

Estudo do grau de polarização linear em lesões de pele irradiadas com *laser* durante o processo de cicatrização

Study of linear polarization degree in skin lesions irradiated with laser during the healing process

Daniela de Fátima Teixeira da Silva¹; Alessandro Melo Deana¹; Cristiane Miranda França²; Kristianne Porta Santos Fernandes³; Raquel Agnelli Mesquita-Ferrari⁴; José Antônio da Silva Junior⁵; João Carlos Ferrari Correa⁶; André Felipe Henriques Librantz⁷; Martha Simões Ribeiro⁸

¹Doutores em Ciências – USP, Professores de ensino superior – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

²Doutora em Patologia Bucal – USP, Professora Colaboradora do Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

³Doutora em Imunologia – USP, Professora do Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁴Doutora em Fisioterapia – UFSCar, Professora do Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁵Pós-doutor em Biologia Molecular – Unifesp, Professor do Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁶Doutor em Morfologia – Unicamp, Professor do Mestrado em Ciências da Reabilitação – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁷Pós-Doutor em Materiais/Modelagem Computacional – USP, Coordenador do Mestrado em Engenharia de Produção – Uninove. São Paulo, SP – Brasil.

⁸Doutora em Ciências – USP, Pesquisadora do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Centro de *Lasers* e Aplicações (CLA). São Paulo, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Daniela de Fátima Teixeira da Silva
Av. Franz Voegeli, 577 – Bl 01 apto 22 – Continental
06020-190 – Osasco – São Paulo [Brasil]
dfteixeira@uninove.br

Resumo

Introdução: Alguns dos fatores determinantes na resposta fotobiológica da terapia *laser* em baixa intensidade são o estado fisiológico do tecido e as características ópticas do feixe, como a polarização de seu campo elétrico. **Objetivos:** Investigaram-se o grau e a preservação da polarização linear em amostras de pele de rato sadia e lesionada. **Métodos:** Criolesões foram realizadas no dorso de ratos e tratadas por quatro dias com 1J/cm². O campo elétrico do *laser* foi alinhado a 0° e a 90° em relação à coluna vertebral dos animais. **Resultados:** A polarização foi mantida nas camadas superficiais da pele, sendo mais preservada na pele queimada. Durante o processo cicatricial, a lesão cujo campo elétrico foi alinhado a 0° em relação à coluna vertebral mostrou um grau de polarização semelhante àquele da pele sadia. **Conclusões:** O processo de reparação da pele foi influenciado pela polarização linear do feixe *laser* de He-Ne.

Descritores: Cicatrização de feridas; Óptica e fotônica; Terapia a *laser* de baixa intensidade.

Abstract

Introduction: The physiological conditions of tissue and optical characteristics of beam, like electric field polarization, are some of the determining factors in the photobiological response of low intensity laser therapy. **Objectives:** The degree and preservation of linear polarization in samples of healthy and injured rat skin were investigated. **Methods:** Cryolesions were created in the lower back of rats and treated for four days with 1J/cm². The laser electric field was aligned in 0° and 90° to the backbone of the animals. **Results:** The polarization was maintained in the superficial layers of the skin, being better preserved in burned skin. During the wound healing, the lesion whose electric field was aligned parallel to the spine showed a degree of bias similar to that of healthy skin. **Conclusions:** The repair process of skin was influenced by linear polarization of He-Ne laser beam.

Key words: Laser therapy, low-level; Optics and photonics; Wound healing.

Introdução

Experimentos sobre os efeitos médicos e biológicos obtidos com *lasers* em baixa intensidade são relatados desde 1964¹. A partir dessa data, sabe-se que a irradiação de um tecido vivo com *lasers* em baixa intensidade provoca, biológica e funcionalmente, um aumento na síntese de proteínas da célula^{2,3}, além de mudanças na distribuição de cargas elétricas na membrana celular⁴. Os efeitos macroscópicos observados são desde aceleração de cicatrização à analgesia^{5,6,7}. É importante ressaltar, também, que os resultados mostram a existência desses efeitos numa ampla faixa de densidade de energia (0,05 – 5,0J/cm²) e para vários comprimentos de onda (632,8nm; 694,3nm; 830nm; 10,6µm), para luz polarizada e não polarizada. As experiências são realizadas tanto com animais de experimentação *in vivo*^{8,9} quanto com cultura de células *in vitro*^{4,10,11,12}. Além disso, há dúvidas se os efeitos atribuídos à irradiação *laser* são específicos de luz coerente¹³. A relação exposição-resposta à irradiação *laser* em baixa intensidade não foi ainda elucidada, e os mecanismos básicos responsáveis pelos efeitos observados com esses tipos de *lasers* no intervalo de dose terapêutica são, até o momento, desconhecidos. Sabe-se, contudo, que os níveis de energia conseguidos com terapia *laser* de baixa intensidade, produzem mudanças mínimas e insignificantes na temperatura local. O aquecimento induzido por essa terapia está no intervalo de 0,1 a 0,5 °C^{14,15}.

Quando a luz incidente é não polarizada, os osciladores atômicos do meio irradiado dispersam a luz seguindo direções aleatórias, no entanto, quando é polarizada, há dispersão da luz em direções bem definidas. A polarização é a vibração do campo elétrico em uma direção preferencial, por exemplo, *lasers* de He-Ne são randomicamente polarizados, isto é, seu campo elétrico vibra aleatoriamente. Ao utilizar um polarizador acoplado ao *laser*, o campo elétrico passa a vibrar na direção estabelecida pelo polarizador. Trabalhos sugerem que a direção de polarização da radiação *laser* de He-Ne pode

acelerar a resposta biológica durante a cicatrização de queimaduras na pele de ratos e camundongos. Os resultados obtidos demonstram que a direção de polarização do campo elétrico, que é alinhada paralelamente a uma direção referencial no animal, afeta o processo cicatricial, particularmente a formação do tecido conjuntivo na derme, consistindo em um importante fator para a aceleração da cicatrização de lesões inflamatórias¹⁶.

O propósito neste trabalho foi medir o grau de polarização linear em amostras de pele sadias e queimadas, cicatrizadas por *laser* ou não, e verificar se a polarização do feixe *laser* pode contribuir para a aceleração do processo de cicatrização.

Materiais e métodos

Animais

Neste experimento, foram utilizados quatro ratos machos adultos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), com massa corpórea de aproximadamente 300 g, oriundos do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrocloreto de ketamina (0,32 mL/kg) e xilazina (0,2 mL/kg) e devidamente tricotomizados na região dorsal. Ainda anestesiados, sofreram três queimaduras com N₂ líquido na parte inferior do dorso, sobre a coluna vertebral, seguindo o método de padronização estabelecido anteriormente por Ribeiro¹⁷. Não foram adotadas medidas de sedação após a lesão, a não ser imediatamente antes das irradiações, com o mesmo protocolo citado acima.

Os animais foram mantidos em condições de luz e temperatura controladas, com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA). A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética na Utilização de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA/IPEN), sob o número de pro-

toocolo 47/2009, com o título “Lasers de baixa intensidade no processo de cicatrização de lesões”.

Criolesão

Utilizou-se uma barra cilíndrica de cobre, refrigerada a -196°C com nitrogênio líquido, mantida em contato com a pele do animal por cinco segundos, duas vezes consecutivas, com intervalo de tempo de cinco minutos entre as aplicações. Esse procedimento foi repetido por três dias consecutivos (dias 1, 2 e 3 do experimento), sendo a primeira irradiação *laser* feita apenas no dia 3, ocasião da última aplicação da barra refrigerada. A área da lesão, determinada pela área da base do recipiente em contato com a pele do animal, foi circular com 28 mm^2 (diâmetro $\Phi = 6\text{ mm}$) (Figura 1).

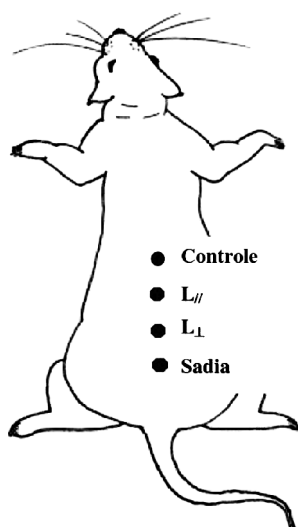


Figura 1: Áreas analisadas no dorso dos animais de experimentação. C: lesão controle; $L_{//}$: lesão irradiada com a polarização do *laser* alinhada em paralelo à coluna vertebral do animal; L_{\perp} : lesão irradiada com a polarização do *laser* alinhada perpendicularmente à coluna vertebral do animal; S: área sadia (sem lesão)

Irradiação

A fonte de luz foi um *laser* de He-Ne com 10 mW de potência ótica contínua, modelo 1300 UNIPHASE, EUA, $\lambda = 632,8\text{ nm}$ e diâmetro do

feixe de 2 mm, acoplado a um sistema óptico composto por um polarizador do tipo Glan-Thompson (modelo 10GT04AR.14 NEWPORT, EUA), de razão de extinção $< 1 \times 10^{-5}$, com transmissão de aproximadamente 36%. Foi utilizado um disco graduado como suporte do polarizador, de modo que ele pudesse ser rotado em 90° . Utilizou-se também uma lente convergente de $f = 7\text{ cm}$ e um filtro de densidade neutra aproximadamente igual a 0,04 para $\lambda = 632,8\text{ nm}$. Por último, utilizou-se uma objetiva (modelo SMC 6166358 PENTAX, Japão) composta de duas lentes, de $f = 5\text{ cm}$ e razão 2:1, de modo a obter-se um feixe de 6 mm. A potência de saída útil, após o sistema de formatação de feixe, foi $P \approx 1,8\text{ mW}$, registrada por meio de um detector de potência (modelo LM-1 COHERENT, EUA), devidamente calibrado. A potência foi aferida antes de cada experimento (Figura 2).

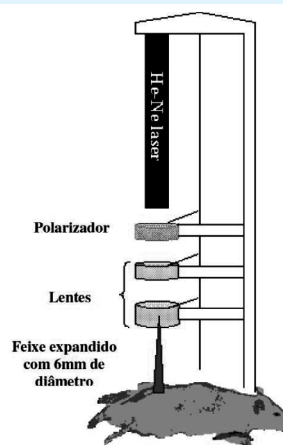


Figura 2: Arranjo experimental para irradiação das lesões

Baseando-se no trabalho de Ribeiro¹⁵, seguiu-se o mesmo procedimento para a irradiação das lesões. Optou-se por uma série de quatro irradiações, aplicadas nos dias 3, 7, 10 e 14, após a primeira queimadura com a barra cilíndrica, utilizando-se uma densidade de energia de 1 J/cm^2 , correspondendo a uma exposição de três minutos.

Nos quatro animais utilizados foram criadas três lesões: a lesão #1, controle (sem irradiação – L1); a lesão #2 em que se incidiu o *laser* cuja

polarização foi alinhada paralelamente à coluna vertebral do animal (L2) e a lesão #3 também foi irradiada, porém com a polarização alinhada à direção perpendicular relativa (L3).

As eutanásias ocorreram logo após as irradiações, sendo um animal sacrificado no dia 3, após a primeira irradiação; um, no dia 7, após a segunda; um, no dia 10, após a terceira e o último animal no dia 14, após a quarta irradiação. Uma câmara de dióxido de carbono foi utilizada para esses procedimentos. Botões de $\Phi = 6$ mm, correspondendo à pele lesada (irradiada ou controle) e sadia (sem nenhum tipo de lesão) foram retirados e fixados em suporte de metal apropriado. Os suportes contendo as amostras foram congelados em isopentano, um crioprotetor, e armazenados em N_2 líquido.

Obtenção das amostras

Para obtenção dos cortes paralelos à superfície da pele sadia e da lesada em diferentes espessuras, foi utilizado um micrótomo de congelação (modelo HM 500 OM MICRON LABORGERÄTE GmbH, Alemanha). Como a espessura da epiderme do rato sadia é aproximadamente $45\mu\text{m}$, fatias da pele na espessura de $10\mu\text{m}$, $20\mu\text{m}$, $30\mu\text{m}$, $40\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ foram obtidas a -21°C e fixadas em lâmina histológica à temperatura ambiente. As amostras foram conservadas a -5°C e, duas horas antes do momento de realização das medições, passaram à temperatura ambiente.

Medição da polarização

Para estudo do grau de polarização linear nas amostras de pele, utilizou-se a mesma montagem experimental descrita anteriormente, porém na horizontal, acrescida de um analisador depois das amostras. O analisador consistiu em um polarizador Glan-Thompson (10GT04AR.14 NEWPORT, EUA) acoplado a um goniômetro. As medições da intensidade do feixe de luz foram realizadas por um detector modelo LM-1 (COHERENT, EUA) após o anali-

sador. As medidas foram obtidas à temperatura ambiente.

Com base no trabalho de Sankaran e colaboradores¹⁸, determinou-se o grau de polarização linear para a propagação de luz coerente em meios túrbidos, em que para um grau de polarização $P = 1$, a luz é completamente polarizada, ao passo que $P = 0$ corresponde à luz completamente não-polarizada.

O grau de polarização linear pode ser obtido da expressão (1). Devido à simetria azimutal para as condições em consideração, o parâmetro de Stokes S_2 é zero. Portanto, para cálculo do grau de polarização linear, a lâmina foi posicionada entre os dois polarizadores. Os parâmetros S_0 e S_1 foram obtidos das medições de $I_{\text{máx}}$, que corresponde à intensidade máxima, obtida com os polarizadores em paralelo, e $I_{\text{mín}}$, correspondente à intensidade mínima, obtida com os polarizadores ortogonais, respectivamente. O grau de polarização linear é então dado por:

$$P_L = \frac{|I_{\text{max}} - I_{\text{min}}|}{I_{\text{max}} + I_{\text{min}}} \quad (1)$$

Resultados

Na Figura 3, é possível observar o grau de polarização linear para pele sadia e pele lesada (L1) obtido no terceiro dia pós-criação da queimadura, em razão da espessura da amostra. Nesse período, as lesões irradiadas L2 e L3 não apresentaram diferenças significantes em relação ao grau de polarização linear, quando comparadas à amostra controle L1.

Observa-se, na Figura 3, que a polarização na pele queimada é mais preservada, quando comparada à sadia. Também é possível notar que, na espessura de $30\mu\text{m}$, o grau de polarização linear diminui, voltando a aumentar na espessura de $40\mu\text{m}$. Analisando as amostras ao microscópio de luz, observou-se que na espessura de $30\mu\text{m}$, encontra-se a interface epiderme-derme, o que justifica a perda de polarização.

A Figura 4 retrata o grau de polarização linear em razão da espessura das amostras de pele (L1, L2 e L3), no dia 7, após a criação das lesões. De acordo com os resultados, nesse período, ou seja, ainda na fase inflamatória do processo de cicatrização, o grau de polarização linear não apresenta diferença significativa entre as lesões.

Observa-se nas Figuras 5 e 6, que a lesão L2 possui um grau de polarização linear mais baixo, quando comparada às lesões L1 e L3, nas espessuras de 40 μm e 50 μm .

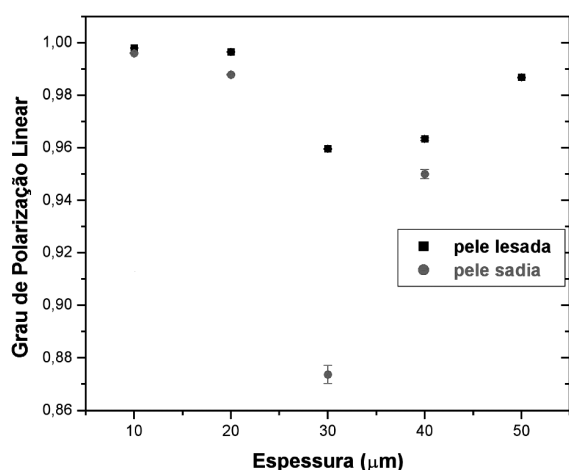


Figura 3: Grau de polarização linear para pele sadia e lesada, obtida no terceiro dia após a criação da queimadura

Discussão

Neste trabalho, foi investigado o grau de polarização linear em amostras de pele de rato sadia e queimada durante o processo cicatricial de queimaduras. Os resultados obtidos indicaram que a polarização linear é mantida nas camadas superficiais da pele, sendo mais preservada na pele lesada, quando comparada à sadia. Conforme a lesão cicatrizou, o grau de polarização linear se aproximou daquele observado na pele sadia.

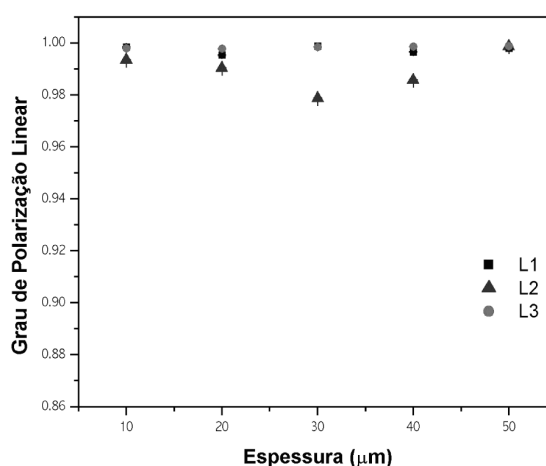


Figura 5: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3, no décimo dia, após a criação da ferida

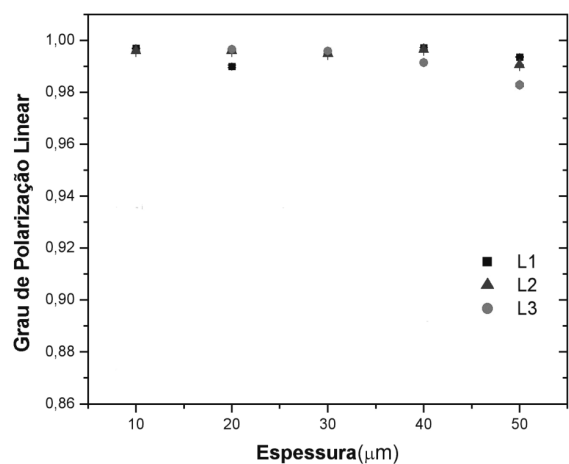


Figura 4: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3, no sétimo dia, após a criação da ferida

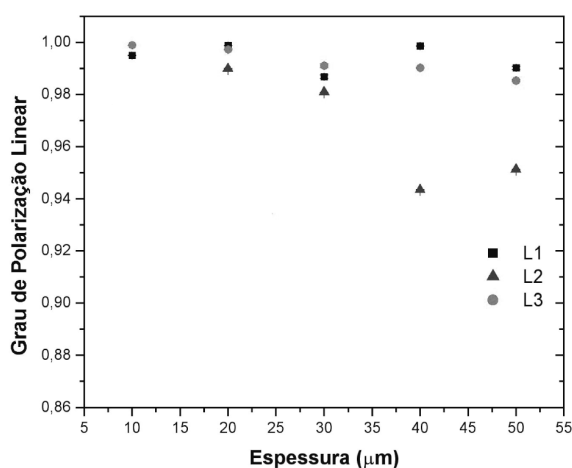


Figura 6: Grau de polarização linear para as amostras L1, L2 e L3 no 14º dia após a criação da ferida

É bem conhecido que a polarização permanece inalterada por meio de uma fina camada de células; entretanto, ao irradiar-se um meio altamente espalhador, como o tecido vivo, ela é perdida depois de uma determinada profundidade¹⁹. A penetração óptica na pele é afetada pelo forte espalhamento produzido principalmente pelas fibras colágenas²⁰. Todavia, um estudo experimental mostrou que a polarização linear pode ser preservada por 2,2 caminhos de transporte no comprimento de onda de 632,8 nm²¹. Portanto, a luz pode se propagar por uma distância de 1,5 mm na pele humana sem a completa perda da polarização linear. Convém ressaltar que esses estudos foram realizados em pele sadia, cuja estrutura é bem caracterizada.

Sob condições fisiológicas alteradas, como uma queimadura, a pele perde suas características estruturais. De fato, um estudo de Kolárova²² e colaboradores sobre a penetração da luz *laser* na pele *in vitro* mostrou que, analisando a profundidade de penetração nas camadas individuais da pele em diferentes localizações sobre sua superfície, as propriedades ópticas de espécimes *in vitro* são distintas para pele normal e tecido de granulação de úlceras de pele. A medida da profundidade de penetração da luz *laser* no tecido de granulação foi 2,5 vezes maior que a de penetração em pele normal de espessura similar e, segundo Túner e Hode¹⁷, o tratamento de feridas abertas pode ser efetivo com luz polarizada, pois, nesse caso, não há epitélio para contribuir com o espalhamento da luz, reduzindo ou destruindo a polarização.

Os resultados aqui apresentados também estão de acordo com Jacques e colaboradores²³, que estudaram a transição de luz linearmente polarizada em luz aleatoriamente polarizada durante a propagação em tecidos. Concluíram que a randomização da polarização linear é mais rápida em tecidos birrefringentes. As fibras colágenas na derme, por exemplo, são aleatoriamente direcionadas, embora elas estejam orientadas, no plano longitudinal da pele. Por

isso, a luz linearmente polarizada incidente sobre a pele será despolarizada pelo colágeno. Entretanto, a epiderme e a derme superficial (papilar) permitem a penetração da luz polarizada com modesta despolarização. Assim, esses autores comprovaram que a polarização na pele, em um modelo porcino, persiste por 265 μm além da epiderme, cuja espessura varia entre 60 e 100 μm .

Também, Ripley e colaboradores²⁴ observaram que as propriedades ópticas de fibroide são mais baixas que as do miométrio e sugeriram que isso pode ser devido às diferenças de anatomia e vascularidade.

Quanto à aceleração do processo cicatricial, é possível observar nas Figuras 5 e 6 que a lesão L2 possui grau de polarização linear mais baixo, similar ao da pele sadia, o qual foi anteriormente observado na Figura 3. Isso sugere que, a partir do décimo dia após a criação das lesões, a pele irradiada com o campo elétrico do *laser* alinhado em 0° com a coluna vertebral do animal estão num estágio de cicatrização mais avançado.

De fato, Silva e colaboradores²⁵ verificaram que o vetor campo elétrico da radiação *laser* polarizada afeta a organização do colágeno na derme, pois as lesões irradiadas, usando a polarização paralela alinhada à direção caudal-occipital, mostraram maior birrefringência, indicando que os feixes de colágeno nessas lesões são mais organizados e em estágio mais avançado de cicatrização do que as lesões irradiadas usando a direção perpendicular relativa.

Assim, propõe-se que as condições fisiológicas da pele e as propriedades ópticas do feixe *laser* sejam consideradas na escolha dos parâmetros adequados da radiação a fim de que se obtenha uma dosimetria ótima para a terapia com *lasers* em baixa intensidade.

Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que, nas condições utilizadas, a luz po-

larizada pode ser preservada nas primeiras camadas da pele. Além disso, verificou-se que o grau de polarização linear foi mais preservado nas amostras queimadas, quando comparado às amostras de pele sadia. Durante o processo de cicatrização, o grau de polarização linear para as amostras de pele num estágio de reparação mais avançado foi similar àquele da pele sadia, principalmente quando alinhada paralelamente ao longo eixo da coluna vertebral do animal.

Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 98/06784-1, e aos professores Anderson Zanardi de Freitas, Telma Maria Tenório Zorn e Denise Maria Zzell pela colaboração e rica discussão.

Referências

1. Goldman L, Richfield DF. The effect of repeated exposure to laser beams. *Acta Derm Venereol.* 1964;44:264-8.
2. Kovacs IB, Mester E, Gorog P. Laser-induced stimulation of the vascularization of the wound healing- An ear chamber experiment. *Experientia.* 1974;30:341-3.
3. Kovacs IB, Mester E, Gorog P. Stimulation of wound healing with laser beam in the rat. *Experientia.* 1974;30:1275-6.
4. Kubasova T, Kovacs L, Somosy Z, Unk P, Kokai A. Biological effects of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, *in vitro.* *Lasers Surg Med.* 1984;4:381-8.
5. Mester E, Spiry T, Szebde B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg.* 1971;122:532-5.
6. Lee P, Kim K, Kim K. Effects of low incident energy levels of infrared laser irradiation on healing of infected open skin wound in rats. *Laser Ther.* 1993;5:59-64.
7. Martin Jr. BB, Klide AM. Treatment of chronic back pain in horses- stimulation of acupuncture points with a low powered infrared laser. *Veterinary Surg.* 1987;16:106-10.
8. Baptista J, Martins MD, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS, Júnior DS, Ferrari RAM. Influence of laser photobiomodulation on collagen IV during skeletal muscle tissue remodeling after injury in rats. *Photomed Laser Surg.* 2010 Aug 11. [Epub ahead of print].
9. Ferrari RAM, Martins M, Silva JA, Silva TD, Piovesan RF, Pavesi VCS, Bussadori SK, Fernandes KPS. Effects of low-level laser therapy on expression of TNF-alpha and TGF-beta in skeletal muscle during the repair process. *Lasers Med Sci.* 2010 Nov 4. [Epub ahead of print].
10. Ferreira MPP, Ferrari RAM, Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Gonzalez, DAB, Fernandes KPS. Effect of low-energy gallium-aluminum-arsenide and aluminium gallium Indium phosphide laser irradiation on the viability of C2C12 myoblasts in a muscle injury model. *Photomed Laser Surg.* 1992;27:901-6.
11. Bolton P, Dyson M, Young S. The effect of polarized light on the release of growth factors from the U-937 macrophage-like cell line. *Laser Ther.* 1992;4(1):33-7.
12. Gravalos ED, Martins MD, Bussadori SK, Silva CA, Biasotto-Gonzalez DA, Correa JCF, Ferrari RAM, Fernandes KPS. Efeito do laser na produção de óxido nítrico por células musculares submetidas a estresse nutricional. *Fisioter Bras (São Paulo).* 2009;10:113-6.
13. Greguss P. Low-level laser therapy – reality or myth? *Opt Laser Tech.* 1984;16:81-5.
14. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts *in vitro.* *Lasers Surg Med.* 1994;14:347-54.
15. Coulter AH. Low-energy laser research in wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 1994;12:117-8.
16. Ribeiro MS, Zzell DM, Carbone K, Pellegrini CMR, Zorn, TMT. Effects of He-Ne polarized laser radiation on skin wounds repair. A morphological study. In: *Effects of Low Power Light on Biological Systems.* Karu T, Lubart R, editores. *Proc of SPIE.* 1997;3198:31-6.
17. Ribeiro MS. Theoretical-experimental study of the non-thermal effects of the polarized laser radiation on living tissues. [dissertação de mestrado]. São Paulo, Brazil: IPEN-CNEN/SP; 1991.



18. Sankaran V, Schönenberger K, Walsh Jr. JT, Maitland DJ. Polarization discrimination of coherently propagating light in turbid media. *Appl Opt.* 1999;38:4252-61.
19. Túner J, Hode L. Low level laser therapy: clinical practice and scientific background. Sweden: Prima Books; 1998.
20. Anderson RR. Polarized light examination and photography of the skin. *Arch Dermatol.* 1991;127:1000-5.
21. Jacques SL, Ostermeyer M, Wang L, Stephens D. Polarized light transmission through skin using video reflectometry: toward optical tomography of superficial tissue layers. In: *Lasers in Surgery: Advanced Characterization, Therapeutics, and Systems VI*, Anderson, RR, editores. *Proc. SPIE.* 1996;2671:199-220.
22. Kolárová H, Ditrichová D, Wagner J. Penetration of the laser light into the skin in vitro. *Lasers Surg Med.* 1999;24:231-5.
23. Jacques SL, Roman JR, Lee K. Imaging superficial tissues with polarized light. *Lasers Surg Med.* 2000;26:119-29.
24. Ripley PM, Laufer JG, Gordon AD, Connell RJ, Bown SG. Near-infrared optical properties of *ex vivo* human uterus determined by the Monte Carlo inversion technique. *Phys Med Biol.* 1999;44:2451-62.
25. Silva DFT, Vidal BC, Zezell DM, Zorn TMT, Nunez SC, Ribeiro MS. Collagen birefringence in skin repair in response to red polarized-laser therapy. *J Biomed Opt.* 2006;11(2):1-6.