

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

VALÉRIA COUTO CALAZANS SILVA

**O EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (658 nm)
NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO
GRAU EM RATOS WISTAR**

São José dos Campos - SP
2006

VALÉRIA COUTO CALAZANS SILVA

**O EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (658 nm)
NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO
GRAU EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Munin.

São José dos Campos, SP
2006

S584e

Silva, Valéria Couto Calazans

O Efeito do Laser de Baixa Potência (658nm) na Reparação Tecidual de Queimaduras de Terceiro Grau em Ratos Wistar. / Valéria Couto Calazans Silva. São José dos Campos : Univap, 2006.
f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Cicatrização de feridas 2. Queimadura 3. Terapia a Laser de Baixa Potência I. Munin, Egberto: Orientador. II. Título

CDU: 616-003.9

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial dessa dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura da acadêmica:

Valéria Couto Calazans Silva

Data: São José dos Campos, 22 de agosto de 2006.

“O EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (658NM) NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS WISTAR”

Valéria Couto Calazans Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **LUIZ VICENTE FRANCO OLIVEIRA** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **EGBERTO MUNIN** (UNIVAP) _____

Prof^a. Dra. **VIVIANE PILLA** (UNIVAP) _____

Prof. Dr. **JOSÉ BENEDICTO DE MELLO** (UNITAU) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap

Dedico este estudo à minha mãe, *in memoriam*,
por sempre ter sido uma incentivadora das minhas conquistas.
Ao meu pai e meus irmãos, por sempre estarem presentes em minha vida, vibrando
nos momentos de glória e apoiando-me nos momentos difíceis.
À minha filha, pelo carinho e compreensão pelos dias faltosos,
por me amar e ser essa pessoa tão importante em minha vida.
A todos os amigos que me apoiaram
em momentos em que pensei que não fosse conseguir.
Em especial à professora Daniela Nascimento Rocha,
por ser uma grande amiga e meu anjo de guarda.
Não poderia esquecer de citar o Prof. Dr. Leandro M. Alves, que, mesmo durante sua viagem
à Alemanha, não deixou de estar presente um só minuto.
E a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram,
não somente para realização desse estudo,
como também para a minha formação de maneira geral.

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Deus, pois sem a Sua força e poder, que me acompanharam durante toda esta jornada, eu não seria capaz de transpor tantos obstáculos.

Agradeço à Universidade do Vale do Paraíba, em especial ao IP&D, por todo o apoio didático e tecnológico fornecido, que viabilizaram o embasamento técnico-científico necessário para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Egberto Munin, pela orientação e dedicação aos meus questionamentos durante a elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco, coordenador do curso de Pós-Graduação em Bioengenharia, por sua dedicação e por ter como premissa a qualidade de formação dos seus discentes.

Ao Centro Universitário Augusto Motta, Rio de Janeiro, pela viabilização do desenvolvimento do projeto em seu laboratório de pesquisa, a LabMorf. Ao coordenador, Januário G. Mourão e Lima; aos estagiários, Rubens Meyer Ferreira Medeiros e Débora da Fonseca Silva, e à técnica, Juliana da Silva Ribeiro de Andrade, que muito me ajudaram neste trajeto, em especial ao coordenador de Fisioterapia Luis Felipe da Fonseca Reis, por ser um grande amigo.

E não poderia deixar de agradecer à HTM Eletrônica e, em especial, ao engenheiro Paulo Gustavo S. Lopes, responsável técnico, que cedeu o equipamento com o qual foi possível a realização do estudo em questão.

Existem três passos na história de uma descoberta. Primeiro, seus oponentes dizem que o descobridor está louco; depois dizem que ele é normal, mas que sua descoberta não é de real importância; e, por último, dizem que a descoberta é importante. Mas todo mundo já sabia há tempo.

Sigmund Freud

O EFEITO DO LASER DE BAIXA POTÊNCIA (658 nm) NA REPARAÇÃO TECIDUAL DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU EM RATOS WISTAR

RESUMO

O laser de baixa potência tem sido utilizado em muitos estudos visando favorecer o processo de reparo tecidual. Os efeitos terapêuticos que são induzidos pela radiação laser nos tecidos biológicos são, principalmente, o antiinflamatório, o analgésico e o regenerativo. Objetivou-se a análise dos efeitos do laser no processo de cicatrização das lesões por queimaduras de terceiro grau em ratos Wistar. Para isso, utilizaram-se trinta ratos, variação *albinus*, *Rattus norvegicus*, pesando 200 gramas cada, divididos em três grupos experimentais de dez animais cada, assim distribuídos: grupo I (grupo-controle), com terapia convencional, banho com polivinilpirrolidina iodo degermante (PVPI) e curativo com sulfadiazina de prata; grupo II (terapia laser) e o grupo III (terapia convencional mais terapia laser). O experimento foi realizado com os animais anestesiados, com Ketamina (4mg/kg im.) e analgesia com Dipirona Sódica (0,01mg/kg iv.), através de agulha e seringa descartáveis. Ainda sob os efeitos anestésico e analgésico, foi realizada a retirada do material biológico para primeira biópsia, com Punch de 3mm de diâmetro, constatando-se, assim, a profundidade da lesão. Foram realizadas oito sessões com laser diodo (InGaAlP), com comprimento de onda de 658 nm, potência de 30mW, em cinco pontos fixos, com fluência de 3 J/cm² cada ponto, na área queimada, sendo quatro pontos periféricos e um central, em um período de 15 dias alternados. A primeira biópsia foi retirada logo após a lesão. Após o período de 15 dias, foi realizado o sacrifício dos animais e feita a coleta do último material biológico para a análise da qualidade cicatricial. O tecido biológico foi preparado segundo técnica histomorfológica para verificação da quantidade de fibras colágenas e elásticas depositadas no tecido cicatricial. Os valores obtidos foram expressos em média aritmética e desvio-padrão. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer. Os resultados obtidos foram positivos quanto à quantidade de fibras colágenas ($P < 0,01$), porém não houve dados significativos para as fibras elásticas ($P = 0,3205$). A conclusão deste estudo foi que, a terapia laser de baixa potência associada a sulfadiazina de prata nas lesões por queimaduras de terceiro grau, obteve-se aumento na produção das fibras colágenas no tecido neoformado, que produziram uma cobertura cicatricial de melhor qualidade, menos friável e com maior resistência.

Palavras Chaves: Queimadura de terceiro grau. Cicatrização. Terapia laser de baixa potência.

THE EFFECT OF THE LOW POWER LASER TREATMENT ON THE TISSUE REPAIR AFTER THIRD DEGREE BURNS IN WISTAR RATS

ABSTRACT

The low power laser has been used in many studies, to favor the process of tissue repair. The therapeutic effects that occur in biological tissues are, mainly, the anti-inflammatory, the analgesic and the regenerative ones. The objective of the present work was to analyze the laser effects in the healing process of tissues injured by third degree burns in Wistar rats. For that, thirty rats variation *albinus*, *Rattus norvegicus*, weighing 200 grams each, were used. The three experimental groups with ten animals each, were distributed as: group I (control-group), with conventional therapy, bath with degerming polyvinylpyrrolidone iodine (PVPI) and dressing with silver sulfadiazine; group II (laser therapy) and group III (conventional therapy and laser therapy). The experiments were performed with the animals under anesthesia, with Ketamine (4mg/kg im.) and analgesia with sodium dipyrone (0,01mg/kg iv.), through disposable needle and syringe. Still under the anesthetic and analgesic effects, the withdrawal of the biological material for a first biopsy was carried out with a 3mm diameter punch, evidencing, thus, the depth of the injury. Eight sessions with laser diode (InGaAlP), with a wavelength of 658 nm and 30mW of optical power were carried through, in five fixed points, with fluency of 3 J/cm² each, in the burned area, being four peripheral points and the other one at the center of the injured area, in a period of 15 alternating days. The first biopsy was removed right after the injury. After the period of 15 days, the animals were sacrifice the final collection of the biological material for histological analysis was performed. The biological tissues were prepared by using histo-morphologic technique for the verification of the amount of collagen and elastic fibers deposited in the cicatrizing tissue. The obtained values were expressed by the group means and standard deviation. The data were submitted to the ANOVA statistical test, followed by the Tukey-Kramer post-test. It was observed statistically significant difference between the group means for the quantification of collagen fibers ($P < 0.01$). However, no significant differences were observed for elastic fibers ($P= 0,3205$). The conclusion of this study was that, the low power laser therapy in association with silver sulfadiazine on tissues subjected to third degree burns, there was an increase in the production of the collagen fibers in the neo-formed tissue, which produced a better quality, less loosening and more resistant scar surface.

Key Words: Burn. Wound healing. Low level laser therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático das conseqüências da lesão térmica	29
Figura 2: Modelo de boneco para cálculo da “Regra dos Nove”.	35
Figura 3: Modelo de boneco utilizado no diagrama de Lund-Browder para cálculo da área queimada.	36
Figura 4: Queimadura em dorso de rata	80
Figura 5: Biópsia realizada logo após a queimadura	80
Figura 6: Lesão no 15º dia de aplicação laser	81
Figura 7: Aplicação do diodo laser	81
Figura 8: Fotomicrografia de tecido cutâneo de ratos Wistar (aumento 20X) corado com hematoxilina-eosina. Apresentando lesão coagulativa, característica de queimadura de terceiro grau.	87
Figura 9: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com <i>picrosirius-red</i> para fibras colágenas (grupo–controle, com uso medicamentoso de sulfadiazina de prata)	89
Figura 10: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com <i>picrosirius-red</i> para fibras colágenas (grupo de laser)	89
Figura 11: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com <i>picrosirius-red</i> para fibras colágenas (grupo de laser + sulfadiazina de prata)	90

Gráfico 1: Número total de fibras colágenas nos grupos pesquisados (após 15 dias de tratamento)	91
Figura 12: Fotomicrografia de tecido cicatricial (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com sulfadiazina de prata)	92
Figura 13: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com laser)	92
Figura 14: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com laser + sulfadiazina de prata)	93
Gráfico 2: Número total de fibras elásticas nos grupos pesquisados (após 15 dias de tratamento)	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação quanto ao Padrão CDRH	25
Tabela 2: Análise das causas de queimaduras de acordo com dados do Hospital de Andaraí, no Rio de Janeiro	31
Tabela 3: Sinais e sintomas da profundidade da queimadura	35
Tabela 4: Tabela de Lund Browder	36
Tabela 5: Fatores de crescimento implicados na reparação de feridas cutâneas	52
Tabela 6: Atividade biológica dos fatores de crescimento implicados na reparação cutânea	53
Tabela 7: Divisão dos grupos e subgrupos de animais segundo cada técnica utilizada e cronograma de sacrifício	79
Tabela 8: Quantidade de fibras colágenas nos diferentes grupos pesquisados	88
Tabela 9: Resultados do pós-teste de múltiplas comparações (Tukey-Kramer) para a quantificação das fibras colágenas	88
Tabela 10: Quantidade de fibras elásticas nos diferentes grupos pesquisados	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina-trifosfato

bFGF: Basic Fibroblast Growth Factor = Fator de crescimento básico do fibroblasto

C: centígrado

CDRH: *Center for Devices and Radiological Health*

cm²: centímetro quadrado

CO₂: Dióxido de Carbono

Cr: Cromo

Daltons: medida para peso molecular das proteínas

DE: Densidade de Energia

DNA: *Desoxyribonucleic Acid* = ácido desoxirribonucléico

EGF: *Epidermal Growth Factor* = Fator de crescimento epidérmico

He-Ne: Hélio Neônio

HPV: Papiloma vírus

HSV1: Herpes simplex vírus 1

HSV2: Herpes simplex vírus 2

Hz: hertz

IgA: Imunoglobulina A

IGF: *Insulin-Like Growth Factor*

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-1a : *Interleukin-1a* = Interleucina-1a

IL-6: *Interleukin-6* = Interleucina-6

IL-8: *Interleukin-8* = Interleucina-8

im.: intramuscular

InGaAlP: Fosfeto de Índio-Gálio e Alumínio

iv.: intravenoso

J: joules

LDF: *Laser Doppler Flowmetry*

LDH: *Lactic Acid Dehydrogenase* = Ácido láctico desidrogenase

mm: milímetro

mW: miliwatts

nm: nanometro

NPA: *Neutrofilo Protein Activator* = Proteína Neutrófilo-ativadora

NV: *Nailfod Videomicroscopy*

OPS: *Orthogonal Polarization Spectral Imaging*

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* = Fator de crescimento derivado de plaqueta

PG12: prostaciclina

PVPI: polivinilpirrolidina

RNA_m: *Messenger Ribonucleic Acid* = Ácido ribonucléico mensageiro

SCQ: Superfície corporal queimada

TGF α : *Transforming Growth Factor alfa* = Fator de crescimento transformante alfa

TGF β : *Transforming Growth Factor beta* = Fator de crescimento transformante beta

TLBP: Terapia Laser de Baixa Potência

TNF α : *Tumor Necrosis Factor alfa* = Fator de necrose tumoral alfa

V: volts

W: watts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 O laser	22
2.2 Queimadura	27
2.2.1 Fisiopatologia das queimaduras	27
2.2.1.1 Resposta hemodinâmica	28
2.2.2 Agentes causais	30
2.2.3 Fatores que influenciam o prognóstico de um paciente queimado	31
2.2.4 Grau de queimadura	31
2.2.4.1 Lesão de primeiro grau	32
2.2.4.2 Lesão de segundo grau	32
2.2.4.3 Lesão de terceiro grau	33
2.2.5 Extensão corporal queimada ou área de queimadura	34
2.2.6 Classificação das queimaduras	37
2.2.7 Fatores que podem influenciar diretamente o prognóstico	37
2.2.8 Choque hipovolêmico do queimado	38
2.2.9 O curativo	39
2.2.10 Enxertia cutânea	40
2.2.10.1 Desvantagens dos tipos de auto-enxertos	41
2.2.10.2 Comparativo entre o auto-enxerto laminar e o auto-enxerto expandido	42

2.3 Reparação tecidual	42
2.3.1 Cicatrização por primeira intenção	44
2.3.1.1 Hemostasia: dentro do primeiro segundo aos minutos seguintes	44
2.3.1.2 Inflamação: dentro do primeiro minuto a horas	45
2.3.1.3 Formação de crosta	46
2.3.1.4 Migração de células vinte e quatro horas após a lesão	46
2.3.1.5 Cicatrização: dentro do terceiro dia	48
2.3.1.6 Cicatrização precoce: entre o sétimo e o décimo dia	49
2.3.1.7 Maturação da cicatrização: entre o primeiro mês e o segundo ano	50
2.3.1.8 Mediadores químicos de reparação tecidual	50
2.3.2 Cicatrização por Segunda Intenção	54
2.3.2.1 Miofibroblastos	55
2.4 Revisão dos efeitos do laser na cicatrização <i>in vivo</i>	56
2.4.1 Estudos <i>in vivo</i>	58
2.4.2 Efeitos locais do laser de baixa potência	61
2.4.3 Efeitos da vascularização	62
2.4.3.1 Microcirculação	62
2.4.3.2 Fluxo linfático	63
2.4.3.3 Imunidade	64
2.5 Revisão dos efeitos do laser na cicatrização <i>in vitro</i>	66
2.5.1 Cultura de células	66
2.5.2 Estudos <i>in vitro</i>	69
2.5.2.1 Angiogênese	69

2.5.2.2 Sistema Imunológico	69
2.5.2.3 Queratinócitos e células epiteliais	72
2.5.2.4 Enzimas	73
2.5.2.5 Fibroblastos	73
3 OBJETIVO	77
4 MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1 Grupos experimentais	79
4.2 Técnica histológica	82
4.2.1 Processamento de material biológico para corte histológico	83
4.3 Desbridamento de tecido necrótico	84
4.4 Histopatologia e histomorfometria	84
4.5 Análise estatística	85
5 RESULTADOS	87
6 DISCUSSÃO	95
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	102
ANEXO	129

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras ou lesões térmicas estão entre os principais problemas de saúde no mundo industrial. No Brasil, estima-se em torno de um milhão de acidentes/ano, dos quais cem mil indivíduos serão atendidos pelo serviço hospitalar e, cerca de 2,5 mil pacientes irão a óbito direta ou indiretamente relacionado a esse tipo de lesão (GOMES; SERRA, 2001).

A mais alta incidência desses ferimentos é registrada nos Estados Unidos da América. Dados recentes indicam que mais de dois milhões de pessoas sofrem queimaduras a cada ano. Pelo menos meio milhão/ano de indivíduos serão atendidos pelo serviço de saúde americano, devido às lesões térmicas, com aproximadamente cinco mil mortes (PRUITT JR.; MASON JR., 1996). Então, estima-se a possibilidade de 1 entre 70 americanos sofrer uma queimadura durante sua vida, de forma grave o suficiente para necessitar de hospitalização (DERLING, 1986).

As queimaduras que atingem grandes superfícies corporais produzem distúrbios fisiológicos que afetam diversos órgãos do corpo humano. Os profissionais da área de saúde que se dedicam a tratar desse tipo de lesão deparam-se com complicações que fatalmente se apresentarão no decorrer do tratamento e que tornar-se-ão sem solução.

Por outro lado, vários agentes causais existem, como chama direta, álcool, eletricidade, líquidos superaquecidos, agentes químicos, vapor quente, raios ultravioletas e outros. Além disso, a profundidade e superfície corporal queimada interferem diretamente na gravidade da lesão. Um atendimento eficiente nos primeiros-socorros faz grande diferença quanto à gravidade da lesão (JORGE; DANTAS, 2003).

Se o contato com o agente causal não for por tempo prolongado ou se, no ato do ferimento, a região lesionada for rapidamente resfriada com água corrente, evitar-se-á que a lesão se propague para as camadas mais profundas da pele. Se, contudo, os cuidados não forem realizados em tempo hábil, ou ainda, dependendo do fator etiológico da lesão, ela poderá se tornar mais profunda e chegar ao tecido ósseo. Tal lesão é conhecida como queimadura com perda total do tecido de revestimento corpóreo, sendo denominada *queimadura de terceiro grau* (GOMES; SERRA, 2001; JORGE; DANTAS, 2003), ou *queimadura de espessura completa* (O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004).

A queimadura com perda total é um ferimento muito grave e promove seqüelas desastrosas. A destruição atinge a epiderme e a derme e pode destruir os tecidos subcutâneos, fáscia muscular, músculos e, até mesmo, ossos (GOMES; SERRA, 2001; GOMES, SERRA;

PELLON, 1997; JORGE; DANTAS, 2003), comprometendo a microvascularização subdérmica, com seus componentes coagulados, e a fixação da hemoglobina, sem palidez à pressão, além de deixar vasos sangüíneos trombosados e as circulações distais prejudicadas, que impedem a irrigação sangüínea dos tecidos. (O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004).

Quanto ao aspecto macroscópico, essas lesões apresentam a característica de escara dura, devido à presença de tecido desvitalizado, consistindo de coágulo de plasma desidratado e células necróticas (O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004).

Assemelha-se a couro ressecado, com aspecto rígido e redução da elasticidade local; exopilose (os pêlos saem facilmente), aparência de pergaminho seco, branco (isquêmico) e carbonizado. (GOMES; SERRA, 2001; O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004). A coloração pode apresentar-se nos tons castanho-claro, mogno, vermelho (O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004), preto (GOMES; SERRA, 2001; O'SULLIVAN; SCHIMITZ, 2004), amarelado, marrom ou marmóreo (GOMES; SERRA, 2001).

Ocorre destruição das terminações nervosas livres e, como conseqüência, a área apresenta-se deprimida e com sensação anestésica ou hipoestésica (JORGE; DANTAS, 2003). Não há reparo da pele de forma espontânea, havendo necessidade de enxertia cutânea.

Além disso, as queimaduras não são lesões estanques, podendo evoluir de uma camada tecidual para outra, devido a infecções ou a uma grave instabilidade hemodinâmica, que aumenta o aprofundamento da lesão (GOMES; SERRA, 2001). Quando a queimadura atinge grandes áreas corporais, produz distúrbios fisiológicos que afetam praticamente todos os órgãos do corpo (JORGE; DANTAS, 2003).

Segundo Gomes e Serra (2001), as queimaduras de terceiro grau que excedem 10% da área corporal e as de segundo grau que atingem 20% da superfície do corpo são, na maioria dos casos, indicativas de internação. As lesões são de tamanha gravidade que surgem importantes alterações metabólicas, hormonais e imunológicas que têm como conseqüência o aumento acentuado do metabolismo basal (TREDGET; MING YU, 1992; WOLFE, 1996).

Na fase imediata após a queimadura, as necessidades energéticas do paciente queimado se aproximam do limite de reserva fisiológica, excedendo em até duas vezes os níveis calóricos basais exigidos por uma pessoa saudável (CUNNINGHAM *et al.*, 1995a; 1995b; SAFFLE *et al.*, 1985). O quadro de hipermetabolismo tem intensidade e duração variáveis, estando intimamente ligado a outros fatores, tais como a extensão e a profundidade da superfície corporal queimada, bem como a presença de infecções e eficácia do tratamento inicial (WOLFE, 1996).

Por outro lado, estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a mucosa do tubo digestivo é uma importante barreira mecânica à microflora intestinal habitual. Esses microorganismos são inofensivos em pessoas saudáveis. Em pacientes criticamente doentes, no entanto, representam um reservatório capaz de iniciar infecção sistêmica (DEITCH, 1990; SWANK; DEITCH, 1996).

Alguns pesquisadores identificaram infecção sistêmica causada por bactérias associadas ao intestino em pessoas queimadas, vítimas de trauma e/ou com síndrome de falência múltipla de órgãos, sem que houvesse pontos focais de infecção, contudo os pacientes evoluíram para óbito (LIPPMAN, 1995; SWANK; DEITCH, 1996).

As alterações metabólicas, hormonais e imunológicas observadas em pacientes com extensas áreas corporais queimadas, em casos de queimadura de terceiro grau, promovem um elevado gasto energético do organismo lesado (DEITCH, 1995) e extenso gasto financeiro às instituições que prestam assistência a essas vítimas (GOMES; SERRA, 2001). A realização da presente pesquisa soma-se como uma valiosa contribuição para a ampliação do conhecimento e utilização do laser de baixa potência com comprimento de onda de 658 nm de diodo de fosfeto de índio, gálio e alumínio (InGaAlP), no favorecimento da reparação tecidual de queimaduras de terceiro grau, bem como uma nova alternativa de baixo custo para o tratamento.

O laser de baixa potência tem sido usado desde a década de 60 (GUIRRO; GUIRRO, 2002), sendo Mester (1966) um dos pioneiros a demonstrar seus efeitos na reparação tecidual. Sua potência de radiação é tão baixa (2 a 30mW), que os efeitos biológicos ocorrem devido à deposição de radiação no tecido, e não como resultado do aquecimento.

A colimação dos fótons e a coerência de emissão permitem a elevada concentração energética, determinando a base da utilização laser como instrumento terapêutico e cirúrgico (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Os efeitos terapêuticos do laser de baixa potência junto aos tecidos biológicos são amplos, dentre os quais pode-se citar os efeitos antiinflamatórios e analgésicos e a qualidade regenerativa (GUIRRO; GUIRRO, 2002). Estudos têm demonstrado um aumento na microcirculação local (MAIER; HAINA; LANDTHALER, 1990; MIRÓ *et al.*, 1984) e proliferação de células epiteliais (STEINLECHNER; DYSON, 1993).

Pesquisas *in vitro* com fibroblasto, a principal célula de reparação tecidual, foram desenvolvidas por diversos pesquisadores como Abergel, Glassberg e Uitto (1988), Abergel *et al.* (1986), Al-Watban e Zhang (1994), Karu (1991), Balboni *et al.*, (1985), Halevy *et al.*

(1997), Hallman *et al.*, (1988), Loevschall e Arenholt-Bindslev (1994), Mester e Mester (1989), Noguero *et al.* (1994), Pourreau-Schneider *et al.* (1989; 1990) e Soundry *et al.* (1988). Tais estudos foram correlacionados com outros *in vivo*, que demonstram efeitos na redução do período de cicatrização de feridas dentro do estrato cutâneo e de mucosas (ABERGEL; GLASSBERG; UITTO, 1988; AL-WATBAN; ZHANG, 1994; BIHARI; MESTER, 1989; HALEVY *et al.*, 1997; ROCHKIND *et al.*, 1989; TERRIBILE *et al.*, 1992; TRELLES *et al.*, 1989a; 1989b).

A reparação tecidual é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, sendo a microvascularização de grande importância nesse processo, o que favorece de forma singular a integração do enxerto cutâneo (GOMES; SERRA; PELLON, 1997).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

No capítulo referente à revisão da literatura, foram coletados, em diversos meios literários, a história do laser, conceitos, e efeitos terapêuticos. Define-se lesão de queimadura de forma abrangente e específica de terceiro grau, demonstrando sua gravidade para o indivíduo, principalmente, quando vem associada a grande extensão e profundidade. Apresentam-se as complicações que essa lesão promove à fisiologia humana e finaliza-se a exposição com amplos aspectos do processo cicatricial.

2.1 O laser

A luz tem sua aplicação terapêutica desde os tempos remotos da Antiguidade.

Através de trabalhos realizados com a luz no espectro do infravermelho e no espectro visível procedentes de lâmpadas incandescentes de alta potência, ocorreram avanços tanto na fotobiologia, quanto na fotomedicina.

Schawlow e Townes publicaram em 1958 os princípios da amplificação de microondas por emissão de radiação. Foi a primeira vez que se fez menção à radiação monocromática e coerente (RIGAU, 1996).

No início, o laser foi utilizado como material bélico, mas rapidamente foi incorporado na área de saúde devido às suas características especiais, como monocromaticidade, colimação e coerência. A possibilidade de obtenção de foco em pequenas áreas e a emissão de altas densidades de energia fazem do laser um instrumento de grande interesse e importância para aplicações diagnósticas e terapêuticas (NICOLAU, 2001).

O primeiro laser a ser desenvolvido com objetivo terapêutico foi o laser de rubi, operando em 694,3 nm nos laboratórios da *Hughes Research Laboratories*, em Malibu, estado da Califórnia, EUA, em 1960, pelo professor Theodore Maiman e sua equipe (MAIMAN, 1960).

Em 1961, foi fundado, na mesma universidade, por Leon Goldman, o primeiro laboratório de laser para aplicações médicas (GOLDMAN, 1981), onde as primeiras experiências em animais foram realizadas. Não havia, contudo, confiabilidade nos primeiros aparelhos lasers, pois os parâmetros de emissão variavam muito, pois a potência emitida apresentava alterações da ordem de cem por cento durante o período de sua utilização. Esse

fato implicou vários acidentes que detiveram o avanço das pesquisas com lasers na época. O novo dispositivo, até então, não apresentava tecnologia industrial suficiente que promovesse efetividade à sua aplicação. O desenvolvimento de outros equipamentos laser, entretanto, foi despertando o interesse e a confiabilidade da comunidade científica. A partir desse fato, as pesquisas voltaram a crescer.

Em 1966, foram relatadas as primeiras aplicações clínicas com laser operando em baixa potência por Endre Mester, de Budapeste, Hungria. O pesquisador apresentou os primeiros relatos de casos clínicos sobre a bioestimulação com laser em úlceras crônicas de membros inferiores, usando os lasers de rubi e argônio (MESTER, 1966). Seus primeiros artigos foram publicados em 1966, porém muitos trabalhos científicos, experimentais e clínicos foram produzidos por ele posteriormente, tendo sempre como tema central o laser de He-Ne.

A palavra *laser* é um acrônimo da expressão inglesa *light amplification by stimulated emission of radiation*, que significa *amplificação de luz por emissão estimulada da radiação* (SULEWSKI, 2000). É uma radiação eletromagnética, proveniente da amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, produzida em uma cavidade óptica ressonante a partir de um meio ativo e de uma fonte de excitação (SALGADO, 2002).

Consiste em uma fonte luminosa com características distintas da luz fluorescente e de lâmpadas comuns. Dentre as características especiais desta luz, pode-se ressaltar o fato de o laser ser uma radiação não ionizante e apresentar a monocromaticidade, ou seja, a emissão da radiação, idealmente, em um único comprimento de onda que oscila na mesma frequência e, conseqüentemente, em uma única cor.

O comprimento de onda é um fator determinante e fundamental na interação entre o laser e o sistema biológico, a qual corresponde à distância percorrida pela onda em uma oscilação completa mensurada em nanômetros (nm) e a sua frequência em Hertz (Hz). Em geral, é o meio ativo que denomina o laser, definindo sua pureza espectral e seu comprimento de onda, conferindo diversas características de emissão e possível ação biológica (FEDOSEYEVA *et al.*, 1988).

Uma outra característica da radiação laser é sua coerência temporal e espacial. A propagação das ondas ocorre com a mesma fase no tempo e espaço, propriedade esta que pode se perder nos primeiros estratos cutâneos, devido à grande variedade de componentes celulares que estão presentes nesse tecido (ANDERSON; PARRISH, 1982; HACZEKI; TAMURA, 1988; 1989; JORI, 1980; MICKILEY; HARLEN; WHILLOCK, 1988; PARRISH,

1980; WHARTON; GIBSON, 1964; WHARTON; TZAGOLOFF, 1966). Segundo os dados da literatura, apesar de haver perda da coerência da radiação laser de baixa potência no interior dos tecidos, sabe-se que a radiação é absorvida pelas células, promovendo alterações no metabolismo celular, tanto em tecidos superficiais como profundos (GIESE, 1980; LOBKO; KARU; LETOKHOV, 1985; MESTER; MESTER; MESTER, 1985; SVAASAND, 1990).

A colimação, ou direcionalidade, que seria outra propriedade da radiação laser de baixa potência, permite a focalização de altas densidades de energia em pequenos pontos, fazendo do laser um instrumento de grande interesse e importância na aplicação diagnóstica e terapêutica na área de saúde. A radiação laser pode ainda ser polarizada com ajuda de dispositivos ópticos (SCHAWLOW, 1995).

Além disso, a radiação laser está submetida aos fenômenos físicos comuns à luz, tais como a reflexão (que ocorre na interface entre os diferentes meios, não havendo interação com o tecido biológico), a refração (quando uma onda eletromagnética muda de meio), expressa pela Lei de Snell ou Lei de Refração dada por $(n_1 \text{ sen } \theta_1 = n_2 \text{ sen } \theta_2)$, a transmissão (que se traduz na trajetória da radiação nos diferentes estratos), a absorção (que iniciará um processo bioquímico ou bioelétrico, dependendo do comprimento de onda utilizado, pois cada um deles possui um fototropismo positivo para determinados tecidos), e o espalhamento pelo tecido (que ocorrerá em parte pelas moléculas, fibras ou células no interior dos estratos, dependendo da dimensão da partícula que forma o estrato em relação ao comprimento de onda da radiação laser (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

Os lasers podem ser classificados como de alta e de baixa potência, podendo promover diferentes efeitos biológicos. Os lasers de alta potência são geralmente destinados à remoções, cortes, carbonizações, vaporizações, coagulações, ou mesmo a simples degradações ou desnaturações das proteínas que constituem os tecidos. De acordo com Ohshiro e Calderhead (1991), quando utilizados em cirurgias, os pesquisadores observaram, no pós-operatório, que os pacientes relatavam menos desconforto, menor quadro edematoso e melhor cicatrização tecidual em comparação a métodos convencionais. A luz laser induz o processo de reparação tecidual precoce nas feridas cirúrgicas na pele, na gengiva e na mucosa palatina, conforme estudos realizados por Chomette *et al.* (1987a; 1987b), Surinchack *et al.* (1983) e Watanabe *et al.* (1987).

Os lasers são classificados em alta potência ou cirúrgicos (*High-Intensity LASER Treatment*) e baixa potência ou não-cirúrgicos (*Low-Intensity LASER Treatment*). O laser de

alta potência pertence à classe IV da classificação dos lasers, quanto ao risco de lesões. Essa classificação divide os lasers em seis classes, sendo que os pertencentes à classe IV são aqueles capazes de provocar lesões na pele e olhos, mesmo com reflexão direta ou difusa (MELLO; MELLO, 2001). A classificação dos lasers, segundo o padrão do *Center for Devices and Radiological Health* (CDRH), está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Classificação quanto ao Padrão CDRH

Classe	Riscos	λ (nm)	Laser
I	Não são considerados perigosos	180 a $1,0 \cdot 10^6$	CW ou P
IIa	Considerados perigosos se observados num intervalo de tempo superior ou igual a 1×10^3 s	400 a 710	CW
II	Apresentam riscos crônicos à visão	400 a 710	CW
IIIa	Apresentam tanto riscos severos como crônicos à visão e riscos severos se observados diretamente por meio de instrumentos óticos	400 a 710	CW
IIIb	Apresentam riscos severos à visão e à pele nas exposições diretas	180 a $1,0 \cdot 10^6$	CW ou P
IV	Apresentam riscos severos à visão e à pele nas exposições diretas ou indiretas	180 a $1,0 \cdot 10^6$	CW ou P

Fonte: Brandalize e Phillips (2002). Nota *Center for Devices and Radiological Health* (CDRH).

Os lasers apresentam diferentes meios ativos: sólido, líquido ou gasoso. O laser diodo é um *chip* semiconductor que funciona como um diodo elétrico, sendo a região ativa formada por materiais semicondutores diferentes.

Dependendo do coeficiente de absorção do tecido-alvo, o laser de alta potência poderá gerar carbonização, vaporização, coagulação ou, até mesmo, a degradação ou desnaturação protéica. Esse efeito é denominado fototérmico e tem como característica a destruição ou alteração permanente da estrutura tecidual. Existem, porém, outros efeitos não dependentes de calor, os quais criam alterações irreversíveis ou destruição do tecido. Dentre eles, pode-se citar os efeitos foto-osmótico, foto-iônico, foto-enzimático e foto-imunológico (FULLER, 1983; OHSHIRO; CALDERHEAD, 1998).

Os primeiros benefícios observados pelo laser de alta potência durante cirurgias foram menor desconforto no pós-operatório, menor edema e cicatrização tecidual mais acelerada. A partir desse fato, levantou-se a hipótese de que o laser poderia proporcionar alguns efeitos adicionais ainda desconhecidos.

Ohshiro e Calderhead (1991) propuseram chamar um desses efeitos de “Efeito X do LASER”, e se embasaram no efeito da distribuição gaussiana do feixe laser, um efeito apresentado pela maioria dos lasers, que consiste em o pico de energia concentrar-se na

região central do feixe, desvanecendo gradualmente à medida que se aproxima da periferia.

No limite entre a desnaturação protéica e a ativação fototérmica, a temperatura não transpõe 40° C.

Na área que corresponde à ativação fototérmica, há um aumento de temperatura, contudo, insuficiente para causar mudanças estruturais macroscópicas no tecido, promovendo somente sua ativação.

E na região mais afastada do epicentro, há uma zona denominada não-fototérmica, que sofre ativação das estruturas teciduais. Apesar das duas últimas regiões não demonstrarem alterações macroscópicas teciduais (CALDERHEAD, 1998), dados de estudos anteriores comprovam efeitos sobre estruturas teciduais. Esses efeitos são conhecidos atualmente como “Terapia Laser de Baixa Potência” ou “Laser Terapia”.

Ohshiro e Calderhead (1998) observaram a ocorrência de reparação tecidual via incremento do metabolismo celular, com ação principalmente sobre as organelas celulares (mitocôndria e membrana), gerando adenosina trifosfato (ATP) e modificando o transporte iônico. Devido à presença de fotorreceptores celulares, sensíveis a determinados comprimentos de onda, a absorção de fótons desencadeia reações bioquímicas. Dessa forma, o laser de baixa potência acelera, em curto período, a síntese de ATP (glicólise e oxidação fosforilativa) e, a longo prazo, a transcrição e replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA). (KARU, 1987; KARU *et al.*, 1989; KARU; SMOLYANINOVA; ZELENIN, 1991a; 1991b; 1991c).

O limiar de sobrevivência celular depende de sua linhagem e seu estado fisiológico. Quando o trabalho é realizado respeitando-se esses limites e oferecendo-se uma baixa intensidade de energia, a célula utiliza essa energia, que vai estimular sua membrana ou suas mitocôndrias, promovendo a bioestimulação celular, ou seja, a célula busca a homeostasia da área afetada, a esta condição é denominada Terapia Laser. Sua indicação é referida aos estados patológicos em que se deseja promover a melhor qualidade e aceleração do processo de reparação tecidual, nos pós-operatórios, reparação de tecidos moles, ósseos e nervos, em quadros de edemas instalados, mediação dos processos inflamatórios ou dor (crônica ou aguda).

2.2 Queimadura

As queimaduras são lesões traumáticas, causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos. Ocorrem na pele, promovendo destruição parcial ou total do tecido cutâneo e seus anexos, podendo estender-se às camadas mais profundas, como tela subcutânea, músculos, tendões e ossos. A extensão e a profundidade da lesão tecidual é um fator limitante à cicatrização, devido ao maior risco de infecções bacterianas. As manifestações clínicas de um traumatismo térmico podem se apresentar desde pequenas bolhas (flictenas) até aspectos marmóreos, que caracterizam a forma mais grave da lesão (LIMA JR.; SERRA, 2004).

A pele constitui um dos mais importantes elementos de defesa do organismo humano contra agentes de agressão ambiental. Após uma lesão por queimadura, há um desequilíbrio da microbiota cutânea, o que favorece a instalação e crescimento bacteriano. Além disso, a suscetibilidade do hospedeiro pode culminar num quadro de septicemia, a maior causa de morte dos pacientes queimados nos tempos atuais, podendo chegar a 75% dos óbitos (WACHTEL, 1985).

A restauração dos tecidos lesados é o principal objetivo do tratamento em um paciente queimado, seja por cicatrização em segunda intenção ou por enxertia. Esses dois processos, contudo, não ocorrem com a velocidade desejada. Sendo assim, é de suma importância todo o empenho da equipe, a fim de garantir o sucesso terapêutico.

2.2.1 Fisiopatologia das queimaduras

A queimadura é uma lesão dinâmica que acomete os órgãos em geral, promovendo disfunções orgânicas proporcionais à extensão e profundidade da lesão. Quando ocorre uma queimadura de pequeno porte, a reação é unicamente local, enquanto que nas queimaduras moderadas e graves, há uma reação local intensa e sistêmica. As disfunções são bifásicas, promovendo uma hipofunção dos sistemas seguida por uma hiperfunção tardia (LUND, 1944).

2.2.1.1 Resposta hemodinâmica

Ao ocorrer um trauma térmico, há exposição do colágeno tecidual e, conseqüentemente, a ativação e liberação de histamina pelos mastócitos. A histamina liberada provoca o aumento da permeabilidade capilar (APC), que, por sua vez, permite a transudação de um filtrado plasmático para o interstício tecidual, provocando um edema importante no tecido e hipovolemia (WARD; FRIEDL, 1989). Com isso, o sistema calicreína é ativado, produzindo cininas, o que faz aumentar a permeabilidade capilar, intensificando o edema tecidual e a hipovolemia (DEMLING, 1985).

As associações das cininas com a exposição do colágeno ativam o sistema fosfolipase-ácido araquidônico, liberando prostaglandinas e, dentre estas, a prostaciclina (PGI₂), o que aumenta mais a permeabilidade capilar (KRIZEK; ZIMMERMAN, 1984).

Outra via ativada é a tromboxane, que, junto à plasmina e à trombina circulante, provoca um depósito nas paredes dos capilares, ocasionando um aumento da pressão hidrostática de até 250%, contribuindo ainda mais para o edema no tecido (ROBSON, 1985).

O aumento da permeabilidade capilar foi tema de diversos estudos ao longo dos anos. As pesquisas comprovaram que os capilares normais não permitem a passagem de uma simples molécula de albumina, com peso molecular de 60.000 Daltons, mas, após a lesão térmica, ocorre a passagem de moléculas de até 250.000 Daltons (REED; OHARHEIN, 1992).

A capilaridade aumentada ocorre em um período, em média, de 18 a 24 h. Inicia-se minutos após a lesão térmica e atinge seu máximo em oito horas, quando regride progressivamente até a normalidade (GOMES; SERRA, 2001).

No tecido íntegro, os poros capilares permitem a passagem das soluções cristalóides em ambos os sentidos, permitindo o perfeito equilíbrio com o interstício tecidual. O peso molecular das soluções colóides ultrapassa, porém, o diâmetro dos poros capilares, não permitindo a passagem dessas soluções (LIMA JR.; SERRA, 2004).

Nas lesões térmicas, contudo, o aumento da permeabilidade capilar é tão intenso que permite não somente a passagem das soluções cristalóides, mas também, das soluções colóides. Conseqüentemente, há formação de grande edema nos tecidos afetados, e a passagem dos colóides ainda acarreta um aumento da pressão coloidosmótica desses tecidos, agravando a retenção hídrica (GOMES; SERRA, 2001; LIMA JR.; SERRA, 2004).

O conhecimento da fisiopatologia do queimado foi fundamental para o aporte

terapêutico de ressuscitação dos pacientes dos estudos citados. Atualmente utilizam-se soluções cristalóides, evitando as soluções colóides enquanto perdurar o aumento da permeabilidade capilar, na tentativa de minimizar o edema da queimadura.

Após a metabolização das substâncias desencadeadoras do aumento da permeabilidade (de 18 a 24 h), o poro capilar retorna ao seu diâmetro original, aprisionando todo o colóide na área queimada e mantendo o edema tecidual (GOMES; SERRA, 2001). Os processos acima relatados estão ilustrados na figura 1.

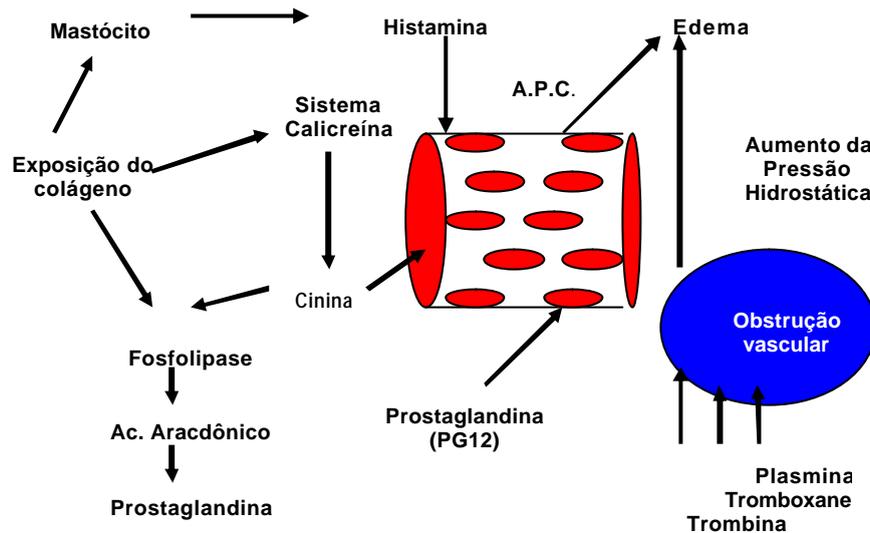


Figura 1: Desenho esquemático das conseqüências da lesão térmica

Fonte: Lima Jr. e Serra (2004)

Em 1966, Abramson, utilizando técnica de micropipetagem celular, descreveu um aumento de 2.000 a 4.000 % da força de sucção intersticial, e concluiu que esse fator aumenta ainda mais a inundação tecidual (ABRAMSON, 1966).

O aumento da permeabilidade capilar ocorre somente no tecido queimado, o edema observado nos tecidos não queimados ocorre à custa da redução aguda da pressão coloidosmótica plasmática (DEMLING, 1985).

Quando ocorre um trauma térmico, sobrevém a contração do compartimento intravascular e depleção das reservas energéticas, culminando com acidose metabólica, o que leva a evolução rápida para o choque hipovolêmico (MILLER, 1983).

O enfoque terapêutico do paciente queimado foi influenciado diretamente pelo conhecimento fisiopatológico das lesões térmicas, não somente na quantidade, mais também na qualidade dos líquidos utilizados na ressuscitação desses pacientes em choque, evitando muitos óbitos.

2.2.2 Agentes causais

As causas mais freqüentes de queimaduras no nosso meio são os líquidos superaquecidos, somando quase metade dos casos (DE-SOUZA; MARCHESAN; GREENE, 1998; GOMES; CUNHA; VOGEL, 2000). Por outro lado, há relatos em que o principal agente causal em idosos é a chama direta (DE-SOUZA; MARCHESAN; GREENE, 1998; FERRARO, 1998; LALOE, 2000; PAMJESHAHIN *et al.*, 2001; TEJERINA *et al.*, 1992).

A escaldadura é a causa mais comum de queimaduras em crianças pequenas (GONZÁLEZ; DEMIRDJIAN; MUÑOZ, 2000; SERRA *et al.*, 2002; BARRETO, 2003), e a maioria dos acidentes acontecem nas residências, na presença de adultos, o que evidencia a falta de cuidados e prevenção (SERRA, 1995). Nas crianças acima de três anos, a chama direta é a causa mais freqüente de acometimento. Entre os adolescentes, as maiores incidências de acidentes são os combustíveis.

A segunda maior causa de acidentes são os combustíveis. No Brasil, o álcool líquido, por ser usado em larga escala como produto de limpeza, é responsável por quase 20% de todas as queimaduras no país (BARRETO, 2003; DE-SOUZA; MARCHESAN; GREENE, 1998; GOMES; SERRA, 2001; SERRA *et al.*, 2002). A substituição recente do álcool líquido pelo gel e a manutenção desta lei pelo governo poderão dificultar a ocorrência desses acidentes.

Os principais agentes causais de queimaduras podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2: Análise das causas de queimaduras de acordo com dados do Hospital de Andaraí, Rio de Janeiro.

Agente causal	Número de acidentes	%
Líquidos superaquecidos	1.179	49,0
Combustível	448	18,6
Chama direta	252	10,5
Superfície superaquecida	185	7,7
Choque elétrico	124	5,1
Gás	75	3,1
Folha de Figo	51	2,1
Química	46	1,9
Radiação solar	45	1,9
Frio	3	0,1
Total	2.408	100,0

Fonte: Lima Jr. e Serra (2004).

Lima Jr. e Serra (2004) afirmam que os líquidos superaquecidos são as maiores causas de acidentes domésticos, atingindo, em sua maioria, crianças e adolescentes.

2.2.3 Fatores que influenciam o prognóstico em um paciente queimado

A profundidade da lesão e a extensão da superfície corporal queimada são fatores que influenciam diretamente o prognóstico da queimadura. Quanto mais profunda e mais extensa, mais grave será o prognóstico de sobrevivência do paciente (BERRY *et al.*, 2001; GOMES; SERRA, 2001; MARVIN, 1992).

2.2.4 Grau de queimadura

Determinar o grau de queimadura significa avaliar a profundidade da lesão térmica cutânea. Existe certa dificuldade em classificar alguns tipos de queimaduras. Por exemplo, em casos de queimadura elétrica, deve-se esperar dois a três dias para que haja melhor definição do ferimento. A perfeita avaliação da profundidade da lesão térmica só poderá ser validada pelo estudo histopatológico, ou seja, por biópsia. O agente causador, o tempo de exposição e as condições prévias do paciente influenciam de forma ímpar a profundidade da queimadura (MARVIN, 1992; GOMES; SERRA, 2001).

A determinação da profundidade em uma criança se torna ainda mais difícil devido à espessura de sua pele, que é mais fina que a do adulto, tornando-se a criança, assim, mais

susceptível a queimaduras mais profundas que o adulto. Assim sendo, na mesma condição de lesão em que um adulto teria uma queimadura de segundo grau, a criança provavelmente apresentará uma lesão mais profunda (SCHANFELD, 1990; GOMES, 1999).

A maior dificuldade está em diferenciar uma queimadura de segundo grau profundo de uma de terceiro grau. Além do mais, a queimadura não é uma lesão estanque, podendo se aprofundar com presença de infecções ou uma grave instabilidade hemodinâmica. Sendo assim, uma queimadura de segundo grau superficial pode evoluir para uma de segundo grau profundo, ou até mesmo, de terceiro grau. Em decorrência desse fato, não se pode precipitar a classificação de uma lesão em uma primeira avaliação, sendo de fundamental importância uma reavaliação em um período de 48 a 72 horas após a lesão térmica (WAITZMAN; NELIGAN, 1993).

A classificação das queimaduras quanto à profundidade da lesão térmica divide-se em três graus: lesão de primeiro grau, de segundo grau e de terceiro grau.

2.2.4.1 Lesão de primeiro grau

A lesão de primeiro grau é aquela que atinge a camada mais superficial da pele, ou seja, a epiderme. Apresenta um aspecto clínico úmido, hiperemiado, edema e dor intensa. Não provoca alterações clínicas significativas e tampouco alterações hemodinâmicas. Devido a esse fato, o percentual deste tipo de queimadura não é incluído nos cálculos de reposição hídrica. Sua resolução ocorre em aproximadamente cinco a sete dias após o trauma (GOMES, 1999; SERRA *et al.*, 2002).

2.2.4.2 Lesão de segundo grau

A lesão de segundo grau atinge epiderme e parte da derme. Sua característica clínica é a formação de bolhas, ou flictenas, que podem apresentar-se íntegras ou rompidas. Há uma subdivisão da lesão de segundo grau em superficial e profunda (LINARES, 1996; GOMES, 1999).

As queimaduras de segundo grau superficiais são também conhecidas como queimaduras de espessura parcial, atingindo parte superficial da pele, epiderme e porção da

derme, bem como parte inferior do tecido cutâneo, apesar de conservar uma quantidade razoável de folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Caracteriza-se clinicamente pela formação de flictenas, eritema, umidade e quadro doloroso acentuado. Quando ocorre o rompimento das flictenas, podem deixar à mostra uma superfície de aspecto úmido e rosado. A evolução da restauração total da pele em uma queimadura de 2º grau superficial ocorre de 14 a 21 dias, com mínima formação cicatricial (LINARES, 1996; GOMES, 1999).

Nas queimaduras de segundo grau profundas, a destruição de quase toda a derme é a maior das características. Essas queimaduras apresentam comportamento mais próximo aos das queimaduras de terceiro grau, ocorrendo coloração mais pálida e menos dolorosa e acarretando maior repercussão sistêmica, embora evoluam para recuperação após três semanas, se não houver nenhuma intercorrência. O epitélio neoformado, entretanto, é muito frágil, apresentando ulcerações recorrentes. Há, ainda, grande tendência à cicatrização hipertrófica e formação de contraturas cicatriciais. O tratamento clínico usual das áreas de queimaduras de segundo grau profundas pode envolver a excisão tangencial e a enxertia cutânea (LINARES, 1996; GOMES, 1999).

2.2.4.3 Lesão de terceiro grau

A lesão de terceiro grau acomete a totalidade do tecido cutâneo, epiderme e derme. Em muitos casos, atinge outros tecidos, como o tecido subcutâneo, músculos, ou até mesmo o tecido ósseo. Seu aspecto clínico é esbranquiçado ou marmóreo e apresenta redução da elasticidade tecidual, formando um tecido rígido, podendo apresentar por transparência vasos sanguíneos trombosados. É a mais grave de todas as lesões térmicas, podendo ser de causa elétrica ou térmica. Alguns autores consideram como “lesão de quarto grau” as áreas carbonizadas (LINARES, 1996; GOMES, 1999). A tabela 3 ilustra os sinais e sintomas relacionados à profundidade da queimadura.

2.2.5 Extensão corporal queimada ou área de queimadura

O cálculo da extensão corporal queimada pode parecer muito simples, porém, é motivo de diversos erros. Existe uma tendência a supervalorizar a área corporal queimada, por serem colocadas no cálculo áreas de queimaduras de primeiro grau. Estas não apresentam importância clínica, por este motivo, não devem entrar no percentual de área por lesões térmicas (LINARES, 1996; GOMES, 1999).

O método mais rápido para determinação da área queimada é constituído pela “regra dos nove”, método este desenvolvido por Polaski e Tennison, no qual se divide a superfície corporal em segmentos que equivalem a aproximadamente 9% do total (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Cada segmento do corpo corresponde a um percentual, ou seja, o corpo é dividido em múltiplos de nove, sendo esse um método rápido, prático e de fácil memorização.

É frequentemente usado nas salas de emergências, porém, é importante lembrar que não é um método preciso, podendo ser usado na sala de emergência apenas como uma primeira determinação da área queimada.

Como este método consiste na divisão corporal de múltiplos de nove, a cabeça vale nove por cento, cada membro superior vale, também, nove por cento, o tórax anterior vale dezoito por cento e o posterior outros dezoito por cento, cada membro inferior vale, também, dezoito por cento e o períneo vale um por cento. A “regra dos nove” não deve ser aplicada em crianças, por apresentarem superfícies corporais parciais diferentes das dos adultos, principalmente crianças com idade abaixo de quatro anos.

A “regra dos nove”, porém, pode ser modificada para crianças, pois é muito prática e de fácil memorização. Ela consiste em subtrair um por cento da cabeça para cada ano acima de um ano de idade e somar 0,5% a cada perna para cada ano acima de um ano de idade. Considera-se a superfície corporal da criança semelhante à do adulto a partir da puberdade.

Considerando-se principalmente a queimadura de terceiro grau, é necessário cautela na avaliação, aguardando-se pelo menos 48 horas antes de uma avaliação final, pois as lesões de terceiro grau podem demorar a se definir.

O cálculo da área queimada é de fundamental importância não só para o prognóstico de um paciente queimado, como também durante todo tratamento (GODINHO; ASCHER, 1999; GOMES, 1999; LINARES, 1996).

A superfície da palma da mão do paciente equivale aproximadamente a 1% da superfície corporal total (BERRY *et al.*, 2001). Usando-se, portanto, a superfície palmar como guia, até mesmo a superfície de queimaduras irregulares dispostas pode ser estimada.

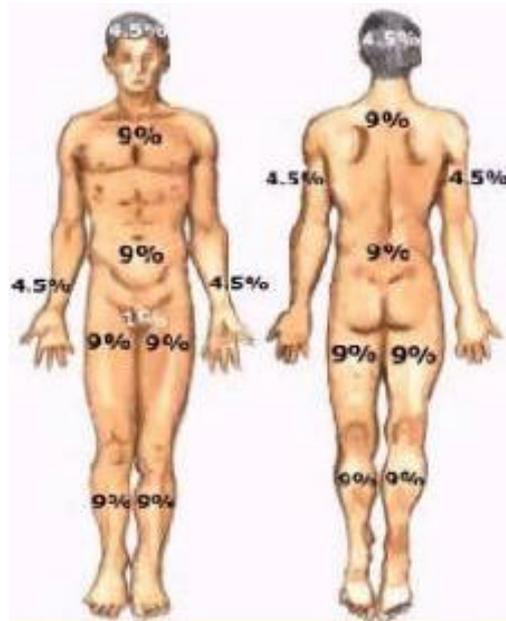


Figura 2: Modelo de boneco para cálculo da “Regra dos Nove”.

Fonte: Guirro e Guirro (2004)

Tabela 3: Sinais e sintomas da profundidade da queimadura

Grau	Local afetado	Sinais	Sintomas
1°	Apenas epiderme	Eritema	Dor
2°	Epiderme e parte da derme	Eritema + bolha	Dor e choque
3°	Epiderme e derme	Branca nacarada	Choque
4°	Pele e músculo	Carbonizada	Choque grave

Fonte: Lima Jr. e Serra (2004).

O diagrama e a tabela de Lund Browder com o detalhamento da avaliação feita com a palma da mão estão representados na figura 3 e tabela 4, respectivamente. A tabela de Lund Browder é o método mais apurado que existe, levando em consideração as proporções corporais em relação à idade. Um exemplo disso é a cabeça de uma criança, que corresponde a uma área proporcionalmente bem maior comparativamente à do adulto.

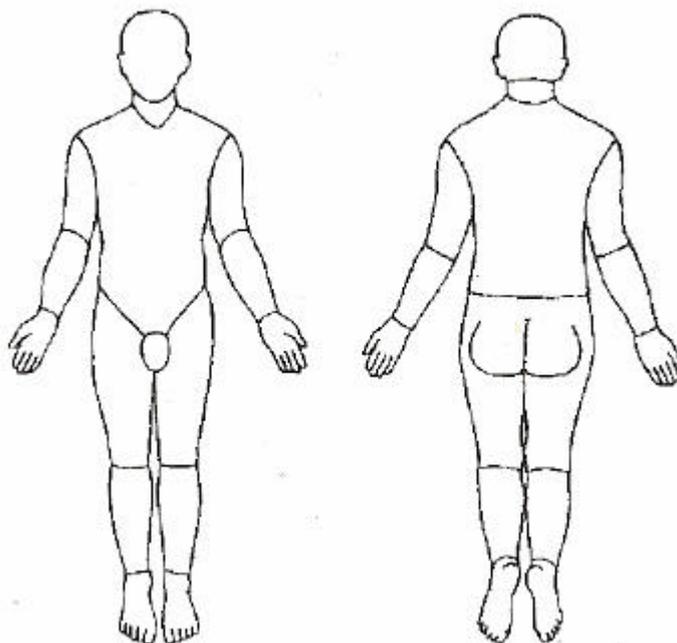


Figura 3: Modelo de boneco utilizado no diagrama de Lund Browder para cálculo da área queimada.

Fonte: Gomes e Serra (2001).

Tabela 4: Tabela de Lund Browder

Área	1 ano	1 a 4	5 a 9	10 a 16	Adulto	T 2° G	T 3° G	Total
Cabeça	19	17	13	11	7			
Pescoço	2	2	2	2	2			
Tronco Ant.	13	13	13	13	13			
Tronco Post.	13	13	13	13	13			
Nádega D	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			
Nádega E	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			
Genitália	1	1	1	1	1			
Braço D	4	4	4	4	4			
Braço E	4	4	4	4	4			
Antebraço D	3	3	3	3	3			
Antebraço E	3	3	3	3	3			
Mão D	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			
Mão E	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5			
Coxa D	5.5	6.5	8	8.5	9.5			
Coxa E	5.5	6.5	8	8.5	9.5			
Perna D	5	5	5.5	6	7			
Perna E	5	5	5.5	6	7			
Pé D	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5			
Pé E	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5			
Total								

Fonte: Lima Jr. e Serra (2004).

A tabela fornecida por Lima Jr. e Serra (2004) reserva colunas que assinalam o valor de cada região atingida em relação ao grau de profundidade para que se possa ter uma visão global, além da noção do percentual correspondente à lesão de segundo grau, de terceiro grau e o percentual total da superfície corporal queimada (GOMES; SERRA, 2001; LIMA JR.; SERRA, 2004).

2.2.6 Classificação das queimaduras

As queimaduras são classificadas quanto à gravidade do trauma em leves, moderadas e graves. As queimaduras leves são aquelas que apresentam profundidade de primeiro grau, podendo atingir qualquer extensão corporal; as de segundo grau com menos de 10% da superfície corporal queimada (SCQ.) e as de terceiro grau com menos de 3% da SCQ. São tratadas em nível ambulatorial, não apresentam repercussões hemodinâmicas e raramente complicam.

As moderadas compreendem a profundidade de segundo grau com extensão de queimadura que varia de 10 a 20%, e as de terceiro grau entre 3 e 5% de SCQ. Os pacientes acometidos por esse tipo de lesão necessitam de um acompanhamento diário, podendo ser tratados em nível ambulatorial. É melhor, porém, interná-los para que se observe a evolução das manifestações clínicas da lesão.

As queimaduras graves, por sua vez, são as de segundo grau em que a SCQ. é excedente a 20%, ou as de terceiro grau em que a SCQ. exceda 10%. Nesses casos, os pacientes são graves, instáveis da questão hemodinâmica e necessitam de internação em um centro de tratamento de queimados (LIMA JR.; SERRA, 2004).

2.2.7 Fatores que podem influenciar diretamente o prognóstico

A gravidade de uma queimadura é determinada pela extensão da área corporal envolvida e, em um grau menor, pela profundidade da queimadura. Outros fatores, contudo, devem ser considerados, tais como o agente causal, doenças preexistentes, áreas especiais (face, genitália, mãos e pés), traumas associados à queimadura e idade do paciente, uma vez que crianças menores de três anos e adultos com mais de 65 anos apresentam piores

prognósticos (KUMAR; THOMAS; CHITTORIA, 2000).

Um outro fator indireto de prognóstico e de morbidade é a lesão térmica de vias aéreas. Mesmo em pacientes com pequenas ou médias superfícies corporais queimadas, o índice de mortalidade é de 90 a 100%. Quando houver suspeita de queimaduras de vias aéreas, deve-se dar atenção especial a este fato, promovendo uma investigação minuciosa para que não ocorra erro grave nos primeiros socorros à vítima de queimadura.

As queimaduras vão variar muito de importância e gravidade, dependendo do agente causal, do tempo de exposição a esse agente, da profundidade, da extensão da superfície corporal queimada e o tempo transcorrido entre o acidente e os primeiros socorros.

2.2.8 Choque hipovolêmico do queimado

No primeiro momento após a queimadura, devido à liberação de catecolaminas, o paciente frequentemente apresenta pressão arterial normal ou elevada e se encontra taquicárdico. Assim sendo, a frequência cardíaca e a pressão arterial não são parâmetros confiáveis para avaliar o estado volêmico do paciente.

A monitorização do débito urinário é o parâmetro mais confiável para o controle da perfusão tecidual, devendo ser passada sonda de demora em sistema fechado (GOMES; SERRA, 2001). Deverá ser puncionada uma veia periférica em área não-queimada, utilizando-se para tanto um cateter de maior luz possível para iniciar a reposição volêmica. Se não houver veia íntegra superficial puncionável, deve-se passar um cateter através da pele queimada, pois, nessa fase inicial, a queimadura ainda se encontra estéril.

A cateterização da veia subclávia é difícil devido à hipovolemia e ao seu colapso, trazendo um alto risco de pneumotórax, de modo que deve ser evitada. Poderá ser necessária a dissecação de veias de membros superiores, quando a punção venosa periférica for impossível, não devendo ser retardado de forma alguma esse procedimento (LIMA JR.; SERRA, 2004).

A ressuscitação volêmica deverá ser realizada o mais breve possível, de preferência antes da chegada do paciente ao hospital, se atendido por equipe de socorro de emergência. Caso o paciente não tenha sido atendido em tais condições, tão logo chegue ao hospital, deve receber solução salina isotônica ou hipertônica no volume adequado para obter débito urinário satisfatório. O atraso na ressuscitação induz a alta mortalidade, não apenas pelo

desenvolvimento do choque hipovolêmico, insuficiência renal e acidose metabólica, que seriam as complicações terminais de um paciente que permaneceu horas sem hidratação, mas principalmente por alteração na perfusão gastrointestinal.

Alguns estudos têm comprovado que as lesões térmicas induzem isquemia, mediada por angiotensina II, e lesão de reperfusão no intestino, levando o aumento da permeabilidade de translocação bacteriana (GENNARI, 1996; TADROS *et al.*, 2000). A translocação e a absorção de endotoxinas bacterianas serão responsáveis pela sepse, que levará ao quadro de falência orgânica múltipla, principal causa de mortalidade em queimaduras (GENNARI, 1996).

A monitorização oxi-hemodinâmica atualmente permite ao clínico obter continuamente o débito cardíaco, a função do ventrículo direito, a oximetria do sangue venoso misto e o transporte de oxigênio.

Novas tecnologias têm surgido para a visualização direta da microcirculação, tais como as técnicas de *Nailfod Videomicroscopy*, *Laser Doppler Flowmetry*, e a *Orthogonal Polarization Spectral Imaging* (OPS), abrindo, certamente, novas áreas para o estudo da fisiopatologia das alterações dos estados de choque, em geral, e, particularmente, dos pacientes queimados (BACKER; DUBOIS, 2001).

Qualquer paciente com mais de 20% de área corporal queimada necessita de suporte hídrico. Infunde-se uma solução de lactato de Ringer no intuito de manter o paciente com um débito urinário entre 30 a 50 ml/h (GOMES; SERRA, 2001).

2.2.9 O curativo

O tratamento da lesão térmica nunca tem precedência sobre as alterações que põem em risco a vida do paciente, mas é um aspecto importante do cuidado durante a fase aguda da queimadura.

Com o paciente estabilizado hemodinamicamente, o curativo poderá ser realizado sob analgesia e não anestesia, quando, então, lavase a área queimada com água corrente e faz-se a degermação com soluções de polivinilpirrolidina (PVPI) ou clorexidina durante oito minutos.

Após a secagem da área, aplica-se topicamente um agente que pode ser sulfadiazina de prata a 1% , sulfadiazina de cério, ou mesmo a vaselina pura. Seca-se o curativo contensivo

utilizando-se compressas cirúrgicas e ataduras de crepom aplicadas de modo pouco compressivo (GOMES; SERRA, 2001; LIMA JR.; SERRA, 2004).

As queimaduras profundas circulares podem funcionar como “garrotes”, não permitindo a vascularização das extremidades. As escarotomias são incisões nessas áreas de queimadura profunda com o objetivo de descomprimi-las (incisões de descarga). Geralmente não é necessária anestesia para o procedimento, pois a área incisada é indolor em virtude da queimadura das terminações nervosas. Pode ser realizada, ainda, no tórax, para permitir movimentos respiratórios.

Outro procedimento muito importante é o cuidado com a postura do paciente, que deverá ter a área queimada mantida em elevação de 30°, no caso de queimaduras da face e extremidades para diminuir a formação de edema, o qual agrava a perfusão dos tecidos e aprofunda a lesão.

2.2.10 Enxertia cutânea

É de conhecimento dos profissionais da área de saúde que atuam em centros de tratamento de queimados que a cobertura cutânea dos pacientes com grandes extensões do corpo comprometidas com queimadura de segundo grau profundo e de terceiro grau é certamente a maior dificuldade. Quando se retira o tecido desvitalizado, há exposição de grandes áreas cruentas que são portas abertas a infecção, a perda de plasma, sangue, eletrólitos e líquidos, além de serem responsáveis pela intensa dor causada ao paciente. Por essa razão, é necessário recobri-las o mais rapidamente possível para que o paciente não se infecte e para que se restabeleça sua movimentação articular, evitando o desenvolvimento de seqüelas funcionais. A condição básica para realizar-se uma enxertia cutânea é obter um leito cruento limpo e vascularizado (GOMES; SERRA, 2001).

Quanto à classificação dos enxertos, eles podem ser:

- a) Aloenxerto ou homólogo: conhecido como curativo biológico utilizado como cobertura temporária. Quando o paciente apresenta grandes áreas do corpo queimadas com profundidade de segundo e terceiro graus, propicia uma melhora da condição geral. Além disso, regenera as áreas mais superficiais que vão servir, no futuro, de áreas doadoras definitivas, preparando o leito receptor. O tecido para o enxerto é retirado de um cadáver. Usualmente a pele pode ser armazenada em bancos

de pele por tempo prolongado. Este tipo de enxerto é utilizado quando não há possibilidade de auto-enxerto (GUIRRO; GUIRRO, 2002).

- b) Xenoenxerto ou heterólogo: oferece uma cobertura temporária da pele. São tecidos (pele, cartilagem, osso, nervo, etc.) transplantados entre indivíduos de espécies diferentes. Geralmente utiliza-se pele de porco e rã (GUIRRO; GUIRRO, 2004).
- c) Enxerto temporário: enxerto de pele artificial utilizado quando existem extensas áreas queimadas. Sua indicação visa sobrevivência (GUIRRO; GUIRRO, 2004).
- d) Auto-enxerto: consiste na técnica mais utilizada pelos cirurgiões especializados em pacientes queimados. É um enxerto permanente e as áreas doadoras são do próprio indivíduo (GUIRRO; GUIRRO, 2004). Os auto-enxertos podem ser:
 - fragmentados: atualmente em desuso (GOMES; SERRA, 2001).
 - laminares: finos (*Ollier Thiersch*), intermediários 2/3 (*Blair e Brown*), intermediários 3/4 (*Padgett*) e pele total (tipo *Wolf Krause*), de acordo com Gomes (1999).
 - expandidos *Mesh Graft*: utiliza-se, neste caso, um expansor de pele que proporciona aumento de 1,5 a 9 vezes a largura da faixa de pele. Utilizado quando não há área doadora extensa (LIMA JR.; SERRA, 2004).

2.2.10.1 Desvantagens dos tipos de auto-enxertos

Segundo Lima Jr. e Serra (2004) os auto-enxertos fragmentados são ruins do ponto de vista estético e funcional por apresentarem desagradável aspecto de mosaico, com pequena resistência aos atritos e traumatismos, fazendo com que ocorra ulcerações com frequência. A cicatriz resultante entre os pequenos enxertos é, em geral, hipertrófica ou queloidiana e sujeita à dor, prurido e grande tendência a retração cicatricial secundária.

O auto-enxerto fino, por sua vez, segundo os mesmos pesquisadores, apresenta acentuada retração cicatricial secundária, com pouca resistência aos atritos e discromia associada.

O auto-enxerto intermediário de pele parcial apresenta diferença de coloração quando aplicado principalmente na face, enquanto o enxerto de pele total tem, de acordo com Gomes e Serra (2001) e Lima J. e Serra (2004), difícil cicatrização da área doadora.

Segundo Gomes (1999), os enxertos laminares são os mais utilizados. São enxertos de

qualidade e devem possuir espessura semelhante à região a ser enxertada. A espessura da pele varia com a idade e com a localização no corpo.

2.2.10.2 Comparativo entre o auto-enxerto laminar e o auto-enxerto expandido

O enxerto com a pele laminar é qualitativamente superior ao de pele expandida. As áreas prioritárias para a cobertura com pele laminar são a face, o pescoço, as mãos e os punhos, a axila, a região anterior do cotovelo e a região posterior do joelho (GOMES; SERRA, 2001).

O auto-enxerto de pele expandida (*Mesh Graft*), por sua vez, é indicado em pacientes que possuem pouca área doadora de pele. A expansão obtida refere-se à largura do enxerto. O enxerto em malha oferece a possibilidade de cobertura de uma área cruenta maior, que deve conter uma camada dérmica e não apenas epitélio, pois a pele fina retrai mais, comprometendo a qualidade do enxerto (LIMA JR.; SERRA, 2004).

2.3 Reparação tecidual

O estudo sobre cicatrização de ferida engloba atualmente um meio complexo contendo muitas proteínas da matriz, fatores de crescimento e citocinas, os quais regulam e modulam o processo de reparação (RUBIN *et al.*, 2006).

Segundo Rubin *et al.* (2006), a reparação e a regeneração desenvolvem-se após respostas inflamatórias, sendo a inflamação a resposta primária à lesão tissular.

A inflamação é a reação do tecido e sua microcirculação a uma agressão patogênica. Podendo influenciar a reparação no processo inflamatório agudo. Quando a reparação aguda é transitória, pode sofrer resolução completa com reposição local dos elementos parenquimatosos lesados. Por outro lado, a inflamação aguda progressiva, com o aparecimento de inflamação com predominância de macrófagos, é intrínseca à seqüência de elaboração e reparação do colágeno. Ainda segundo Rubin *et al.* (2006), a regeneração é a renovação de um tecido lesado ou de um apêndice perdido, idêntico ao original.

O advento da cicatrização tecidual é dividido de forma clássica em três fases: a fase da inflamação, fase de formação do tecido de granulação com deposição da matriz extracelular e

a remodelação tecidual (CLARK, 1993). Essas fases são sobrepostas no tempo, e não são necessariamente exclusivas.

Segundo McKinney e Cunningham (1989), a aparência final da cicatriz propriamente dita vai depender de fatores que influenciam diretamente o processo. Desde o momento em que se instala uma ferida, há um grau de isquemia, oxigenação e fatores angiogênicos de crescimento até a fase final de remodelação, passando pelo processo de reposição tecidual e havendo, assim, o evento específico da cura. A reparação combina três eventos fundamentais: a hemostasia, pois durante o processo de lesão existe o rompimento de vasos; a inflamação pela lesão local; e a reparação propriamente dita, pois se houve destruição, ou lesão, de determinadas estruturas, haverá processo de reposição tecidual por regeneração ou cicatrização.

De uma maneira ampla, o processo de cicatrização ocorre por preenchimento dos espaços fechados com uma cicatriz. A evolução desse processo vai variar de acordo com a presença ou ausência de bactérias, com a natureza da ferida (fechada ou aberta), com o grau de nutrição sanguínea, com a quantidade de tecido morto a ser eliminado, com a característica do tecido lesado e outros fatores (MAJNO; JORIS, 1996).

A ferida incisional tem como característica apresentar-se fechada, suturada e não apresentar presença de infecção, aspecto que favorece a cicatrização. Por outro lado, quando algum fragmento de tecido é removido, essa ferida é denominada excisional.

Quando não há população bacteriana envolvida e nem tecido morto a ser removido, o processo cicatricial pode começar imediatamente. O termo cirúrgico para este quadro é “cicatrização por primeira intenção”. Por outro lado, haverá prolongamento do processo cicatricial se houver sinal de infecção ou se houver distanciamento entre os bordos cicatriciais devido há perda tecidual. Estas condições são obstáculos que deverão ser transpostos antes que a ferida se feche. Neste caso, especificamente, ocorre o processo cicatricial conhecido por “cicatrização por segunda intenção”.

Segundo Rubin e Farber (1990), é tradicional promover distinção entre a cicatrização de um ferimento inciso, com margens apostas e não contaminada (cicatrização por primeira intenção) e a de um ferimento lacerado, com as bordas separadas (cicatrização por segunda intenção). Embora os resultados finais, cicatrização mínima e proeminente, respectivamente, sejam nitidamente diferentes, o mecanismo básico em ambos é o mesmo. As diferenças são quantitativas, e não qualitativas.

2.3.1 Cicatrização por primeira intenção

Tecnicamente, todas as feridas são infectadas, umas em maior e outras em menor grau. Na cirurgia asséptica, porém, existe uma redução considerável de bactérias, o que favorece o processo de reparação tecidual. A cascata de eventos é relativamente constante. A regulação indicada a seguir é meramente didática, pois, dependendo das condições, alguns eventos podem ser antecipados, e outros, prolongados, ou mesmo dobrados em sua evolução.

2.3.1.1 Hemostasia: dentro do primeiro segundo aos minutos seguintes

Parar o sangramento é a prioridade do organismo, pois ele busca sempre a hemostasia, ou seja, a estagnação de sangue em um vaso ou parte do corpo, promovendo assim, o equilíbrio orgânico. Esse fato ocorre graças à contração das arteríolas, que favorecem a cessação da hemorragia. Mecanismos de coagulação sangüínea são ativados, podendo, para isso, ser desencadeados dois mecanismos: intrínseco e extrínseco.

No mecanismo intrínseco, há início da ação de fatores de crescimento promovidos pelas células lesadas por plaquetas e fatores sangüíneos associados.

No extrínseco, o fenômeno ocorre devido ao contato com o colágeno. Os dois mecanismos são disparados na solução de continuidade (ferida), então existe a formação do coágulo sangüíneo, promovendo a cessação do sangramento.

Com a lesão, há ruptura de vasos sangüíneos, concomitantemente ao extravasamento dos seus elementos, ocorrendo a ativação plaquetária e iniciando-se a hemostasia, com a adesão na parede endotelial dos vasos lesionados e, conseqüentemente, a aglutinação.

A formação do coágulo por vias intrínsecas é iniciada pela agregação plaquetária. As atividades do endotélio íntegro do vaso sangüíneo limitarão o coágulo às áreas vasculares lesadas. No interior do lúmen do vaso, o coágulo sangüíneo mantém a hemostasia e provê uma matriz provisória para migração celular no espaço da ferida. Por exemplo, os exsudatos de fibrina e fibronectina, atuam como matriz provisória para a diapedese de monócitos e orientação de fibroblastos (GRINNELL; FELD; MINTER, 1980).

Enquanto os processos citados ocorrem na luz dos vasos, o fibrinogênio migra para o interstício, transformando-se em fibrina, formando, assim, uma fina rede que conecta os dois bordos da solução de continuidade, denominado leito da ferida. Os produtos do coágulo

ajudam a iniciar o processo de reparação. A enzima que catalisa a formação de fibrina é denominada trombina, atraindo macrófagos e promovendo a replicação de fibroblastos; além disso, existe a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), favorecido pela degranulação de plaquetas, e também de um fator mitótico e quimiotático para fibroblastos (COLVIN, 1986).

Existe dupla função plaquetária. Além de promoverem a formação do tampão hemostático, também secretam citocinas, incluindo fatores de crescimento como o PDGF, fator de crescimento transformante α (TGF α), fator de crescimento β (TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de outros mediadores com multiplicidade de ações. As plaquetas, além de liberarem todos esses fatores, liberam substâncias biológicas ativas, incluindo moléculas da matriz extracelular (MEC), como a fibronectina, a trombospondina e o fator de Von Willebrand.

2.3.1.2 Inflamação: dentro do primeiro minuto a horas

O processo inflamatório inicia-se imediatamente após a agressão ao tecido, independentemente da presença de bactéria na região afetada. Provavelmente este é um procedimento preventivo do organismo para ganhar tempo contra possíveis contaminações da lesão. Logo após a agressão, ocorre uma cascata de fenômenos iniciais da cicatrização, conhecidos como “fase de demolição”, que leva a uma limpeza do local ou demolição dos tecidos lesionados, restos de agentes, entre outros elementos.

O processo trata-se de uma inflamação asséptica, pois não existem agentes contaminantes na região. Sendo assim, uma abundante quantidade de mediadores da inflamação é gerada, iniciando sua ação. Um exsudato de células e fluidos começa a extravasar das vênulas para o meio, existe a dilatação das arteríolas e os leucócitos movem-se lentamente para região, atraídos por agentes quimiotáticos, como substâncias químicas endógenas ou algum microorganismo.

Se houver microorganismos no local, inicia-se uma batalha e mais leucócitos serão recrutados para a região. Em uma ferida estéril, entretanto, o número de leucócitos no exsudato não é o suficiente para ser chamado de pus. Os neutrófilos promovem o desbridamento da lesão e esse processo inicia-se imediatamente após a agressão. Existe o intumescimento do tecido próximo à lesão, devido ao edema inflamatório. Nos espaços de

tecido conectivo destendidos, os exsudatos coagulam e formam uma tênue rede de fibrina; isso ocorre juntamente com a fibronectina, oferecendo aos leucócitos uma superfície extra contra a qual favorece a captura das bactérias, promovendo a fagocitose de superfície.

2.3.1.3 Formação de crosta

A formação da crosta ocorre pela liberação do exsudato filtrado da solução de continuidade suturada, aparecendo na superfície da pele. Este processo coagula, e eventualmente ocorre um ressecamento superficial. Este evento continua seu processo formando uma crosta, que tem importante função de isolar a ferida do meio externo, prevenindo a penetração de agentes infecciosos e impedindo a dessecação. Grillo *apud* Majno e Joris (1996) são a favor da crosta, tendo como opinião que ela é um curativo natural da ferida.

Porém a opinião não é compartilhada por todos os estudiosos na área. De acordo com Cotran (1989), a crosta, que é constituída de coágulo, fibrinas e exsudato; tem como função apenas isolar a ferida do meio ambiente.

2.3.1.4 Migração de células vinte e quatro horas após a lesão

Algumas células, como os fibroblastos, células epidérmicas e endoteliais (GROTENDORST; MARTIN, 1986) tendem a migrar para a região lesada, vinte quatro horas após a lesão.

Os leucócitos, porém, nessa fase, incluindo mais monócitos são atraídos para a ferida, colonizam o espaço ao redor, fagocitando os restos de neutrófilos, os quais continuam chegando e morrendo horas depois de sua chegada. Conforme os macrófagos promovem a fagocitose local, tornam-se ativos, secretando citocinas, direcionando, assim, atividades de outras células. O fibrinogênio fornecido através do exsudato inflamatório faz com que a rede de fibrina continue crescendo. Os filamentos de fibrinas coaguladas com a proteína plasmática são adequados como ponto de apoio para as células epidérmicas e fibroblastos migratórios.

Após as 24 horas, existe um alargamento dos fibroblastos que migram em direção ao leito da ferida, arrastando-se ao longo dos filamentos de fibrina coagulados. O PDGF é um

dos fatores quimiotáticos liberado pelas plaquetas durante o processo da hemostasia. Existe a mobilização das células epidérmicas dentro de horas.

Células basais ao lado da lesão são ativadas pela repentina falta de células na vizinhança, deprimindo-se e migrando para a região desprovida de células, sendo as células fagocitárias as primeiras a serem ativadas, as quais ajudam na digestão da região abaixo e ao longo da crosta em formação. Montesano e Orci (1988) chamaram esse fenômeno de “efeito de vizinhança livre”.

A regeneração dos vasos sangüíneos, denominada angiogênese, está se desenvolvendo nos bordos da feridas nas 24 horas que seguem a lesão, porém, é difícil de ser observada por microscopia eletrônica. A falta de oxigênio, anoxia, é o principal fator determinante do estímulo interno vascular. A tensão de oxigênio nos bordos da ferida é próxima a zero.

Knighton, Silver e Hunt (1981) estudaram o aumento artificial do aporte de oxigênio no leito da ferida e comprovaram a cessação da angiogênese. Nessa fase de angiogênese, os macrófagos estão muito envolvidos. Eles migram para o interior do leito da ferida, tornando-se anóxicos e esta anoxia incentiva-os a secretar um fator que estimula o crescimento capilar (KNIGHTON *et al.*, 1983), provavelmente o TNFa (LEIBOVICH; WISEMAN, 1988).

Quando existe alta concentração de lactato, outra condição que também está presente no leito da ferida, ocorre, também, a liberação do fator de crescimento angiogênico (JENSEN *et al.*, 1986).

Existe uma diversidade de fatores quimiotáticos presentes na área da lesão, havendo, assim, atração de diversas células para a região. Exemplo dessas células são os neutrófilos, que estarão presentes nas primeiras horas após a lesão, na tentativa de limpeza da área contra bactérias e/ou partículas estranhas ao organismo.

Os monócitos estarão maciçamente presentes, dentro de uma variação de tempo que compreende 24 e 48 horas. Se houver grande contaminação, ou mesmo a possibilidade de haver, no local, partículas não passíveis de sofrer fagocitose, haverá a presença de neutrófilos, que possuem como principal função a liberação de fragmentos teciduais mortos e de microorganismos contaminantes. Esses microorganismos podem causar mais danos ao tecido, devido à produção de enzimas e produtos citotóxicos. Assim sendo, haverá ativação dos monócitos em estado de macrófagos.

Os macrófagos possuem diversas funções, dentre as quais se podem citar: o desbridamento do tecido através da fagocitose e digestão de microorganismos patogênicos, bem como a limpeza da área de tecido lesado e de neutrófilos efetores, que desempenham um

papel fundamental para o início da reparação tecidual. Esses neutrófilos poderão ser fagocitados por fibroblastos (NEWMAN; HENSON; HENSON, 1992).

Quando ocorre a infiltração de neutrófilos, existe a permanência do acúmulo dos monócitos pelo estímulo dos fatores quimiotáticos próprios a esta célula. Esses fatores incluem fragmentos de colágenos, elastina e fibronectinas, trombina enzimática ativa e TGF- β . Fatores quimiotáticos ativam monócitos similares ao recrutamento de neutrófilos. Esta ativação dos monócitos circulantes favorece sua adesão à parede endotelial dos vasos sanguíneos em direção ao interstício da matriz extracelular.

Os macrófagos controlam também a síntese e liberação de enzimas como a colagenase, por parte dos fibroblastos (HUYBRECHTS-GODIN; PEETERS-JORIS; VAES, 1979), as quais facilitam esse desbridamento (CAMPBELL *et al.*, 1987). Além disso, quando existe a ativação dos macrófagos por endotoxinas bacterianas, substâncias como proteínas neutrófilo-ativadoras (NPA) são liberadas, facilitando o recrutamento de mais células inflamatórias para a região. Os macrófagos, além de promoverem fagocitose e desbridamento, aderência para a matriz extracelular, também estimulam o monócito a sofrer uma metamorfose em macrófago inflamatório/reparativo.

Dessa forma, o papel desempenhado pelos macrófagos é de suma importância na transição entre a inflamação e a segunda fase da reparação das lesões por solução de continuidades, que é a formação do tecido de granulação.

2.3.1.5 Cicatrização: no terceiro dia

Em um período de dois a três dias, em relação às células inflamatórias, os monócitos começam a exceder o número de neutrófilos (SIMPSON; ROSS, 1972). A regeneração que havia iniciado sua ativação nas primeiras 24 horas após a lesão está em plena atividade. Por secreção de colagenase, existe um avanço das células epidérmicas entre a crosta serohemática e a derme. As células basais em regeneração possuem receptores para a fibronectina, o que não ocorre com células basais normais.

Quando a epiderme é perfurada por uma linha de sutura, as células epidérmicas crescem para o seu interior, formando um tubo que circunda o fio. Esse crescimento é esperado, pois a tendência do crescimento epitelial é sobre a superfície do tecido exposto. Os fibroblastos ativados no processo cicatricial estão em plena diferenciação, respondendo a

fatores de crescimento, multiplicando-se e produzindo fibras colágenas, inicialmente do tipo III (McPHERSON; PIEZ, 1988), secretando, além disso, proteoglicanas e fibras elásticas.

A progressão da angiogênese avança até que ao segundo ou terceiro dia já existam brotos capilares e comecem a aparecer de uma extremidade a outra da ferida. Este fenômeno é conhecido como *inosculation*, do termo latino *ósculo*, que significa *beijo* (RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990).

O início do tecido de granulação é formado pela junção dos novos capilares misturados aos novos fibroblastos. O tecido de granulação começa a aparecer em torno do quarto dia após a lesão (GUIDUGLI-NETO, 1987), e os vasos apresentam células com forte característica de ativação (GUIDUGLI-NETO, 1992).

O tecido de granulação é constituído de um denso leito de macrófagos, fibroblastos e uma neovascularização que repousam sobre uma matriz de fibronectina, colágeno do tipo I e III e ácido hialurônico. Os fibroblastos movimentam-se dentro do leito da ferida apresentando diferentes fenótipos. Primeiro os fibroblastos assumem um fenótipo migrante, depois um fenótipo produtor de colágeno e finalmente um fenótipo contrátil, que é denominado miofibroblasto.

2.3.1.6 Cicatrização precoce: entre o sétimo e o décimo dia

No período de uma semana, o leito da ferida é preenchido por tecido de granulação (GUIDUGLI-NETO, 1987). Devido à proximidade dos leitos da ferida, há pouco tecido de granulação na região. Além disso, uma rede capilar atravessa o leito da ferida em ambos os lados, como a rede vascular, porém com algum atraso em relação aos vasos sanguíneos, e inicia-se o processo de regeneração da rede linfática na região. O tecido de granulação vai adquirindo lentamente mais fibras colágenas, iniciando-se a aparência de massa fibrosa denominada cicatriz.

Os macrófagos continuam agindo em sua limpeza nos bordos da ferida e, eventualmente, removem também fibrina. Existe, ainda, o aparecimento do colágeno tipo I nesta fase (CLARK; HENSON, 1988).

Embora haja a regeneração epidérmica, não há, ainda nesta fase, o desenvolvimento dos anexos da pele, como pêlos e glândulas. Devido à pobreza de regeneração dos melanócitos, a coloração da cicatriz é pálida.

2.3.1.7 Maturação da cicatrização: entre o primeiro mês e o segundo ano

Após o processo citado em 2.3.1.6, ocorre a maturação da cicatriz, que se torna uma massa de tecido fibroso com muitas fibras colágenas, algumas células e vasos. Esse fenômeno, porém, é lento no seu desenvolvimento. Com o passar do tempo, a maioria das células desaparece, observando-se apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais (DARBY; SKALLI; GABBIANI, 1990). Nas últimas fases da reparação tecidual, em alguns casos, podem ser observados eosinófilos, que, de acordo com Todd, Donoff e Chiang (1991), talvez contribuam com fatores de crescimento. As fibras colágenas apresentam cada vez mais pontes de ligação entre si, permanecendo algumas fibras elásticas. O desaparecimento de muitos capilares justifica a aparência esbranquiçada de cicatrizes antigas, sendo, assim, hipovascularizadas.

A remodelação da matriz é a fase final da reparação cicatricial, que se entremeia com sua fase antecessora, ou seja, com a fase de tecido de granulação. Nos meses seguintes à reepitelização, contudo, há redução e alteração contínua da matriz. Existe a eliminação rápida da fibronectina da matriz e as fibras colágenas do tipo I aumentam lentamente ao longo da neomatriz para promover resistência à pele e à cicatriz. Esse processo se estende durante muitos meses, até mesmo de um a dois anos após a lesão inicial, fazendo com que a cicatriz cirúrgica altere sua cor de rosa para branca. As alterações locais da fibra colágena continuam em grande atividade durante anos.

A resistência ao estiramento é modificada no local da cicatriz, entretanto, nem mesmo uma cicatriz madura é tão resistente ao estiramento quanto à pele normal. A força tênsil permanece abaixo do normal, nunca atingindo a mesma da pele original. Em tecidos frouxos pode-se, contudo, atingir níveis superiores.

2.3.1.8 Mediadores químicos de reparação tecidual

Nas primeiras horas após a instalação da lesão, existe a presença dos mediadores pertinentes à inflamação aguda. Entre os mediadores, pode-se citar como exemplo os mastócitos lesados, que liberam histamina que causa hiperemia; uma variedade de células que liberam prostaglandinas; plaquetas do tampão hemostático, que liberam serotonina, um vasoconstritor; além de uma infinidade de outros mediadores. O aumento da permeabilidade

das vênulas pode resultar da liberação de leucotrienos, liberados pelas plaquetas. Essas reações ocorrem em cadeia, ou seja, a coagulação é acompanhada da ativação de calicreínas de origem plasmática, as quais produzem bradicinina. A bradicinina induz a produção de prostaglandinas (WILLIAMS, 1988).

Os leucócitos são atraídos pelos leucotrienos B₄ e por muitos produtos proteolíticos, dentre eles, as enzimas proteolíticas produzidas em diversas fontes, como: lisossomas de células e plaquetas que sofreram lise, grânulos de mastócitos, e plasminas do sistema fibrinolítico ativado. As plasminas atuam numa variedade de proteínas para produção de mediadores, como: substratos, incluindo moléculas do complemento C₃, C₄, C₅, cininogênio e fibrina.

Os complementos ajudam a atrair os neutrófilos, ainda que estes não sejam essenciais para a reparação tecidual (WAHL *apud* MAJNO; JORIS, 1996). Os mediadores da inflamação aguda desaparecem em horas e o papel principal é desempenhado por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, especialmente o PDGF e o TNF α , secretados por macrófagos. As plaquetas liberam alguns desses fatores, principalmente nas primeiras horas, porém os mastócitos também os fornecem. Os macrófagos assumem o controle de vigia do processo reparacional dentro de dois ou três dias, tudo indicando ser a anoxia um dos principais indutores desse processo.

Existem inúmeros fatores de crescimento envolvidos na reparação das feridas. Esses fatores produzem uma ação complexa e inter-relacionam-se entre si, porém, existem controvérsias entre os estudiosos da área e ainda há necessidade de elucidar os processos relacionados entre eles.

Os efeitos estimuladores sobre a proliferação celular e síntese de DNA *in vitro* são denominados pelo termo “fator de crescimento”. Esses fatores constituem uma família de peptídeos reguladores com múltiplas e variadas funções. Sporn e Roberts (1988) afirmaram que os fatores de crescimento formam parte de uma complexa linguagem de sinais celulares em que os peptídeos individuais são equivalentes às letras de um alfabeto ou código. Rothe e Falanga (1989) consideram o importante papel que esses peptídeos desenvolvem em muitos processos biológicos *in vivo*, incluindo a embriogênese, a oncogênese e a reparação de feridas. Os fatores de crescimento implicados diretamente na reparação tecidual estão resumidos na tabela 5, que representa as células de origem, as células-alvo e seus receptores específicos.

Tabela 5: Fatores de crescimento implicados na reparação de feridas cutâneas.

FATOR DE CRESCIMENTO	ORIGEM	ALVO	RECEPTOR
PDGF PM: 30.000	Plaquetas Células endoteliais Macrófagos	Fibroblastos Células .musc. lisa Células gliais	Tirosina quinase
EGF PM: 6.045	Gl. Brunner Gl. submaxilar	Queratinócitos Células endoteliais Fibroblastos	Tirosina quinase
IGF – I PM: 7.800	Fibroblastos Hepatócitos	Fibroblastos Queratinócitos Hepatócitos	Tirosina quinase
IGF – II PM: 7.471	Fibroblastos Hepatócitos	Queratinócitos Fibroblasto Hepatócitos Adipócitos	Tirosina quinase
TGF α PM: 5.700	Células epiteliais Células tumorais Macrófagos	Queratinócitos Hepatócitos Fibroblastos Osteoblastos Células Schwann	Tirosina quinase
TGF β PM: 25.000	Plaquetas	Queratinócitos Hepatócitos Fibroblastos Osteoblastos	Três receptores alta afinidade
aFGF PM: 15.600	Cérebro Retina	Células endoteliais Fibroblastos Condrócitos Células gliais Células epiteliais Osteoblastos Queratinócitos	PM: 150.000
bFGF PM: 16.400	Cérebro Retina Corpo lúteo Macrófago Rim Próstata tireóide	Células endoteliais Fibroblastos Condrócitos Células gliais Células epiteliais Osteoblastos queratinócitos	Alta afinidade sem endocitose do complexo FGF-FGF-R

Fonte: Rigau (1996).

Rubin (2006) relata que, embora os papéis dos fatores de crescimento na iniciação e progressão da reparação tecidual sejam bem compreendidos, os eventos que limitam e terminam esses processos não são bem definidos. Isso implica mais estudos para aprofundar conhecimentos na área.

Tabela 6: Atividade biológica dos fatores de crescimento implicados na reparação cutânea.

Fatores de crescimento	Atividade biológica
<p data-bbox="311 353 368 383">PDGF</p> <p data-bbox="311 658 363 687">EGF</p> <p data-bbox="311 927 363 956">IGF</p> <p data-bbox="311 1122 363 1151">TGF</p>	<ul style="list-style-type: none"> • vasoconstrição • modulador da síntese de componentes da matriz extracelular • aumento da proliferação de fibroblastos, células. da musculatura lisa e células gliais • ativação de fosfolipases <p data-bbox="507 510 576 539"><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • aumento da proliferação de queratinócitos e células endoteliais • aumento da síntese de GAGs • favorecimento da união EGF – EGF- R • aumento da produção de IGH <p data-bbox="507 741 576 770"><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • favorecimento da hiperplasia e hipertrofia <ul style="list-style-type: none"> • modulação da proliferação de queratinócitos • aumento da síntese de fosfatidilcolina • diminuição do catabolismo protéico • inibição da glicogênese em adipócitos <ul style="list-style-type: none"> • regulação da proliferação celular e síntese • diminuição do crescimento de queratinócitos e fibroblastos • favorecimento da formação de queratina • aumento da proliferação de fibroblastos e osteoblastos • imunossupressão de linfócitos T
<p data-bbox="311 1391 363 1420">FGF</p>	<p data-bbox="507 1279 576 1308"><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • atuação como um fator de concorrência • intervenção na morfologia, proliferação e diferenciação celular • ação como potente mitógeno para mesoderma e células derivadas • modulação da proporção relativa dos tipos de colágeno sintetizados pelo endotélio vascular • atuação como substituto da matriz extracelular na regulação da diferenciação das células mesodérmicas

Fonte: Rigau (1996).

Diversos fatores de crescimento estimulam a atividade biológica durante a reparação cutânea, existindo fatores que controlam estágios específicos na reparação tecidual, os quais se encontram bem ilustrados na tabela 6.

2.3.2 Cicatrização por segunda intenção

Se a ferida for contaminada ou estiver com os bordos muito afastados (aberta), a reparação tecidual pode ser retardada. Neste caso específico, há duas condições para o processo cicatricial: cicatrização em feridas infectadas e cicatrização em feridas abertas.

Uma ferida infectada apresentará na sua superfície grande quantidade de neutrófilos. Mesmo que os bordos cicatriciais estejam unidos por sutura, não ocorrerá aderência do leito da ferida, pois a secreção purulenta que se encontra na superfície impede sua fixação. Eventualmente, os dois bordos da ferida são recobertos por uma camada de tecido de granulação similar à membrana piogênica de um abscesso, produzindo pus.

A ferida infectada comporta-se como um abscesso bem delimitado e não haverá processo de reparação até que a infecção seja debelada naquela região da ferida, preenchendo-se parcialmente o espaço com tecido de granulação e tornando a lesão uma ferida aberta. Desse modo, o processo de cura evoluirá de maneira especial. A presença de neutrófilos na região traz consigo uma quantidade imensa de enzimas líticas. Essas enzimas alteram o pH, comprometendo, com isso, o adequado crescimento celular e o tempo cicatricial, o que provoca alterações estéticas à cicatriz.

Uma ferida aberta, seja ela cirúrgica (excisional) ou acidental, apresenta um complicador no processo de reparação, devido à perda de substância no local, que faz com que o organismo preencha o espaço vazio com tecido de granulação. O organismo, entretanto, também dispõe de outros mecanismos coadjuvantes mais rápidos que ajudam muito no preenchimento, que não somente a síntese de tecido de granulação. Para tanto, dentro de um período que pode variar de cinco e nove dias, as margens da ferida movem-se uma contra a outra, como se houvesse uma força invisível de tração (PEACOCK, 1984). A denominação para esse fenômeno é “contração de ferida”. Embora esse fenômeno ocorra em qualquer processo cicatricial, neste caso específico, pela presença de tecido de granulação, seu processo é quantitativamente mais exuberante.

Existem dois mecanismos distintos para essa contração de feridas abertas. Uma dessas condições ocorrerá se a ferida aberta não for recoberta por curativo úmido. Nos primeiros dias, a crosta que se forma superficialmente promove sua própria contração, por constituir-se, principalmente, de fibrina seca. Quando a fibrina seca, ela se contrai e, estando firmemente ligada ao tecido inferior, reduz a superfície de uma ferida pequena aberta.

Após uma semana, ocorre outro mecanismo de contração, que promove forte contração da ferida. Esse processo acontece independente da ferida ser aberta ou fechada, pois na região existe a presença de células capazes de contrair-se, denominadas miofibroblastos.

2.3.2.1 Miofibroblastos

A transformação de fibroblastos em miofibroblastos faz-se necessária para que possa haver a contração da ferida. Os miofibroblastos assumem um fenótipo contrátil e, depois de executarem sua função, retornam à condição de fibroblastos, isolados, são mais curtos, não promovendo contração do tecido circundante, porém, quando se diferenciam em miofibroblastos, desenvolvem estruturas peculiares que favorecem o encurtamento tecidual (GABBIANI *apud* MAJNO e JORIS, 1996).

Essas estruturas são fibrilas intracelulares com densidade corpórea semelhante a músculos lisos e microtendões. Descritos por Majano e Joris, como feixes fibrosos que emergem das células, em continuidade com as fibrilas intracelulares, denominado “*fibronexus*”. Essas junções intracelulares são de vários tipos, especialmente junções tipo gap; que não são vistas habitualmente entre os fibroblastos comuns. Os fibroblastos normais não estão em contato uns com os outros. As modificações que os miofibroblastos sofrem fazem com que se assemelhem às células do músculo liso, porém não se tornam uma delas.

Os miofibroblastos são células intermediárias entre o fibroblastos e as células da musculatura lisa, porém ainda não está inteiramente elucidado o seu mecanismo contrátil, uma vez que parecem exercer essa motilidade de duas formas diferentes (MAJNO; JORIS, 1996):

- a) por encurtamento, como fazem as células musculares. Os fibroblastos estão conectados uns aos outros e ao estroma, se cada um tornar-se menor, o resultado em toda a extensão será similar àquele do músculo sob contração.
- b) por um mecanismo estacionário (HARRIS; WILD; STOPAK, 1980). Esse mecanismo ainda é hipotético e baseia-se na imagem de um marinheiro puxando

uma âncora. Ele faz tração, entretanto, não tem como se mover nesse processo. Esse conceito foi inspirado em fibroblastos (miofibroblastos) cultivados em gel de colágeno, capazes de contrair o gel do seu cultivo.

Ainda são desconhecidas as causas que induzem a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Com certeza, existe algo na ferida aberta que induz esse processo.

Os miofibroblastos posicionam-se alinhados ao longo dos novos depósitos de matriz extracelular no eixo axial da ferida, formando uniões de célula a célula e de célula a matriz para gerar, posteriormente, forças de tensão da ferida, a qual produzirá sua própria contração.

A reparação das mucosas é mais acelerada que a da pele, demonstrando que muitos relatos de experimentos realizados em pele devem ser generalizados para outros locais com muito cuidado.

2.4 Revisão dos efeitos do laser na cicatrização *in vivo*

Os estudos *in vivo* em animais de laboratório, como também estudos clínicos em pacientes, respaldam a teoria de que a regeneração dos tecidos e a cicatrização de feridas são favorecidas quando tratadas com laser de baixa potência. Na década de sessenta, Mester (1966) publicou seus primeiros resultados no tratamento de úlceras crônicas com laser de rubi operando em baixa intensidade de energia. Foram publicados estudos e efeitos desse tipo de terapia com laser tanto em clínica humana como em animais, além de inúmeros trabalhos *in vitro*.

De início, tais estudos refletiam casos pontuais ou experiências de alguns poucos clínicos cuja casuística apresentada era pouco significativa. Além disso, a metodologia empregada nesses estudos era de pouca qualidade científica e contestável, havendo uma variedade enorme de parâmetros de irradiação e modelos de trabalho. Com o passar do tempo, foram aparecendo trabalhos seguindo uma metodologia mais adequada e homogênea, além de parâmetros mais reprodutíveis e menos passíveis de contestação. Estudos do tipo duplo cego e seguimentos a longo prazo começaram a dar mais qualidade e subsídio aos resultados obtidos nessas pesquisas.

A maioria das publicações *in vivo* apresentava estudos em animais e humanos tratados com laser de baixa potência demonstrando sua ação sobre a síntese e remodelação de colágeno, número de fibroblastos, diâmetro e força de tração das feridas tratadas, viabilidade

dos enxertos tratados, vascularização, vasodilatação, sistema linfático, efeito antibacteriano, imunológico e seus efeitos sistêmicos.

Mester publicou diversos trabalhos com diferentes parcerias até sua morte, em 1984 (1966; 1969; 1984; MESTER *et al.*, 1971a; 1971b; MESTER *et al.*, 1971c; MESTER *et al.*, 1972; MESTER *et al.*, 1973; MESTER *et al.*, 1974; MESTER *et al.*, 1975; MESTER *et al.*, 1977; MESTER *et al.*, 1978; MESTER; JASZSAGI, 1973; MESTER; SPIRY; SZENDE, 1973; MESTER; TOTH; MESTER, 1980; MESTER, 1982), e concluiu que o laser de baixa potência acelerava a divisão celular. Observou, em seus trabalhos realizados ao longo desses anos, um significativo aumento dos leucócitos que participavam na fagocitose e maior síntese de colágeno por parte dos fibroblastos tratados.

Além disso, observou que havia uma regeneração mais precoce de vasos linfáticos nos grupos tratados, o que o levou a concluir que facilitava o desenvolvimento do tecido de granulação.

O aumento da síntese de colágenos por parte dos fibroblastos é o efeito mais importante do laser de baixa potência, demonstrado nos experimentos nos quais se monitorou essa síntese utilizando-se microscópio eletrônico para controle da captação de prolina e glicina tritiada (RIGAU, 1996). Foram observados os efeitos na área tratada, atribuídos por Mester *et al.* (1974) a fatores humorais.

Devido a esse importante postulado, os pesquisadores preconizaram que durante o tratamento não seria necessário irradiar toda a área lesada para obter um efeito uniforme. Rodrigo, Lerma e Zagarosa (1985), baseados nessa teoria, publicaram um estudo sobre o efeito do laser de He-Ne no tratamento de fístulas de osteomielite múltiplas em ratos fêmeas. Eles obtiveram a cura do corpo todo das ratas, irradiando apenas uma única pata dos animais.

Essa foi uma importante descoberta, já que dessa forma surgiu uma possível resposta às dúvidas que aparecem quando equipes como as de Kana (1981), Hunter *et al.* (1984), Basford *et al.* (1986) e Saperia *et al.* (1986), em diferentes tipos de experimentos, não conseguiram resultados positivos na cicatrização de feridas padronizadas em animais de experimentação.

Em todos esses experimentos, os pesquisadores usaram o mesmo animal para estudar as feridas irradiadas e não irradiadas. Ou seja, em um mesmo animal eram realizadas duas feridas: uma não irradiada, que servia como controle, e a outra ferida irradiada. Os dois ferimentos, porém, tiveram resultados idênticos. Mesmo assim, Silveira e Lopes, pioneiros em pesquisas com laser de baixa potência no Brasil (1991), obtiveram dados divergentes.

Eles estudaram os aspectos do comportamento dos mastócitos quando se irradiava cobaias com diodo laser operando em 904nm, utilizando como modelo de estudo feridas em cobaias, sendo a ferida-controle e a ferida irradiada no mesmo animal. E observaram que havia maior degranulação de mastócitos, além de maior proliferação fibroblástica e aumento da substância fundamental do tecido conjuntivo nas feridas irradiadas em relação às feridas-controle, mesmo ambas as feridas sendo realizadas no mesmo animal.

Abergel, Glassberg e Uitto (1988), foram também pesquisadores significantes nessa área. Estudaram feridas padronizadas, usando pele de porco como modelo, e compararam o efeito do laser de He-Ne e de uma lâmpada de tungstênio sobre a cicatrização tecidual. Realizaram um segmento fotográfico para verificar a força de tensão e a evolução do diâmetro da área da ferida tratada.

Os resultados foram positivos, demonstrando uma evolução de até 94% nas feridas tratadas com laser de baixa potência. No mesmo ano, Strube *et al.* publicaram um artigo no qual desenvolveram um experimento similar, obtendo resultados negativos.

Pesquisadores como Hall *et al.* (1994) e Chelyshev e Kubitsky (1995) também não conseguiram observar nenhum tipo de efeito com a terapia laser sobre a cicatrização tecidual, todavia os primeiros pesquisadores trabalharam com fluências extremamente inferiores às aquelas recomendadas pela literatura, e os segundos pesquisadores trabalharam com regeneração de axônios mielinizados, sendo o mesmo um modelo de estudo totalmente diferente daqueles preconizados e utilizados na literatura, desde a década de sessenta.

2.4.1 Estudos *in vivo*

Alguns pesquisadores, como Leung, Manfredi Roccia. (1985), Martinez *et al.* (1984), Rodrigo, Lerma e Zaragoza (1985), Sarti *et al.* (1995), Smith-Agreda *et al.* (1985), Smith-Agreda *et al.* (1986), e Villaplana *et al.* (1995), têm estudado os efeitos do laser de baixa potência sobre as células em cultivo e em tecidos de pequenos roedores. Foram utilizadas nesses estudos emissões de laser na região do visível, como He-Ne, e na região do infravermelho próximo, com diversos comprimentos de onda. Em todos os grupos irradiados, foram estimuladas as funções endócrinas e a divisão celular. As células tireoidianas e hipofisárias dos grupos irradiados mostraram incremento na sua atividade após irradiação da

adeno-hipófise. Os estudiosos concluíram com sua pesquisa, que a terapia laser de baixa potência exerce efeitos sobre as glândulas secretoras.

Os pesquisadores recomendavam que se deve evitar a irradiação clínica direta sobre as zonas glandulares em humanos, ainda que não houvesse nenhuma comprovação clínica de que este tipo de laser atuasse na hiperfunção glandular. Em consequência desse fato, as primeiras literaturas sobre a terapia laser de baixa potência, que tinham como autores Cisneros e Trelles (1987), sugeriam como contra-indicação à irradiação clínica direta em glândulas.

Rochkind *et al.* (1989) contribuíram muito para o esclarecimento dos mecanismos básicos de ação do laser de baixa potência, publicando um trabalho sobre os efeitos sistêmicos do laser de He-Ne comparando três modelos experimentais em ratos. Provocaram feridas padronizadas, por lesão do sistema nervoso periférico e central e observaram a evolução dessas feridas cutâneas.

Subdividiram os três modelos em dois grupos e realizaram duas feridas, uma de cada lado do dorso dos animais. Um grupo-controle não recebeu radiação laser e o outro grupo foi irradiado apenas em uma das feridas.

Este estudo demonstrou que tanto a ferida irradiada quanto a não irradiada cicatrizaram em tempo significativamente menor, comparado ao grupo-controle não irradiado e apresentaram diferença estatística significante entre si. Esses mesmos autores escreveram os efeitos positivos e sua permanência a longo prazo e demonstraram efeitos deletérios quando se utilizou alta irradiância em 200 mW/cm².

Trelles *et al.* (1988) publicaram um estudo em sangue e língua pulverizados de ratos, que haviam sido irradiados com fluência de 2,4 J/cm². Analisaram os níveis de histaminas detectados em ambos os modelos. Foram utilizados dois protocolos: o primeiro trabalhou com um laser de 4mW de potência óptica de saída e o segundo um laser de 50mW. No sangue, não foram observadas alterações significativas entre os grupos irradiados e os grupos-controle. Na língua, porém, o grupo irradiado com laser de 50mW de potência apresentou 30% de histamina a mais que o grupo-controle e, no grupo irradiado com o laser de 4mW, observou-se um aumento de 100% no nível de histamina em relação ao grupo-controle.

Com base nesses resultados, Trelles *et al.* (1989a) e Trelles *et al.* (1989b) realizaram um segmento microscópico, com cortes semifinos e em nível ultra-estrutural de línguas de ratos irradiadas e observaram degranulação de mastócitos significativamente aumentada nos grupos irradiados.

El Sayed e Dyson (1990) realizaram um trabalho em pele íntegra e lesada utilizando lasers que emitiam seis diferentes comprimentos de ondas com fluência de 10,8 J/cm². Observaram a degranulação e o número de mastócitos nesses grupos e demonstraram que a pele íntegra, quando irradiada, produz um aumento do número de mastócitos, sem que haja, porém, degranulação. Na pele lesada, houve o mesmo aumento de mastócitos seguido da respectiva degranulação.

Os parâmetros utilizados nos grupos foram diferentes. A equipe de El Sayed utilizou fluência quatro vezes a mais que a equipe de Trelles e, para análise dos mastócitos, ambos utilizaram diferentes técnicas. Houve também influência do modelo, que no primeiro foi de mucosa e, no segundo, de pele, sendo ambos muito heterogêneos do ponto de vista óptico. As irradiâncias utilizadas também foram diferentes, fato que foi significativo, inclusive, entre os diferentes grupos irradiados no primeiro experimento do grupo de Trelles.

Ainda a respeito desses experimentos, Rigau (1996) observou que os mastócitos e os mediadores biologicamente ativos que são liberados durante a degranulação são elementos-chave durante a primeira fase inflamatória da cicatrização de feridas, tanto no papel que desempenham na permeabilidade vascular como na liberação de substâncias que influenciam na regulação da migração linfocitária e na adesão molecular das células endoteliais a partir dos capilares venosos. E observou também sua importância nos processos imunológicos em nível cutâneo, como demonstrado nos experimentos de Kaminer *et al.* (1991), Reich *et al.* (1991) e van Neste (1991).

Sasaki e Ohshiro (1997) realizaram um estudo sobre os efeitos do diodo laser operando em 830nm na reparação tecidual, utilizando modelo de pele de ratos. Nesse trabalho, promoveram feridas padronizadas em vinte animais, irradiadas com laser de 60mW de potência óptica com fluência de 24 J/cm², em um período de sete dias, diariamente. Foram avaliadas alterações nas citocinas, principalmente na interleucina-6 (IL-6), por ser mais típica e de fácil detecção.

Os pesquisadores observaram que em dois dias de pós-operatório havia um melhor controle inflamatório e, na questão histológica, houve uma diferença significativamente maior na quantidade de citocinas. Além disso, observaram que nos grupos irradiados houve um grande número de neutrófilos, que estavam presentes mais cedo nos tecidos subcutâneos em relação ao grupo-controle e que desapareceram igualmente mais rápido. A conclusão dos pesquisadores é que o laser de baixa potência induz mais rapidamente à fase proliferativa e aumenta os níveis de IL-6.

Stadler *et al.* (1999) estudaram os efeitos sobre os linfócitos utilizando o laser de corante operando em 660nm, emitindo na região do visível e de diodo laser operando em 830nm, emitindo na região do infravermelho próximo. Os pesquisadores irradiaram linfócitos em suspensão com diferentes fluências, que variavam entre 0,1 e 5 J/cm², na presença e ausência de eritrócitos.

A irradiação com o primeiro diodo laser, na presença de eritrócitos, aumentou significativamente a resposta de proliferação dos linfócitos, sendo a maior resposta detectada com a fluência de 3 J/cm². Para o segundo diodo laser, a maior interação ocorreu com fluência de 1,5 J/cm². Os pesquisadores observaram que, na ausência de eritrócitos, o efeito da irradiação mostrou uma fraca relação dose-resposta.

Anderson *et al.* (1981, *apud* ALBERTINI, 2001), utilizaram o laser de AlGaAs (620–680nm) e comprovaram que a reflexão da pele é de 4% a 7%, concluindo que 93% a 96% da radiação incidente na superfície penetra nos substratos subseqüentes, atuando de forma sistêmica.

2.4.2 Efeitos locais do laser de baixa potência

Kameya *et al.* (1995) apresentaram um estudo em ratos no qual irradiaram feridas padronizadas nesses animais com diodos laseres emitindo diferentes comprimentos de onda (632,8 nm, 680 nm e 830 nm). Observaram diferenças macroscópicas significativas nos grupos irradiados em relação aos grupos-controle, embora essas diferenças não fossem estatisticamente significantes entre os diferentes grupos irradiados. Histologicamente, eles observaram que os três grupos irradiados apresentaram maior proliferação de tecido conjuntivo e maior presença de vasos sanguíneos quando comparados aos grupos-controle.

Reddy, Stehno-Bittel e Enwemeka (1998) realizaram um estudo sobre os efeitos da foto-estimulação laser sobre a produção de colágeno em tendões de Aquiles de coelhos. Foram realizadas lesões nos tendões seguidas de imobilização das patas dos animais com talas de poliuretano. O tratamento foi feito com laser de He-Ne, com aplicações diárias, utilizando fluência de 1 J/cm² durante catorze dias consecutivos. As análises bioquímicas revelaram um aumento de 26% na concentração de colágeno, indicando um processo de cicatrização mais rápido nos tendões dos animais irradiados, em relação ao grupo-controle não irradiado.

Almeida-Lopes *et al.* (1999) apresentaram um estudo clínico em pós-operatório de 150 pacientes submetidos à cirurgia oral menor, utilizando o mesmo protocolo de estudo *in vitro* que haviam publicado anteriormente (ALMEIRA-LOPES *et al.*, 1998).

Os pacientes foram divididos em três grupos: um grupo-controle não irradiado, um irradiado com diodo laser operando em 635 nm e outro com diodo laser em 780 nm. As aplicações foram realizadas no pós-operatório imediato, aos sete dias e catorze dias após a intervenção cirúrgica, quando necessário. A fluência utilizada foi de 2 J/cm². Os grupos irradiados apresentaram cicatrização significativamente mais rápida, além de qualidade estética superior, quando comparados ao grupo-controle. Não houve diferença significativa entre os grupos irradiados com diferentes comprimentos de onda.

2.4.3 Efeitos da vascularização

Os efeitos da vascularização foram subdivididos em microcirculação, fluxo linfático e imunidade, especificando-se, assim, cada efeito, quando utilizado o laser de baixa potência.

2.4.3.1 Microcirculação

Benedicenti (1982) comprovou o aumento do grau de vascularização do tecido neoformado, quando se irradiava uma ferida em processo cicatricial com o laser de baixa potência, demonstrando que aumentou o fluxo de sangue em capilares mesentéricos após a irradiação com um diodo laser operando em 904 nm, fenômeno confirmado por Miró *et al.* (1984).

Estes pesquisadores utilizaram como modelo de estudo o leito ungueal e irradiaram com um diodo laser de GaAs, observando o aumento da circulação na região após a irradiação. O aumento do fluxo sanguíneo continuou durante vinte minutos após o cessamento da aplicação com laser, inclusive quando a área-alvo foi esfriada.

Trelles, Mayayo e Iglesias (1983) publicaram um estudo realizado em olho de coelho, no qual foi mais uma vez comprovado o aumento da circulação na região. Resultados parecidos foram obtidos por Mayayo e Trelles (1984), quando irradiaram mucosa anal de ratos.

Miró *et al.* (1984) concluíram que a vasodilatação e o aumento da microcirculação eram resultantes do aumento do metabolismo tecidual e da normalização da homeostase.

2.4.3.2 Fluxo linfático

Um autor que trabalhou muito no tema de efeitos do laser de baixa potência na atividade do sistema linfático foi Lievens, que publicou vários estudos deveras elucidativos na área (1986; 1988; 1990; 1991).

O último experimento publicado pelo pesquisador foi de grande porte, realizado com 50 ratos, nos quais fez incisões na região abdominal e irradiou-as com laser de He-Ne e diodo laser de GaAs operando em 904 nm. Lievens (1991) procurou avaliar a adesão pós-operatória, o edema local e a regeneração de veias e de vasos linfáticos da região mesentérica. Observou que houve rápida instalação do fluxo linfático na região irradiada com o laser.

A regeneração dos vasos linfáticos nos animais tratados com a terapia laser foi rapidamente restabelecida, em comparação com o grupo-controle não irradiado. No grupo-controle, a regeneração apresentava-se incompleta aos 55 dias após o ato cirúrgico. Em contrapartida, o grupo irradiado apresentava regeneração completa em nove dias.

Foi também observada pelo autor a formação de uma neovascularização em um tempo significativamente menor nos animais tratados pela terapia laser, que ocorreu em menos da metade do tempo que dos animais do grupo-controle. Houve, ainda, escassez de adesão peritonal nos grupos tratados, enquanto foi comum observar a adesão nos grupos-controle.

Labajos (1986) observou que após a irradiação do intestino de ratos com um diodo laser de As-Ga emitindo no infravermelho próximo, com fluência de 1 J/cm², o fluxo de água e eletrólitos através da parede do intestino dos animais do grupo tratado foi retardado, simultaneamente com um incremento do potássio intracelular.

2.4.3.3 Imunidade

Mester *et al.* (1977), trabalhando em um experimento sobre cicatrização de feridas, e Trelles em 1986, estudando a ação do laser de He-Ne sobre herpes genital, especularam que esse tipo de laser poderia agir sobre a função imunológica, envolvendo principalmente os leucócitos que aumentariam a fagocitose.

Publicações que envolvem estudos com vírus e bactérias utilizando esse tipo de laser promovem muitas controvérsias e são pouco esclarecedoras. Trelles (1986), demonstrou que o laser de baixa potência atua como tratamento efetivo na prevenção dessas infecções *in vivo*.

O autor irradiou pacientes com surto de herpes genital, utilizando na pesquisa o laser de He-Ne. Veléz-González *et al.* (1994) associaram o tratamento com acyclovir ao laser em herpes labial e facial. Utilizaram no estudo clínico sessenta pacientes, tratando um grupo com He-Ne, associando, num segundo grupo, o laser de He-Ne ao acyclovir e utilizando, num terceiro grupo, somente acyclovir.

Os pesquisadores observaram que os melhores resultados foram obtidos nos grupos tratados com a associação de laser de He-Ne e acyclovir. Outros pesquisadores também demonstraram a efetividade desse tratamento na prevenção da nevralgia pós-herpética. Iijima (1991) apresentou um trabalho com dezoito pacientes portadores desse tipo de alteração, e tratou-os com laser de He-Ne, obtendo resultados favoráveis.

Alguns trabalhos *in vitro*, porém, demonstraram que o laser de baixa potência é capaz de estimular o crescimento da virulência de bactérias e vírus em cultivo ou cultura. Gilioli *et al.* (1985) estudaram os efeitos do diodo laser de GaAs em HSV1 e HSV2 *in vitro* e observaram que esses vírus foram estimulados pela ação do laser. Rubenstein (1987) publicou um experimento com 57 pacientes portadores de lesões ulcerativas vulvares induzidas por papiloma vírus (HPV).

Promoveu a remoção com o laser cirúrgico de CO₂ e irradiou o leito cirúrgico com diodo laser, emitindo na região do infravermelho próximo, com potência de 25 mW, duas vezes por semana, com irradiância de 22 mW/cm². Os resultados foram significativamente benéficos, em cerca de 45% dos casos tratados.

Existe ainda muita polêmica sobre esse assunto, porém, pesquisadores como Trelles (1986), Tunér e Hode (1996) e Veléz-González *et al.* (1994), entre outros, atribuem esse efeito antiviral do laser de baixa potência, que foi demonstrado *in vivo*, possivelmente ao efeito estimulador do sistema imunológico local e sistêmico.

Ruffolo (1985) obteve bons resultados em um trabalho no qual utilizou laser de baixa potência no tratamento de leucoplasias, para alívio sintomático daqueles pacientes. O autor atribui a normalização da área afetada à estimulação da imunidade local dos pacientes tratados.

Mayayo e Trelles (1986) estudaram ratos portadores de aplasia tímica e os induziram a septicemia. Os animais foram irradiados a cada dois dias, com fluência entre 2 e 4 J/cm². Os animais que foram irradiados sobreviveram mais tempo que os não irradiados.

Carrilo *et al.* (1987) fizeram um estudo *in vitro* sobre o crescimento de uma cepa de *Stafilococcus aureus*, no qual utilizaram laser de He-Ne com fluências de 0,3 J/cm² e 6 J/cm². Os pesquisadores não observaram nenhum crescimento significativo.

Skobelkin, Michailov e Zakharovt (1991) realizaram um experimento clínico em pacientes oncológicos que tinha como propósito a ativação do sistema auto-imune dos pacientes no pré-operatório. Trabalharam com sessenta pacientes e propuseram que a terapia fosse utilizada como coadjuvante em pacientes portadores de imunodeficiências.

Os pacientes foram divididos em quatro grupos e irradiados no pré-operatório imediato. Um grupo-controle e outro irradiado através da pele sobre os linfonodos com diodo laser operando em 890 nm, outro irradiado internamente sobre as lesões com laser de He-Ne, e outro com associação de ambos os métodos de irradiação.

O experimento avaliou componentes de células brancas do sangue, ensaios de atividade imunoglobulínica (IgA, IgM e IgG) além de determinar o comportamento de frações de linfócitos T. A avaliação foi realizada antes e depois das irradiações. Os pesquisadores observaram que a resposta imunológica dos pacientes irradiados foi significativamente maior do que a do grupo-controle.

Filonenko (1995) desenvolveu um estudo dos efeitos laser de baixa potência na defesa imunológica específica e não específica. O tratamento foi utilizado como prevenção de complicações pós-operatórias em alterações de joelho e em pós-cirúrgicos de *lifting* facial cirúrgico.

Wei *et al.*, em 1997b, estudaram a ação do laser de corante operando em 630 nm em ratos portadores de septicemia crônica. Os pesquisadores queriam verificar se o laser de baixa potência tinha efeito estimulativo na resposta auto-imune em septicemia, usando modelo animal. Os ratos foram submetidos a uma cirurgia na cavidade abdominal. A irradiação foi feita no pós-operatório imediato com fluências de 5 J/cm². Em um experimento a parte,

linfócitos de ratos normais *in vitro* foram utilizados para verificação dos efeitos bioestimuladores do laser.

Os pesquisadores observaram que *in vivo* o laser de baixa potência aumenta significativamente a proliferação de linfócitos nos ratos com septicemia, bem como o tempo de sobrevivência desses animais, quando comparados aos do grupo-controle não irradiado. Os pesquisadores observaram *in vitro* que o laser de baixa potência estimulou significativamente a proliferação de linfócitos na presença de estímulo nitrogênico e aumentou a resposta imunológica e a sobrevivência dos ratos com septicemia.

A revisão dos estudos demonstrou que a ação do laser de baixa potência na cicatrização dos tecidos *in vivo* depende de mecanismos complexos envolvendo atividades celulares e humorais. Para que se possam analisar os eventos individualmente, a próxima seção apresenta uma revisão da ação do laser de baixa potência *in vitro* sobre as principais células envolvidas no processo cicatricial.

2.5 Revisão dos efeitos do laser na cicatrização *in vitro*

A revisão pretende demonstrar, segundo diversos autores, quais as influências que a terapia de baixa potência exerce no processo cicatricial *in vitro*, apresentando-se suas vantagens e desvantagens.

2.5.1 Cultura de células

Freshney (1990) demonstrou que o estudo *in vitro* utilizando cultura de células tem sido muito usado devido à facilidade de padronização da amostra, cujo controle de pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e de O₂ pode ser obtido de maneira precisa, além de conseguirem amostras totalmente homogêneas. Existem, porém, algumas desvantagens nesse tipo de estudo, como por exemplo, a necessidade de trabalhar-se em um ambiente estéril e asséptico, o que limita muitas vezes os protocolos. Além disso, exige prática do pesquisador e, também, o material obtido em cultura é bem pequeno, ainda que o custo de uma pesquisa utilizando células em cultura seja muito maior que a mesma pesquisa realizada com animais.

Menegaux *et al.* *apud* Kawahara, Yamagami e Nakamura (1968), relatam em estudo realizado em 1934, que o primeiro estudo *in vitro* sobre materiais implantados foi realizado em medicina na área ortopédica. Foram realizados por Kawahara *et al.* e Grant *apud* Kawahara, Yamagami e Nakamura (1968) estudos *in vitro* na área da odontologia, utilizando cultura de células para avaliar a citotoxicidade de materiais dentários.

Pode-se avaliar o dano celular observando-se a morfologia celular, os efeitos na membrana, atividade celular e índice de proliferação celular. Em 1959, Bergman *apud* Spangberg (1969) induziu o método de contagem celular e o número de mitoses para avaliar o dano celular, misturando a suspensão celular e a solução-teste em uma câmara de cultura apropriada. A câmara consiste em um anel de vidro fixado a uma lâmina. Logo após a fixação e coloração da cultura, as células e mitoses são contadas.

Diversos métodos de avaliação do dano celular foram propostos. Em 1965, Guess *et al.* *apud* Schmalz (1994) afirmaram que os efeitos de membrana poderiam ser demonstrados pelo vermelho neutro, que é armazenado em células viáveis e liberado no meio circulante após o dano celular. Esse método é considerado subjetivo.

Spangberg (1973) avaliou a citotoxicidade do material, introduzindo o método de medida da liberação do isótopo radiativo incorporado no interior das células (cromo radioativo – ^{51}Cr), com base no dano celular depois do contato material com a célula.

Para avaliar a quantidade do dano celular, foi usada a liberação de marcadores radioativos de células-alvo. Expondo-se a célula aos materiais tóxicos, ocorre dano celular e liberação de DNA marcado e pode-se medir e indicar o dano celular. Essa técnica tem sido utilizada em grande escala como teste de avaliação para muitos materiais dentários, cuja vantagem é ser um método rápido, altamente sensível, que possibilita contato adequado com o material-célula e permite a quantificação objetiva do dano celular com excelente precisão.

A Federação Dentária Internacional, em 1980, recomendou que a avaliação da toxicidade de materiais dentários fosse feita segundo os níveis biológicos, o seja, testes iniciais, testes secundários e testes de uso.

Schmalz (1994) propôs um outro método baseando-se na exclusão do corante Azul de Trypan, o qual penetra nas células mortas, com lesão da membrana celular. Isso, contudo, não ocorre nas células vivas, que apresentam membrana íntegra.

De acordo com Baserga (1990), as células em cultura poderiam crescer por aumento no tamanho da célula ou por aumento do seu número. A contagem de células em uma placa de Petri demonstra o quanto a população celular cresceu, porém não informa se as células estão

ou não se proliferando. Quando se deseja determinar a capacidade de estimular ou inibir a divisão celular, o método mais indicado é contar o número de células antes e depois do tratamento, de preferência a cada 24 horas. O melhor parâmetro para determinar se uma população celular está crescendo ou não é contar o número de células por placa de cultura.

Ciapetti *et al.* (1996) demonstraram que os métodos que empregam a incorporação de nucleotídeos, ainda que sejam sensíveis, apresentam desvantagens, como uso de equipamentos e sala específicos, perigo de manuseio dos marcadores radioativos, bem como geração de resíduos radioativos.

Segundo Mjör, Hensten-Pettersen e Orstavik, (1985), a citotoxicidade de material dentário *in vitro* foi avaliada por meio de medidas de crescimento celular, alterações na permeabilidade de membrana, alterações metabólicas ou alterações citopáticas.

Browne e Tias (1979) revisaram o tema da dependência celular sobre o resultado da citotoxicidade *in vitro*. Segundo os pesquisadores, em relação ao tipo celular a ser utilizado no estudo, muitos aspectos desses testes são relevantes para a simulação do uso clínico de materiais dentários, como o tipo de célula usada, o método de contato dela com o material, estado físico do material e o método de avaliação da citotoxicidade. Os pesquisadores concluíram, porém, que o tipo de linhagem celular experimental empregada na pesquisa não era um fator decisivo na determinação da toxicidade de um material.

De acordo com Schmalz (1994), podem ser utilizados dois tipos de células: uma linhagem de células permanentes derivadas de coleções do tipo cultura ou fontes comerciais e uma linhagem de células primárias, derivadas de *explants* e estabelecidas em cada laboratório individualmente. O autor afirma que a escolha do método de registro deve ser baseada na informação que se deseja e preconiza o uso de métodos mais simples, baseados nos efeitos de membrana ou no índice de proliferação celular. Caso ocorra a necessidade de informação mais detalhada, deverão ser usados métodos mais sofisticados, baseados na atividade celular. O autor ainda acredita que o uso do índice de proliferação para registrar o dano celular é um dos métodos mais antigos e mais comumente usados. A contagem celular direta apresenta vantagens, pois é um método de fácil realização e, além disso, pode ser combinado com corante vital, a fim de excluir as células mortas.

2.5.2 Estudos *in vitro*

Para melhor entendimento dos estudos da TLBP *in vitro*, apresentase a seguir breves exposições sobre angiogênese, sistema imunológico, queratinócitos, células epiteliais, enzimas e fibroblastos.

2.5.2.1. Angiogênese

Trelles *et al.* (1988) fizeram uma pesquisa em língua de ratos para verificar o nível de histamina local e sistêmica, após tratamento com laser emitindo na região do visível, operando em 632,8 nm, com potência de 4 mW e de 50 mW e fluência de 2,4 J/cm². Observaram no local da irradiação dos grupos que utilizaram potência de 4 mW um aumento de 100% de histamina, e, nos grupos com potência óptica de saída de 50 mW, um aumento de 30%. Os pesquisadores observaram diferença significativa na liberação de histamina em nível sistêmico, em relação aos grupos-controle.

El Sayed e Dyson (1990) usaram diodos laser com vários comprimentos de emissão de onda (λ= 660, 820, 870, 880, 940, 950 nm) sobre modelo animal. A irradiação foi realizada com luz comum no grupo-controle. Quando promoveram a irradiação da pele normal com qualquer um dos comprimentos de onda do laser, houve maior número de mastócitos, embora sem degranulação.

Os grupos irradiados com luz comum, no entanto, apresentaram resultados nulos. Quando irradiaram a pele lesada, porém, observaram aumento, tanto do número como na degranulação dos mastócitos, em comparação com os grupos-controle irradiados com luz comum. Os pesquisadores revelaram que controlaram a temperatura local dos animais em 1,8° C, que se normalizou aos quatro minutos, e não atribuíram os resultados conseguidos no experimento a esse fato.

2.5.2.2 Sistema imunológico

O sistema imunológico é vital para o organismo humano. Por esta razão, muitos estudiosos desenvolveram interesse em pesquisar os efeitos que o laser de baixa potência

poderia exercer sobre alguns componentes desse sistema. Enumeram-se nesta seção alguns estudos que se julgam ter obtido bons resultados à imunologia humana. Devido à diversidade do sistema imunológico, optou-se por ressaltar, na discussão, os aspectos referentes às linhas hematológicas, linfócitos, macrófagos e granulócitos.

Em relação a estudos das linhas hematológicas, Viscor, Palacios e Palomeque, (1989) utilizaram o laser de He-Ne com irradiância de $0,5 \text{ mW/cm}^2$ para observar a curva de fragilidade osmótica de eritrócitos. Nos grupos irradiados com laser, foi observada uma alteração da viscoelasticidade da membrana eritrocitária sem que se evidenciasse alteração em sua estrutura.

Vicent *et al.* (1991) observaram a ação do laser de corante sobre células sanguíneas. Para tanto, irradiaram o sangue de coelhos e humanos. Observaram que o comprimento de 630 nm foi intensamente absorvido pelo sangue. Com um hematócrito entre 42 e 50 e uma espessura de fluxo de sangue de $0,15 \text{ mm}$, houve a absorção de 42% da luz e quando a espessura do fluxo foi de 1 mm , a absorção foi de 80% da energia laser, com uma transmissão de 20%.

Callaghan *et al.* (1996) estudaram a ação da emissão do diodo laser na região do visível, operando em 660 nm , sobre uma linhagem de células hematopoiéticas U937. Usaram fluências que variavam de $1,0$ a $11,5 \text{ J/cm}^2$. Houve grande significância no aumento da síntese de DNA quando utilizaram fluências de $2,9$ e $8,6 \text{ J/cm}^2$.

Em relação a estudos relacionados aos linfócitos, Ohta, Abergel e Uitto (1987) estudaram os efeitos do diodo laser de GaAs sobre esse tipo de célula, com diversas fluências. Os pesquisadores observaram, porém, que quando os linfócitos foram irradiados com fluência de $10,8 \text{ J/cm}^2$, houve uma inibição da proliferação celular.

Chio, Lin e Kao (1990) estudaram os efeitos de três lasers diferentes (He-Ne, AlGaAs e Argônio) sobre linfócitos *in vitro*. Foi observado que o índice mitótico era inversamente proporcional à fluência de irradiação e que as rupturas cromossômicas aumentaram proporcionalmente com a fluência. Com o laser de He-Ne e com o diodo laser de AlGaAs não se observou nenhuma alteração significativa, em comparação ao grupo-controle, tanto no índice mitótico como nas rupturas cromossômicas.

Karu (1991) realizou estudo com linfócitos irradiados com laser de He-Ne, utilizando a fluência de 56 J/cm^2 , e concluiu que o laser proporcionou um aumento no fluxo de íons de cálcio em alguns minutos e um aumento da síntese de DNA a longo prazo.

Volpi *et al.* (1995) estudaram o laser de He-Ne para verificar a ação do laser de baixa potência sobre granulócitos e linfócitos. Observaram passados trinta minutos da irradiação que se produziu nos linfócitos um aumento estatístico significativo de ATP e, aos sessenta minutos, o mesmo se deu nos granulócitos, sem modificação no total de adenilato da célula.

Manteifel, Bakeeva e Karu (1997) estudaram as alterações ultra-estruturais em mitocôndrias de linfócitos humanos após irradiação com laser de He-Ne, com fluência de 56 J/cm². Logo após a aplicação do laser nas células, foram realizados cortes ultrafinos para análise em microscópio eletrônico. A conclusão dos pesquisadores foi de que as células irradiadas tiveram um aumento de 20% no número de perfis mitocondriais na secção celular sem aumento em sua área total e que o número de mitocôndrias foi reduzido.

Em relação a estudos referentes à ação do laser em macrófagos e granulócitos, alguns experimentos merecem menção.

Hubacek *et al.* (1985) estudaram os efeitos do laser de He-Ne sobre a atividade fagocitária de neutrófilos cultivados com cristais de cádmio. Utilizaram fluências diversas (0,3; 0,7 e 1,5 J/cm²). Na primeira fluência, não observaram efeito significativo sobre a fagocitose. A segunda fluência, porém, estimulou a atividade fagocitária e a terceira produziu inibição desse fenômeno.

Karu *et al.* (1989) estudaram os efeitos do laser de He-Ne sobre a atividade fagocitária de neutrófilos, verificando que houve um incremento dessa atividade nos grupos irradiados em comparação ao grupo-controle não irradiado. Osanai *et al.* (1990), por sua vez, estudaram a ação fagocitária de neutrófilos utilizando um diodo laser de AlGaAs. Os pesquisadores não observaram nenhuma alteração que fosse significativa nos grupos irradiados em relação ao grupo-controle não-irradiado.

Estudos feitos por Bolton, Dyson e Young (1991) e Bolton, Young e Dyson (1992) para verificar a ação do diodo laser operando em 820 nm sobre cultivo de macrófagos apresentaram resultados relevantes. Os pesquisadores irradiaram os cultivos, aspiraram seu meio e o colocaram em cultivo de fibroblastos, observando a replicação dessas células. Ao utilizarem irradiância de 400 mW/cm² e fluências variando de 2,4 a 7,2 J/cm², verificaram um aumento significativo na população de fibroblastos. Utilizando o mesmo protocolo, estudaram se a luz polarizada poderia afetar a proliferação dessas culturas. Fizeram comparações entre lasers com polarização de 95% e de 14% e concluíram que a primeira polarização era mais eficaz que a segunda.

Trabalhando com o mesmo protocolo, Rajaratnam, Bolton e Dyson (1994) utilizaram diferentes frequências de emissão (2,28; 18,24; 292,3 e 1000 Hz) com fluência fixada em 7,2 J/cm², e concluíram que todas as frequências produziram um aumento significativo no número de fibroblastos, em comparação aos grupos irradiados com luz comum.

2.5.2.3 Queratinócitos e células epiteliais

Mester e Snow (1990) utilizaram o efeito do laser de He-Ne sobre a maturação e regeneração de *explants* neuroepiteliais olfatórios embrionários, com fluência de 0,5 J/cm². Os pesquisadores observaram diferença significativa em comparação aos grupos-controle.

Steinlechner e Dyson (1993) concluíram que o laser de He-Ne e o diodo laser operando em 904 nm estimularam a proliferação de queratinócitos e houve redução dessa proliferação quando o cultivo apresentava-se confluyente. Os pesquisadores também observaram que o efeito foi muito importante quando as células cresceram em meio de cultivo pobre em soro (1%) e que o efeito bioestimulador do laser produziu-se com fluência extremamente baixa (0,25 J/cm²).

Hsin-Su *et al.* (1996) observaram a ação do laser de He-Ne em queratinócitos humanos em cultivo para avaliar os níveis de Interleucina-1a (IL-1a) e Interleucina-8 (IL-8), com fluência de 1,5 J/cm².

Os resultados demonstraram que houve aumento significativo na produção de IL-1a e IL-8 e suas respectivas expressões no RNAm, nos grupos irradiados com laser, em comparação aos resultados obtidos nos grupos-controle. Os pesquisadores verificaram ainda que esse efeito estimulador depende da concentração de células em cultura.

Grossman *et al.* (1998) estudaram os efeitos de diversas fluências sobre queratinócitos em cultivo, quantificando os parâmetros mais indicados de irradiação para o diodo laser operando em 780 nm que produzisse o efeito proliferativo sobre essas células.

Os autores concluíram que os melhores resultados foram atingidos nos grupos irradiados com fluências entre 0,45 e 0,95 J/cm², e que as demais fluências foram consideradas menos efetivas.

2.5.2.4 Enzimas

Ostuni, Passarella e Quaglianiello (1994) estudaram a atividade da enzima desidrogenase glutamato, utilizando um laser de He-Ne com diferentes fluências e irradiâncias. Para a fluência de 4 J/cm², uma irradiância de 1,7 mW/cm², em que foi observado o aumento da atividade enzimática com 10 mW/cm², houve diminuição na atividade enzimática; e, com fluência de 24 J/cm², para ambas as irradiâncias utilizadas (7 e 10 mW/cm²), houve aumento na atividade enzimática.

Bolton, Young e Dyson (1995) realizaram um estudo no qual verificaram os efeitos do diodo laser operando em 860 nm, com fluências de 2 e 6 J/cm², na proliferação celular de fibroblastos humanos de pele em linhagem primária e na atividade da succinato desidrogenase (enzima diretamente unida à cadeia de transporte eletrônico). A observação dos pesquisadores foi a de que, com fluência de 2 J/cm², os níveis dessa enzima aumentaram com a proliferação celular, efeitos esses que foram inibidos quando as células foram irradiadas com fluência de 16 J/cm².

2.5.2.5 Fibroblastos

Ryhanen, Rantala-Ryhanen e Tan (1982) estudaram as atividades enzimáticas das colagenases e gelatinases, que intervêm na degradação do colágeno. Os estudiosos cultivaram fibroblastos em meio isento de soro e irradiaram essas culturas com dois diferentes tipos de lasers, um de He-Ne e o outro diodo laser de GaAs, observando o comportamento das enzimas.

Os autores perceberam que não houve alteração na atividade enzimática, nem mesmo na atividade da elastase e concluíram que o aumento na formação de colágeno descrita no estudo não foi devido à diminuição em sua degradação, mas sim, a um aumento de sua síntese. O estudo de viabilidade celular, incubando-se fibroblastos com Azul de Trypan, não demonstrou alterações. A atividade do LDH e das enzimas intercelulares que se liberam do citoplasma quando há alteração da integridade de membrana celular também não apresentou alteração após a irradiação.

Gimenez e Casado (1985) fizeram um estudo sobre a respiração tissular e verificaram que a irradiação sobre as células *in vitro* teve um efeito bioestimulador, promovendo um

aumento do consumo celular de oxigênio e glicose. Houve, porém, uma resposta inibitória, com diminuição da respiração celular, quando a fluência excedeu 1 J/cm^2 .

Hallman *et al.* (1988) realizaram um estudo com o laser de He-Ne para observar a proliferação celular de fibroblastos humanos em cultivo. Os pesquisadores irradiaram essas células em diferentes passagens, verificando que entre a terceira e quarta, e entre a décima terceira e décima quarta passagens, não houve efeito significativo estimulador ou inibidor do laser.

Labbe *et al.* (1990) estudaram a incorporação de hidroxiprolina tritiada em linhagem de fibroblastos irradiados com diodo laser de AlGaAs. Os pesquisadores obtiveram aumento na absorção de hidroxiprolina tritiada nas culturas irradiadas.

Noble *et al.* (1992) promoveram um estudo que observou a migração de fibroblastos embrionários em uma matriz de colágeno polimerizado. Os pesquisadores verificaram que os fibroblastos fizeram mais paradas e de maior duração nas matrizes irradiadas e, portanto, sua velocidade de deslocamento foi menor. As matrizes irradiadas apresentaram maior retração. A conclusão dos pesquisadores foi que a turgidez do gel de colágeno poderia produzir um aumento do espalhamento (*scattering*) do laser, com conseqüente diminuição de sua transmissão e absorção, devido a fenômenos como a vibração do gel, que poderia ter detido o avanço dos fibroblastos.

Wei, Naim e Lanzafame (1994) estudaram o efeito do diodo laser operando em 660 nm na produção de bFGF, em cultura de fibroblastos 3T3 (linhagem preestabelecida). Os pesquisadores analisaram duas diferentes fluências: $3,2 \text{ J/cm}^2$ e $2,1 \text{ J/cm}^2$.

Os fibroblastos irradiados com menores fluências demonstraram aumento na proliferação celular e na produção de bFGF, enquanto que aqueles submetidos a fluências maiores não demonstraram aumento na proliferação celular, nem nos níveis de bFGF, em relação aos grupos-controle não irradiados.

Rigau (1996) estudou o efeito do laser de corante operando em 633 nm na morfologia e comportamento de fibroblastos de linhagem primária em cultivo. Utilizou um equipamento com potência óptica de saída de 38 mW, com fluência de 2 J/cm^2 e irradiância de 4 mW/cm^2 . A pesquisadora concluiu que esse tipo de laser induziu vários efeitos biológicos nos fibroblastos dos grupos irradiados, como formação de colônias, movimento de quimiotaxia e quimiocinética.

Webb, Dyson e Lewis (1998) estudaram os efeitos do diodo laser operando em 660 nm sobre duas linhagens primárias de fibroblastos humanos, uma originada de tecido normal e

outra de cicatriz hipertrófica. Usaram fluências de 2,4 e 4 J/cm². Ambos os grupos estudados tiveram um aumento significativo na proliferação celular, em comparação com os grupos-controle não irradiados.

Almeida-Lopes (1998), por sua vez, realizou um estudo-piloto em fibroblastos de gengiva humana, no qual trabalhou com dois tipos diferentes de diodos lasers, operando em 630 nm e 780 nm. A pesquisadora irradiou os fibroblastos previamente divididos em grupos com diferentes concentrações de soro fetal bovino. Verificou que houve proliferação significativa para os fibroblastos cultivados em meio com déficit nutricional e irradiados, quando comparados com os grupos-controle cultivados com o mesmo meio e não irradiados.

A pesquisadora, porém, não observou diferença significativa, tanto nos grupos irradiados, como no grupo-controle, quando os fibroblastos foram cultivados em condições nutricionais ideais. Também não foi observada diferença significativa nos resultados obtidos com os diferentes comprimentos de onda.

3. OBJETIVO

3 OBJETIVO

O estudo relatado teve como objetivo comprovar a profundidade da lesão padronizada de queimadura de terceiro grau, através do material biológico cutâneo obtido na primeira biópsia.

Além disso, investigar o efeito da Terapia Laser de Baixa Potência (InGaAlP) com comprimento de onda de 658 nm no processo de cicatrização de queimadura de terceiro grau em ratos Wistar, através da análise das fibras colágenas e elásticas, utilizando-se a técnica de histomorfometria.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo, foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal em conformidade ao COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (ANEXO A).

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas no estudo trinta ratas Wistar, variação *albinus*, as quais passaram por um período de duas semanas de ambientação no Biotério do Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, sendo mantidos em gaiolas próprias, ambientadas em climatização a 23° C, e alimentados com ração LABINA®, *ad libitum*, segundo os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA, 1991) e as Normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais Lei nº 6638 (BRASIL, 1979).

A tabela 7 descreve a divisão dos grupos, número de animais, técnicas estabelecidas e cronograma da pesquisa.

Tabela 7: Divisão dos grupos e subgrupos de animais segundo cada técnica utilizada e cronograma de sacrifício

Grupos	Grupos Nº de animais	Biópsia	Sacrifício
Terapia convencional	10	Imediatamente após a lesão e no 15º dia experimental	No 15º dia, seguido à retirada da última biópsia
Terapia LASER	10	Imediatamente após a lesão e no 15º dia experimental	No 15º dia, seguido à retirada da última biópsia
Terapia convencional + LASER	10	Imediatamente após a lesão e no 15º dia experimental	No 15º dia, seguido à retirada da última biópsia

Fonte: dados de pesquisa.

No dia em que foi realizado o processo de queimadura, os animais foram pesados e, logo após, foi ministrada Ketamina na dose de 4mg/Kg im., com agulha e seringa estéreis descartáveis. Após vinte minutos, foi aplicado o analgésico Dipirona Sódica na dose de 0,01mg/Kg iv, em veia caudal. A anestesia foi ministrada através de injeção intramuscular

com seringa de insulina descartável, e a analgesia por injeção intravenosa, também com seringa descartável. Em seguida, foi feita a tricotomia no dorso superior do animal, logo abaixo da cabeça. A queimadura de terceiro grau foi efetuada com uma lâmina circunferencial de metal (alumínio) medindo 3 cm de diâmetro e 5,5 mm de espessura (figura 4). O controle da temperatura da referida lâmina foi realizado através de termômetro digital em 100° C.

A lâmina foi mantida sobre a região do dorso superior do animal por um período de cinco segundos. Logo após, ainda sob os efeitos analgésico e anestésico, foi realizada a retirada do material biológico para a primeira biópsia, com Punch de 3 mm de diâmetro, constatando-se assim, a profundidade da lesão.

A figura 4 demonstra a queimadura padronizada no dorso da rata.

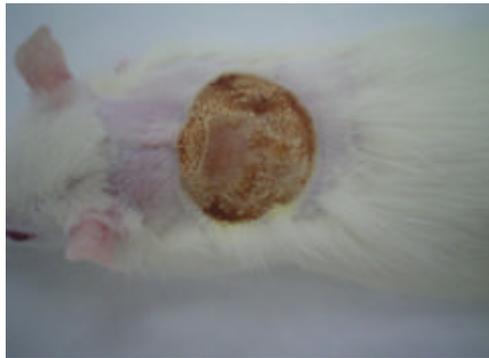


Figura 4: Queimadura em dorso de rata

Fonte: dados de pesquisa

A figura 5 apresenta a biópsia que foi feita logo após a realização da queimadura, sem nenhum tipo de tratamento.



Figura 5: Biópsia realizada logo após queimadura.

Fonte: dados de pesquisa.

A figura 6 demonstra a condição da queimadura no 15º dia de tratamento somente a laser.



Figura 6: Lesão no 15º dia de aplicação laser.

Fonte: dados de pesquisa.

O diodo laser (InGaAlP), utilizado no primeiro e segundo grupos pesquisados, fornecia o comprimento de onda de 658 nm de diodo, com intensidade de 3 J/cm², aplicados em cinco pontos, em uma área de 3 cm de diâmetro, realizadas em oito sessões, em dias alternados, durante um período de quinze dias, respectivamente. A aplicação está demonstrada na figura 7.



Figura 7: Aplicação do diodo laser (InGaAlP).

Fonte: dados de pesquisa.

Os animais foram manipulados durante a aplicação do diodo laser, sob sedação e analgesia, para que não sofressem estresse no decorrer do estudo. Assim, foi possível a

aplicação nos cinco pontos protocolados para o tratamento junto à lesão padronizada de queimadura. Os animais que não receberam a terapia laser também foram submetidos à sedação e analgesia, durante a realização dos curativos com sulfadiazina de prata, pelos mesmos motivos relatados anteriormente.

4.2 Técnica histológica

A técnica histológica consiste na preparação do tecido biológico, conservando-o o mais próximo possível das características do organismo vivo, ou seja, de modo que sua estrutura e composição molecular sejam as mesmas que havia no corpo vivo para que possam ser estudadas com auxílio da microscopia óptica.

Para isso, existem etapas específicas durante o processamento do material biológico, que devem ser rigorosamente respeitadas para a conservação de tais características. Dentre essas etapas, está a fixação, com a finalidade de evitar autólise, que consiste na digestão dos tecidos pela presença de enzimas no interior celular. Para a fixação, foi utilizada a solução isotônica de formaldeído a 4 %, um fixador rotineiro para microscopia óptica.

Após terem passado pela fixação, os fragmentos teciduais devem apresentar uma consistência firme, para que possam sofrer uma secção delgada, favorecendo a observação pela microscopia. Para tanto, devem ser embebidos em parafina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Este processo é denominado embebição ou inclusão e consiste em duas etapas: desidratação e clareamento. O procedimento é realizado a partir da extração da água do fragmento biológico, que foi submetido a diversos banhos em soluções de concentrações crescentes de etanol em água, iniciando com etanol a 70 % até chegar a 100 %.

Após o processo de desidratação com o etanol, o fragmento é mergulhado em xilol, pois essa substância é miscível, tanto em etanol como em parafina. A partir desta fase, o fragmento biológico apresenta uma característica de transparência e, a seguir, será incluído em parafina previamente derretida em estufa a 58-60° C. O calor desprendido no processo provoca a evaporação do solvente e ocorre o preenchimento dos espaços teciduais com parafina. O bloco rígido contendo o tecido foi levado ao micrótomo e seccionado em lâmina de aço fornecendo cortes de 4 µm de espessura.

O próximo passo é a coloração com hematoxilina-eosina (HE), *pricosirius-red* e orceína, facilitando evidenciar os vários componentes teciduais, a fim de que se promova a

distinção entre eles.

As preparações coradas foram examinadas em microscopia óptica com um limite resolutivo que pode variar entre 1.000 a 1.500 vezes a ampliação da imagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

4.2.1 Processamento de material para corte histológico

O material histológico foi processado em diversas etapas. A primeira é denominada fixação. Nessa etapa, o material biológico foi colocado em formol tamponado por um período de 24 horas, depois das quais seguiu-se a lavagem em água corrente durante 25 minutos.

A segunda etapa é a desidratação. O material foi colocado em álcool 70 % durante 30 minutos, álcool 80 % durante 30 minutos, álcool absoluto I durante 30 minutos, álcool absoluto II durante 40 minutos e, por último, álcool absoluto III durante toda a noite (*overnight*).

A terceira etapa é a diafanização, utilizando-se álcool/xilol por 30 minutos, xilol I por 30 minutos, xilol II por 30 minutos e xilol III por 50 minutos.

A quarta etapa é a impregnação, em que há infiltração do material biológico em parafina I por 40 minutos e parafina II por uma hora.

A quinta etapa é denominada de embebição ou inclusão. O tecido foi colocado em paraplast (para montagem dos blocos), onde foram cobertos com parafina, a qual não deve ultrapassar 60° C para não haver dano ao tecido.

A sexta etapa consiste em retirar o material biológico do paraplast e realizar o corte histológico em micrótomo com 4 µm.

A sétima etapa é a desparafinização, iniciando-se com banhos de xilol por um ou dois minutos; xilol II por dois minutos e xilol III por mais dois minutos.

A oitava etapa é a hidratação, na qual se introduziu o tecido em álcool absoluto de um a três minutos, em álcool absoluto II por dois minutos, em álcool absoluto III por mais dois minutos, em álcool 70 % por três minutos e H₂O destilada por dez minutos.

A nona etapa consiste na coloração com hematoxilina-eosina (HE) para observação histológica, *pricrosirius-red* para fibra colágena, e orceína para fibra elástica.

A décima etapa é a desidratação, que foi realizada através de banhos sucessivos com álcool 70 % por três minutos, eosina-floxina por três minutos, álcool 95 % por dois minutos,

álcool absoluto por um a dois minutos e álcool absoluto III por três minutos.

A décima primeira etapa é a diafanização, que consistiu-se na submersão do tecido em xilol por um a dois minutos, em xilol II por dois minutos e em xilol III por mais dois minutos.

Vale ressaltar que o volume de álcool e xilol deve ser de dez a vinte vezes maior que o volume do tecido.

4.3 Desbridamento de tecido necrótico

Segundo Gomes e Serra (1999), o desbridamento consiste na retirada de tecido necrótico por camadas até que a superfície profunda demonstre pontos de sangramento. No presente estudo, o desbridamento foi realizado com lavagem da área afetada com água corrente e PVPI (polivinilpirrolidina iodo degermante), utilizando gaze estéril para retirada da área necrótica. Após o desbridamento, foi aplicada terapia com sulfadiazina de prata no primeiro grupo, terapia com laser no segundo grupo e terapia laser mais sulfadiazina de prata no terceiro grupo pesquisado.

O laser de diodo utilizado no primeiro e segundo grupos fornecia o comprimento de onda de 658 nm, com fluência de 3 J/cm² por ponto de aplicação, em cinco pontos na área de 3cm de diâmetro, em oito sessões, em dias alternados, durante um período de quinze dias, respectivamente. A última sessão foi seguida do sacrifício do animal e retirada de material para biópsia.

4.4 Histopatologia e histomorfometria

Todas as amostras das lesões cutâneas obtidas foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7) por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histológicos de rotina detalhados na seção 4.2.1.

Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo modelo “820” *Spence*, obtendo-se seções de 4 µm de espessura. As lâminas histológicas foram

mantidas em estufa para secagem, e os cortes posteriormente submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, *picrosirius-red* e orceína para análise histológica.

A histomorfometria foi realizada através de imagens capturadas e avaliadas por sistema computadorizado de captura de imagens. Foi realizada captura de imagens de dez campos microscópicos aleatórios de cada lâmina histológica com câmera digital (aumento total 20X) do microscópio modelo Olympus BX 51. As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de fibras colágenas e elásticas e do diâmetro das áreas ulceradas das lesões ao final do experimento, com auxílio de marcação digital, através do programa *Image Pro Plus4*.

O *Image Pro Plus 4* é um *software*, que possui vários subprogramas e modos para armazenar as medições ou outros tipos de informação, para cada aplicação específica, mas que trabalham integrados dentro do programa principal.

4.5 Análise estatística

Todas as variáveis aferidas no estudo foram analisadas com o auxílio do programa *Graph PadInStat*[®]. A expressão dos valores está demonstrada em média aritmética e desvio-padrão. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido do pós-teste de Tukey-Kramer.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

As lâminas obtidas na primeira biópsia foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas histologicamente. Os resultados histológicos concluíram a presença de lesão coagulativa em todas as lâminas, característica de queimadura de terceiro grau (figura 8).

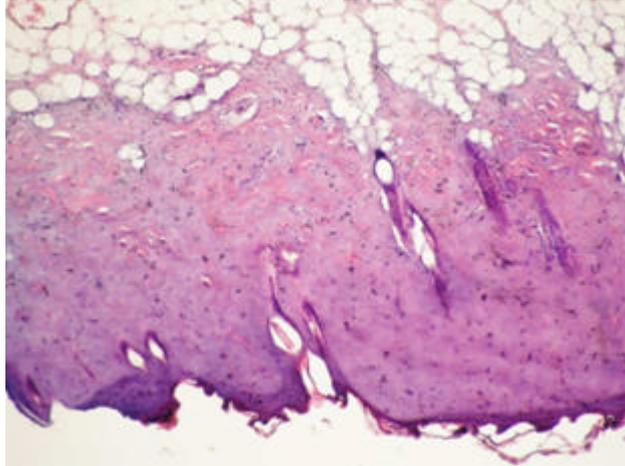


Figura 8: Fotomicrografia da primeira biópsia de tecido cutâneo de rato Wistar (aumento 20X), corado com hematoxilina-eosina. Apresentando lesão coagulativa, característica de queimadura de terceiro grau.

Fonte: dados de pesquisa.

Os resultados histológicos obtidos entre o grupo-controle (terapia com sulfadiazina de prata) e os grupos irradiados (grupo irradiado somente com laser e o grupo com a associação do laser e sulfadiazina de prata) comprovaram um aumento significativo ($P < 0,01$) das fibras colágenas no grupo que utilizou irradiação laser associado a sulfadiazina de prata, quando comparado ao grupo-controle.

Não houve, porém, significância estatística das fibras colágenas quando comparado o grupo irradiado com o laser e o grupo-controle. Além disso, também não houve achados estatísticos significantes na produção das fibras colágenas, quando comparados o grupo laser e o grupo tratado com laser e associação da sulfadiazina de prata.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos diferentes grupos ($P = 0.3205$) na quantificação das fibras elásticas.

Tabela 8: Quantidade de fibras colágenas nos diferentes grupos pesquisados

Laser		Sulfa		Laser + Sulfa	
Animal	Total	Animal	Total	Animal	Total
1	226,82	1	283,85	1	440,14
2	401,33	2	207,25	2	332,70
3	341,40	3	246,89	3	509,27
4	406,80	4	253,20	4	486,05
n	4	n	4	n	4
média	344,09	média	247,80	média	442,04
desvio	83,60	desvio	31,48	desvio	78,35
EPM	48,27	EPM	18,18	EPM	45,23

Fonte: dados de pesquisa.

A tabela 8 demonstra os resultados quantitativos de fibras colágenas analisadas nos grupos estudados. As análises demonstraram que houve um aumento significativo, do ponto de vista estatístico, das fibras colágenas do grupo que utilizou a terapia laser mais a sulfadiazina de prata em relação ao grupo-controle.

Tabela 9: Resultados do pós-teste de múltiplas comparações (Tukey-Kramer) para a quantificação das fibras colágenas.

Grupos comparados:	Significância	Valor de P
Laser vs Sulfa	Não	$P > 0.05$
Laser vs Laser + Sulfa	Não	$P > 0.05$
Sulfa vs Laser + Sulfa	Sim	$P < 0.01$

Fonte: dados de pesquisa.

A figura 9 representa o grupo de estudo que utilizou somente a terapia medicamentosa com sulfadiazina de prata (grupo-controle) nas lesões de queimadura de terceiro grau, objetivando-se a verificação da quantidade de fibras colágenas.

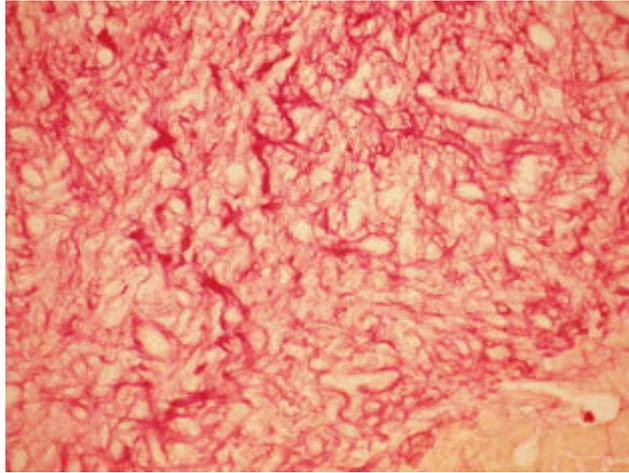


Figura 9: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com *picrosirius-red* para fibras colágenas (grupo–controle, com uso de sulfadiazina de prata).

Fonte: dados de pesquisa.

Os resultados demonstraram que não houve um aumento da quantidade de fibras colágenas tão acentuado quando comparado com o grupo da figura 11.,

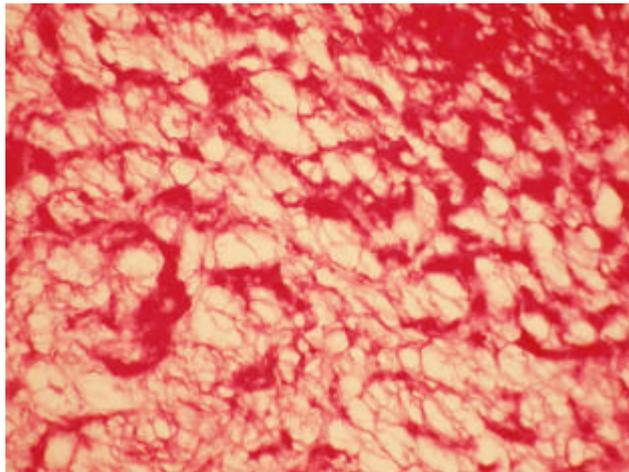


Figura 10: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com *picrosirius-red* para fibras colágenas (grupo com terapia laser).

Fonte: dados de pesquisa.

A figura 11 representa o grupo que utilizou laser associado a sulfadiazina de prata. A figura 10 representa o grupo que utilizou somente laser para o tratamento. Mesmo não havendo valores significativamente superiores entre os achados estatísticos para fibras colágenas, entre o grupo de laser e o grupo-controle, ainda assim, constatou-se maior elevação da quantidade de fibras colágenas no grupo que utilizou a terapia laser, quando comparado com o grupo-controle.

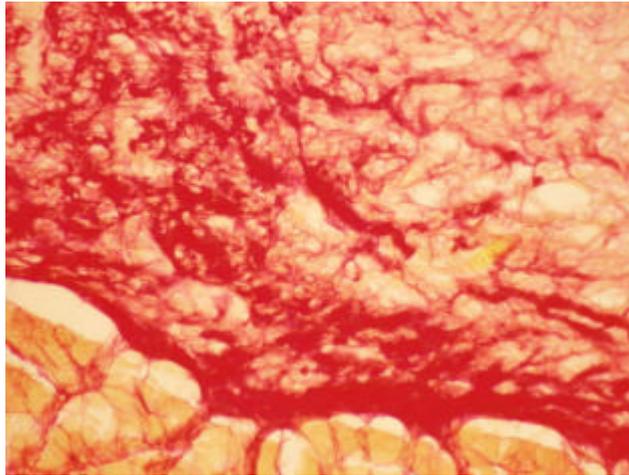


Figura 11: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado como *picrosirius-red* para fibras colágenas (laser + sulfadiazina de prata).

Fonte: dados de pesquisa.

A tabela 10 demonstra que não houve significância estatística na quantidade de fibras elásticas dos grupos estudados.

O pós-teste de Tukey-Kremer para fibras elásticas, não foi aplicado, pois o valor de P foi maior que 0.05, quando comparado todos os grupos pesquisados.

Tabela 10 : A quantidade de fibras elásticas nos diferentes grupos pesquisados.

Laser		Sulfa		Laser + Sulfa	
Animal	Total	Animal	Total	Animal	Total
1	303,00	1	353,87	1	280,33
2	273,51	2	397,87	2	329,81
3	283,68	3	366,77	3	294,93
4	377,10	4	277,60	4	319,10
n	4	n	4	n	4
média	309,32	média	349,03	média	306,04
desvio	46,81	desvio	51,07	desvio	22,51
EPM	27,03	EPM	29,49	EPM	13,00

Fonte: dados de pesquisa.

No gráfico 1, tem-se a representação gráfica dos resultados, quanto à quantidade de fibras colágenas nos grupos pesquisados.

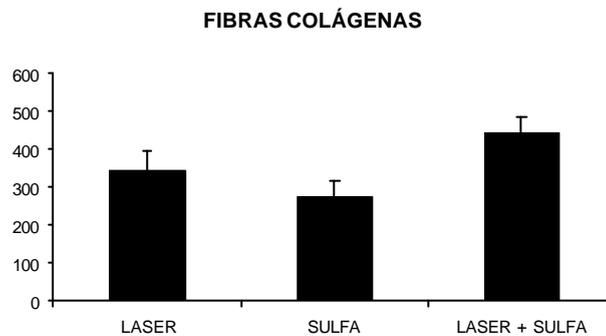


Gráfico 1: Número total de fibras colágenas nos grupos pesquisados (após 15 dias de tratamento).

Fonte: dados de pesquisa.

O gráfico 1 demonstra nitidamente a superioridade na produção das fibras colágenas do grupo que utilizou a terapia laser associada a sulfadiazina de prata em relação ao grupo-controle (sulfadiazina de prata) ou, até mesmo, em relação ao grupo que somente utilizou a terapia laser como tratamento, o qual apresentou, ainda assim, maior quantidade de fibras colágenas quando comparado ao grupo-controle.

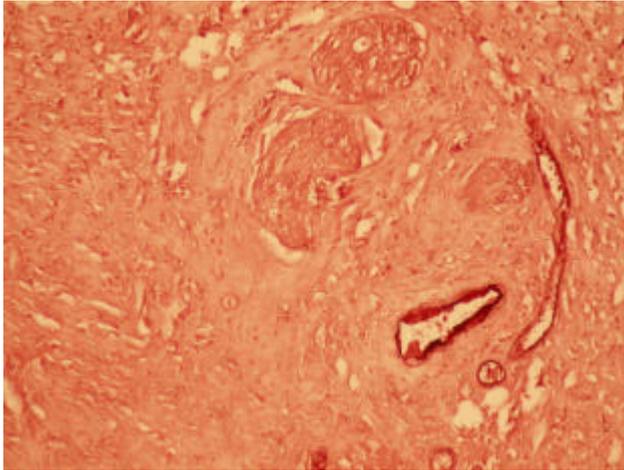


Figura 12: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com sulfadiazinade prata).
Fonte: dados de pesquisa.

As figuras 12, 13 e 14 são fotomicrografias do processo cicatricial (tecido conjuntivo) da lesão por queimadura de terceiro grau.

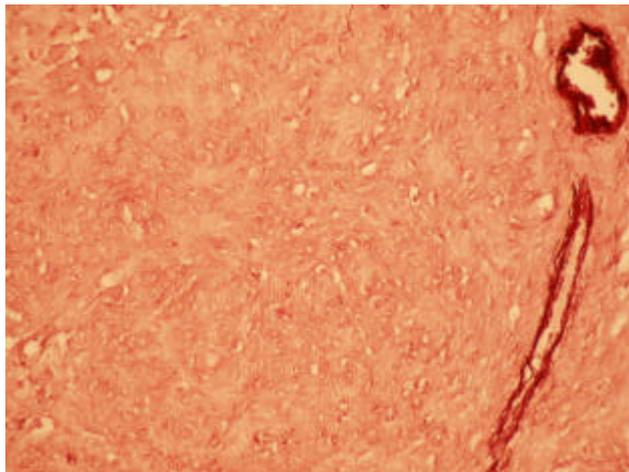


Figura 13: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com laser).
Fonte: dados de pesquisa.

Utilizou-se o corante orceína para a análise das fibras elásticas.

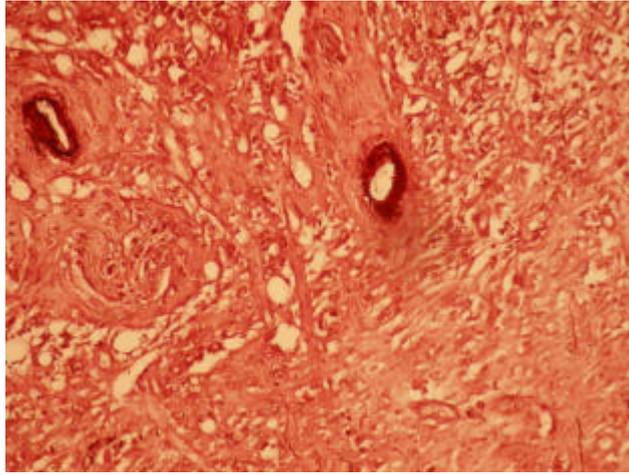


Figura 14: Fotomicrografia de tecido conjuntivo (aumento 20X) corado com orceína para fibras elásticas (grupo tratado com laser + sulfadiazina de prata).

Fonte: dados de pesquisa.

Os resultados obtidos não foram significativamente maiores no tratamento com terapia laser de baixa potência associada a sulfadiazina de prata em relação ao grupo-controle.

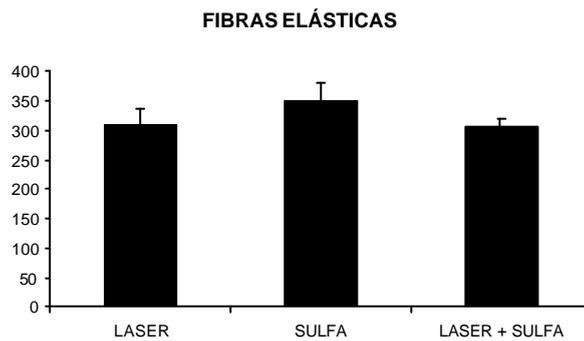


Gráfico 2: Número total de fibras elásticas nos grupos pesquisados (após 15 dias de tratamento).

Fonte: dados de pesquisa.

O gráfico 2 faz referência aos três grupos tratados com as diferentes terapias durante a pesquisa e os resultados quanto às fibras elásticas. Os dados obtidos, como se pode observar, foram muito próximos, não havendo significância estatística entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a terapia a laser de baixa potência foi eficaz na deposição de fibras colágenas no processo de cicatrização de lesões por queimadura de terceiro grau. Não se obteve com os resultados, porém, a mesma significância quanto à produção de fibras elásticas.

A terapia a laser de baixa potência é método aceito pela *Food and Drug Administration* (FDA) como tratamento clínico eficaz para cicatrização de tecidos, sendo amplamente estudada (CHROMEY, 1992; SUGRUE, 1990). Estudos *in vitro* sugerem que a TLBP facilita a síntese de colágeno (ABERGEL, 1984) e aumenta a motilidade dos queratinócitos (HAAS, 1990), liberando fatores de crescimento (WEI, 1994, 1997a), além de transformar os fibroblastos em miofibroblastos (POURREAU-SCHNEIDER; AHMED; SOUDRY, 1990).

Diversos pesquisadores têm utilizado feridas superficiais para avaliar os efeitos da TLBP na cicatrização. Alguns usam úlceras de vários tamanhos e profundidades (CHROMEY, 1992; GOGIA; HUNT; ZIM, 1988; LUNDEBERG; MALM, 1991), e outros têm desenvolvido modelos de feridas superficiais em animais (ALLENDORF *et al.*, 1997; MESTER; JASZSAGI, 1973). Esses diferentes métodos têm produzido uma variedade de resultados e conclusões sobre os efeitos da TLBP.

De acordo com Vera Mendez (2002), diversos trabalhos experimentais buscam descrever os efeitos do laser sob diversos parâmetros, na busca de melhores respostas no processo de reparação tecidual. Os efeitos da crescente utilização do laser de baixa potência na área clínica, visando reduzir o tempo de reparo em lesões dermatológicas e condições patológicas incapacitantes, tais como úlceras e lesões abertas, levam os pesquisadores a buscar condições, parâmetros mais favoráveis e comprimentos de ondas mais adequados em seus estudos (FLEMMING; CULLUM; NELSON, 1999; LUCAS; VAN GEMERT; DE HAAN, 2003;).

O aumento na síntese de colágeno é um dos efeitos mais importantes no processo de cicatrização utilizando-se a terapia laser (RIGAU, 1996), sendo esta estrutura biológica objeto de estudos em diversos trabalhos (ALMEIDA-LOPES, 2001; PARIZZOTO, 1998).

Resultados conflitantes, entretanto, a respeito da eficácia da terapia laser na reparação tecidual foram apresentados em diversas pesquisas (MALM; LUNDEBERG, 1991; SCHLAGER *et al.*, 2000; WALKER *et al.*, 2000; YILMAZ *et al.*, 2002). Uma das

justificativas encontradas a respeito desses resultados conflitantes vai ao encontro das afirmações de Rigau (1996), pois esses estudos indicam que a escolha de parâmetros ópticos variados, utilizando-se de fluências baixas a extremamente elevadas, pode ter causado os efeitos indesejados nos achados. (HALL *et al.*, 1994; HOUGHTON; BROWN, 1999).

Cambier *et al.* (1996) estudaram os efeitos do laser de He-Ne e GaAs em cicatrização de queimaduras. No modelo experimental adotado, utilizaram vinte ratos Fisher, com duas lesões térmicas em cada animal, irradiando apenas uma das lesões. Os animais foram divididos em dois grupos e tratados com diferentes comprimentos de onda. Nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos.

Bisht, Gupta e Misra. (1994) estudaram os efeitos do laser de baixa potência, utilizando um He-Ne em feridas cutâneas abertas em ratos albinos. A densidade de potência trabalhada foi de 5mW e a densidade de energia foi de 4 J/cm², durante cinco minutos. Foi observada uma aceleração significativa do processo de cicatrização, com aumento do tecido de granulação e rápida reepitelização nos grupos tratados, quando comparados aos grupos-controle.

Gómez-Villamandos, Valenzuela e Calatrava (1995) evidenciaram aumento da cicatrização das feridas após terapia com laser, havendo aumento na atividade mitótica, número de fibroblastos, síntese de colágeno e neovascularização dos tecidos lesados. Outros pesquisadores (BYRNES *et al.*, 2004; WEI; NAIM; LANZAFAME, 1994) observaram que a produção de fatores de crescimento fibroblástico (FGF) e o predomínio de fibroblastos em cultura aumentaram consideravelmente após irradiação com o laser de baixa intensidade. Adicionalmente, Bisht, Gupta e Misra (1994) relataram desenvolvimento do tecido de granulação e epitelização das feridas em ratos Wistar tratados com laser de He-Ne.

Parizotto (1998) estudou os efeitos do laser terapêutico He-Ne no processo de reparo tecidual de tendões. O colágeno foi seu objeto de estudo, analisado por diferentes técnicas. A densidade de potência utilizada foi de 6mW, sendo o rato o sujeito experimental adotado. A microscopia eletrônica de varredura apresentou resultados significativos na cicatrização do colágeno nos grupos irradiados, comparados com o grupo controle. A dose foi um fator de dependência nos resultados encontrados e a melhor resposta foi obtida com a dose de 5 J/cm². As doses de 5 J/cm² e 0,5 J/cm², entretanto, também apresentaram respostas.

Na pesquisa apresentada na presente dissertação, observou-se que, ao provocar lesões padronizadas de queimaduras de terceiro grau, submetendo-as a terapia laser de baixa potência (InGaAlP), com comprimento de onda de 658 nm, potência de 30mW, fluência de 3 J/cm² por

ponto de aplicação, em um total de 5 pontos, associada a sulfadiazina de prata, obtiveram-se bons resultados. Comparados com as lesões do grupo-controle, os grupos irradiados demonstraram processo de cicatrização tecidual mais evoluído e com maior quantidade de fibras colágenas no tecido cicatricial.

Não demonstrando, porém, aumento significativo no número de fibras elásticas, quando comparados ao grupo-controle.

A escolha do comprimento de onda de 658 nm foi realizada pela proximidade do comprimento de onda que Pugliese *et al.* (2003) utilizaram para seu experimento, no qual foram realizados ferimentos cutâneos padronizados no dorso de setenta e dois ratos Wistar e, em seguida, irradiado pontualmente com luz laser de baixa potência do tipo Arseneto de Gálio-Alumínio (AlGaAs), com diferentes densidades de energia. Após 24, 48 e 72 horas e aos cinco, sete e catorze dias, os animais foram sacrificados. E seguiram-se as análises das seções teciduais coradas por hematoxilina-eosina, *pricosirius-red* e orceína.

Os autores observaram que os grupos submetidos a terapia laser tiveram maior redução do edema e infiltrado inflamatório. E os animais tratados com a terapia laser apresentaram uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas, embora sem significância estatística ($p > 0,05$). No tratamento com a fluência de 4 J/cm², observaram-se melhores resultados do que naquele em que foi utilizada a fluência de 8 J/cm².

Os autores concluíram, no entanto, que o estudo realizado com a terapia laser de baixa potência contribuiu para uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial.

O estudo ora relatado, contudo, não obteve melhora na produção de fibras elásticas, provavelmente influenciadas pela fluência de 3 J/cm², com potência de 30mW e comprimento de onda de 658 nm. Sugere-se estudos futuros para a investigação do fato observado na atual pesquisa.

Segundo alguns autores, o mecanismo de ação do laser de baixa intensidade no processo de reparação e cicatrização tecidual ainda não está totalmente desvendado. Não há dúvidas, porém, de que a radiação laser aumenta o Ca²⁺ intracelular (YOUNG; DYSON; BOLTON, 1990; FRIEDMANN; LUBART, 1992; 1996; GROSSMAN *et al.*, 1998; KARU, 1991; LAVIE *et al.*, 1999; LUBART *et al.*, 1992; 1996; 1997).

Resta ainda o aprimoramento da mensuração do atual experimento, com o propósito de se obterem resultados significativos quanto aos fatores de crescimento diversos que estão envolvidos no processo cicatricial, tais como os fatores que influenciaram no crescimento das

fibras colágenas e os que não estimularam o desenvolvimento das fibras elásticas. Essas questões serão observadas em futuras pesquisas, procurando-se elucidar os resultados obtidos no estudo ora relatado.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se, no modelo experimental utilizado para o presente estudo, que a terapia laser de baixa potência associada a sulfadiazina de prata aumentou consideravelmente a produção de fibras colágenas em queimaduras de terceiro grau.

Não houve porém, alterações significativas nas fibras elásticas no grupo de animais irradiados, comparado aos grupos que só utilizaram a sulfadiazina de prata, ou somente a terapia laser.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABERGEL, R. P.; GLASSBERG, E.; UITTO, J. Increased wound-healing rate in pig skin treated by helium-neon laser. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. *Proceedings...* Boston : OSA. p. 6-10, 1988.
- ABERGEL, R. P. *et al.* Control of connective tissue metabolism by lasers: recent developments and future prospects. *American Academy of Dermatology Journal*. v. 11, p. 1142-1150, 1984.
- ABERGEL, R. P. *et al.* Efectos biológicos del láser. *Investigation Clinic Laser*. v. 1, p. 7-14, 1986.
- ABRAMSON, D. J. The care and treatment of severely burned children . *Surgery Gynecology and Obstetrics*. v. 122, p. 855-860, 1966.
- ALBERTINE, R. *Análise do efeito do laser de baixa potência (AsGaAl) em inflamação aguda*. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.
- AL-WATBAN, F. A. H.; ZHANG, Z. Dosimetry-related wound healing response in the rat model following helium neon laser LLLT. *Laser Therapy*. p.119-124, 1994.
- ALLENDORF, J. D. *et al.* Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by wound contraction rate and tensile strength. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 20, n. 5, p. 340-345, 1997.
- ALMEIDA-LOPES, L. *et al.* Acción del láser a baja densidad de potencia en la proliferación in vitro de fibroblastos de encía humana. *Bol. SELMQ*. v. 14, n. 5, p.14-18, 1998.
- ALMEIDA- LOPES, L. *et al.* Comparison of the Low Level Laser Therapy Effects on Cultured Human Gingival Fibroblasts Proliferation Using Different Irradiance and Same Fluence. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 29, p. 179-184, 2001.

ALMEIDA-LOPES, L. *et al.* The use low level laser therapy for wound healing: clinical study. In: ANNUAL MEETING- LASERS IN SURGERY AND MEDICINE. *Proceedings...* San Diego, Ca., [s.ed.], p. 16-18, 1999.

ANDERSON, R. R.; PARRISH, J. A. Optical properties of human skin. In: REGAN, J. D.; PARRISH, J. A. (Eds.) *The Science of Photomedicine*. New York: Plenum. p. 147-195, 1982.

BACKER, D.; DUBOIS, M. Assesment of the microcirculatory flow in patients in the intensive care unit. *Current Opinion in Critical Care*. v.7, n. 10, p. 200-203, 2001.

BALBONI, G. C. *et al.* Effects of laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts in vitro. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY. *Proceedings...* Bologna: Monduzzi Editore. p.101-103, 1985.

BARRETO, M. Estudo epidemiológico de 4.907 casos de queimaduras internados no CTQ do Hospital da Restauração de Recife – PE. *Revista Brasileira de Queimaduras*. v. 3, n. 1, p.12-28, 2003.

BASERGA, R. *Cell growth and division: a practical approach*. Philadelphia: IRL Press, 1990.

BASFORD, J. R. *et al.* Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser and occlusion in wound healing in a swine model. *Archives of Physics Medicine and Rehabilitation*. v. 67, p. 151, 1986.

BENEDICENTI, A. La valutazione dell' effecto del la luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: _____. *Atlate di laser-terapia*. Gênova: Langa Grafica. p. 71-83, 1982.

BERRY, M. G. *et al.* The influence of body mass index on burn surface area estimated from the area of hand burns. *Burns*. v. 27, n. 6, p. 591-94, 2001.

BIHARI, J.; MESTER, A. R. The biostimulative effect of low level laser therapy on longstanding crural ulcers using Helium Neon Laser, Helium Neo Laser Plus infrared lasers,

and noncoherent light: Preliminary report of a randomised double blind comparative study. *Laser Therapy*. v. 1, n. 2, p. 97, 1989.

BISHT, D.; GRUPTA, S. C; MISRA, V. Effects of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian Journal of Medicine Res*. v. 100, p. 43-46, 1994.

BOLTON, P.; DYSON, M.; YOUNG, S. The effect of polarised light on the release of growth factors from the U937 macrophage-like cell line. *Laser Therapy*. v. 4, n. 1, p. 33-37, 1992.

BOLTON, P.; YOUNG, S.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to light therapy with varying power and energy densities. *Laser Therapy*. v. 2, n. 3, p. 105-111, 1991.

_____. The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic deshydrogenate activity of human fibroblasts in vitro. *Laser Therapy*. v. 7, p. 55-60, 1995.

BRANDALIZE, M. C. B.; PHILLIPS, J. *Padrões de classificação de equipamentos laser utilizados em levantamentos terrestres e aéreos*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CADASTRO TÉCNICO MULTIFINALITÁRIO, 2002, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: UFSC, p. 35-54, 2002.

BRASIL. Normas para a Prática Didático-científica da Vissecação de Animais. Lei nº 6638. *Coleção de Leis da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, artigos 1-8, maio 1979.

BROWNE, R.; TIAS, M. J. Biological testing of dental restorative materials in vivo: a review. *Journal of Oral Rehabilitation*. v. 6, n. 4, p. 365-374, 1979.

BYRNES, K. R. *et al*. Photobiomodulation improves cutaneous wound healing in na animal model of type II diabetes. *Photomedicine Laser Surgery*. v. 22, p. 281-290, 2004.

CALDERHEAD, R. G. Introduction to laser therapy: pathways, mechanisms and dosimetry. In: CONGRESS WORLD ASSOCIATION FOR LASER THERAPY.2., *Proceedings...* Kansas City, p. 7, 1998.

CALLAGHAN, G. A. *et al.* Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation after DNA synthesis in the haemopoietic cell line V937. *Lasers Surgery and Medicine*. v. 19, p. 201-206, 1996.

CAMBIER, D. C. P. T. *et al.* Low-Power Laser And Healing of Burns: A Preliminary Assay. *Plastic Reconstruction Surgery*. v. 97, n. 3, p. 555-558, 1996.

CAMPBELL, E. J. *et al.* Monocyte procollagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases: identification, characterisation and regulation of secretion. *Journal of Biological Chemistry*. v. 262, p. 15862-15968, 1987.

CARRILLO, J. S. *et al.* Acción del láser de He-Ne sobre el crecimiento de una cepa de estafilococcus aureus "in vitro". In: CONGRESS INTERNATIONAL LASER, *Anales...* Salt Lake City, Utah, p. 26-28, 1987.

CHELYSHEV, Y. A.; KUBITSKY, A. A. Effect of infra-red low-power laser irradiation on regeneration of myelinated axons. *Lasers Medicine Sciences*. v. 10, p. 273-277, 1995.

CHIO, C. H.; LIN, S. H. J.; KAO, M. C. H. Cytogenetic effects of low level laser irradiation of human leukocytes. *Laser Therapy*. v. 2, n. 3, p. 111-117, 1990.

CHOMETTE, G. *et al.* Effect du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival I. Effect sur les fibroblastes. Etude d'histoenzymologie et de microscope eletronique. *Journal of Biologie Buccale*. n. 15, p. 45-49, 1987a.

_____. Effect du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II. Effect sur les fibroblastes. Etude en microscope optique, histoenzymologie et microscopie eletronique. *Journal of Biologie Buccale*. n. 15, p. 67-71, 1987b.

CHROMEY, P. A. The efficacy of carbon dioxide laser surgery for adjunct ulcer therapy. *Clinic Pediatric Medicine Surgery*. v. 9, n.7, p. 709-719, 1992.

CIAPETTI, G. *et al.* Application of a combination of neutral red and amid black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. *Biomaterials*. v. 17, n. 13, p. 1259-1264, 1996.

CISNEROS, J. L.; TRELLES, M. A. *Laser y terapéutica em medicina y cirugía cutánea*. Barcelona: Centro Documentación Láser, 1987.

CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *Journal of Investigative Dermatology*: v. 11, n. 4, p. 647-661, 1993.

CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1988.

COBEA - COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. *Princípios éticos na experimentação animal*. São Paulo : COBEA, 1991.

COLVIN, R. B. Wound healing processes in homeostasis and thrombosis. In: GIMBRONE, M. A. Jr. (Ed.) *Vascular endo-thelium in homeostasis and thrombosis*. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 220-224, 1986.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

CUNNINGHAM, J. J. *et al.* Nutrition support during the acute care of moderately or severely burned patients. In: PAYNE-JAMES, J. *Artificial nutrition support in clinical practice*. London: Edward Arnold, p. 459-468, 1995a.

CUNNINGHAM, J. J. *et al.* Measured and predicted calorie requirements of adults during recovery from severe burn trauma. *American Journal of Clinical Nutrition*. n. 49, p. 404-408, 1995b.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory Investigation*. v. 63, n. 28, p. 21-29, 1990.

DE-SOUZA, D. A.; MARCHESAN, W. G.; GREENE, L. J. A Prospective study on the epidemiology of burns in patients admitted to the Harare burn units. *Burns*. v. 24, n. 5, p. 433-438, 1998.

DEITCH, E. A. Bacterial translocation of the gut flora. *Journal Trauma*. n. 30, p. S184-S189, 1990.

DEITCH, E. A. Nutritional support of the burn patients. *Critical Care Clinics*. 11: 735-750, 1995.

DEMLING, R. H. Fluid and electrolyte management. *Critical Care Clinics*. v. 1, n. 1, p. 27-45, 1985.

DERLING, R. H. Medical progress. *Burns: New England Journal of Medicine*. v.2, n. 3, p. 313-389, 1986.

EL SAYED, S. O.; DYSON, M. Comparison of the effect of multiwavelength light produced by a cluster of semiconductor diodes and each individual diode on Mast cell number and degranulation in intact and injured skin. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 10, p. 559-568, 1990.

FEDOSEYEVA, G. E. *et al.* The activation of yeast metabolism with He-Ne laser radiation: I protein synthesis in various cultures. *Lasers life Sciences*. v. 2, n. 2, p. 137-146, 1988.

FERRARO, A. Epidemiologic study of 1768 burned patients. *Academic Medicine Port.* v. 11, n. 3, p. 265-269, 1998.

FILONENKO, N. Multiparametric dosimetry for low power Cower photon (laser) therapy. *Lasers in Surgery and Medicine*. p. 95- 102, 1995.

FLEMMING, K. A.; CULLUM, N. A.; NELSON, E. A. A systematic review of laser therapy for venous leg ulcers. *Journal of Wound Care*. v. 8, n. 3, p. 111-114, 1999.

FRESHNEY, R. I. *Biology of the cultured cell: a manual of basic technique*. 2 ed. New York: Wiley-Liss, 1990.

FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Photobiostimulation by light-induced cytosolic calcium oscillations. *Laser Therapy*. v. 8, p. 137-142, 1996.

_____. Towards an explanation of visible and infrared laser induced stimulation and damage of cell cultures. *Laser Therapy*. v. 4, n. 1, p. 39-42, 1992.

FULLER, A. T. Fundamentals of lasers in surgery and medicine. In: DIXON, J. A. (Ed). *Surgical applications of lasers*. Chicago: Year Book Medical Publishers, p.11- 28, 1983.

GENNARI, R. Anti-interleukin 6 antibody treatment improves survival during gut-derived sepsis in a time-dependent manner by enhancing host defense. *Critical Care Medicine*. v. 23, n. 12, p. 132-146, 1996.

GIESE, A. C.; Photobiology and open problems. In: PRATESI, R.; SACCHI, C. A. *Lasers, Photomedicine and Photobiology*. New York: Springer Verlag, p. 26-39, 1980.

GILIOLI, G. *et al.* Effecti sperimentali del laser infrarosso: studi in vitro con 1 Herpes virus. *Medicine Laser Rep*. v. 3, p. 28-31, 1985.

GIMENEZ, R.; CASADO, F. Influencia de extractos biológicos sobre la respiración tisular. *Investigation Clinic Laser*. v. 2, n. 2, p. 11-15, 1985.

GODINHO, S. G.; ASCHER, L. Avaliação da área queimada. In: SERRA, M. C.; GOMES, D. *A criança queimada*. Rio de Janeiro: Eventos, 1999.

GOGIA, P. P.; HUNT, B. S.; ZIM, T. T. Wound management with whirlpool and infrared cold laser treatment: a clinical report. *Phys. Therapy*. v. 68, p. 1239-1242, 1988.

GOLDMAN, L. *The biomedical laser: technology & clinical applications*. New York: Springer Verlag, p. 5-25, 1981.

GOMES, D. R.; CUNHA L.; VOGEL, I. Análise de 2.450 queimados. *Boletim Científico da Sociedade Brasileira de Queimaduras*. Rio de Janeiro, v. 1, n. 4, p. 7, 2000.

GOMES, D.; SERRA, M. C. Conhecendo o paciente queimado. In: GOMES, D.; SERRA, M. C.; MACIEIRA, L. *Condutas atuais em queimaduras*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.

_____. Fisiologia e Fisiopatologia. In: SERRA, M. C.; GOMES, D. *A criança queimada*. Rio de Janeiro: Eventos, 1999.

GOMES, D. R.; SERRA, M. C.; PELLON, M. A. *Tratamento de queimaduras: um guia prático*. Rio de Janeiro: Revinter, 1997.

GÓMEZ-VILLAMANDOS, R. J.; VALENZUELA, J. M. S.; CALATRAVA, I. R. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 16, p. 184-188, 1995.

GONZÁLEZ, J.; DEMIRDJIAN, G.; MUÑOZ, W. Epidemiologia de las queimaduras en la Infancia. *Healthing News: Magazine Eletrônico de la Salud*. Buenos Aires, ano IV, n. 2, p. 6-8, 2000.

GRINNELL, F.; FELD, M.; MINTER, D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for col-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell*. v. 19, p.517-525, 1980.

GROSSMAN, N. *et al.* 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 22, p. 212-218, 1998.

GROTENDORST, G. R.; MARTIN, G. R. Cell movements in wound healing and fibrosis. *Rheumatology*. v.10, p. 385-403, 1986.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue. I. Quantitative study of the vascular volume. *Revista Odontológica da Universidade de São Paulo*. São Paulo, v. 1, p. 6-8, 1987.

_____. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue. II. Ultrastructural aspects. *Revista Odontológica da Universidade de São Paulo*. São Paulo, v. 6, p. 66-71, 1992.

GUIRRO, R. R. J.; GUIRRO, E. C., *Fisioterapia dermato-funcional: fundamentos, recursos e patologias*. 3 ed. São Paulo: Manole, 2002.

_____. _____. 4 ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAAS, A. F. *et al.* Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 94, p. 822-826, 1990.

HACZEKI, O.; TAMURA, M. Near infrared quadruple wl. Spectrophotometry of the rat head. *Advances Experimental Medicine and Biology*. v. 248, p. 63, 1989.

_____. Quantitative analysis of oxygenation satate of rat brain in situ by near-infrared spectrophotometry. *Journal of Applied Physiology*. v. 64, p. 796, 1988.

HALEVY, S. *et al.* Infrared (780 nm) low level laser therapy for wound healing: in vivo and in vitro studies. *Laser Therapy*. v. 9, p. 159-164, 1997.

HALL, G. *et al.* Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experiemental study in rats. *Swedish Dental Journal*. v. 18, p. 29-34, 1994.

HALLMAN, H. O. *et al.* Does low-energy Helium-Neon Laser irradiation after in vitro replication of human fibroblasts? *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 8, p. 125-129, 1988.

HARRIS, A. K.; WILD, P.; STOPAK, D. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*. v. 208, p. 177-179, 1980.

HOUGHTON, P. E.; BROWN, J. L. Effect of Low Level Laser on Healing in Wounded fetal Mouse Limbs. *Laser Therapy*. v. 11, n. 2, p. 54-70, 1999.

HSIN-SU, Y. *et al.* Low energy Helium-Neon laser irradiation stimulates interleukin-1a and interleukin-8. Release from cultured human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 107, n. 4, p. 54-60, oct. 1996.

HUBACEK, J. *et al.* Changes of the phagocytic activity of neutrophil leukocytes after irradiation with an He-Ne laser. *Cesk Otolaryngology*. v. 34, n. 3, p. 141-146, 1985.

HUNTER, J. *et al.* Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 3, p. 285-290, 1984.

HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETERS-JORIS, C.; VAES, G. Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degradation. *Biochemistry Journal*. v. 184, p. 643-650, 1979.

IJIMA, K. Evaluation of analgesic effect of low power He:Ne laser on postherpetic neuralgia using VAS and modified McGill pain questionnaire. *Journal of Clinic Laser Medicine Surgery*. v. 2, n. 9, p. 121, 1991.

JENSEN, J. A. *et al.* Effect of lactate, pyruvate, and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages. *Laboratory Investigation*. v. 54, p. 574-578, 1986.

JORGE, A. S.; DANTAS, S. R. P. E. *Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas*. São Paulo: Atheneu, 2003.

JORI, G. The molecular biology of photodynamicaction. In: PRATI, R.; SACCHI, C. A..(Eds). *Lasers in photomedicine and photobiology*. Springer Verlag, p. 58-60, 1980.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica: texto / Atlas*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAMEYA, T. *et al.* Effects of different wavelengths of low level laser therapy on wound healing in mice. *Laser Therapy*. v. 7, p. 33-36, 1995.

KAMINER, M. S. *et al.* Extracellular localisation of human connective tissue mast cell granule contents. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 96, p. 857-863, 1991.

KANA, J. Effect of low-power density laser radiation on healing of open wounds in rats. *Archives of Surgery*. v. 116, p. 293, 1981.

KARU, T. I. Depression of the genome after irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. *Laser Therapy*. v. 4, n. 1, p. 5-24, 1991.

_____. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. *IEEE Journal Quantum Electronics QE-23*. v. 10, p. 1703-1717, 1987.

KARU, T. *et al.* Helium-Neon laser-induced respiratory burst of phagocyte cells. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 9, p. 585-588, 1989.

KARU, T. I.; SMOLYANINOVA, N. K.; ZELENIN, A. V. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser radiation. *Lasers Life Sciences*. v. 4, n. 3, p. 167, 1991a.

_____. Irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. I: increase the blast-transformation caused by phytohemagglutinin. *Laser Technology*. v. 1, n. 2, p. 51-54, 1991b.

_____. Irradiation of human lymphocytes with He-Ne laser. II: absence of expression of interleukin-2 receptors. *Laser Technology*. v. 1, n. 3, p. 99-101, 1991c.

KAWAHARA, H.; YAMAGAMI, A.; NAKAMURA J. R. M. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. Journal*. v. 18, n. 2, p. 443-467, 1968.

KNIGHTON, D. R. *et al.* Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science*. v. 221, p.1283-1285, 1983.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I. A.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis: effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. v. 90, p. 262-270, 1981.

KRIZEK, T. J., ZIMMERMAN, T. J. Thermally induced dermal injury: A review of pathophysiologic events and therapeutic intervention. *Journal Burn Care*. v. 5, n. 3, p. 193-201, 1984.

KUMAR, P.; THOMAS, P.; CHITTORIA, R. Ten years epidemiological study of pediatric burns in *Manipal. India Burns* v. 26, n. 3, p. 261-264, 2000.

LABAJOS, M. Effects of the IR radiation of the GaAs diode laser on intestinal absorption in vitro and in vivo studies. *Laser*. v. 2, p. 21-25, 1986.

LABBE, R. F. *et al.* Laser photobioactivation mechanisms: in vitro studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 10, p. 201, 1990.

LALOE, V. Epidemiology and mortality of burns in a general hospital of Eastern Sri Lanka. *Burns*. v. 28, n. 8, p. 778-781, dec. 2000.

LAVIE, R. *et al.* Low power visible light and hydrogen peroxide changes intracellular calcium concentration in fibroblasts cells. In: ANNUAL MEETING- LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, *Proceedings...* San Diego, Ca., [s.ed.], p. 72, 1999.

LEIBOVICH, S. J.; WISEMAN, D. M. Macrophages, wound repair and angiogenesis. *Prog Clin. Biol. Res.* v. 266, p. 131-145, 1988.

LEUNG, C. Y.; MANFREDI, C.; ROCCIA, L. Prime osservazioni sugli effectti collaterali della softlaserterapia. In: oltre 500 casi trattati ambulatoriamente. *Minere Riflessoter Laserter II*. v. 1, p. 35-37, 1985.

LIEVENS, P. C. Effects of laser treatment on the lymphatic system and wound healing. *LASER. Journal of European Medicine Laser Association*. v. 1, n. 2, p. 12, 1988.

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

_____. The effect of I. R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. *Laser Medicine Science*. v. 6, p. 189-191, 1991.

_____. The influence of laser-irradiation on the motricity of the lymphatical system and on the wound healing process. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY. *Proceedings...* Bologna, Itália., p. 171-174, 1986.

LIMA JR, E. M.; SERRA, M. C. V. F. *Tratado de queimaduras*. São Paulo: Atheneu, 2004.

LINARES, H. Piel normal y piel quemada: clasificación. In: BENDLIN, A.; LINARES, H.; BENAÏM, F. *Tratado de queimaduras*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1996.

LIPPMAN, T. O. Bacterial translocation and enteral nutrition in humans: an outsider looks in. *Journal Parent Enteral Nutr*. n. 19, p. 156-165, 1995.

LOBKO, V. V.; KARU, T. I.; LETOKHOV, V. S. “É a coerência da luz de laser da intensidade baixa essencial para seus efeitos em objetos biológicos?”. *Biophysics*. Moscow, v. 30, n. 2, p. 400-407, 1985.

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

LUBART, R. *et al.* Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biol*. v. 12, p. 305-310, 1992.

LUBART, R. *et al.* The effect of He:He Laser (633 nm) radiation on intracellular Ca²⁺ concentration in fibroblasts. *Laser Therapy*. v. 9, p. 115-120, 1997.

LUBART, R. *et al.* The role of intracellular calcium oscillations in photobiostimulation. *Laser Technology*. v. 6, n. 3, p. 79-84, 1996.

LUCAS, C.; VAN GEMERT, M. J.; DE HAAN, R. J. Efficacy of low-level laser therapy in the management of stage III decubitus ulcers: a prospective, observer-blinded multicentre randomised clinical trial. *Lasers Medicine Sciences*. v. 18, n. 2, p. 72-77, 2003.

LUND, C.C.; Browder, N.C. The estimation of areas of burns. *Surgery Gynecology and Obstetrics*. 79, 352, 1944.

LUNDEBERG, T.; MALM, M. Low-power He-Ne laser treatment of venous leg ulcers. *Ann. Plastic Surgery*. v. 27, p. 537-539, 1991.

MAIER, M.; HAINA, D.; LANDTHALER, M. Effect of low energy laser on the growth and regeneration of capillaries. *Lasers Medicine Science*. v. 5, p. 381-386, 1990.

MAIMAN, T. H Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. v. 187, n. 6, p. 493, aug. 1960.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, tissues and disease: principles of general pathology*. Cambridge, Massachusetts: Blackwell Science, 1996.

MALM, M.; LUNDEBERG, T. Effect of Low Power GalliumArsenide Laser on Healing of Venous Ulcers. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. v. 25, p. 249-251, 1991

MANTEIFEL, V.; BAKEEVA, L.; KARU, T. Ultrastructural changes in chondriome of human lymphocytes after irradiation with He-Ne laser: appearance of giant mitochondria. *Journal of Photochemistry and PhotoBiology B: Biol*. v. 38, p. 25-30, 1997.

MARTINEZ, F. *et al.* Variaciones morfológicas del parénquima pineal tras estimulación con luz láser. *Inv. Clin. Laser I.* v. 4, p. 21-24, 1984.

MARVIN, J.; HEIMBASCH, D. Burn Depth: a review. *World Journal of Surgery.* v. 16, p. 10-15, 1992.

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

_____. Láser e inmunidad. *Inv. Clin. Laser III.* v. 2, p. 73-74, 1986.

McKINNEY, P.; CUNNINGHAM, B. L. *Wound Healing: handbook of plastic surgery.* [s.l.:s.ed.], p. 55-70, 1989.

McPHERSON, J. M.; PIEZ, K. A. Collagen in dermal wound repair. In: CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. (Eds.) *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum Press, p. 471-496, 1988

MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. *Laser em Odontologia.* São Paulo: Santos, 2001.

MESTER, A. F.; MESTER, A. Wound healing. *Laser Therapy.* v. 1, n. 1, p. 7, 1989.

MESTER, A. F.; SNOW, J. B. Photochemical effects of low-intensity laser irradiation on wound healing and on the maturation and regeneration of olfactory neuroepithelial explants. *Journal of Clinical Laser Medicine Surgery.* p. 31-33, 1990.

MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. *Orv. Hetilap.* v. 107, p. 1012, 1966.

_____. Der Biostimulative effekt von laserstrahlen. *Z. Exper. Chirurg.* v. 15, p. 67, 1984.

_____. Experimentation on the interaction between infrared laser and wound healing. *Exper. Chirurg.* v. 2, p. 94, 1969.

_____. Laser application in promoting of wound healing. In: KOEBNER, H. K. (Ed.) *Lasers in Medicine*. New York: Koebner, p. 83-95, 1980.

MESTER, E. *et al.* Auswirkungen direkter laserbestrahlung auf menschliche Lymphocyten. *Archives Dermatology Res.* v. 263, p. 241, 1978.

MESTER, E. *et al.* Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of laser irradiation on wound healing. *Langenbecks Archv. Chir. Suppl.* v. 261, 1974.

MESTER, E. *et al.* Effect of laser radiation on the wound healing. *Zeitschrift Exper. Chi.* v. 8, p. 258, 1971a.

_____. Effect of laser rays on wound healing. *American Journal of Surgery.* v. 122, p. 532, 1971b.

MESTER, E. *et al.* Effect of the laser in wound healing. *Lyon Chi.* v. 67, p. 416, 1971c.

MESTER, E. *et al.* Laser stimulation of wound healing by laser rays. *Acta Chi. Acad. Sci. Hungaricae.* v. 13, p. 315, 1972.

MESTER, E. *et al.* Stimulation of wound healing by means of laser rays: clinical and electro microscopical study. *Acta Chi. Acad. Sci. Hungaricae.* v. 14, p. 347, 1973.

MESTER, E. *et al.* *The effect of wound healing: enzyme-histochemical studies.* *Acta Chi. Acad. Sci. Hungaricae.* v. 15, p. 203, 1975.

MESTER, E. *et al.* Wundheilung und regeneration: neuere untersuchugen über die wirkung der laserstrahlen auf die undheilung - immunologische effekte. *Z. Exper. Chirurg.* v. 10, p. 301, 1977.

MESTER, E.; JASZSAGI, E. The effects of laser radiation on wound healing and collagen synthesis. *Studia Biophysica.* v. 35, n. 3, p. 227, 1973.

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

MESTER, E.; SPIRY, T.; SZENDE, B. Effect of laser rays on wound healing. *Bull. Soc. Int. Chir.* v. 32, p. 169, 1973.

MESTER, E.; TOTH, N.; MESTER, A. The biostimulative effect of laser beam. *Laser Basic BioMed. Res.* v. 22, p. 4-7, 1982.

MICKILEY, A. F.; HARLEN, F.; WHILLOCK, M. J. *Biological Interactions of opitcal radiations*. In: HILGERS, A. *Hazards of opitcal raduation*. [s.l.:s.ed.], p. 12-23, 1988.

MILLER, A. The immunologic effects of trauma. In: NINNEMAN, J. L. (Ed.) *Traumatic injury: Infection and other immunological sequelae*. Baltimore: University Park Press, p.17-32, 1983

MIRÓ, L. *et al.* Estudio capiloscópico de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación. *Investigative Clinic Laser*. v. 1, n. 2, p. 9-14, 1984.

MJÖR, I. A.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; ORSTAVIK, D. Biological properties. In: MJÖR, I. A. *Dental materials: biological properties and clinical evaluations*. Boca Raton: CRC Press, p. 21-68, 1985.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 85, p. 4894-4897, 1988.

NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *Journal of Experimental Medicine* v. 156, p. 430-442, 1992.

NICOLAU, R. A. *Análise histomorfométrica de tecido ósseo fotobiostimulador por laser de AsGaAl (660 nm)*. 2001. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de

Pesquisas e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.

NOBLE, P. B. *et al.* Locomotory characteristics of fibroblasts within a three-dimensional collagen lattice: modulation by a Helium/Neon soft laser. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 12, p. 669-674, 1992.

NOGUEROL, B. F. *et al.* Ultrastructural changes of the mouse periodontum after HeNe laser radiation: a transmission electron microscopic study. *Laser Therapy*. v. 6, p. 95-100, 1994.

O'SULLIVAN, S. B.; SCHIMITZ, T. J. *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 4 ed. São Paulo: Manole, 2004.

OHSIRO, T.; CALDERHEAD, R. G. Laser therapy: a decade further on. *Laser Therapy*. v. 10, p. 5-6, 1998.

_____. The development of low reactive-level laser therapy (LLLT) and its present status. *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*. v. 9, n. 4, p. 267-275, 1991.

OHTA, A.; ABERGEL, R. P.; UITTO, J. Laser modulation of human immune system: Inhibition of lymphocyte proliferation by a Gallium-Arsenide laser at low energy. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 7, p. 199-201, 1987.

OSANAI, T. *et al.* Measurement of GaAlAs Diode laser action on phagocytic activity of human neutrophils as a possible therapeutic dosimetry determinate. *Laser Therapy*. v. 2, n. 3, p. 123-133, 1990.

OSTUNI, A.; PASSARELLA, S.; QUAGLIANIello, E. The energy dose dependence of the activity of glutamate de hydrogenase irradiated with helium neon laser. *Laser Technology*. v. 4, n. 1/2, p. 13-16, 1994.

PAMJESHAHIN, M. R. *et al.* A Epidemiology and mortality of burns in the South West of Iran. *Burns*. v. 27, n. 3, p. 219-26, 2001.

PARIZOTTO, N. A. *Ação do laser de hélio-neônio sobre o processo de reparo tecidual: um estudo do colágeno por microscopia eletrônica de varredura, microscopia de força atômica e espectroscopia por infravermelho*. 1998. Tese (Doutorado) – Unicamp, Campinas, 1998.

PARRISH, J. A. Photomedicine: potentials for lasers. In: PRATESI, R.; SACCHI, C. A. (Eds). *Lasers in photomedicine and photobiology*. [s.l.]:Springer Verlag, p. 3-20, 1980.

PEACOCK, E. E. Jr. *The wound repair*. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 76-85, 1984.

POURREAU-SCHNEIDER N.; AHMED, A.; SOUDRY, M. Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *American Journal of Pathology*. v. 137, p. 171-178, 1990.

POURREAU-SCHNEIDER, N. *et al.* Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblast. *Quintessence Int.* v. 20, n. 12, p. 887-893, 1989.

PRUITT Jr., B. A.; MASON Jr., A. D. Epidemiological, demographic and outcomes characteristics of burn injury. In: HERDOS, D. N. *Total Burn Care*. Philadelphia.:Saunders, p. 5, 1996.

PUGLIESE, L. S. *et al.* A influência da terapia a laser de baixa densidade de energia na biomodulação das fibras colágenas e elásticas. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. v. 17, n. 4, p. 307-313, out./dez. 2003.

RAJARATNAM, S.; BOLTON, P.; DYSON, M. Macrophage responsiveness to laser therapy with varying pulsing frequencies. *Laser Therapy*. v. 6, p. 107-112, 1994.

REED, R. K.; OHARHEIN, H. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. *World Journal of Surgery*. v. 16, p. 2-9, 1992.

REDDY, G. K.; STEHNO-BITTEL, L.; ENWEMEKA, C. S. Laser photostimulation of collagen production in healing rabbit achilles tendons. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 22, p. 281-287, 1998.

REICH, J. D. *et al.* The effect of electrical stimulation on the number of Mast Cells in healing wounds. *Journal of American Academic Dermatology*. v. 25, n. 1, p. 40-46, 1991.

RIGAU, J. *Acción de la luz láser a baja intensidad en la modulación de la función celular*. 1996. Tese (Doutorado em Histologia) - Facultad de Medicina i Ciència de la Salut. Univ. Rovira i Virgili. Réus-Tarragona, 1996.

ROBSON, M. C., EGGERS, P. J. Prostaglandinis and tromboxane. *Critical Care Clinics*, v.1, n.1, p. 59-77, 1985

ROCHKIND, S. *et al.* Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. *Lasers in Surgery and Medicine* v. 9, p. 174-182, 1989.

RODRIGO, P.; LERMA, E.; ZARAGOZA, J. R. Efectos de la irradiación láser sobre glándulas tiroideas. Estudio experimental en la rata blanca. *Inv Clin Laser*, v.11, n.1, p.7-9, 1985.

ROTHER, M.; FALANGA, B. Factores de crecimiento: su biología y expectativas en enfermedades dermatológicas y reparación dérmica. *Archives Dermatology*. v. 1, n. 1, p. 33-43, 1989.

RUBENSTEIN, E. Combined high-power and low power laser treatment for ulcerative vulval lesions induced by human papillomavirus (HPV). In: CONGRESS INTERNATIONAL ON LASER, *Proceedings...* Salt Lake City, Utah, 1987.

RUBIN, E.; FARBER, J. L. *Patologia*. Rio de Janeiro: Interlivros, 1990.

RUBIN, E. *et al.* *Patologia: bases clinicopatológicas da medicina*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE, D. L. Jr. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G.; MAY, J. W. Jr.; LITTLER, J. W. *Plastic surgery*. Philadelphia: W. B. Saunders, v. 1, 1990.

RUFOLLO, P. Impiego della laser-terapia nelle leucoplachie del cavo orale. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON LASER IN MEDICINE AND SURGERY, *Proceedings...* Bologna, Itália [s.ed.], p. 279, 1985.

RYHANEN, L.; RANTALA-RYHANEN, S.; TAN, E. M. L. Assay of collagenase activity by a rapid, sensitive, and specific method. *Collagem Rel. Res.* v. 2, p. 117-130, 1982.

SAFFLE, J. R. *et al.* Use of indirect calorimetry in the nutritional management of burned patients. *Journal Trauma* . n. 25, p. 32-39, 1985.

SALGADO, J. F. M. *Avaliação da velocidade do processo de reparação óssea primária, conjugando a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia com laser de baixa potência*. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.

SAPERIA, D. *et al.* Demonstration of elevated type I and type II procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser: proposed mechanism for enhanced wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 138, p. 1123, 1986.

SARTI, M. A. *et al.* Transformations in type II leydig cells in the rat after anterior pituitary irradiation with low incident levels of HeNe Laser Energy. *Laser Therapy*. v. 7, p. 119-122, 1995.

SASAKI, K.; OHSHIRO, T. Assessment in the rat model of the effects of 830 nm diode laser irradiation in a diachronic wound healing study. *Laser Therapy*. v. 9, p. 25-32, 1997.

SCHLAGER, A. *et al.* Low-Power Laser Light in the Healing of Burns: A Comparison Between Two Different Wavelengths (635nm and 690nm) and a Placebo Group. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 27, n. 1, p. 39-42, 2000.

SCHANFELD, N. Outpatient management of burns in children. *Pediatric Emergency Care*. v. 6, p. 249-53, 1990.

SCHAWLOW, A. L. Principle of laser *Journal of clin. Laser Medicine and Surgery*. v. 13, n. 3, 1995.

SCHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials: advantages and limitations. *Journal of Dental Research*. v. 22, n. 2, p. S6-S11, aug. 1994.

SERRA, M. C. V. F. A Criança Queimada. In: GOMES, D. R.; SERRA, M. C.; PELLON, M. A. *Queimaduras*. Rio de Janeiro: Revinter, p.30-45, 1995.

SERRA, M. C. V. F. *et al.* Burns in children and adolescents: analysis of 1.302 cases. In: QUADRENNIAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF BURNS INJURIES, 11., *Proceedings*.. Seattle: [s.ed.], p. 75-89, 2002.

SILVEIRA, J. C.; LOPES, E. E. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de GaAs-904 nm: estudo experimental em cobaias - *Cavia Porcellus*. *Arquivos do Centro de Estudos do Curso de Odontologia*. v. 28, n. 1/2, p. 73-96, 1991.

SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair. A study with antineutrophil serum *Journal of Clinical Investigation*. v. 51, p. 2009-2023, 1972.

SKOBELKIN, O. K.; MICHAÏLOV, V. A.; ZAKHAROV, S. D. Preoperative activation of the immune system by low reactive level laser therapy (LLLT) in oncologic patients: A preliminary report. *LLLT Cancer Surgery*. p. 169-175, 1991.

SMITH-AGREDA, V. *et al.* Alteraciones de la ciclosis celular adeno-hipofisaria tras la estimulación con láser He/Ne e IR. *Investigative Clinical Laser III*. v. 3, p. 99-105, 1986.

SMITH-AGREDA, V. *et al.* Aportaciones al estudio de las interacciones morfoquímicas de las células adenohipofisarias tras la estimulación con láser He/Ne 632,8 nm de baja potencia. *Investigative Clinical Laser II*. v. 2, p. 51-62, 1985.

SOUNDRY, M. *et al.* Action d'un laser hélium-néon sur la croissance cellulaire: étude in vitro sur fibroblastes gingivaux humains. *Journal of Biologie Buccale*, v. 16, p. 129-135, 1988.

SPANGBERG, L. Biological effects of root canal filing materials. 1. Media for the investigation of the toxic effect of water-soluble substances on human cells in vitro. *Odontol. Rev.* v. 20, n. 2, p. 123-132, 1969.

_____. Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. v. 35, n. 3, p. 389-401, 1973.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*. v. 332, p. 217-219, 1988.

STADLER, J. *et al.* The effect of low-level laser irradiation on lymphocytes from peripheral blood. In: ANNUAL MEETING OF LASERS IN SURGERY AND MEDICINE, *Proceedings...* San Diego, Ca., [s.ed.], p. 16-18, 1999.

STEINLECHNER, C. W. B.; DYSON, M. The effects of low level laser therapy on the proliferation of keratinocytes. *Laser Therapy*. v. 5, p. 65-73, 1993.

STRUBE, D. *et al.* Störeffekte bei tierversuchen zur stimulation der wundheilung mit laserlicht. *Lasers Medicine Surgery*. v. 4, p. 15-20, 1988.

SUGRUE, M. E. *et al.* The use of infrared laser therapy in the treatment of venous ulceration. *Ann. Vasc. Surgery*. v. 4, p. 179-181, 1990.

SULEWSKI, J. G. Historical survey of laser dentistry. *Dent. Clin. North American*. v. 44, n. 4, p. 717 – 752, 2000.

SURINCHACK, J. S. *et al.* Effects of low level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Laser in Surgery and Medicine*. n. 2, p. 267-274, 1983.

SVAASAND, L. O. Biostimulation with low-intensity lasers: physics or metaphysics? *Nordisk Med*. v.105, p. 72, 1990.

SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World Journal of Surgery*. n. 20, p. 411-417, 1996.

TADROS, T. *et al.* Angiotensin II inhibitor Du P753 attenuates burn and endotoxin-induced gut ischemia, lipid peroxidation, mucosal permeability, and bacterial translocation. *Ann. Surgery*. v. 231, p. 566-576, 2000.

TEJERINA, C. *et al.* Burns in patients over 60 years old: epidemiology and mortality. *Burns*. v. 18, n. 2, p. 149-52, 1992.

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

TODD, R.; DONOFF, B. R.; CHIANG, T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *American Journal of Pathology*. v. 138, p. 1307-1313, 1991.

TREDGET, E. E.; MING YU, Y. The metabolic effects of thermal injury. *World Journal of Surgery*. n. 16, p. 68-79, 1992.

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

TRELLES, M. A. *et al.* Clinical use of He-Ne laser for wound healing. *Journal of Bloodless Medicine Surgery*. v. 7, n. 1, p. 3-7, 1989a.

TRELLES, M. A. *et al.* Histamine & Low Power Laser. *Journal of Bloodless Medicine Surgery*. v. 6, n. 1, p. 15-16, 1988.

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

TRELLES, M. A.; MAYAYO, E.; IGLESIAS, J. M. Histological study of the effect of the 632 nm HeNe irradiation on the nasal mucous of the rabbit. Its clinical interest. In: INTERNATIONAL CONGRESS OPTOELEKTRONIK. *Proceedings..* [s.l.:s.ed.], p.105-109, 1983.

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

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

VELÉZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* Treatment of relapse in Herpes simplex on labial & facial areas and of primary herpes simplex on genital areas and area pudenda with low power laser (He-Ne) or acyclovir administered orally. In: THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING. *Proceedings...* [s.l.: s.ed.], p. 43-48, 1994.

VERA MENDEZ, T. M. T. *Avaliação da influência da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas a laserterapia*. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.

VICENT, G. M. *et al.* Presence of blood significantly decreases transmission of 630 nm laser light. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 11, p. 399-403, 1991.

VILLAPLANA, L. A. *et al.* Changes in albino rat testicle interstitial cells after pituitary stimulation in vivo with HeNe Laser. *Laser Therapy*. v. 7, p. 19-22, 1995.

VISCOR, G.; PALACIOS, L.; PALOMEQUE, J. Effect of He-Ne laser irradiation of blood in vitro on erythrocyte microrheological properties. *Lasers Life Science*. v. 3, n. 1, p. 31-36, 1989.

VOLPI, N. *et al.* Adenylate pool and energy change in human lymphocytes and granulocytes irradiated at 632 nm (HeNe laser). *Laser Technology*. v. 5, n. 1/2, p. 19-23, 1995.

WACHTEL, T. L. Epidemiology, classification, initial care, and administrative considerations for critically burned patients. *Critical Care Clinics*. v.1, n. 1, p. 3-6, 1985.

WAITZMAN, A. A.; NELIGAN, P.C. How to manage burns in primary case. *Com Fam Physician*. v. 39, p. 2394-2400, 1993.

WALKER, M. *et al.* Effect of Low- Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation-Impaired Wound -Healing Model in Murine Skin. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 26, p. 41-47, 2000.

WARD, P. A.; FRIEDL, H. P. Role of histamine, complement and xantine oxidase in thermal injury of skin. *American Journal of Pathology*. v. 135, n. 1, p. 203-217, 1989.

WATANABE, I. *et al.* Estudo ao microscópio óptico e eletrônico de transmissão na cicatrização de feridas produzidas pelo laser de CO2 no palato do rato. *Acta Cirurg. Bras*. v. 2, n. 4, p.108-112, 1987.

WEBB, C.; DYSON, M.; LEWIS, W. H. P. Stimulatory effect on 660 nm low level laser energy on hypertrophic scan-derived fibroblasts: Possible mechanisms for increase in cell culture. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 22, p. 294-301, 1998.

WEI, Y. U. *et al.* Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. *Lasers in Surgery Medicine*. v. 20, p. 56-63, 1997a.

WEI, Y. U. *et al.* Improvement of host response to sepsis by photobiomodulation. *Lasers in Surgery and Medicine*. v. 21, p. 262-268, 1997b.

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

WHARTON, D. C.; GIBSON, W. H. Possible chromophore os Copper. In: PEISACH, J.; CUSEN, P.; BLUMBERG, Y. W. E. *Copper: The Biochem.* [s.l.:s.ed.], p. 236-265, 1966.

WHARTON, D. C.; TZAGOLOFF, A. Studies on the electron transfer system. *Journal of Biology and Chemistry.* v. 239, p. 2036, 1964.

WILLIAMS, T. J. Factors that affect vessel reactivity and leukocyte emigration. In: CLARK, R. A. F.; HENSON, P. M. (Eds.) *The molecular and cellular biology of wound repair.* New York: Plenum Press, p.115-147, 1988.

WOLFE, R. R. Relation of metabolic studies to clinical nutrition: the example of burn injury. *American Journal of Clinical Nutrition.* n. 64, p.800-808, 1996.

YILMAZ, S. *et al.* Effects of Galium Arsenide Diodo Laser on Human Periodontal Disease: A Microbiological and Clinical Study. *Lasers in Surgery and Medicine.* v. 30, n. 1, p. 60-66, 2002.

YOUNG, S. R.; DYSON, M.; BOLTON, P. Effect of light on calcium uptake by macrophages. *Laser Therapy.* v. 2, n. 2, p. 53 -57, 1990.

ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L178/2005/CEP, intitulado "*O efeito do laser de baixa potência (658nm) na reparação tecidual de queimaduras de terceiro grau, em ratos Wistar*", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Egberto Munin, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecação de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

Informamos que o pesquisador responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação.

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2005.



PROF. DR. LANDULFO SILVEIRA JUNIOR
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP