratos, também foi verificado redução do TNF- $\alpha$  utilizando laser de HeNe com  $\lambda 632,8\text{nm}$ ,  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$  por 300 segundos (SAFAVI *et al.*, 2008).

As interleucinas presentes na inflamação foram outras citocinas alteradas pela ação do laser. A irradiação utilizando o laser diodo de InGaAlP

com  $\lambda 660\text{nm}$ ,  $20\text{mW}$ , área de saída do raio de  $0,035\text{cm}^2$  e  $2,1\text{J}$ , reduziu a expressão das interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) além do óxido nítrico em experimento que induziu inflamação aguda na pleura de ratos (BOSCHI *et al.*, 2008). A fototerapia foi capaz ainda de suprimir interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) em processo inflamatório na gengiva de ratos, com utilização de laser de HeNe,  $\lambda 632,8\text{nm}$ ,  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$ , por 300 segundos (SHIBATA *et al.*, 2005). A redução desta interleucina também foi demonstrada a partir de material biológico retirado de humanos com artrite reumatóide, com utilização de luz polarizada de comprimento de onda de 600 a 1600nm e densidade de energia de  $3,8\text{J}/\text{cm}^2$ . (SAFAVI *et al.*, 2008). Em estudo *in vitro*, com células retiradas de gengiva humana, a secreção de IL-1 $\beta$  também foi inibida com a aplicação de laser AsGaAl com  $\lambda 830\text{nm}$  e densidade de energia de  $7,90\text{J}/\text{cm}^2$  (NOMURA *et al.*, 2001). A interleucina-2 (IL-2) foi outra citocina inflamatória reduzida com o efeito da fotobiomodulação. Esta citocina foi inibida com a aplicação de laser HeNe ( $\lambda 632,8\text{nm}$ ,  $0,2\text{mW}/\text{cm}^2$ , 60 segundos) sobre o timo de ratos (NOVOSELOVA *et al.*, 2006). Esta redução da IL-2, entretanto, esteve condicionada a aplicação repetida, diária, do laser sobre o timo de ratos. Quando a mesma dosimetria foi aplicada em dose única, houve um aumento da produção de IL-2 (NOVOSELOVA *et al.*, 2006).

As células que participam da inflamação foram outros componentes a mudar de comportamento após a aplicação do laser. Em estudo *in vivo* utilizando laser de InGaAlP, de  $2,5\text{mW}$ , densidade de potencia de  $3,1\text{mW}/\text{cm}^2$  e com densidade de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$ ,  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $15\text{J}/\text{cm}^2$  foi demonstrado que houve redução do número de células polimorfonucleares e mononucleares apenas com as densidades de energia de 3 e  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$  (LOPES-MARTINS *et*

*al.*, 2005). A redução do número de células mononucleares também foi verificada com a aplicação de laser HeNe com  $\lambda 632,8\text{nm}$ , 10mW e  $2,4\text{J}/\text{cm}^2$  através de feridas por queimaduras em ratos (BAYAT *et al.*, 2005). Em estudo *in vitro*, entretanto, foi observado um aumento da proliferação de células mononucleares utilizando o mesmo laser de HeNe, com comprimento de onda de  $632,8\text{nm}$ , por 20 segundos e densidade de energia de  $2,5\text{J}/\text{cm}^2$  (KLEBANOV *et al.*, 2005).

A atividade secretora do macrófago apresentou diferentes respostas para a aplicação de dosimetrias distintas em estudo *in vitro*. Utilizando o laser de HeNe ( $\lambda 632,8\text{nm}$  e 16mW), foi observado aumento da secreção enzimática de macrófagos com a densidade de energia de  $0,94\text{J}/\text{cm}^2$ , enquanto que houve diminuição desta atividade celular com a densidade de energia de  $14,1\text{J}/\text{cm}^2$  (KLEBANOV *et al.*, 2005). Estes diferentes resultados revelam que as variações nos parâmetros de aplicação dos lasers e mesmo a metodologia empregada para avaliação são de fundamental importância para a análise da interferência do laser sobre o processo inflamatório.

Todos os estudos descritos anteriormente relatam o estímulo energético direto desta fonte luminosa sobre as células, induzindo a fotobioestimulação e conseqüente modulação do processo inflamatório. Há estudo, entretanto mostrando que o laser também atua sobre a inflamação através do estímulo a liberação de corticóide endógeno pela glândula supra-adrenal. Esta sugestão foi feita através de experimento *in vivo* utilizando laser de AsGaAl ( $\lambda 650\text{nm}$ ,  $2,5\text{J}/\text{cm}^2$ , 2,5mW e 80 segundos) com um grupo de ratos adrenalectomizados e foi verificado que nestes animais o laser não apresentou efeito sobre a resposta inflamatória (ALBERTINI *et al.*, 2004). Confirmando esta hipótese, foi

demonstrado que o bloqueio aos receptores celulares de corticóide, através de um antagonista destes receptores, inibiu o efeito biomodulador da radiação laser de diodo de AsGaAl, com  $\lambda 650\text{nm}$ , potência de 2,5mW, energia de 0,6J, tempo de aplicação de 240 segundos e densidade de energia de  $7,5\text{J}/\text{cm}^2$ . Como os glicocorticóides são absorvidos pelas células através dos receptores de esteróides celulares, e ao mesmo tempo promovem seu bloqueio, provavelmente, a administração de glicocorticóide também inibe a ação da laserterapia aplicada sobre a modulação inflamatória (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006).

Evidências também sugerem que o laser acelera o processo de reparo tecidual através da bioestimulação das células que participam deste fenômeno. Estudos *in vitro* têm demonstrado que os fibroblastos expostos a radiação laser apresentam maior proliferação e atividade secretora que culturas de células controle. Isto foi demonstrado com a utilização de laser diodo de AsGaAl,  $\lambda 660\text{nm}$ , potência de 10mW, densidade de potência de  $142,85\text{mW}/\text{cm}^2$  e densidade de energia de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  (AZEVEDO *et al.*, 2006) e com a aplicação do mesmo laser de AsGaAl com  $\lambda 830\text{nm}$ , potência de 40mW, por 5 segundos e  $1\text{J}/\text{cm}^2$  de densidade de energia (VINCK *et al.*, 2003). Mesmo em cultura de células oriundas de carcinoma de laringe, que se pressupõe já apresentar uma alta atividade mitótica, foi observado um aumento da capacidade proliferativa com a aplicação de laser de AsGaAl, ( $\lambda 809\text{nm}$ , 10mW, 75 e 300 segundos, 1,96 e  $7,84\text{J}/\text{cm}^2$ ) com significativo aumento destas células em ambas dosimetrias (KREISLER *et al.*, 2003).

Em estudo *in vivo*, este efeito estimulatório do laser também foi observado mesmo quando houve comprometimento sistêmico. Com um

desenho experimental utilizando ratos diabéticos com feridas cutâneas circulares e a aplicação de laser HeNe ( $\lambda 632,8\text{nm}$ ,  $4,8\text{J}/\text{cm}^2$ ) foi observado um reparo mais rápido em relação aos animais controles (MAIYA *et al.*, 2005). Em outro estudo analisando feridas em dorso de ratos, utilizando o AsGaAl ( $\lambda 670\text{nm}$ ,  $9\text{mW}$  e  $1\text{J}/\text{cm}^2$  dia, por 4 dias) e a aplicação de sílica, foi observado que a aplicação do laser melhorou a modulação e organização das fibras colágenas, mesmo quando o laser foi aplicado isoladamente (MEDRADO *et al.*, 2008). Até em ratos subnutridos, a aplicação do laser de AsGaAl ( $\lambda 635\text{nm}$ ,  $40\text{mW}$  e  $20\text{J}/\text{cm}^2$ ) em ferida cutânea, apresentou uma maior e mais organizada produção de fibras colágenas no processo de reparo quando comparado com o grupo controle (PINHEIRO *et al.*, 2004).

Esta melhora do processo de cicatrização tem demonstrado a interferência da luz em diferentes células e etapas do reparo tecidual. Por meio de experimento animal com feridas cutâneas, foi observado que o laser de AsGaAl ( $\lambda 670\text{nm}$ ,  $9\text{mW}$ ,  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , 31 segundos) com uma única dose, aumentou a secreção de colágeno e a proliferação de miofibroblastos, otimizando o reparo e acelerando a contração da ferida (MEDRADO *et al.*, 2003). Em Outro estudo *in vivo* também com o laser de AsGaAl ( $\lambda 685\text{nm}$ ,  $40\text{mW}$ ,  $20\text{J}/\text{cm}^2$ ) foi constatado que houve uma distribuição mais regular do colágeno sintetizado e maior proliferação dos fibroblastos (PINHEIRO *et al.*, 2005). O TGF- $\beta$  também pode sofrer interferência positiva do laser em baixa potência com aumento da sua expressão tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Este achado foi demonstrado através da aplicação do laser de AsGa, com  $\lambda 904\text{nm}$ ,  $10\text{mW}$  de potência, por 300 segundos e densidade de energia de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  em culturas, contendo células

com TGF-b recombinante e em humanos após a extração dentária (ARANY *et al.*, 2007).

A atuação da luz sobre os tecidos com a finalidade de melhorar o reparo também depende da quantidade de energia que é empregada, uma vez que a aplicação de laser AsGaAl com  $\lambda 685\text{nm}$ , 40mW e  $40\text{J}/\text{cm}^2$  diminuiu o número de miofibroblastos, mostrando que dosimetrias diferentes podem influenciar positiva ou negativamente a cicatrização (PINHEIRO *et al.*, 2005). A literatura, não mostra apenas efeitos estimulatórios da radiação laser, mas também inibitórios, como na redução da proliferação *in vitro*, de fibroblastos derivados de cicatrizes hipertróficas, utilizando o laser de AsGaAl,  $\lambda 880\text{nm}$ , 16mW,  $2,4\text{J}/\text{cm}^2$  (WEBB *et al.*, 2003). Outra linhagem celular, derivada de tumor hepático, hepatoma, também diminuiu sua proliferação com a interferência do laser de AsGaAl,  $\lambda 808\text{nm}$ , 130mW em ambas densidades de energia de 5,85 e  $7,8\text{J}/\text{cm}^2$  (LIU *et al.*, 2006).

Por esta razão deve-se considerar a diversidade de parâmetros que caracterizam o laser, como potência, densidade de energia, comprimento de onda, entre outros. As diferentes dosimetrias utilizadas pelos trabalhos de pesquisa devem ser comparadas a fim de formar protocolos de aplicação clínica e assim utilizar este agente terapêutico com maior conhecimento e adequadas indicações (POSTEN *et al.*, 2005; REDDY *et al.*, 2004). Faz-se necessário, desta forma, a realização de um número ainda maior de estudos a fim de que seus resultados sejam comparados e as indicações dos diferentes parâmetros do laser possam ser bem empregadas na clínica.

#### **2.4 – Controle medicamentoso das feridas**

Com a finalidade de reduzir os danos aos tecidos circunvizinhos e a sintomatologia dolorosa ocasionada pela fase exudativa da inflamação, medicamentos antiinflamatórios, como os corticóides, são administrados clinicamente.

#### **2.4.1 - Dexametasona**

A dexametasona é um glicocorticóide sintético muito utilizado por possuir uma potência antiinflamatória trinta vezes maior que seu análogo natural, a hidrocortisona, e por apresentar menor retenção de sódio. De modo geral, os glicocorticóides ligam-se principalmente a globulinas plasmáticas e são metabolizados pelo fígado. A excreção das formas livres ou de metabólitos se faz pela urina e pela bile (MACEDO e OLIVEIRA, 1998).

A dexametasona ( $9\alpha$ -fluoro- $16\alpha$ -metilprednisone) é um glicocorticóide apresentado sob as formas de elixir, gel, suspensão oftálmica, comprimidos para ingestão, injetável para administração parenteral e intravenosa, de inalação e tópica. Existem as formas de acetato de dexametasona e dexametasona sódio fosfato (PARFITT, 1999).

Os glicocorticóides, incluindo a dexametasona, têm sido amplamente utilizados como drogas imunossupressoras e antiinflamatórias no tratamento da artrite reumatóide, lúpus eritematoso, reações alérgicas e após procedimentos cirúrgicos (ABRANHAN *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2006). Os glicocorticóides possuem receptores em praticamente todas as células do organismo (MORSINK *et al.*, 2006).

O efeito antiinflamatório da dexametasona não pode ser atribuído a um único fator. Ela atua em diferentes etapas e células do processo



inflamatório. A dexametasona inibe a migração celular para o local da inflamação, além de reduzir a diapedese celular do interior dos vasos para o meio extravascular. Este glicocorticóide limita a vasodilatação e reduz a permeabilidade capilar, ocasionada pelos agentes pró-inflamatórios. Inibe, ainda, a produção de interleucinas (Il-1, Il-2), Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e de fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e FGF (BRUNETTI *et al.*, 2002; KAMBERI *et al.*, 2002). Além disto, a dexametasona interfere sobre a ação das células mononucleares, uma vez que inibe a ação secretora e fagocitária dos macrófagos (ORLIKOWSKY *et al.*, 2001; KAMBERI *et al.*, 2002) e a proliferação e ativação das células T e B (MIGLIORATI *et al.*, 1997, ORLIKOWSKY *et al.*, 2001; BRUNETTI *et al.*, 1998, CAULFIELD *et al.*, 2002, BRUNETTI *et al.*, 2002).

Em relação a matriz extracelular, a dexametasona também possui capacidade de supressão sobre as metaloproteinases (SAADAT *et al.*, 2005). Este glicocorticóide sintético possui ainda a habilidade de bloquear a liberação de prostaglandinas pró-inflamatórias através da inibição da fosfolipase A2 (MACEDO e OLIVEIRA, 1998). Em virtude desta ampla atividade inibitória sobre o processo inflamatório, a dexametasona possui uma diversificada aplicação na clínica médica e odontológica. Utiliza-se tanto em condições inflamatórias graves, como na síndrome da resposta inflamatória sistêmica, como em procedimentos cirúrgicos (CICARELLI *et al.*, 2006). Na clínica odontológica, a dexametasona é bastante administrada na remoção de dentes inclusos e após cirurgias maxilofaciais, com a finalidade de reduzir o edema e a sintomatologia dolorosa (GRAZIANI *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2005; MARKOVIC *et al.*, 2007).

Outras atividades da dexametasona, entretanto, não são desejáveis. Este medicamento interfere no reparo tecidual por inibir a formação de colágeno (GRAS *et al.*, 2001; MARCHIONNI *et al.*, 2001), de laminina (SCHWARZ *et al.*, 2005) e da reepitelização (CUMBERBATCH *et al.*, 1999), além de reduzir a proliferação e ativação de fibroblastos (WU *et al.*, 2006). Em estudo *in vivo*, foi demonstrado que a dexametasona prejudica a cicatrização traqueal (TALAS, *et al.*, 2002). Em outro estudo utilizando ratos, a cicatrização traqueal foi menos inibida pela dexametasona devido a administração concomitante de vitamina A que favoreceu a cicatrização da traquéia (TALAS *et al.*, 2003).

Desta forma, pode-se concluir que a dexametasona comprovadamente apresenta efeito deletério sobre o reparo tecidual, apesar de muito utilizada em virtude da sua eficiente função antiinflamatória. Assim, sugeriu-se a utilização de outros agentes terapêuticos, associados à dexametasona, a fim de reduzir seus efeitos indesejáveis.

Na literatura ainda são poucos os estudos associando a dexametasona com a laserterapia. Em estudo *in vivo* utilizando laser de AsGaAl, com  $\lambda 904\text{nm}$ , potência de 2,75mW, densidade de energia de  $33\text{J}/\text{cm}^2$  por um período de 120 segundos e uma administração de 2mg/Kg, foi demonstrado que o laser atuou como um bioestimulador coadjuvante, balanceando os efeitos do corticóide (PESSOA *et al.*, 2004). Através da utilização do laser de AsGaAl com  $\lambda 670\text{nm}$ , 9mW e  $4\text{J}/\text{cm}^2$  e 2mg/Kg de dexametasona intramuscular em ratos com lesões cutâneas, foi observado através da microscopia eletrônica de transmissão fibras colágenas mais numerosas, espessas e organizadas no grupo laser e mesmo quando havia

a ação concomitante da dexametasona (REIS *et al.*, 2008). Entretanto, em outro estudo utilizando laser de AsGaAl com  $\lambda 635\text{nm}$ ,  $15\text{mW}/\text{cm}^2$  e  $5\text{J}/\text{cm}^2$  e  $20\text{mg}/\text{kg}$  de metil-prednisolona, não foi relatado efeitos positivos do laser no padrão da cicatrização (GÁL *et al.*, 2008).

Desta forma, muitos estudos ainda são necessários para elucidar a interação das diferentes aplicações da fototerapia com medicamentos químicos e suas posologias. Com certeza, o maior conhecimento a respeito da ação conjunta destas modalidades terapêuticas trará benefícios para a aplicação clínica.

A perda da solução de continuidade de um tecido representa uma ferida. Estas lesões cicatrizam através de processamentos teciduais interligados. Estes eventos sofrem interferências de diversos fatores como da ação do laser e da dexametasona. Esta revisão demonstrou informações presentes na literatura científica que foram de grande importância para a realização deste trabalho de pesquisa. Observou-se que as intervenções com a laserterapia, entretanto, podem apresentar os mais variados resultados e por isto, torna-se de suma importância o conhecimento sobre suas atividades e os diferentes efeitos biológicos.

**3 - OBJETIVOS**

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral**

Analisar, do ponto de vista morfológico, a cronologia do reparo cutâneo após a indução de ferimentos circulares padronizados em ratos, submetidos à terapia com o laser em baixa potência, com a dexametasona e com a associação das duas modalidades terapêuticas.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

Analisar, histologicamente, as diferentes fases do processo inflamatório e do reparo tecidual através do estudo semiquantitativo do edema, das células polimorfonucleares, mononucleares e síntese de colágeno após a indução de ferimentos cutâneos em ratos que foram submetidos à terapia com o laser de baixa potência, com a dexametasona e com a associação de ambos.

Avaliar, através de estudo imuno-histoquímico com anticorpos anti actina- $\alpha$  de músculo liso e desmina e estudo ultraestrutural, a expressão dos miofibroblastos no leito de ferimentos cutâneos em ratos que foram submetidos à terapia com o laser de baixa potência, com a dexametasona e com associação de ambos.

## ***4 - MATERIAIS E MÉTODOS***

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - Aspectos éticos**

O projeto desta pesquisa foi encaminhado para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, Bahia. O parecer desta comissão foi favorável. Dessa forma, o manejo dos animais foi considerado eticamente correto, conforme parecer protocolado e aprovado sob n. 03/2006.

### **4.2 - Animais**

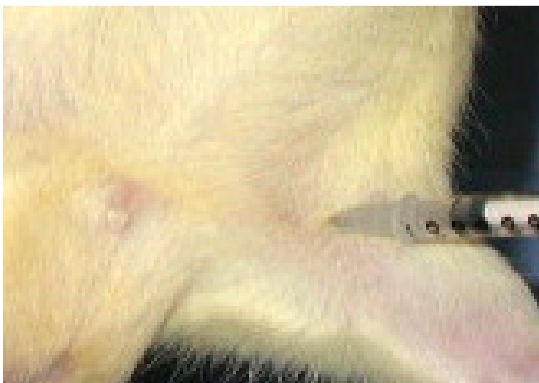
Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas, que foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de 20 ratos cada. Cada grupo era constituído por cinco subgrupos de quatro animais, mortos no 1<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após a cirurgia.

### **4.3 - Manejo dos animais**

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em condições sanitárias de biotério convencional, no Núcleo de Pesquisa em Cirurgia Experimental da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). O acondicionamento foi realizado em gaiolas individuais, com chão coberto por maravalha. Os animais foram mantidos em condições padrão de temperatura (22-25°C), umidade relativa (40-60%) e expostos a luminosidade artificial entre oito e 10 horas por dia. Os ratos foram alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. O ambiente era limpo e protegido de estímulos auditivos para evitar o estresse. Os animais foram oriundos do biotério Anilabe e apresentavam prévio controle de ectoparasitas e endoparasitas.

### **4.4 - Procedimento cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (Zoletil 50®, Virbac, São Paulo, Brasil) na dosagem de 50 mg/kg do peso corporal. Foram realizadas a tricotomia no dorso dos ratos e, em condições assépticas, uma ferida circular com 6mm de diâmetro no tecido cutâneo. Como instrumento cirúrgico para a padronização desta ferida, foi usado um *punch* (Stiefel Tabe, São Paulo, Brasil) de 6 mm de diâmetro (GÁL *et al.*, 2008; MAIYA *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Administração intraperitoneal dos medicamentos e soro fisiológico. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 2.** Realização da cirurgia com "punch" de 6 mm. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

#### **4.5 - Grupos experimentais**

**Grupo I - controle.** Os animais deste grupo foram submetidos à intervenção cirúrgica e a aplicação da ponteira laser, desligada, sobre a ferida a fim de simular o mesmo estresse dos animais participantes do grupo laser. Foi administrada solução salina à 0,9%, o equivalente ao volume utilizado para a dexametasona em animal de 250g (0,13 ml/250g).

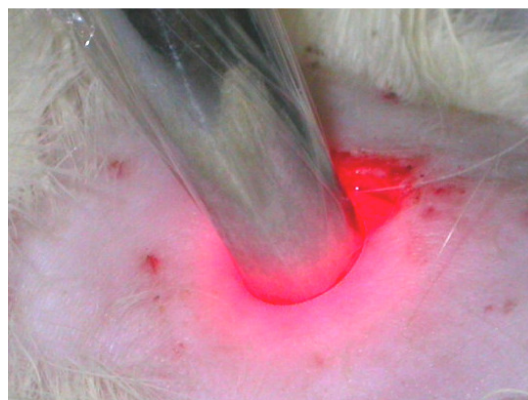
**Grupo II - tratados com laser em baixa potência.** Quatro aplicações pontuais de 1J/cm<sup>2</sup> foram realizadas sobre as bordas das feridas, de modo a atingir uma dose total de 4J/cm<sup>2</sup>, logo após a intervenção cirúrgica. O tempo utilizado para cada aplicação pontual foi de 31 segundos para 1J/cm<sup>2</sup>,



totalizando 124 segundos para  $4\text{J}/\text{cm}^2$ . O aparelho utilizado foi um diodo semiconductor de AsGaAl, emissão contínua (9mW,  $\lambda 670\text{nm}$ ,  $0,031\text{W}/\text{cm}^2$ ) área de saída do raio de  $0,28\text{cm}^2$ , Laser VR-KC-610 – Dentoflex, Brasil. Foi administrada solução salina à 0,9%, o equivalente ao volume utilizado para a dexametasona em animal de 250g (0,13 ml/250 g).



**Figura 3.** Aparelho de laser diodo semiconductor de AsGaAl. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 4.** Aplicação do laser sobre a lesão. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

### **Grupo III - tratados com dexametaso**

**Brasil**). Foi utilizada uma única dose para cada animal de 2mg/kg (0,5mg/250g), uma hora antes do procedimento cirúrgico ser realizado. Houve a aplicação da ponteira laser, desligada, sobre a ferida.

**Grupo IV - tratados com a associação entre a terapia laser e a dexametasona.** Nesses animais, a dexametasona foi administrada uma hora antes do procedimento cirúrgico e após a realização da ferida foi aplicado a irradiação laser com o mesmo protocolo do grupo II e III.

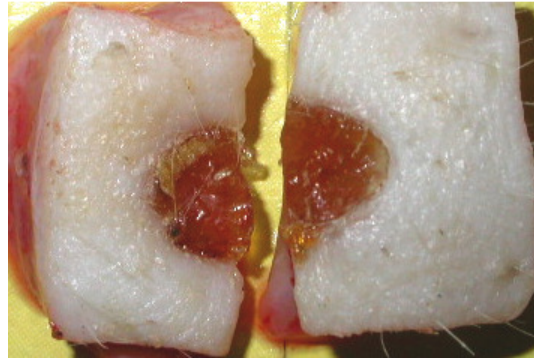
### **4.6 – Processamento histológico**

Os animais foram mortos através da administração excessiva da droga anestésica. Foi removida uma porção de tecido cutâneo em torno da lesão e

tecido muscular subcutâneo. Metade do material permaneceu fixando, por um período mínimo de 18 horas, em solução de formol 10%, tamponada. Em seguida, este tecido foi processado para a coloração com hematoxilina-eosina e sÍrius vermelho específico para colágeno.



**Figura 5.** Remoção do tecido após morte dos animais. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 6.** Secção do tecido para encaminhar à microscopia. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

#### **4.7 - Imuno-histoquímica**

Secções embebidas em parafina foram obtidas com 3µm de espessura e montadas em lâmina previamente tratada com aminopropyl-triethoxy-silano e submetidos à marcação com anticorpos monoclonais anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (1:800) e anti-desmina (1:100) (DAKO, Cardinteria, CA, EUA). A recuperação antigênica foi obtida através de tratamento com microondas. Todos os procedimentos estavam de acordo com as instruções dos fabricantes dos anticorpos. Assim, todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente, como se segue: (a) os anticorpos primários foram incubados a partir de 30 minutos a 24 horas de acordo com as instruções dos fabricantes: (b) os anticorpos secundários foram incubados por 20 minutos, (c) a enzima conjugada com estreptavidina foi incubada por 20 minutos, (d) o substrato DA peroxidase foi incubado por 5 min. Após a

imunomarcção, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Gil e coberto com o bálsamo do Canadá. Secções de animais controle foram tratadas identicamente às seções de animais. Como controles positivos foram utilizados cortes de tecido contendo músculo liso, e como controles negativos, os mesmos tecidos, sendo suprimidos da reação o anticorpo primário.

#### ***4.8 - Microscopia eletrônica de transmissão***

Para a análise ultra-estrutural, a outra metade do tecido cicatricial foi fixado em glutaraldeído 3% e solução-tampão (1:1) 0,2 M cacodilato durante uma hora a 4°C. A pós-fixação foi realizada com uma solução de tetroxídio de ósmio a 2% e cacodilato 0,22 (1:1) durante uma hora a 4°C. Os fragmentos foram desidratados em diluições sucessivas de acetona e incorporados em resina POLI-BED 812 (Polysciences, Inc., Warrington, Pennsylvania, USA). Esses blocos foram então seccionados utilizando o ultramicrotomo da marca Reichert-Supernova (Leica, Austria). Após uma análise cuidadosa, as secções selecionadas foram submetidas a cortes ultrafinos e contrastados com acetato de uranilo e, em seguida, citrato de chumbo, para análise por microscópio eletrônico (EM-109; Zeiss, Germany) em 50 kV. A análise dos resultados obtidos com esta avaliação foi expressa de forma descritiva.

#### ***4.9 - Análise semi-quantitativa***

As variáveis, edema, células polimorfonucleares e mononucleares, expressão de colágeno e de actina- $\alpha$  de músculo liso e desmina, foram analisadas de forma semi-quantitativa, por ocultação e avaliação de lâminas codificadas com os escores de intensa (+++), moderada (++) , discreta (+) e

ausente (0). A padronização desta análise microscópica foi realizada como descrito na Tabela 1. (Soares, 2006).

**Tabela 1. Critério usado para análise da microscopia óptica**

<b>Critérios</b>	<b>Escore</b>		
<b>Edema</b>	INTENSO Presença > 50% de edema na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de edema na região observada	DISCRETO Presença < 25% de edema na região observada
<b>Células polimorfonucleares</b>	INTENSO Presença > 50% de neutrófilos na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de neutrófilos na região observada	DISCRETO Presença < 25% de neutrófilos na região observada
<b>Células mononucleares</b>	INTENSO Presença > 50% de monócitos na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de monócitos na região observada	DISCRETO Presença < 25% de monócitos na região observada
<b>Colágeno</b>	INTENSO Presença > 50% de colágeno na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de colágeno na região observada	DISCRETO Presença < 25% de colágeno na região observada
<b>Actina-<math>\alpha</math> de músculo liso</b>	INTENSO Presença > 50% de actina- $\alpha$ na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de actina- $\alpha$ na região observada	DISCRETO Presença < 25% de actina- $\alpha$ na região observada
<b>Desmina</b>	INTENSO Presença > 50% de desmina na região observada	MODERADO Presença de 50-25% de desmina na região observada	DISCRETO Presença < 25% de desmina na região observada

#### **4.10 - Análise estatística**

Uma versão não-paramétrica dos métodos de Kruskal-Wallis e o teste exato de Fisher foram utilizados para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados foram considerados significativos quando foi encontrado  $p \leq 0,05$ .



## **5 - RESULTADOS**

A distribuição dos níveis de edema e do infiltrado de células polimorfonucleares estão representadas nas Tabelas 2 e 3. No 1º dia houve redução significativa do edema nos grupos dexametasona e laser quando comparados ao grupo controle. A presença de células polimorfonucleares foi discreta em 100% dos animais do grupo dexametasona com significante diferença para o grupo controle no mesmo período ( $p=0,03$ ). No 3º dia do estudo, todos os três grupos submetidos aos agentes terapêuticos apresentaram reduções significativas de edema e células polimorfonucleares comparados ao grupo controle ( $p=0,04$ ). No 5º dia este grupo de células exibiu diferenças significantes não apenas nos animais tratados com a dexametasona em relação ao grupo controle, mas também no grupo submetido apenas ao laser.

**Tabela 2. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de edema na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

<b>Morte dos animais</b>	<b>Grupos</b>	<b>Edema</b>				<b>p</b>
		<b>Intenso</b> %	<b>Moderado</b> %	<b>Discreto</b> %	<b>Ausente</b> %	
1 dia	Controle	75 <sup>a</sup>	-	25	-	-
	Laser	-	75 <sup>b</sup>	-	25	0,04
	Dexametasona	-	25 <sup>b</sup>	75	-	0,04
	Laser e Dexametasona	25	25	50	-	-
3 dias	Controle	-	100 <sup>a</sup>	50	-	-
	Laser	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,03
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	25	25	50 <sup>b</sup>	-	0,04
5 dias	Controle	-	25	75	-	-
	Laser	-	-	75	25	-
	Dexametasona	-	-	75	25	-
	Laser e Dexametasona	-	-	100	-	-
7 dias	Controle	-	-	50	50	-
	Laser	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	25	75	-
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100	-
14 dias	Controle	-	-	-	100	-
	Laser	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	-	100	-
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100	-

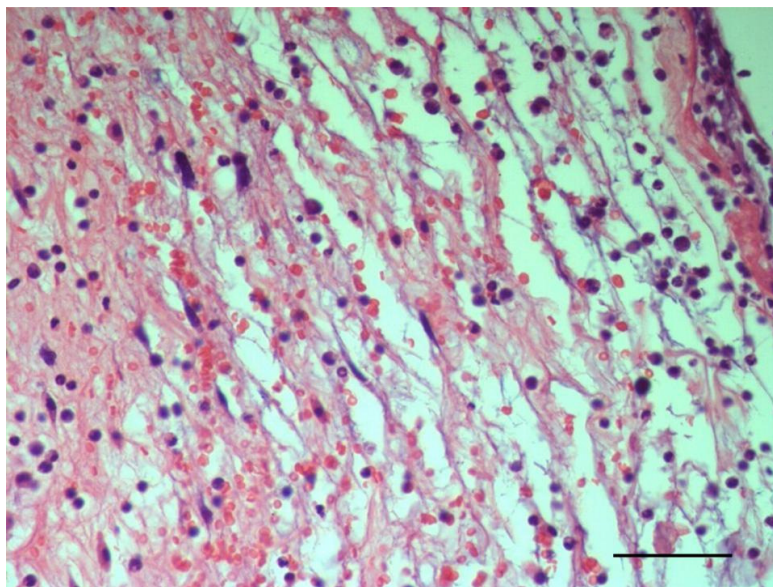
<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.



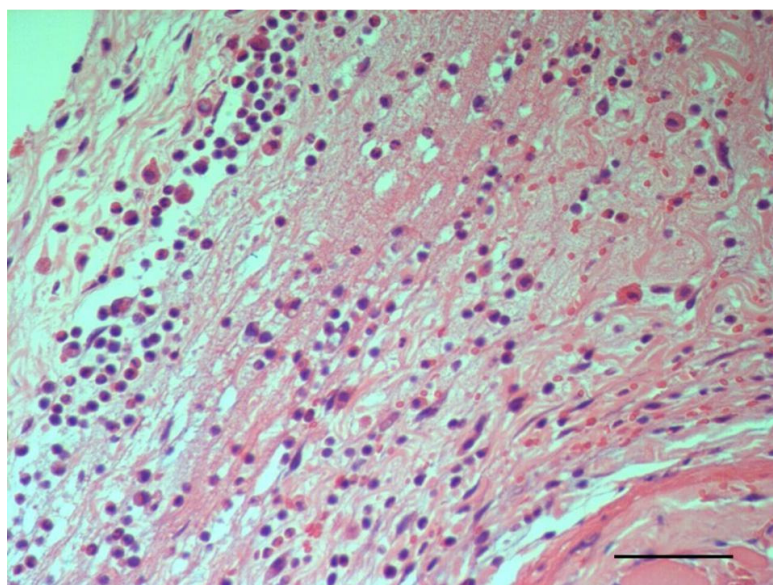
**Tabela 3. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de células polimorfonucleares na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

<i>Morte dos animais</i>	<i>Grupos</i>	<i>Células polimorfonucleares</i>				<i>p</i>
		<i>Intenso</i> %	<i>Moderado</i> %	<i>Discreto</i> %	<i>Ausente</i> %	
1 dia	Controle	50 <sup>a</sup>	50	-	-	-
	Laser	-	25	75	-	-
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	-	50	50	-	-
3 dias	Controle	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	Laser	-	-	25	75 <sup>b</sup>	0,03
	Dexametasona	-	25 <sup>b</sup>	75 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	-	25	50	25 <sup>b</sup>	0,03
5 dias	Controle	-	25 <sup>a</sup>	75	-	-
	Laser	-	-	25	75 <sup>b</sup>	0,04
	Dexametasona	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,03
	Laser e Dexametasona	-	-	50	50	--
7 dias	Controle	-	-	75	25 <sup>a</sup>	-
	Laser	-	-	25	75	-
	Dexametasona	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,04
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,04
14 dias	Controle	-	-	-	100	-
	Laser	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	-	100	-
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100	-

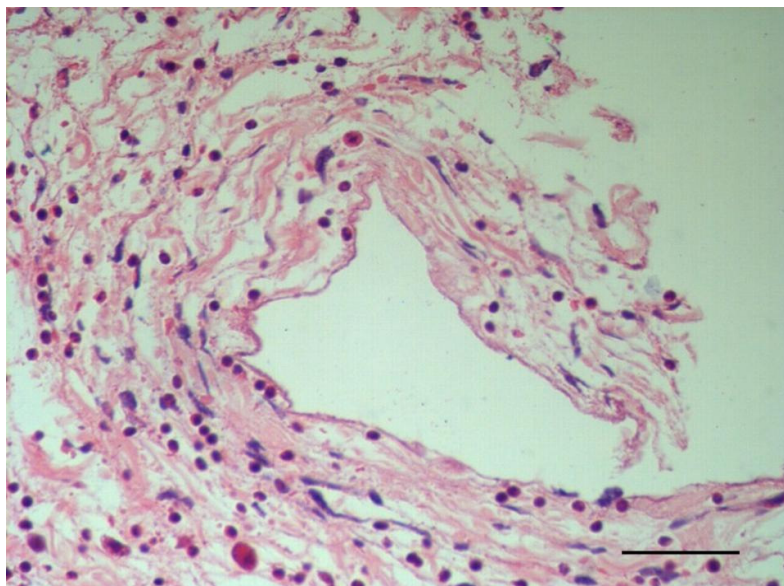
<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.



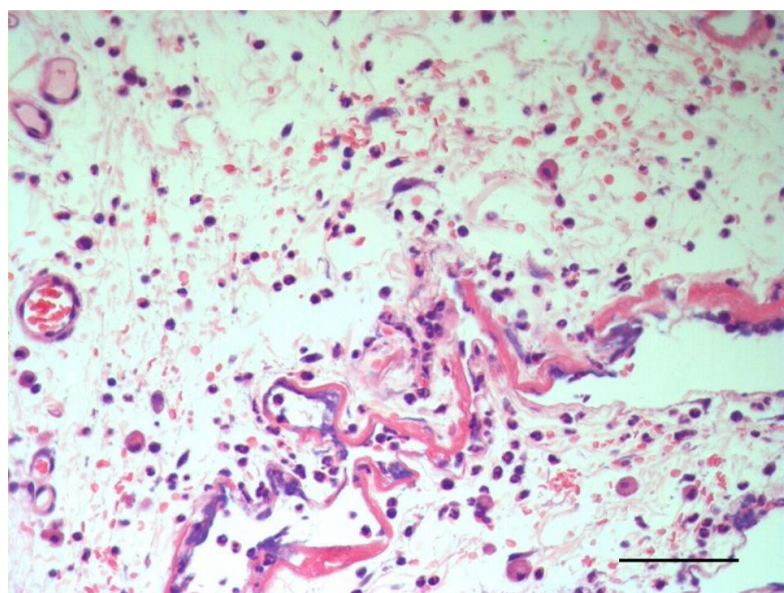
**Figura 7. Região cicatricial com presença moderada de células inflamatórias e intensa de edema. Grupo controle, 24 horas. (HE, Escala= 0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**



**Figura 8. Discreta presença de células inflamatórias e edema. Grupo laser, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala= 0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**



**Figura 9.** Tecido conjuntivo com discreta presença de edema e componente matricial escasso. Grupo dexametasona, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 10.** Presença moderada de edema. Grupo laser associado à dexametasona, 24 horas pós-operatória. (HE, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

A Tabela 4 evidencia os níveis de células mononucleares na área da cicatrização nos diferentes grupos. Observou-se que apenas o grupo controle apresentou completa ausência histológica destas células no 1º dia do estudo. No 5º dia, entretanto, 100% dos animais submetidos às todas as modalidades de tratamento, apresentaram discreto infiltrado destas células com diferença significativa para o grupo controle. No 14º dia apenas o grupo controle mostrou presença discreta de infiltrado histio e linfoplasmocitário.

**Tabela 4. Distribuição do percentual de animais cujos cortes histológicos exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de células mononucleares na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

<i>Morte dos animais</i>	<i>Grupos</i>	<i>Células mononucleares</i>				<i>p</i>
		<i>Intenso</i> %	<i>Moderado</i> %	<i>Discreto</i> %	<i>Ausente</i> %	
1 dia	Controle	-	-	-	100 <sup>a</sup>	-
	Laser	-	-	50	50	-
	Dexametasona	-	-	75	25 <sup>b</sup>	0,04
	Laser e Dexametasona	-	25	75 <sup>b</sup>	-	0,03
3 dias	Controle	-	-	100	-	-
	Laser	-	-	100	-	-
	Dexametasona	-	-	100	-	-
	Laser e Dexametasona	-	-	75	25	-
5 dias	Controle	-	75	25 <sup>a</sup>	-	-
	Laser	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Laser e Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
7 dias	Controle	-	75	25 <sup>a</sup>	-	-
	Laser	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Laser e Dexametasona	-	-	75	25	-
14 dias	Controle	-	-	100 <sup>a</sup>	-	-
	Laser	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,03
	Dexametasona	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,03
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100 <sup>b</sup>	0,03

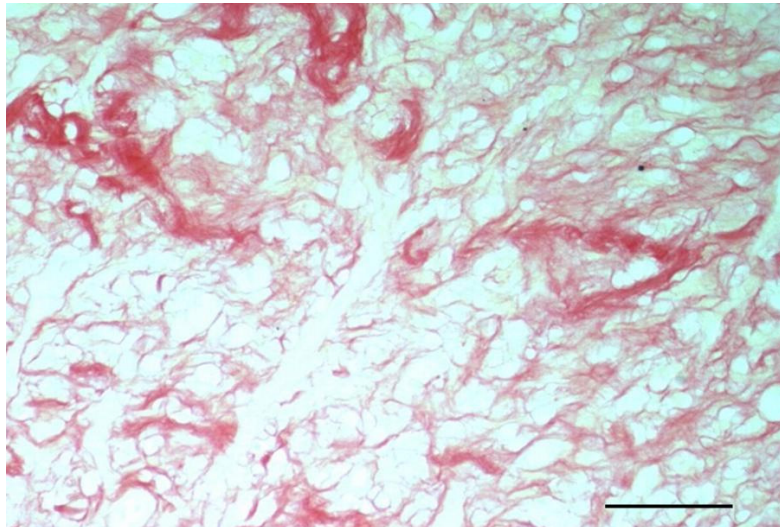
<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.

Observou-se na Tabela 5 que a matriz colagênica foi maior nos animais submetidos à fototerapia ao longo dos dias de estudo, tanto isoladamente quanto associada à dexametasona. No 3º dia, apenas o grupo laser apresentou 100% dos animais com moderada síntese de colágeno, sendo significativamente maior que o grupo controle ( $p=0,04$ ) e dexametasona ( $p=0,03$ ). No 7º dia de estudo, 25% dos animais tratados com o laser e laser associado à dexametasona já apresentavam intensa expressão desta proteína, enquanto que no 14º dia, todos os animais destes dois grupos tinham intenso preenchimento de colágeno no local da cicatrização com diferenças significativas para os outros dois grupos ( $p=0,04$ ).

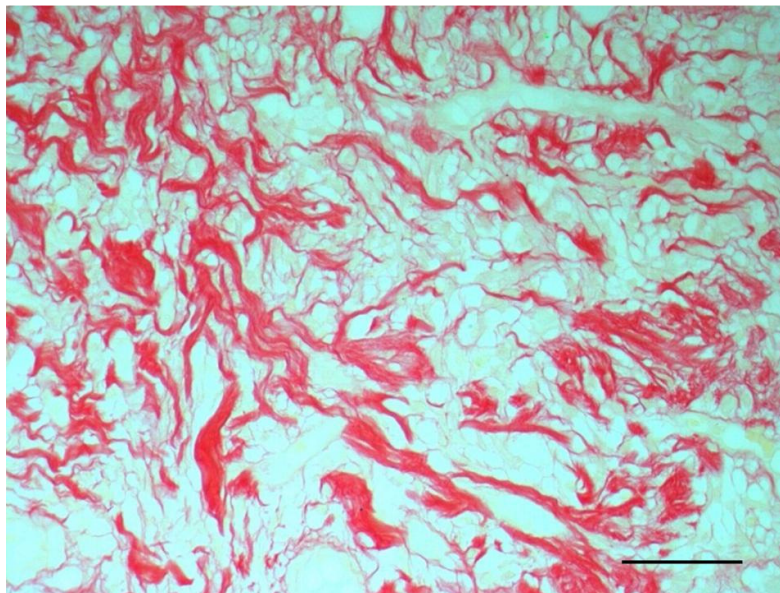
**Tabela 5. Percentual dos animais com intensa, moderada, discreta ou ausência histológica de colágeno na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

<i>Morte dos animais</i>	<i>Grupos</i>	<i>Colágeno</i>				<i>p</i>
		<i>Intenso</i> %	<i>Moderado</i> %	<i>Discreto</i> %	<i>Ausente</i> %	
1 dia	Controle	-	-	100	-	-
	Laser	-	25	75	-	-
	Dexametasona	-	-	100	-	-
	Laser e Dexametasona	-	25	75	-	-
3 dias	Controle	-	25	75 <sup>b</sup>	-	0,04
	Laser	-	100 <sup>a</sup>	-	-	-
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	-	75	25	-	-
5 dias	Controle	-	25	75	-	-
	Laser	25	75	-	-	-
	Dexametasona	-	25	75	-	-
	Laser e Dexametasona	-	100	-	-	-
7 dias	Controle	-	100	-	-	-
	Laser	25	75	-	-	-
	Dexametasona	-	75	25	-	-
	Laser e Dexametasona	25	75	-	-	-
14 dias	Controle	50	50 <sup>b</sup>	-	-	0,04
	Laser	100 <sup>a</sup>	-	-	-	0,04
	Dexametasona	25	75 <sup>b</sup>	-	-	0,04
	Laser e Dexametasona	100 <sup>a</sup>	-	-	-	0,04

<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.

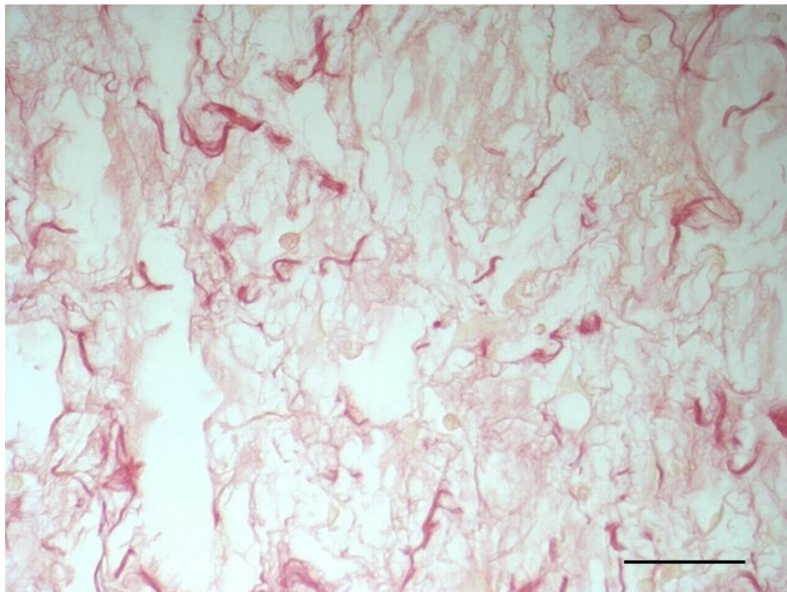


**Figura 11. Distribuição discreta de fibras colágenas. Grupo controle, 5<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

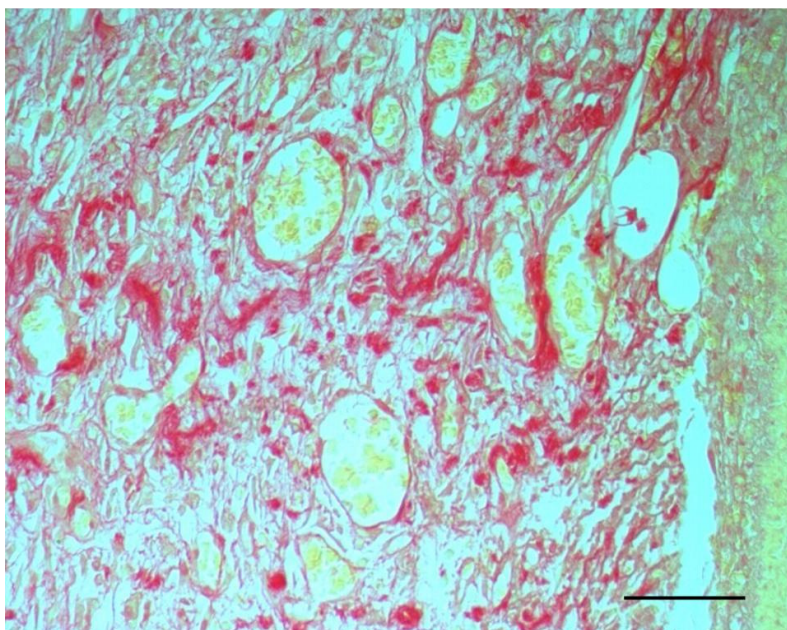


**Figura 12. Fibras colágenas mais expressas e com padrão organizacional mais acentuado. Grupo laser, 5<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**





**Figura 13.** Discreta presença de fibras colágenas esparsamente distribuídas. Grupo dexametasona, 5<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 14.** Moderada presença de fibras colágenas em meio a vasos dilatados. Grupo laser associado à dexametasona, 5<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Sírius vermelho, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

A análise dos miofibroblastos foi iniciada com o estudo imunohistoquímico de células que expressaram actina- $\alpha$  de músculo liso e desmina, representadas nas Tabelas 6 e 7. O predomínio da expressão dos miofilamentos foi observado nos animais submetidos a fotoestimulação, principalmente nos 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias do estudo. A presença de actina- $\alpha$  de músculo liso foi intensa em 100% dos animais que sofreram a ação exclusiva da fototerapia, com diferença significativa para os outros três grupos ( $p=0,03$ ). Nestes mesmos períodos de estudo a expressão da desmina foi menos representativa. No 5<sup>o</sup> dia, este miofilamento foi intensamente identificado em 50% dos animais submetidos ao laser, com diferença significativa apenas para o grupo dexametasona ( $p=0,04$ ). No 7<sup>o</sup> dia, entretanto, os animais submetidos exclusivamente ao laser expressaram intensa e moderada imuno-marcação da desmina com diferenças significativas quando comparado a todos os outros grupos (0,04).

Tabela 6. Distribuição do percentual de animais cujas imuno-marcações exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de actina- $\alpha$  de músculo liso na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

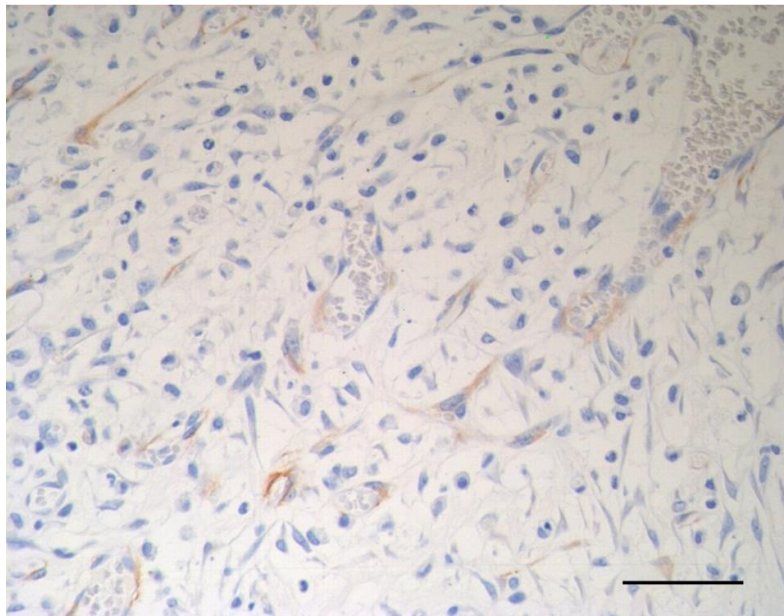
<i>Morte dos animais</i>	<i>Grupos</i>	<i>Actina-<math>\alpha</math> de músculo liso</i>				<i>p</i>
		<i>Intenso</i> %	<i>Moderado</i> %	<i>Discreto</i> %	<i>Ausente</i> %	
1 dia	Controle	-	-	-	100	-
	Laser	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	-	100	-
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100	-
3 dias	Controle	-	-	50	50	-
	Laser	-	75	25	-	-
	Dexametasona	-	-	50	50	-
	Laser e Dexametasona	-	-	50	50	-
5 dias	Controle	-	100 <sup>b</sup>	-	-	0,03
	Laser	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	Dexametasona	-	25	75 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	-	100 <sup>b</sup>	-	-	0,03
7 dias	Controle	-	50	50 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-
	Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,03
	Laser e Dexametasona	-	50	50 <sup>b</sup>	-	0,03
14 dias	Controle	-	25	75	-	-
	Laser	-	75	25 <sup>a</sup>	-	-
	Dexametasona	-	-	50	50 <sup>b</sup>	0,04
	Laser e Dexametasona	-	50	50	-	-

<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.

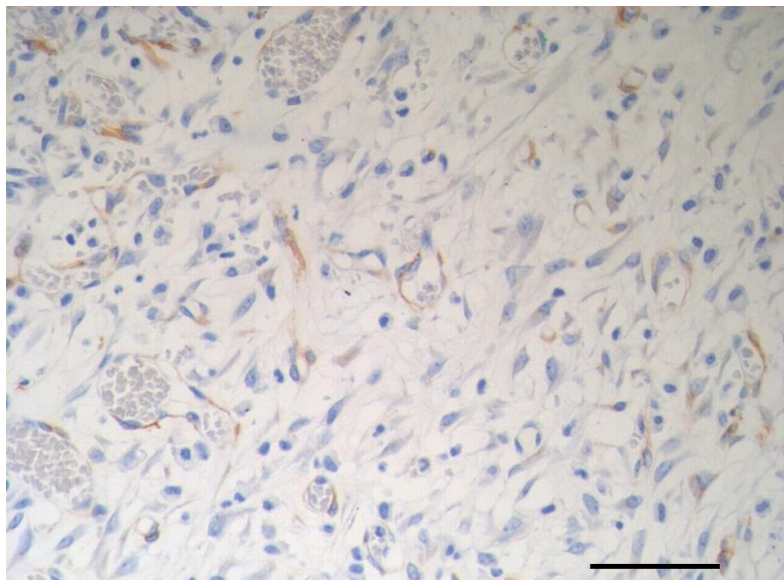
**Tabela 7. Distribuição do percentual de animais cujas imuno-marcações exibiram intensa, moderada, discreta ou ausência de desmina na área da cicatrização. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).**

<b>Morte dos animais</b>	<b>Grupos</b>	<b>Desmina</b>				<b>p</b>
		<b>Intenso %</b>	<b>Moderado %</b>	<b>Discreto %</b>	<b>Ausente %</b>	
1 dia	Controle	-	-	-	100	-
	Laser	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	-	100	-
	Laser e Dexametasona	-	-	-	100	-
	Dexametasona	-	-	-	100	-
3 dias	Controle	-	-	50	50	-
	Laser	-	50	50	-	-
	Dexametasona	-	-	50	50	-
	Laser e Dexametasona	-	-	25	75	-
	Dexametasona	-	-	25	75	-
5 dias	Controle	-	75	25	-	-
	Laser	50	50 <sup>a</sup>	-	-	-
	Dexametasona	-	25	75 <sup>b</sup>	-	0,04
	Laser e Dexametasona	-	50	50	-	-
	Dexametasona	-	25	75 <sup>b</sup>	-	0,04
7 dias	Controle	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Laser	25	75 <sup>a</sup>	-	-	-
	Dexametasona	-	-	75	25 <sup>b</sup>	0,04
	Laser e Dexametasona	-	-	100 <sup>b</sup>	-	0,04
	Dexametasona	-	-	75	25 <sup>b</sup>	0,04
14 dias	Controle	-	-	50	50	-
	Laser	-	-	100 <sup>a</sup>	-	-
	Dexametasona	-	-	25	75 <sup>b</sup>	0,04
	Laser e Dexametasona	-	-	75	25	-
	Dexametasona	-	-	25	75 <sup>b</sup>	0,04

<sup>a,b</sup> Grupos entre os quais houve diferenças significativas.



**Figura 15.** Células actino-positivas na região cicatricial. Grupo laser, 7<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Streptoavidina Biotina, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

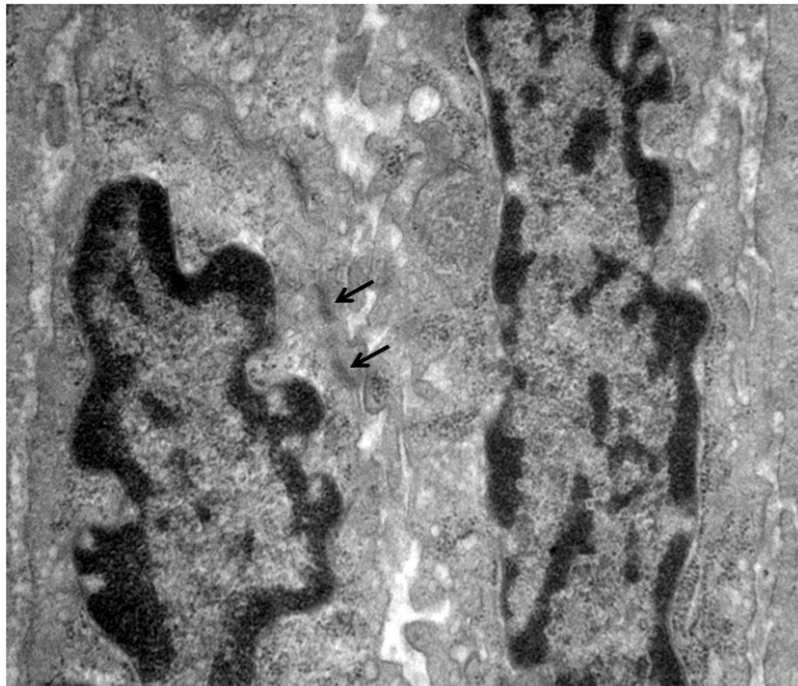


**Figura 16.** Distribuição discreta de imunomarcção para actina- $\alpha$  de músculo liso. Grupo laser associado à dexametasona, 7<sup>o</sup> dia pós-operatório. (Streptoavidina Biotina, Escala=0,1mm). Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

O estudo ultraestrutural teve como objetivo revelar a presença de células com características de miofibroblastos, ratificando os achados imunohistoquímicos. No grupo controle observou-se nos períodos iniciais correspondentes ao 3º e 5º dias do experimento predomínio de células fusiformes semelhantes a fibroblastos com discreta atividade de síntese, distribuídas numa matriz frouxa, pouco eletrondensa. As células caracterizadas como miofibroblastos eram menos presentes ao longo do experimento e apresentavam núcleos chanfrados e membranas com regiões eletrondensas em sua extensão. No grupo laser os miofibroblastos eram volumosos, de contorno irregular e mostravam um intenso processo de síntese, em especial no 5º dia. A presença de fibronexus era uma outra característica ultraestrutural evidenciada de forma expressiva. Algumas destas células puderam ser identificadas até o fim do experimento. Na presença da dexametasona, os miofibroblastos não eram presentes em grandes quantidades, mostravam-se isolados com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi menos desenvolvidos. Na associação do laser com a dexametasona o perfil ultraestrutural dos miofibroblastos foi evidenciado e alguns deles encontravam-se associados a fibroblastos.



**Figura 17.** Miofibroblastos exibindo contatos focais (\*), com núcleos de contorno irregular e presença de indentações (setas). Eletromicrografia, 4.400X. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).



**Figura 18.** Miofibroblasto em detalhe, evidenciando-se ao longo da membrana, corpos densos (setas). Eletromicrografia, 7.000X. Fonte: Dados da pesquisa (UFPB-UFBA, 2008).

**6 - DISCUSSÃO**



## **6 - DISCUSSÃO**

Na Odontologia, especialmente na Cirurgia Bucomaxilofacial, a dexametasona é um medicamento bastante utilizado devido as suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias em processos agudos (ABRANHAN *et al.*, 2006, BLAKYTNY *et al.*, 2006; GRAZIANE *et al.*, 2006; MOORE *et al.*, 2005; McGRORY *et al.*, 2004). Este fármaco, entretanto, interfere na cicatrização por inibir diversos eventos teciduais que fazem parte do reparo tecidual (WU *et al.*, 2006; SAADAT *et al.*, 2005; CAULFIELD *et al.*, 2002; ORLIKOWSKY *et al.*, 2001). Por isto, são essenciais pesquisas que busquem alternativas terapêuticas com a mesma capacidade antiinflamatória da dexametasona sem seus efeitos adversos. Neste sentido, o presente trabalho avalia a atuação do laser comparando-o à dexametasona, tanto na atividade antiinflamatória quanto na gênese do tecido cicatricial, com ênfase na avaliação do miofibroblasto.

Para a realização deste estudo foram realizadas feridas circulares no dorso de ratos por tratar-se de um modelo experimental com formação de abundante tecido de granulação, lenta cicatrização e uma distribuição uniforme dos miofibroblastos nas margens das feridas (MAWAKI, *et al.*, 2007). O laser de diodo de AsGaAl foi utilizado por ser um laser bastante empregado na clínica odontológica e a dosimetria escolhida está respaldada em trabalhos de pesquisas que demonstraram ser uma dosimetria capaz de otimizar o fenômeno da cicatrização (REIS, *et al.* 2008; MEDRADO, *et al.* 2003).

Os resultados obtidos desta análise demonstraram que a irradiação laser foi eficiente em abreviar as fases aguda e crônica de feridas na pele de ratos, a partir de 24 horas da injúria. Outros estudos avaliando a inflamação aguda na

pleura e pata de ratos também utilizando comprimento de onda vermelho, confirmaram este benéfico efeito modulador do laser (ALBERTINI *et al.*, 2007; LOPES-MARTINS *et al.*, 2005; ALBERTINI *et al.*, 2004). O mecanismo de ação do laser sobre a inflamação ainda não está completamente esclarecido, mas há estudos demonstrando supressão da IL-1 $\beta$ , IL-2 (BOSCHI *et al.*, 2008; NOVOSELOVA *et al.*, 2006; SHIBATA *et al.*, 2005; NOMURA *et al.*, 2001) da expressão do RNAm da COX-2 (ALBERTINI *et al.*, 2007) e do TNF $\alpha$ , como possíveis formas de intervenção (AIMBIRE *et al.*, 2006, AIMBIRE *et al.*, 2006).

Na distribuição da matriz de colágeno houve uma tendência de maior síntese nos grupos submetidos ao laser, quando comparado ao grupo dexametasona isolado e ao grupo controle, concordando com outros estudos (GÁL *et al.*, 2008; AZEVEDO *et al.*, 2006; BAYAT *et al.*, 2005; MAIYA *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2004; VINCK *et al.*, 2003; KREISLER *et al.*, 2003). A deposição de colágeno nos animais irradiados e a diminuição de células mononucleares pode ser justificada devido a capacidade do laser em aumentar localmente a atividade enzimática destas células e dos fibroblastos (SAFAVI *et al.*, 2007; ARANY *et al.*, 2007; KLEBANOV *et al.*, 2005) em especial no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias de cicatrização (REIS *et al.*, 2008). Observou-se também predominância de células fusiformes expressando actina- $\alpha$  de músculo liso e desmina nos 5<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias nos animais expostos a fototerapia laser. Assim supõe-se que o estímulo luminoso não apenas aumentou o número de miofibroblastos no local da injúria, como também ativou suas funções secretoras. Estes achados foram ratificados através da microscopia eletrônica de transmissão.

Está bem estabelecido que glicocorticóides são capazes de atuarem como imunossupressores ou potentes antiinflamatórios, dependendo da dose

empregada (CICARELLI *et al.*, 2006; ABRAHAM *et al.*, 2006). Na clínica odontológica, a dexametasona é utilizada para reduzir a dor, o edema e o trismo pós-operatório (MOORE *et al.*, 2005). Essa efetividade antiinflamatória resulta da redução de muitos mediadores inflamatórios. Este medicamento inibe a produção de citocinas como IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  e seus receptores, interfere sobre as moléculas de adesão de membrana de linfócitos que regulam a ativação e tráfego destas células (MORSINK *et al.*, 2006; KAMBERI *et al.*, 2002), além de reduzir a proliferação de células T (BRUNETTI *et al.*, 2002; CAULFIELD *et al.*, 2002). Confirmando estas informações, os resultados demonstraram a capacidade da dexametasona em reduzir todas as fases da inflamação, através da inibição do edema, das células polimorfonucleares e mononucleares e da deposição de fibras colágenas. A redução da síntese de colágeno demonstrou um potencial efeito negativo deste medicamento sobre o reparo. Estes achados foram encontrados em estudo ultra-estrutural no 3º e 5º dias após o uso da dexametasona, onde os fibroblastos exibiram poucas organelas e reduzida matriz colagênica (REIS *et al.*, 2008). Na presente pesquisa, o perfil inibitório deste fármaco foi observado também através de níveis mais baixos da expressão de células actino- $\alpha$  e desmimo positivas.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a associação do laser com a dexametasona e verificar o comportamento da interação destes agentes na cronologia do reparo cutâneo. Foi observado que na fase exsudativa, este grupo não apresentou resultados modulatórios tão eficientes quanto os grupos laser e dexametasona isoladamente. Desta forma, surge uma questão: por que não houve maior redução da fase aguda neste grupo, uma vez que havia a associação de dois agentes moduladores da inflamação? Um dos mecanismos

sugeridos para a atividade do laser sobre a inflamação é o estímulo a secreção de cortisol endógeno, hormônio liberado pelas glândulas supra-adrenais que age como antiinflamatório natural (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006; ALBERTINI *et al.*, 2004). A presença da dexametasona, entretanto, inibe a atividade desta glândula, assim como dos receptores do cortisol endógeno distribuídos em praticamente todas as células do corpo. Desta forma, se o estímulo às glândulas supra-adrenais é uma das atuações do laser, a dexametasona possivelmente inibiu este mecanismo de ação (LOPES-MARTINS *et al.*, 2006).

Ainda neste grupo de estudo, os resultados observados em relação à síntese de colágeno e a expressão de miofibroblastos demonstraram índices mais elevados destas variáveis em relação ao grupo dexametasona. É descrito que o laser exerce efeitos locais que aceleram o metabolismo, a proliferação celular (AMAT *et al.*, 2005) e melhor organização da matriz extracelular (REIS *et al.*, 2008; ARANY *et al.*, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2005;). Como a dexametasona apresentou ação inibitória na cronologia do reparo cutâneo, sugere-se que a fototerapia tenha realizado uma atividade estimulatória local dos componentes celulares e extracelulares, mesmo na presença da dexametasona.



## **7 – CONCLUSÃO**

Conclui-se, portanto, que a utilização isolada do laser apresentou resultados semelhantes aos obtidos pela dexametasona para a modulação dos eventos da inflamação em 24 horas. Na avaliação da deposição de colágeno e proliferação dos miofibroblastos, o laser também foi capaz de otimizá-los, mesmo em associação com a dexametasona. Estes resultados sugerem que na atividade clínica cirúrgica, onde é importante a administração da dexametasona, o laser seja utilizado com o objetivo de melhorar a fase secretora e de contração do reparo de tecidos moles.

**8 - REFERÊNCIAS**

## 8 – REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S.M.; LAWRENCE, T.; KLEIMAN, A., et al. Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1883–1889, 2006.

AIMBIRE, F.; ALBERTINI, R.; PACHECO, M.T.T.; et al. Low-Level Laser Therapy Induces Dose-Dependent Reduction of TNF $\alpha$  Levels in Acute Inflammation. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 24, p. 33–37, 2006.

AIMBIRE, F.; LOPES-MARTINS, R.A.B.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; et al. Low-level laser therapy can reduce lipopolysaccharide-induced contractile force dysfunction and TNF- $\alpha$  levels in rat diaphragm muscle. **Lasers in Medical Science**, v. 21, p. 238–244, 2006.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.; VILLAVERDE, et al. COX-2 mRNA expression decreases in the subplantar muscle of rat paw subjected to carrageenan-induced inflammation after low level laser therapy. **Inflammation. Research**. v. 56, p. 228–229, 2007.

ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C.; CORREA, F.I.; et al. Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 74, p. 101–107, 2004.

ALBERTINI, R.; VILLAVERDE, A.B.; AIMBIRE, F.; et al. E. Munin; M.S. Costa. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 89, p. 50–55, 2007.

AMAT, A. RIGAU, J.; WAYNANT, R.W.; ILEV, I.K.; TOMAS, J.; ANDERS, J.J. Modification of the intrinsic fluorescence and the biochemical behavior of ATP after irradiation with visible and near-infrared laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 81, p. 26–32, 2005.

ARANY, P.R.; NAYAK, R.S.; HALLIKERIMATH, S.; LIMAYE, A.M.; KALE, A.D.; KONDAIAH, P. Activation of latent TGF-b1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-b1 levels in laser-enhanced oral wound healing, **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, p. 866–874, 2007.

AZEVEDO, L.H.; EDUARDO, F.P.; MOREIRA, M.S.; et al. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. **Lasers in Medical Science**, v. 21, p. 86–89, 2006.

BASFORD, J.R. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool. **Lasers in Surgery Medicine**, v. 16, p. 331–421, 1995.



BAYAT, M.; VASHEGHANI, M.M.; RAZAVI, N. Sudabeh Taheri; Mohammad Rakhshan. Effect of low-level laser therapy on the healing of second-degree burns in rats: a histological and microbiological study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, p. 171–177, 2005.

BLAKYTNY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes, **Diabetic Medicine**, v. 23, p. 594-608, 2006.

BOSCHI, E.S.; LEITE, C.E.; SACIURA, V.C.; et al. Anti-Inflammatory Effects of Low-Level Laser Therapy (660 nm) in the Early Phase in Carrageenan-Induced Pleurisy in Rat. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 40, p. 500-508, 2008.

BOUMA, M.G.; BUURMAN, W.A.; WILDENBERG, F.A.; et al. Low-energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 19, p. 207–215, 1996.

BRAUN, S.; KELLER, U.; BEER, H.D.; et al. Measuring report growth factors in development, repair and disease. **European Journal of Cell Biology**, v. 81, p. 375-382, 2002.

BRUGNERA JUNIOR, Aldo, PINHEIRO, A. L. B.. 1998. Laser na Odontologia Moderna d ed 1. São Paulo: PANCAST.

BRUNETTI, M.; COLASANTE, A.; MASCETRA, N.; et al. IL-10 Synergizes with Dexamethasone in Inhibiting Human T Cell Proliferation1. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 915–919, 1998.

BRUNETTI, M.; MASCETRA, N.; MARTELLI, N.; et al.. Synergistic inhibitory activities of interleukin-10 and dexamethasone on human CD4+ T cells1. **Immunobiology**. V. 74, p. 1152-1158, 2002.

CAULFIELD, J. FERNANDEZ, M.; SNETKOV, V.; LEE, T.; HAWRYLOWICZ, C. CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3<sup>+</sup> T cells. **Immunology**, v. 105, p. 155-162, 2002.

CHANSON, M. DEROUETTE, J.P.; ROTH, I. et al. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1711, p.197-207, 2004.

CICARELLI, D. D.; BENSEÑOR, F. E. M.; VIEIRA, J. E. Effects of single dose of dexamethasone on patients with systemic inflammatory response. **São Paulo Medical Journal**., v.124, p. 90-95, 2006.

CONLAN, MJ,; RAPLEY, J.W,; COBB, C.M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review, **Journal of Clinical Periodontology**. v. 23, p.492-496, 1996.

CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J., KIMBER, I. Inhibition by dexamethasone of Langerhans cell migration: influence of epidermal cytokine signals. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 235–243, 1999.

FERREIRA, D.M., ZÂNGARO R.A., VILLAVARDE A.B., et al, Analgesic Effect of He-Ne (632.8 nm) Low-Level Laser Therapy on Acute Inflammatory Pain, **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 177-181, 2005.

GABIANI, G. Some historical and philosophical reflections on the myofibroblast concept. **Current Topics in Pathology**. v. 93, p. 1-5, 1999.

GÁL, P.; MICHAL, M.; VIDINSKY, B.; KILIIK, R.; DEPTA, F.; HARA KAPOVÁ, M.; et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers in Medical Science**. v. 21, 2008.

GARRETT, Q.; KHAW, P.T.; BLALOCK, D.; SCHULTZ, S.; GROTENDORST, G.R.; DANIELS, T. Involvement of CTGF in TGF- $\beta$ 1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress, **Investigative Ophthalmology**, v. 45, p. 1109-1116, 2004.

GENOVESE, W.J. 2007. Laser de baixa intensidade. Aplicações Terapêuticas em Odontologia. Ed.1, São Paulo: Editora Santos.

GRAS, M.P.; VERRECCHIA, F.; UITTO, J.; MAUVIEL, A. Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone, **Experimental Dermatology** v. 10, p. 28–34, 2001.

GRAS, M.-P.; VERRECCHIA, F.; MAUVIEL, A. Downregulation of human M.-P. type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone. Identification of a glucocorticoid receptor binding region. **Experimental Dermatology**, v. 10, p. 28–34, 2001.

GRAZIANI, F.; D'AIUTO, F.; ARDUINO, P.G.; TONELLI, M.; GABRIELE, M., Perioperative dexamethasone reduces post-surgical sequelae of wisdom tooth removal. A split-mouth randomized double-masked clinical trial. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, p. 241–246, 2006.

GULSOY, M. OZER, G.H.; BOSKULAK, O. et al. The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, p. 199-202, 2006.

ISHIDA, Y.; KONDO, T.; TAKAYASU, T.; et al. The essential involvement of cross-talk between IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the skin wound-healing process. **The Journal of Immunology**. v. 172, p. 1848-1855, 2004.

KAMBERI, M., BRUMMER, E.; STEVENS, D. A. Regulation of bronchoalveolar macrophage proinflammatory cytokine production by dexamethasone and

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after stimulation by aspergillus conidia or lipopolysaccharide, **Cytokine**, v. 19, p. 14–20 2002.

KANDA, T.; FUNATO, N.; BABA, Y.; KUROBA, T. Evidence for fibroblast growth factor receptors in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. **Archives of Oral Biology**, v. 48, p. 213-221, 2003.

KANDOLF-SEKULOVIC, L; KATARANOVSKI, M; PAVLOVIC, M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. **Photodermatology Photoimmunology Photomedicine**, v.19, p. 203-212, 2003.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. 1: **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, p.1-17, 1999.

KLEBANOV, G.I.; POLTANOV, E.A.; CHICHUK, T.V.; OSIPOV, A.N.; VLADIMIROV, Y.A. Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne laser radiation. **Biochemistry**, v. 70, p. 1623-1630, 2005.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 353–358, 2003.

KREISLER, M.; CHRISTOFFERS, A.B.; WILLERSHAUSEN, B.; D'HOEDT, B.. Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 18, p. 100–103, 2003.

LIU, Y.; HO, C.; CHENG, C. et al. Photoradiation could influence the cytoskeleton organization and inhibit the survival of human hepatoma cells in vitro. **Lasers in Medical Science**, v. 21, p. 42–48, 2006.

LOPES, R.P.; LUNARDELLI, A.; PREISSLER, T.; et al. The effects of fructose-1,6-bisphosphate and dexamethasone on acute inflammation and T-cell proliferation. **Inflammation Research**. v. 55, p. 354–358, 2006.

LOPES-MARTINS, R.A.B.; ALBERTINI, R.; MARTINS, P.S.L.L.; et al. Spontaneous Effects of Low-Level Laser Therapy (650 nm) in Acute Inflammatory Mouse Pleurisy Induced by Carrageenan. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 377–381, 2005.

MACEDO, J.M.S.; OLIVEIRA, I.R. Corticosteróides. In: SILVA, P. Farmacologia, 4. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1998. cap. 81, p. 760-775.

MAIYA, G.A.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of Low Intensity Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Diabetic Wound Healing Dynamics. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 187–190, 2005.

MARCHIONNI, A.M.T; REIS, S.R.A; PAGNONCELLI, R.M. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual, **Revista Odonto Ciência**, v. 21, p. 22-29, 2006.

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

MAWAKI, A.; NAKATANI, T.; SUGAMA, J.; KONYA, C. Relationship between the distribution of myofibroblasts, and Stella and circular scar formation due to the contraction of square and circular wound healing. **Anatomical Science International**, v. 82, p. 147-155, 2007.

McGRORY, K.; FLAITZ, C.M.; KLEIN, J.R. Chemokine changes during oral wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, p. 317-320, 2004.

MEDRADO, A.P.; SOARES, A.P.; SANTOS, E.T.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 92, p. 144-152, 2008.

MEDRADO, A.R.A.P.; PUGLIESE, L.S.; REIS, S.R.A.; et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Laser in Surgery and Medicine**, v.32, p. 239-244, 2003.

MIDWOOD, K.S.; VALENICK, L.; SCHWARZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p. 1031-1037, 2004.

MIGLIORATI, G.; BARTOLI, A.; NOCENTINI, G.; et al. Effect of dexamethasone on T-cell receptor/CD3. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 167, p. 135–144, 1997.

MOORE, P.A.; BRAR, P.; SMIGA, E.R., COSTELLO, B.J. Preemptive rofecoxib and dexamethasone for prevention of pain and trismus following third molar surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 99, p. 1-7, 2005.

MORSINK, M.C.; STEENBERGEN, P.J.; VOS, J.B. et al. Acute Activation of Hippocampal Glucocorticoid Receptors Results in Different Waves of Gene Expression Throughout Time. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 239–252, 2006.

MUTSAERS, S.E.; BISHOP, J.E.; MCGROUTHER, G.; LAURENT, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 5-17, 1997.

NICOLA, J.H.; NICOLA, E.M.D.; Wavelength, Frequency, and Color: Absolute or Relative Concepts? **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, p. 307-311, 2002.

NOMURA, K.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Inhibition of Interleukin-1 $\beta$  Production and Gene Expression in Human Gingival Fibroblasts by Low-energy Laser Irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 16, p. 218–223, 2000.

NOVOSELOVA, E.G.; GLUSHKOVA, O.V.; CHERENKOV, D.A.; et al. Effects of low-power laser radiation on mice immunity, **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 22, p. 33-38, 2006.

ORLIKOWSKY, T.W.; WANG, Z.Q.; DUDHANE,; et al. Dexamethasone Inhibits CD4 T Cell Deletion Mediated by Macrophages from Human Immunodeficiency Virus–Infected Persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v.184, p. 1328–1330, 2001.

PARFITT, In: DEXAMETHASONE. K.; org. Martindale: the complete drug reference. 32. ed. London: **Pharmaceutical Press**, 1999. p. 1037-1039.

PESSOA, E.S.; MELHADO, R.M.; THEODORO, L.H.; GARCIA, V.G. A Histologic Assessment of the Influence of Low-Intensity Laser Therapy on Wound Healing in Steroid-Treated Animals. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, p. 199-204, 2004.

PINHEIRO, A.L.B.; MEIRELES, G.C.S.; VIEIRA, A.L.B.; et al. Phototherapy Improves Healing of Cutaneous Wounds in Nourished and Undernourished Wistar Rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 15 SI-21-SI-28, 2004.

PINHEIRO, A.L.B.; POZZA, D.H.; OLIVEIRA, M. et al. Polarized light (400-2000 nm) and non-ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, p. 485-492, 2005.

POSTERN, W.; WRONE, D.A.; DOVER, J.S., et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 334-340, 2005.

REDDY, G.K. Photobiological Basis and Clinical Role of Low-Intensity Laser in Biology and Medicine, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 22, p. 141-150, 2004.

REIS, S.R.A.; MEDRADO, A.P.; MARCHIONNI, A.M.T. et al. Effect of 670-nm Laser Therapy and Dexametasone on tissue Repair: A Histological and Ultrastructural Study. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, p. 307-313, 2008.

SAADAT, F.; KHORRAMIZADEH, M.R., MIRSHAFIEY, A. Apoptotic efficacy and inhibitory effect of dexamethasone on matrix metalloproteinase. **Medical Science Monitor**, v. 11, p. 253-257, 2005.

SAFAVI, SM.; KAZEMI, B.; ESMAEILI, M.; et al. Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , bFGF, and PDGF in rat's gingival. **Lasers in Medical Science**, v. 23, p. 331-335, 2008.

SCHAFFER, M. BONGARDTZ, M.; HOFFMANN, W.; VIEBAHN, R. MHC-Class-II-Deficiency impairs wound healing, **Journal of Surgical Research**, v. 138, p. 100-105, 2006.

SCHAFFER, M.; BONEL, H.; SROKA, R.; et al. Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780 nm-diode laser - preliminary results. 1: **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 59, p. 1-8, 2000.

SCHWARTZ E.A.; REAVEN E.; TOPPER, J. N.; TSAO, P. S. Transforming growth factor- $\beta$  receptors localize to caveolae and regulate endothelial nitric oxide synthase in normal human endothelial cells. **The Biochemical Journal**, v. 390, p. 199–206, 2005.

SCHWARZ, E.A.; SAALMÜLLER, A.; GERNER, W., CLAUS, R. Intraepithelial but not lamina propria lymphocytes in the porcine gut are affected by dexamethasone treatment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 105, p. 125–139, 2005.

SERINI G, GABBIANI G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. 1. **Experimental Cell Research**. v. 250, p. 273-83, 1999.

SKALLI, O.; SCHÜRCH, W.; SEEMAYER, T.; LAGACÉ, R.; MONTANDON, D.; PITTET, B.; GABBIANI, G.; Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. **Laboratory Investigation**, v. 60, p. 275-85, 1989.

SHIBATA, Y; OGURA, N.; YAMASHIRO, K. et al. Anti-inflammatory effect of linear polarized infrared irradiation on interleukin-1b-induced chemokine production in MH7A rheumatoid synovial cells. **Lasers in Medical Science**, v. 20, p. 109–113, 2005.

SIMON, L.S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **The American Journal of Medicine**, Princeton, v. 106, p. 37-42, may. 1999.

SOARES, E.S. **Efeitos da laserterapia de 660 nm na cicatrização de feridas cirúrgicas: estudo histológico e imunocitoquímico**. 2006. 128f. Tese para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

TALASA, D.U.; NAYCIB, A.; ATISC, S.; et al.. The effects of corticosteroids and vitamin A on the healing of tracheal anastomoses. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 67, p. 109-116, 2003.

VINCK, E.M.; CAGNIE, B.J.; CORNELISSEN, M.J.; Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers in Medical Science**, v. 18, p. 95–99, 2003.

WANG, X.J.; LIEFER, K.M.; TSAI, S.; O'MALLEY, B.W.; ROOP, D.R. Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor b1 in the epidermis. **Cell Biology**. v. 96, p. 8483–8488, 1999.

WEBBA, C.; DYSONB, M., The effect of 880 nm low level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 70, p. 39–44, 2003.

WEN, F.Q.; KOHYAMA, T.; SKOLD, C.M; ZHU, Y.K; LIU, X. Romberger DJ, Stoner J, Rennard Sl. Glucocorticoids modulate TGF-beta production by human fetal lung fibroblasts. **Inflammation**, v. 26, p. 279-90, 2002.

WU, W.; WANG, F.; YANG. K.D.; HUANG, C.Y. Dexamethasone Induction of Keloid Regression through Effective Suppression of VEGF Expression and Keloid Fibroblast Proliferation. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 126, p. 1264–1271, 2006.

