

VIVIANE LUCCI BUSNARDO

**OS EFEITOS DO LASER HÉLIO-NEÔNIO DE BAIXA POTÊNCIA NA
CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS INDUZIDAS, EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica
da Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões

Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

CURITIBA
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dificuldades e obstáculos são fontes valiosas de saúde e força para
qualquer sociedade.

Albert Einstein

Ao DEUS único.

Aos meus pais Celso e Graça, pelo exemplo de vida, perseverança e respeito ao próximo. Agradeço a vocês por minha formação e por todo amor dedicado.

Ao meu esposo Gustavo, por seu apoio em todos os momentos. Agradeço-lhe pela infinita compreensão e dedicação a mim prestada.

Aos meus pequenos Giulia e Gustavo, filhos amados, fontes de inspiração e esperança em um futuro melhor.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões, orientadora deste trabalho, por todo incentivo e ensinamentos. A minha admiração e o meu muito obrigado por ter me acolhido como sua aluna e pela confiança em mim depositada.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por ter me recebido como aluna do Programa de Pós- Graduação em Cirurgia, possibilitando a minha titulação.

À Prof.^a Márcia Olandoski, pela disponibilidade e competência na realização do estudo estatístico.

Ao Prof. Roberto Mattar Cepeda e à Universidade Positivo, por viabilizarem a realização das etapas teóricas e práticas desta pesquisa.

Ao Dr. Indalécio Mainardes Sutil, médico veterinário responsável pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela colaboração na obtenção dos animais de experimentação.

Aos Funcionários do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela colaboração durante a realização do presente trabalho.

Aos Funcionários da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná: Sr. Álvaro Roberto Gonçalves Machado e Sr. Misael Barbosa. Agradeço por toda a presteza, experiência e paciência a mim dedicadas. Meu sincero respeito.

À Sr.^a Liége Miranda, pela grande amizade e colaboração preciosa na revisão deste trabalho.

Às pessoas com quem convivi durante este período, pela paciência e compreensão a mim dedicadas nos momentos de estresse e ausência.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 OBJETIVO.....	05
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 BIOFÍSICA DO <i>LASER</i>	07
2.2 <i>LASER</i> DE BAIXA INTENSIDADE.....	08
2.3 GERAÇÃO DO <i>LASER</i> HE-NE.....	09
2.4 INTERAÇÃO <i>LASER</i> -TECIDOS.....	09
2.4.1 Efeitos Primários da Interação do Laser com a Matéria.....	10
2.4.2 Tecido Epitelial.....	17
3 MÉTODOS.....	19
3.1 AMOSTRA.....	20
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO.....	20
3.3 PROCEDIMENTO.....	20
3.3.1 Pós-Operatório.....	21
3.3.2 Grupos de Estudo.....	22
3.3.3 Tratamento a <i>Laser</i>	22
3.3.4 Eutanásia.....	24
3.3.5 Coleta do Material para Estudo.....	24
3.4 MÉTODO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	25
3.4.1 Índice de Maturidade da Cicatriz.....	28
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 ASPECTOS MICROSCÓPICOS GERAIS.....	31
4.2 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE COLÁGENO NAS CICATRIZES.....	37
4.2.1 Colágeno Tipo I.....	37
4.2.2 Colágeno Tipo III.....	39
4.2.3 Colágeno Total.....	41
4.2.4 Índice de Maturidade da Cicatriz (IMaC).....	45
4.2.4.1 Análise do índice de maturidade dicotomizado.....	47
4.3 REAÇÃO INFLAMATÓRIA AVALIADA PELA IMUNOISTOQUÍMICA.....	49
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONCLUSÕES.....	60
7 REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 3.º dia nos dois grupos.....	48
Tabela 2 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 7.º dia nos dois grupos.....	48
Tabela 3 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 14.º dia nos dois grupos.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos cortes corados pela Hematoxilina-eosina (HE).....	26
Quadro 2 – Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com escores final de cada grupo.....	26
Quadro 3 – Equação para cálculo do Índice de Maturação da Cicatriz (IMaC).....	28
Quadro 4 – Variações do Índice de Maturidade da Cicatriz (IMaC).....	29
Quadro 5 – Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com três dias de evolução.....	31
Quadro 6 – Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com sete dias de evolução.....	32
Quadro 7 – Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com quatorze dias de evolução.....	32
Quadro 8 – Média dos valores totais dos escores dos três momentos de avaliação.....	32
Quadro 9 – Valores de p para comparação dos escores entre os grupos nos três momentos de avaliação.....	33
Quadro 10 – Valores de p para comparação dos escores nos três momentos de avaliação, dentro de cada grupo.....	33
Quadro 11 – Estatísticas descritivas do percentual de colágeno I.....	38
Quadro 12 – Estatísticas descritivas do percentual de colágeno III.....	40
Quadro 13 – Comparação das médias do colágeno III, dos dois grupos, em cada momento de avaliação.....	40
Quadro 14 – Comparação das médias do colágeno III, nos momentos de avaliação em cada grupo	41
Quadro 15 – Estatísticas descritivas do percentual de colágeno total.....	42
Quadro 16 – Comparação das médias do colágeno total, nos dois grupos, em cada um dos momentos de avaliação.....	43
Quadro 17 – Comparação das médias do colágeno total, nos três momentos de avaliação, em cada grupo	43
Quadro 18 – Índice de maturidade das cicatrizes nos três tempos estudados e nos dois grupos	46
Quadro 19 – Estatísticas descritivas das médias do número de leucócitos de cada grupo, em cada momento de avaliação.....	50
Quadro 20 – Comparação das médias do número de leucócitos, nos dois grupos, em cada um dos momentos de avaliação.....	51
Quadro 21 – Comparação das médias do número de leucócitos presentes, nos três momentos, em cada grupo.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aspecto final da incisão, feita no dorso do rato.....	21
Figura 2 – Esquema representativo da delimitação da composição da amostra.....	22
Figura 3 – Aparelho de <i>laser</i> He-Ne da marca KLD Biosistemas®.....	23
Figura 4 – Rato recebendo aplicação do <i>laser</i>	24
Figura 5 – Esquema da delimitação do retalho ressecado e do segmento da cicatriz utilizado para exame.....	25
Figura 6 – Fotomicrografia de corte histológico de área de cicatriz, corado pelo <i>Sirius Red</i> sob luz polarizada (200X).....	27
Figura 7 – Demonstração gráfica da evolução inflamatória nos grupos controle e experimento, nos três tempos avaliados.....	34
Figura 8 – Figura 7 – Aspectos histológicos observados no terceiro dia, demonstrando a presença de células inflamatórias (PMN) (→) e congestão vascular (*), nos cortes histológicos das cicatrizes dos grupos experimento e controle (HE – 100 X).....	35
Figura 9 – Fotomicrografias demonstrando o processo inflamatório (→) com 7 dias de evolução, em cortes obtidos de cicatrizes de GE (Experimento) e de GC (Controle) (HE – 100 X).....	36
Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos de cicatrizes dos grupos GE (Experimento) e de GC (Controle) com 14 dias de evolução onde se pode observar redução do infiltrado de células inflamatórias (→) e fibroplasia (*) (HE – 100 X).....	36
Figura 11 – Relação das médias percentuais de colágeno I dos dois grupos em cada momento de avaliação.....	37
Figura 12 – Comparação das médias do colágeno I nos três momentos, dos dois grupos.....	38
Figura 13 – Relação das médias percentuais do colágeno III, dos dois grupos, em cada momento de avaliação.....	39
Figura 14 – Comparação das médias de colágeno III, nos três momentos.....	41
Figura 15 – Relação das médias percentuais do colágeno total, dos dois grupos, em cada momento de avaliação.....	42
Figura 16 – Comparação das médias do colágeno total, nos três momentos de avaliação, dos dois grupos.....	44
Figura 17 – Fotomicrografia de corte histológico de área de cicatriz, corado pelo <i>Sirius Red</i> sob luz polarizada (200X), mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III, na avaliação do terceiro dia.....	44
Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico de área de cicatriz, corado pelo <i>Sirius Red</i> sob luz polarizada (200X), mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III, na avaliação do sétimo dia.....	45
Figura 19 – Fotomicrografia de corte histológico de área de cicatriz, corado pelo <i>Sirius Red</i> sob luz polarizada (200X), mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III, na avaliação do décimo-quarto dia.....	45
Figura 20 – Relação das médias do IMAc do grupo experimento e controle	

nos três momentos de pós-operatório.....	46
Figura 21 – Comparação das médias do IMaC dos dois grupos nos três momentos do pós-operatório.....	47
Figura 22 – Percentual do IMaC do grupo controle e experimento nos três momentos do pós-operatório.....	49
Figura 23 – Relação das médias percentuais de leucócitos, nos dois grupos, em cada momento de avaliação.....	50
Figura 24 – Comparação das médias do número de leucócitos presentes nos cortes histológicos, nos três momentos de avaliação, nos dois grupos.....	52
Figura 25 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45, na avaliação do terceiro dia (400X).....	52
Figura 26 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45, na avaliação do sétimo dia (400X).....	53
Figura 27 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45, na avaliação do décimo-quarto dia (400X).....	53

RESUMO

Introdução: embora tenham sido realizados e publicados muitos estudos clínicos favoráveis ao uso do *laser* de baixa potência, na cicatrização de feridas cutâneas, os seus mecanismos que aceleram o processo de cicatrização não estão totalmente elucidados. **Objetivo:** reconhecer os efeitos do *laser* de baixa potência hélio e neônio (He-Ne) na cicatrização de feridas cutâneas, em ratos, observando a fase inflamatória e a fibroplasia. **Métodos:** utilizaram-se 60 ratos Wistars, machos adultos entre 100 e 150 dias, divididos em 2 grupos: grupo controle e experimento. Foram submetidos à incisão longitudinal, na parte mediana do dorso e em seguida, realizou-se a síntese com pontos separados simples, de um em um centímetro. Os animais foram avaliados no 3.º 7.º e 14º dia de pós-operatório. O grupo experimento foi irradiado com *laser* He-Ne com densidade energética de 4 J/cm² em 3 pontos da lesão com duração de 36 segundos em cada ponto diariamente. Depois de realizado o protocolo de experimento, os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia no 3.º 7.º e 14º dia de pós-operatório. Para a análise histológica foi ressecada a área da cicatriz e os cortes foram corados pela Hematoxilina Eosina a fim de identificar os aspectos gerais, pela técnica do Picrosirius por meio de videomorfometria para a identificação dos colágenos I e III e uma das lâminas foi destinada ao estudo imunoistoquímico com anti CD45 (LCA – Antígeno Leucocitário) para o reconhecimento das células inflamatórias. **Resultados:** na avaliação da inflamação, com três dias de evolução, pôde-se verificar que, nos dois grupos de estudo, o processo inflamatório tinha características de processo agudo. No sétimo dia, passou a ter características de sub-agudo e no décimo-quarto dia de crônico. Na comparação entre os dois grupos, demonstrou haver maior densidade de colágeno do tipo III no grupo experimento, no terceiro dia ($p = 0,001$) o que deixa de existir no sétimo e no décimo-quarto dia. Na análise de cada momento, pôde-se observar que o grupo experimento tinha maior densidade de colágeno total com três dias de evolução ($p = 0,001$). Na avaliação dos momentos 3.º 7.º e 14º, não houve diferença significativa com relação ao Índice de maturidade da cicatriz (IMaC). A análise das médias do número de leucócitos, em cada um dos tempos, permitiu verificar que, no grupo experimento, a intensidade do processo inflamatório foi menor nos três tempos e a regressão foi mais rápida, sendo no 3.º 7.º e 14º os valores de $p < 0,001$. **Conclusão:** observou-se que o *laser* não modifica a qualidade da reação inflamatória, incrementa a deposição de colágeno no início do processo cicatricial, verificado na avaliação do 3.º dia em virtude da maior densidade de colágeno, tanto do tipo I como do tipo III, não interfere no IMaC e diminui a intensidade do infiltrado inflamatório, facilitando sua resolução em todos os tempos avaliados.

DESCRITORES: 1.Cicatrização de Feridas. 2. Laser Terapia de Baixa Intensidade. 3. Laser de gases Hélio e Neônio. 4.Colágeno.

ABSTRACT

Introduction: Many clinical studies have been carried out and published which are favorable to the use of low power lasers, although the mechanisms by which these improve the healing process have not been totally clarified. **Aim:** To recognize the effect of the Helium Neon (HeNe) low power laser in the healing of cutaneous wounds in rats, observing the inflammatory stage and fibroplasia. **Methods:** Sixty male Wistar rats aged between 100 and 150 days were utilized, divided into two groups: the control group and the experiment group. They were submitted to a longitudinal incision in the mid region of the dorsum and then the synthesis was made with simple separate stitches at one centimeter intervals. The animals were evaluated on the third, seventh and fourteenth days after the operation. The experiment group was submitted to the HeNe laser with an energy density of 4 J/cm² on three stitches on the wound for thirty-six seconds on each stitch on a daily basis. Following the experiment protocol, the animals from each group were submitted to euthanasia on the third, seventh and fourteenth days after surgery. For histological analysis, the scar area was removed and the cuts were stained by Hematoxylin Eosin to identify the general aspects using the picosirius technique to identify collagens I and III, and one of the blades was stained by immuno-histochemical study with anti CD45 (LCA – Leukocyte Antigen) to identify the inflammatory cells. **Results:** On the third day there were characteristics of the acute process in both groups. On the seventh day, the characteristics became sub-acute, and on the fourteenth day they were chronic. In the comparison between the two groups, there was greater type III collagen density in the experiment group on the third day ($p = 0.001$) which was no longer found on the seventh and fourteenth days. In each analysis, the experiment groups had higher total collagen density on the third day ($p = 0.001$). When evaluated on the third, seventh and fourteenth days there was no significant difference in terms of the healing maturity index. The analysis of the average numbers of leukocytes on each of the three days showed that, in the experiment group, the intensity of the inflammatory process was lower at all times and regression was more rapid. On the third, seventh and fourteenth days, the values were $p < 0.001$. **Conclusion:** The laser does not modify the quality of the inflammatory reaction; it increases deposition early in the healing process, which was seen on the third day, due to the higher intensity of collagen both in type I and type III; it does not interfere in the healing maturity index and reduces the intensity of the inflammatory infiltration, facilitating its resolution, as observed at all times during the evaluation.

KEY WORDS: 1. Wound Healing. 2. Laser Therapy Low-Level. 3. Laser Gas. 4. Collagen.

1 Introdução

O processo de cicatrização tecidual é muito complexo e envolve inúmeros efeitos biológicos, tais como alterações vasculares e celulares, proliferação epitelial, proliferação de fibroblastos, produção de colágeno, elastina e proteoglicanos, revascularização e contração da ferida^{1, 2}.

As ações envolvidas neste processo de reparo estão integradas entre as células, a matriz e os mensageiros químicos que visam a recuperar a integridade do tecido com a maior rapidez possível. Este é um mecanismo homeostático para restauração do equilíbrio fisiológico e pode ser iniciado como resultado da perda de comunicação entre as células adjacentes e seu meio de sustentação ou pela morte celular. O reparo pode ser descrito em termos de quimiotaxese, multiplicação celular e diferenciação. A cascata de eventos que ocorre inclui a migração de células de origem nos tecidos vasculares e conjuntivos até o local da lesão. Para isto, substâncias quimiotáticas são liberadas *in situ*³.

Existe ainda o envolvimento de dois mecanismos distintos: a regeneração, que se refere à substituição das células lesadas por células do mesmo tipo sem deixar qualquer sinal residual da lesão anterior e a fibroplasia ou fibrose, que se refere à substituição por tecido conjuntivo, deixando cicatriz permanente. Na maioria dos casos, ambos os processos contribuem para o reparo cicatricial⁴.

A cicatrização por primeira intenção, também chamada de união primária, é considerada o exemplo menos complicado no reparo de feridas. Esta é possível quando a ferida está limpa. A incisão provoca a morte de um número limitado de células epiteliais e células do tecido conjuntivo. O espaço da lesão é preenchido imediatamente por fibrina e células sangüíneas. Dentro de vinte e quatro horas surgem os neutrófilos nas margens da lesão, a epiderme sofre importante espessamento e em aproximadamente quarenta e oito horas ocorrem projeções de células epiteliais. Até completar o 3.º dia de lesão, os neutrófilos são a maior parte dos elementos celulares, substituídos, na seqüência, pelos macrófagos. O tecido de granulação invade a ferida e em suas margens ocorre a deposição das fibras de colágeno. Prossegue a proliferação de células epiteliais com conseqüente aumento da camada epidérmica. Aproximadamente no 5.º dia, a

ferida é preenchida por tecido de granulação, ocorrendo o pico da neovascularização. As traves de colágeno ficam mais evidentes formando pontes. A epiderme recupera sua espessura normal e a diferenciação de células superficiais produz uma arquitetura epidérmica madura com queratinização superficial³.

Durante a segunda semana, ocorre acúmulo contínuo de colágeno, bem como a proliferação dos fibroblastos. O infiltrado de leucócitos, o edema e o aumento da vascularidade já desaparecem em sua maior parte. Nessa ocasião, inicia-se o longo processo de empalidecimento, devido ao aumento do acúmulo de colágeno na cicatriz, acompanhado da regressão dos canais vasculares⁴.

Completado um mês de lesão, a cicatriz consiste em um tecido conjuntivo celular destituído de infiltrado inflamatório, recoberto por uma epiderme intacta. A força elástica ou de tensão da ferida aumenta após alguns meses, não sendo possível sua completa recuperação³.

A cicatrização também depende de vários fatores como: a localização anatômica, o tipo de pele ou fototipo e da técnica cirúrgica utilizada⁴.

As falhas que ocorrem nos processos iniciais de reparação são mais importantes, levando à acentuação do edema, à reduzida proliferação vascular e à diminuição dos elementos celulares tais como: leucócitos, macrófagos e fibroblastos⁴. Essas alterações são responsáveis por complicações do processo de cicatrização, além de contribuírem para aumentar o risco de infecções^{2,4}.

O *laser* é uma emissão de luz coerente, monocromática, com grande concentração de energia, capaz de provocar alterações físicas e biológicas⁵. A incorporação do *laser* como instrumento terapêutico tem sido acompanhada, na área biomédica, desde 1960, porém apesar de inúmeras pesquisas sobre seus efeitos, existe grande dificuldade em se justificar as variáveis físicas como: técnica de aplicação, doses, profundidade, modos e tempo de exposição⁶.

A radiação *laser* pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada pelo tecido. A monocromaticidade do *laser* determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos, com resposta a um ou a vários comprimentos de onda, fenômeno conhecido como ressonância a uma determinada frequência. Portanto, cada comprimento de onda terá um tipo diferente de interação segundo o tecido-alvo⁴.

O *laser* de baixa potência tem sido utilizado desde o final da década de 1960, sendo sua potência de radiação extremamente baixa (de 2 a 30 mW) e os efeitos biológicos podem ocorrer devido aos efeitos diretos da radiação e não como resultado de aquecimento⁶. O poder de penetração não vai além de poucos milímetros sendo que sua energia é absorvida nos diferentes extratos da pele.

Mester⁷ reportou que o *laser* hélio e neônio (He-Ne), de baixa potência, poderia ajudar na cicatrização de lesões causadas mecanicamente. Desde então, foi mostrado que este *laser* possui efeitos diversos em tecidos vivos, efeitos conhecidos como bioestimulação por *laser*⁸. Argumentações de cicatrização de lesões foram confirmadas por alguns^{9,10}, mas outros falharam em encontrar alguma melhoria na cicatrização de lesão ou úlcera¹¹⁻¹³. Em alguns estudos^{9,10}, os efeitos da luz vermelha monocromática não-coerente foram idênticos aos da luz do *laser*. Estudos *in vivo* provaram a dificuldade em identificar tantos fatores locais quanto sistêmicos os quais afetam a cicatrização. Diversos estudiosos utilizaram diferentes tipos de *laser*, cada um com seu comprimento de onda característico. O tempo de exposição e a frequência de tratamentos variaram e a irradiação, raramente, era a mesma para dois experimentos. Há uma riqueza de dados, mas a comparação dos resultados é difícil.

Os efeitos terapêuticos do *laser* sobre os diferentes tipos biológicos são amplos, dentre esses se destacam os efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos, em estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esses estudos demonstraram que a regeneração tissular torna-se mais eficaz, quando tratada com *laser* de baixa potência^{13,14}.

Carvalho et. al.¹³ realizaram estudo em ratos usando He-Ne e concluíram que o *laser* de He-Ne era eficiente no tratamento de feridas cutâneas acelerando seu processo de reparo. Afirmaram que, quando esta radiação era aplicada, havia um incremento do processo cicatricial, com uma rede de fibras colágenas melhor elaborada do que a das feridas dos animais não submetidos ao mesmo tratamento.

A presente pesquisa foi motivada pela falta de consenso de trabalhos científicos sobre os efeitos que possam interferir no processo de cicatrização de feridas cutâneas com a utilização da radiação de *laser* de baixa potência, tema investigado por alguns autores, porém, não amplamente explorado em todas suas variáveis. Este estudo pretende utilizar como base a avaliação histológica por

meio de técnica de histoquímica e imunoistoquímica, dos efeitos do *laser* de baixa potência na recuperação de feridas, sendo analisadas especificamente as fases inflamatória e de fibroplasia das lesões.

1.1 OBJETIVO

Identificar os efeitos do *laser* de baixa potência He-Ne na cicatrização de feridas cutâneas, em ratos, observando a fase inflamatória e a fibroplasia.

2 Literatura

A palavra *laser* é um acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*: amplificação da luz por meio da emissão estimulada de radiação. Ela se refere à produção de um feixe de radiação que se diferencia da luz comum por algumas características específicas como: monocromaticidade, coerência temporal e espacial^{6,15}.

2.1 BIOFÍSICA DO LASER

Segundo Low e Reed⁵ a maioria dos lasers é composta dos seguintes elementos:

- ressonador: uma estrutura contendo o meio de *laser* e que incorpora um par de superfícies refletoras ou espelhos posicionados paralelamente;
- meio ativo: capaz de ser “bombeado” com energia de modo a resultar na produção de uma emissão estimulada. Os principais meios ativos utilizados são: a mistura gasosa de hélio e neônio (He-Ne) com um comprimento de onda 632,8 nm (luz vermelha) e os semicondutores de arseneto de gálio (Ga-As), 630 e 950 nm; e
- mecanismo de excitação ou bombeamento (fonte de energia): o qual possibilita o bombeamento do meio *laser* para a produção da emissão estimulada.

A radiação a *laser* difere da luz comum nos seguintes aspectos^{5,6,15}.

- monocromaticidade: um único comprimento de onda e portanto tem uma frequência definida;
- colimação: uma luz *laser*, o raio de luz ou fótons produzidos pelos aparelhos que são paralelos, quase sem divergência da radiação

emitida com a distância; e

- coerência: a radiação *laser* não tem apenas o mesmo comprimento de onda como também a mesma fase, ou seja, os picos e as depressões dos campos elétricos e magnéticos ocorrem ao mesmo tempo (coerência temporal). Além disso, todos correm na mesma direção (coerência espacial).

O *laser* de baixa intensidade pode interagir com o tecido irradiado de duas formas^{5,6,15}:

- espalhamento da luz incidente: mudança na direção de propagação da luz; e
- absorção da luz incidente por um cromóforo: a luz nos comprimentos de onda tipicamente empregados é prontamente absorvida por várias biomoléculas como a melanina e a hemoglobina.

A profundidade de penetração e a absorção dependem do comprimento de onda da luz incidente^{6,15}.

As irradiações *laser* possuem um comprimento de onda específico e único e desta forma têm frequência definida. No *laser* visível é produzida uma única cor; o He-Ne produz uma luz vermelha com comprimento de onda de 632,8 nm. O *laser* é a maneira mais eficiente de produzir radiação monocromática.

2.2 LASER DE BAIXA INTENSIDADE

O termo laserterapia de baixa potência ou baixa intensidade é usado para distinguir a aplicação terapêutica dos lasers de diodos supraluminosos, monocromáticos e com potência relativa baixa (menor que 500m W). O *laser* He-Ne é considerado “*soft laser*” por promover baixa intensidade energética a qual provoca uma reação menor do que o *laser* de alta energia que é conhecido por “*power laser*”, usado com o objetivo de destruir e/ou cauterizar tecidos em procedimentos cirúrgicos que utilizam *laser*^{5,6}.

Os equipamentos de *laser* de baixa e média potência (também considerados frios ou *soft laser*) não causam resposta térmica nos tecidos⁵.

A epiderme humana parece absorver 99% da radiação por *laser*, mas isto

varia dependendo da pigmentação da pele. A absorção também depende da duração de onda e da frequência da luz do *laser*. A radiação por *laser* pode penetrar a uma profundidade de 20 a 30 milímetros em áreas de tecido mole, mas somente dois a três milímetros em ossos⁶.

Comprimentos de ondas diferentes possuem profundidades de penetração diferentes; assim, é possível adequar de forma segura as quantidades ou densidades de energia absorvidas em diferentes profundidades, selecionando-se um comprimento de onda apropriado.

Em estudo sobre o comprimento de onda do *laser*, King *et al*¹⁶, relatam que a profundidade de penetração da luz vermelha em tecido mole é de aproximadamente um a dois milímetros; mas em torno de dois a quatro milímetros do *laser* infravermelho de comprimento de 800-900nm. Assim, as radiações que penetram mais profundamente, isto é, aquelas do infravermelho (AsGA) tais como 904nm, são indicadas para a tela subcutânea, enquanto lesões mais superficiais como as lesões de pele são apropriadamente tratadas por laserterapia de baixa potência (lasers vermelho He-Ne), que serão absorvidos na pele¹⁶.

Há três maiores ações nas quais a laserterapia é usada^{5,6} analgesia, regeneração de tecidos e efeito antiinflamatório.

2.3 GERAÇÃO DO LASER HE-NE

O *laser* He-Ne é gerado a partir da aplicação de uma tensão elevada entre os eletrodos de uma ampola contendo gás de He-Ne. A interação entre os dois gases excitados faz com que ocorra um deslocamento de átomos de He-Ne ao seu estado fundamental e assim acontece a emissão de onda eletromagnética. As ondas geradas são guiadas para fora da ampola por meio de espelhos estrategicamente colocados no interior da mesma⁵.

2.4 INTERAÇÃO LASER-TECIDOS

Ao submeter a pele ao *laser* de He-Ne (luz visível) ou de Arseneto de Gálio (infravermelho), uma pequena parcela de luz é absorvida pela derme e epiderme. Isso ocorre devido à presença de fotorreceptores nessas camadas.

Normalmente cada tipo de fotorreceptor é sensível a um determinado

comprimento de onda. Assim, o *laser* que é uma luz monocromática, possui um único comprimento de onda, é absorvido de maneira seletiva.

2.4.1 Efeitos Primários da Interação do *Laser* com a Matéria¹⁵

- Efeito Bioquímico: o *laser* promove a liberação de substâncias pré-formadas como: histamina, serotonina e bradicinina, bem como modificações enzimáticas normais, tanto acelerando quanto retardando essas reações.
- Efeito Bioelétrico: a radiação *laser* proporciona incremento na produção de ATP, o que promove aumento na eficiência da bomba de sódio-potássio. Com isso a diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior da célula é mantida com melhores resultados.
- Efeito Bioenergético: defende-se que o aporte energético da radiação *laser* tem capacidade de normalizar o contingente físico dos indivíduos.

Os tipos de *laser* de baixa intensidade, como os de rubi, He-Ne e arseneto de gálio, possuem efeito fotobiológico que promove incremento dos eventos relacionados ao processo de cicatrização tecidual. Esses dispositivos atuam em nível celular, por meio de interação fotoquímica, podendo aumentar o metabolismo celular e, conseqüentemente, induzir diferentes efeitos como analgésico, antiinflamatório e reparador^{5,6,17}.

Kana *et al.*¹⁸ pesquisaram os efeitos da irradiação a *laser* de baixa intensidade He-Ne (potência de 25m W e comprimento de onda de 632,8 nm) em feridas, no dorso de ratos. A emissão do *laser* foi realizada de forma contínua, com densidade energética de 4, 10 e 20 J/cm² diariamente, em um período de 17 dias consecutivos. Os autores verificaram que as feridas irradiadas com doses de 4 J/cm², apresentaram cicatrização mais rápida, com maior produção de colágeno. No grupo irradiado com 20 J/cm², observaram redução da velocidade de cicatrização.

Estudos anteriores, descritos por Mester *et al.*⁷, relataram que o *laser* de baixa potência (He-Ne) promoveria aumento da deposição de colágeno na

cicatrização de feridas. Os autores também descreveram um incremento na vasodilatação e na síntese do RNA.

Saperia *et al.*¹⁹ utilizaram o *laser* He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm e com potência média de 1,56 mW, para irradiar feridas de tecido mole (pele, músculo, tendão, ligamento) em animais. As lesões foram irradiadas com densidade energética de 0,596 J/cm², três vezes por semana, durante 28 dias. Avaliaram a formação de colágeno pelos níveis de RNA mensageiro para o protocógeno tipo I e tipo III, presentes na ferida. Os resultados demonstraram elevados níveis de RNA após 17 e 28 dias da irradiação com o *laser*, indicando que o seu uso poderia exercer uma ação na cicatrização tecidual na fase de transcrição do RNA.

Colver *et al.*²⁰ investigaram a natureza da influência, na cicatrização de lesões, do *laser* de baixa intensidade, estudando para isto os setes componentes do processo curativo *in vitro*: fibroblasto da pele humana, proliferação das células epiteliais e endoteliais, migração celular de implantes de pele, contração do colágeno, síntese do colágeno e secreção de glicosaminoglicanas (GAG). Utilizaram o *laser* de baixa intensidade He-Ne de 5 mW, que emite um feixe de um milímetro de diâmetro e comprimento de onda na faixa de 638nm. Verificaram que não houve alteração da proliferação celular por meio da irradiação com *laser*, três vezes ao dia, no período de três dias. Concluíram que não houve efeito na migração celular ou na taxa de contração de colágeno. A taxa para síntese de colágeno, medida com a incorporação de H-prolina na proteína colagenase-sensitiva no grupo experimento, não foi maior do que no grupo controle e a secreção de GAG não aumentou no grupo irradiado. Sendo assim, os autores não encontraram efeito significativo na irradiação de He-Ne em cultura de fibroblastos.

Skinner *et al.*²¹ estudaram os efeitos do laser de baixa potência Arseneto de Gálio (AsGA) pulsado na cultura celular de fibroblastos em células embrionárias humanas. A densidade de energia variou de 0 a 1 J/cm² e foi aplicada a irradiação no período de 1 a 4 dias. A produção do procolágeno foi monitorada pela síntese de [3H] hidroxiprolina e a replicação de DNA foi avaliada por [3H] incorporação de timidina. Os autores observaram aumento na produção de fibroblasto, após 4 dias de estimulação a *laser* com intervalos de 24 horas, com intensidades entre 0,099 e 0,522 J/cm².

Young *et al.*²² estudaram a influência da laserterapia na estimulação dos mediadores para o reparo cicatricial. Utilizaram para a pesquisa macrófagos. As células foram expostas a irradiações, em culturas, com diferentes comprimentos de ondas: 660 nm, 820nm, 870nm e 880nm com densidade energética de 2,4 J/cm² por 20 segundos. A fonte de luz de 820nm foi coerente e polarizada, e as outras não foram coerentes. Doze horas após a exposição, os macrófagos foram retirados e colocados na cultura de fibroblastos. A proliferação dos fibroblastos foi avaliada em um período de cinco dias. Os resultados obtidos evidenciaram que os comprimentos de onda do *laser* de 660nm, 820nm e 870nm, encorajaram os macrófagos a produzirem fatores, os quais estimularam a proliferação dos fibroblastos, quando comparados ao grupo controle. Já no grupo para o qual o comprimento da onda adotado foi de 880 nm (não coerente), observaram efeito inibitório na proliferação dos fibroblastos. A conclusão dos autores é que dependendo do comprimento (duração) de onda do *laser*, este pode ser um agente terapêutico eficaz por prover estimulação ou inibição da proliferação de fibroblastos quando necessário, sendo que a coerência nem sempre é essencial para a biomodulação a *laser*.

Bibicova *et al.*²³ relatam que a laserterapia por meio do *laser* de baixa intensidade, He-Ne, com comprimento de onda de 6,0 mW em média, irradiado em torno de 2 a 3 minutos, seria capaz de promover um preciso processo de neoformação de capilares sanguíneos (angiogênese) durante a reparação dos tecidos músculo-esqueléticos, em sapos. Comprovaram tal efeito após terem realizado estudos comparativos das densidades de volume e de superfície de capilares de zonas lesionadas entre o grupo experimento e o grupo controle.

Em estudo anterior, foram investigados os efeitos da fotoestimulação na síntese de colágeno. Os achados destes indicam que a fotoestimulação a *laser* dos fibroblastos aumentou significativamente o colágeno tanto quanto a síntese de DNA²⁴. Similarmente Rajaratnam *et al.*²⁵ observaram que a fotoestimulação a *laser* influencia na função dos macrófagos de produzir fatores de crescimento os quais aumentam a proliferação celular.

Yu *et al.*²⁶ pesquisaram a ação da irradiação a *laser* (660 nm) na produção de fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) a partir de células de fibroblastos em cultura celular. O estudo demonstrou que fibroblastos irradiados com *laser* de baixa energia de 2,16 J/cm² aumentaram a proliferação celular e reforçou a

produção de bFGF, enquanto que fibroblastos irradiados com densidade energética de 3,24 J/cm² não demonstraram aumento na proliferação celular ou uma melhora da produção do bFGF em comparação com o grupo controle.

Hardy *et al.*²⁷ demonstraram aumento do número de fibroblastos de ratos, expostos à fotoestimulação com *laser* pulsado com densidade energética de 10 J/cm² por cinco minutos, tanto no grupo experimento quanto no grupo controle. Yu *et al.*²⁸ mostraram que a fotoestimulação a *laser* de fibroblastos resultou em acúmulo dos fatores básicos de crescimento e aumento significativo da contagem de fibroblastos humanos derivados de cicatriz hipertrófica.

Pesquisas com culturas de células do tecido conjuntivo mostraram que a fotoestimulação com *laser* He-Ne pode aumentar a produção do colágeno e protocolágeno. Outro estudo sobre os efeitos da estimulação a *laser*, em células, têm reportado mudanças intracelulares específicas mais relatadas no metabolismo do cálcio. Efeitos estimulantes na proliferação dessas células podem ser benéficos para restabelecer o tecido conjuntivo durante a cicatrização de feridas.²⁹

Pesquisas avaliaram a influência da fotoestimulação a *laser* de He-Ne com baixas densidades energéticas em outros tipos de tecidos (tendões, ossos, e mucosa da faringe) com diferentes animais^{30,31,33}. Quanto à análise biomecânica dos tendões foi evidenciado aumento na concentração de colágeno, indicando um processo de cicatrização mais rápido em comparação ao grupo controle³⁰. Foi demonstrado em pesquisas, que o laser promove organização de matriz óssea em lesões tibiais em ratos³¹, induzidas por cirurgia. Porém, outro estudo³² demonstrou que o laser não interferiu na cicatrização óssea e atribuiu esse resultado à atenuação (perda) de densidade energética. Em mucosas de faringes de equinos, ficou evidenciado que as lesões, irradiadas com laser de He-Ne, cicatrizaram com 10 dias de tratamento em média, quando comparadas aos 18 dias do grupo controle³³.

Enquanto evidências continuam a se acumular sobre os efeitos positivos da fotoestimulação a *laser*, pesquisadores estudam outros aspectos da cicatrização de feridas como: a produção de colágeno e a síntese de DNA, a estimulação de macrófagos, a produção de citocinas e a taxa de formação do tecido conjuntivo³⁰.

Bisht *et al.*³⁴ avaliaram os efeitos do *laser* de He-Ne na cicatrização de feridas em ratos. Realizaram duas incisões dorsais medianas na pele dos

animais. Os ferimentos da lateral esquerda foram irradiados diariamente com *laser* de He-Ne com densidade energética de 4 J/cm², as incisões do lado direito serviram como controle. A média de dias necessários para a cicatrização completa no grupo controle foi de 12 a 15 dias, enquanto que nos grupos irradiados foram necessários de 9 a 12 dias. Nas amostras histológicas, foi possível observar precoce epitelização com maior reação fibroblástica e neovascularização nas incisões irradiadas. A concentração de colágeno aumentou significativamente no grupo experimento no 17º dia de pós-operatório. Os autores comprovaram a ação bioestimulante do *laser* na cicatrização de feridas nas peles dos ratos.

Pugliese *et al.*¹⁴ estudaram a ação do *laser* de baixa potência na síntese do colágeno e da elastina. Os autores realizaram ferimentos cutâneos, padronizados, no dorso de 72 ratos da linhagem Wistar, e logo após trataram as lesões com *laser* de baixa potência do tipo Arseneto de Gálio-Alumínio (Ga-Al-As) com 4 e 8 J/cm². Os animais foram divididos em três grupos, randomicamente, cada um com média de 24 animais (G1, G2 e G3). O G1 era o grupo controle, o G2 recebeu tratamento à base de *laser* com a técnica de aplicação pontual, com forma de onda contínua a 670 nm e densidade de energia de 4 J/cm². O G3 recebeu o mesmo tratamento com uma densidade de energia de 8 J/cm². Os animais foram sacrificados com 24, 48 e 72 horas e aos 5.º, 7.º e 14.º dias. As secções teciduais foram coradas por Hematoxilina Eosina, Sirius Red e Orceína Resorcina. Os autores evidenciaram aumento da deposição de colágeno e elastina nos animais dos grupos 2 e 3 quando comparados ao grupo 1, embora sem significância estatística ($p > 0,05$). Observaram também que esse aumento da deposição atingiu maior significância em relação ao G1 do 3.º ao 7.º dia. No tratamento com irradiação de 4 J/cm² (G2), observaram melhores resultados do que naquele em que foi utilizada radiação de 8 J/cm². Concluíram que o *laser* Ga-Al-As, nos parâmetros especificados, induziu a biomodulação de fibras elásticas e colágenas e, que a dose de 4 J/cm² foi mais eficaz do que a de 8 J/cm².

No estudo de Rocha *et al.*³⁵ 12 ratos Wistar foram submetidos à irradiação com *laser* de baixa intensidade, com dosagem energética de 3,8 J/cm², com tempo total de aplicação de 15 segundos. Divididos em dois grupos: controle e experimento. Este último foi tratado por três vezes, imediatamente após o ato operatório, dois e sete dias após a realização de feridas cirúrgicas. Dez dias após

o ato cirúrgico, foram colhidas amostras das lesões de ambos os grupos. Os autores identificaram no estudo histopatológico e histomorfométrico aumento da neovascularização e da proliferação fibroblástica, e diminuição do infiltrado inflamatório nas lesões do grupo experimento, concluindo a eficácia da terapia a *laser* de baixa intensidade no processo de modulação da reparação tecidual, pois contribuiu de forma significativa para uma cicatrização tecidual mais rápida e seqüenciada.

As condições ideais para avaliação da eficácia da fotoestimulação do *laser* estão sendo exploradas agora usando modelos de cicatrizes clínicas de feridas. Portanto, estudos que usam modelos experimentais da ferida estão ainda no estágio inicial. Foi estabelecido que a hiperglicemia e o diabetes interferem negativamente na cicatrização, aumentando o risco de morbidade em ratos diabéticos submetidos a procedimentos cirúrgicos³⁶.

Em pesquisa realizada com *laser* de baixa intensidade (He-Ne), em queimaduras provocadas por nitrogênio líquido em ratos, ficou comprovado pela análise histológica que a cicatrização das feridas irradiadas foi mais rápida que a das não irradiadas. Nesse estudo foram realizadas três padrões de queimaduras, todas com seis milímetros de diâmetro, no dorso dos ratos, com nitrogênio líquido. A primeira lesão, em L, foi irradiada com 1.0 J/cm² com polarização linear paralela à coluna dos ratos. A segunda lesão, também em L, foi irradiada com a mesma densidade energética de irradiação, porém, esta foi alinhada perpendicularmente à orientação relatada. A terceira lesão foi feita no formato da letra C e este grupo não foi irradiado sendo determinado o grupo controle. Os animais foram sacrificados no 3.º e 7.º dia após a lesão. Nos grupos experimentos, com lesão em L, os quais foram irradiados, ficou evidenciada, pela análise histológica, mais rápida cicatrização. Foi observado também, que o reparo da pele dependia da orientação da polarização com respeito ao eixo referencial com a coluna dos animais. Os resultados indicaram que a direção relativa da polarização do *laser* desenvolve um papel importante no processo de cicatrização quando o *laser* He-Ne é usado com alta luz coerente³⁷.

Arruda *et al.*³⁸ realizaram uma análise comparativa da influência da terapia a *laser* de baixa intensidade (TLBI) na organização das fibras de colágeno, na dose de 3 J/cm² com dois comprimentos de ondas, 670 nm e 904nm. Utilizaram 37 ratas Wistar, as quais foram submetidas à tenotomia total por meio de

cisalhamento transversal do tendão na porção média, entre a inserção calcânea e a junção miotendínea. Os animais foram distribuídos em cinco grupos sendo o grupo A: submetido à irradiação a *laser* de 904 nm, o grupo B recebeu irradiação de 670nm, o grupo AB recebeu a irradiação de ambos os lasers, o grupo CGL foi submetido ao tratamento placebo e o grupo padrão GP não sofreu lesão. Os grupos experimentos receberam 12 sessões de laserterapia. Os autores utilizaram do parâmetro retardo óptico (RO) (método de análise de organização das fibras de colágeno utilizando uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas. Os valores de retardo óptico são maiores quanto maior o brilho visível da birrefringência das fibras de colágeno) para avaliação dos grupos. Foi observado que os grupos irradiados apresentaram valores de RO maiores pela birrefringência, quando comparados ao grupo placebo, sendo que o grupo GAB foi o que apresentou melhores resultados. Concluíram que os grupos experimentos apresentaram maior organização das fibras colágenas ao longo do eixo longitudinal do tendão, evidenciando melhor qualidade do reparo.

Aratijo *et al.*³⁹, para entender melhor os efeitos fotobiológicos da radiação a *laser*, realizaram estudo por microscopia eletrônica, imunistoquímica e autoradiografia dos efeitos morfológicos e funcionais na pele lesionada de ratos irradiados e não-irradiados. Para o estudo foram feitas espessas lesões no dorso dos ratos e estas foram expostas por três minutos a uma densidade energética de 1 J/cm² (irradiação do *laser* He-Ne) a qual foi calculada de acordo com a área da lesão, com comprimento de onda de 632,8nm e 10 mW de potência de saída nos 1.º, 5.º, 8.º, 12.º e 15.º dia de pós-operatório. As lesões que não foram irradiadas foram consideradas o grupo controle. As lesões foram escolhidas aleatoriamente para o *laser* e para o controle. Os animais foram inoculados com H-prolina e sacrificados uma hora depois, no 8.º, 15.º e 22.º dias para as análises histológicas e autoradiográficas. Os resultados das análises evidenciaram que as lesões do grupo experimento submetidas à irradiação mostraram reepitelização mais rápida quando comparada ao grupo controle. Nas lesões irradiadas, os pesquisadores verificaram predomínio de células musculares α -actina positivas, as quais correspondem a um maior número de miofibroblastos, observadas ao microscópio eletrônico. Além disso, a irradiação do *laser* reduziu o processo inflamatório local e ficou demonstrada a organização do colágeno e de fibrilas nas áreas de reparação. A análise por meio da autoradiografia quantitativa mostrou que a

incorporação da H-prolina foi significativamente maior na pele irradiada no 15.º dia após o ferimento. Os autores concluíram que, em modelo murino, a radiação a *laser* poderia acelerar a cicatrização cutânea.

2.4.2 Tecido Epitelial

As lesões da pele podem envolver apenas a epiderme ou a epiderme e a derme. Quando a pele é rompida, a substituição rápida da superfície é essencial para reduzir os riscos associados com a sobrecarga e com a contaminação.

A reepitelização é iniciada no período de 24 horas após a lesão. As células basais da epiderme sofrem modificações as quais permitem que as mesmas migrem para o local de lesão; elas afrouxam suas inserções intercelulares (desmossomos), perdem a rigidez celular e desenvolvem pseudopodia actínica, o que facilita a mobilidade celular⁴⁰.

As células epiteliais migram rapidamente em direção à base da ferida, percorrendo por meio da lâmina basal remanescente ou da estrutura de fibrina e do coágulo sanguíneo formado, nas lesões mais profundas. As células migram através do leito da ferida em resposta a inúmeras substâncias na matriz da ferida, incluindo fibronectina, fibrina e colágeno (tipo V), o qual proporciona uma malha estrutural para a migração⁴⁰.

Não existe clareza concernente aos fatores que iniciam o processo de reestruturação. Contudo, incluem fatores quimiotáticos, macromoléculas estruturais, enzimas degradadoras, geometria dos tecidos, fibrina, colágeno, fibronectina e fatores de crescimento⁴¹.

A diferenciação epitelial acompanha a migração. A atividade mitótica, controlada pelo sistema do monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), aumenta no epitélio recém-formado, resultando no espessamento do tecido e desenvolvimento de uma aparência estratificada normal. Em seguida, ocorre a queratinização, a qual inicia pelas camadas superiores, seguida pelo desenvolvimento de um estrato córneo completo⁴¹.

Por fim, a epiderme retorna ao normal. Quando a membrana basal está presente, a reepitelização está completa, as células reassumem sua função e aparência normal e hemidesmossomos se formam novamente para unir a membrana basal e a camada de células epidermais. Nos locais onde a membrana

basal é deficiente, a lâmina basal é sintetizada pelas células epiteliais sobre uma infra-estrutura de colágeno recém formado⁴².

3 Métodos

Para realização deste estudo obedeceu-se à Lei Federal n.º 6.638 e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *International Council for Laboratory Animal Science*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), conforme protocolo n.º 181.06/CEUA-PUCPR (Anexo 1).

3.1 AMOSTRA

Para o estudo utilizaram-se 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com peso variando entre 298g e 451g, com média de 397.84 gramas e desvio padrão de 32,74 gramas. A idade variou entre 100 e 150 dias.

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Realizou-se o experimento no Laboratório de Farmacologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Durante todo o período de estudo, os animais ficaram alojados no Biotério Central da PUCPR, habitando caixas próprias para a espécie, em número de cinco animais para cada caixa. Manteve-se a temperatura ambiente em $22 \pm 2^\circ \text{C}$, o ciclo claro/escuro em 12 horas e a umidade relativa do ar e o volume de ruído os próprios do ambiente. Todas as caixas estavam dispostas em prateleiras à igual distância da fonte de luz. Os animais tiveram livre acesso à ração própria para a espécie (NUVILAB, NUVITAL[®]) e à água.

3.3 PROCEDIMENTO

Sob anestesia obtida com injeção muscular de 0,1 ml/100g de peso do animal de uma mistura de um mililitro de quetamina (50mg) com um mililitro de

xilazina 2% (20 mg), realizou-se a tricotomia da região dorsal com tricótomo, seguindo-se a anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo e delimitação do campo operatório com campo esterilizado fenestrado.

Em seguida, fez-se uma incisão longitudinal, na parte mediana do dorso iniciando abaixo de uma linha imaginária que corresponde à base da inserção das patas anteriores, com quatro centímetros de extensão, cuja espessura compreendeu a pele e a tela subcutânea. Na sequência, realizou-se a síntese com pontos separados simples, com fio monofilamentar de náilon 4.0, separados um do outro por 1 cm (Figura 1).



Figura 1 - Aspecto final da ferida, feita no dorso de rato.

3.3.1 Pós-Operatório

Receberam, imediatamente após o término do ato operatório, dose única de diclofenaco de potássio 10 mg/kg, por via intramuscular com finalidade analgésica e antiinflamatória⁴³.

Após a recuperação anestésica, estes animais, devidamente marcados, foram devolvidos às suas gaiolas.

3.3.2 Grupos de Estudo

Os ratos foram distribuídos ao final do ato operatório, aleatoriamente, em dois grupos distintos contendo 30 animais em cada grupo, sendo que cada um recebeu a seguinte designação: GE (grupo experimento), tratado com *laser* e GC (grupo controle) não tratados.

Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com o mesmo número de animais, denominados GE dia 3, GE dia 7 e GE dia 14 e GC dia 3, GC dia 7 e GC dia 14 (Figura 2), sendo respectivamente o terceiro, o sétimo e o décimo - quarto dias pós-cirurgia.

O GE recebeu tratamento com *laser* de baixa potência He-Ne com 4 J/cm^2 de densidade de energia em 3 pontos da lesão com duração de 36 segundos em cada ponto.

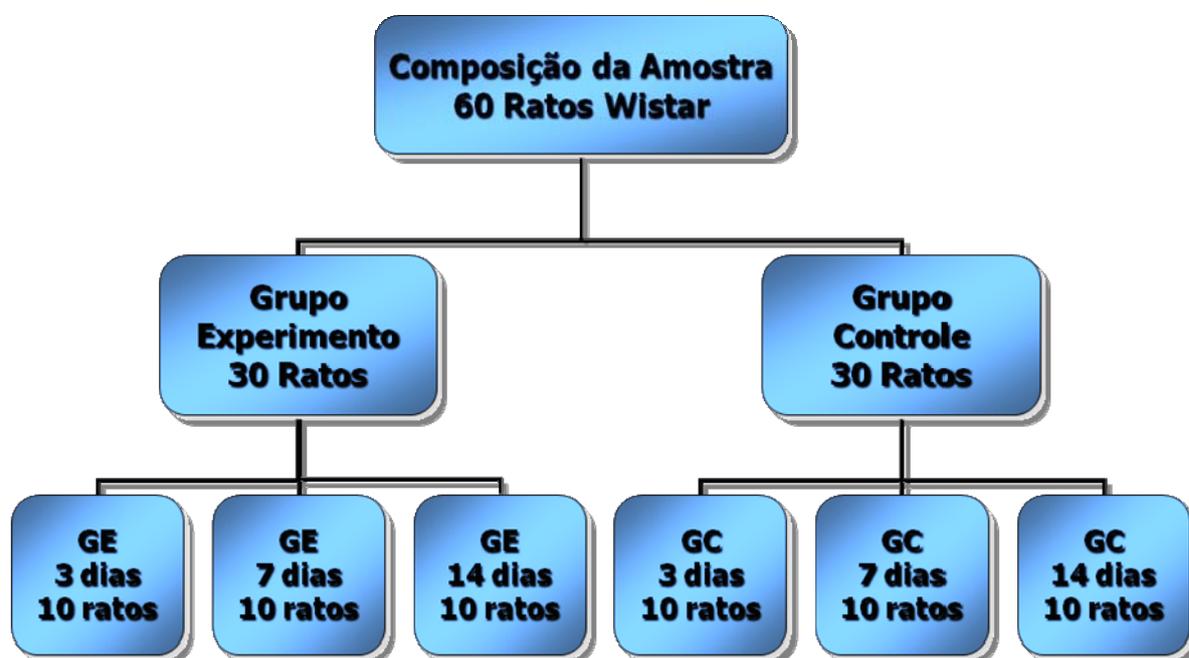


Figura 2 – Esquema representativo da delimitação da composição da amostra.

3.3.3 Tratamento a *laser*

O aparelho utilizado foi aferido pela empresa Medmarte do Instituto São Paulo na cidade de Curitiba, denominado *laser* He-Ne Plasmax IV, LHN 9709 da marca KLD Biosistemas® (Figura 3) com potência contínua máxima de 5 mW, comprimento de onda de 632,8 nm visível com densidade de energia de 4 J/cm².



Figura 3 - Aparelho de *laser* He-Ne da marca KLD Biosistemas®.

Vinte quatro horas depois de realizada a lesão, as feridas dos animais do GE receberam tratamento com *laser* He-Ne, sendo um subgrupo por três dias, outro por sete dias e o último por 14 dias, dosagem 4 J/cm² por 36 segundos (padrão do equipamento) em cada ponto, no local da lesão de um em um centímetro, totalizando três pontos (Figura 4). Para aplicação do *laser*, os animais foram sedados com propofol a 10 mg/Kg via intraperitoneal⁴³.



Figura 4 - Rato recebendo a aplicação do *laser*

3.3.4 Eutanásia

Após a análise macroscópica, no terceiro, sétimo e décimo-quarto dias, sortearam-se dez animais de cada grupo que foram submetidos à eutanásia, em cada um dos tempos, com dose letal de tiopental sódico intra-peritoneal (120 mg/Kg) (método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002) aplicada na fossa ilíaca esquerda.

3.3.5 Coleta do Material para Estudo

Para o estudo, foi ressecado um segmento de pele com área de 5x4 cm que continha a cicatriz na parte medial. Foram desprezados, cerca de um centímetro das extremidades do retalho, utilizando-se os três centímetros centrais da cicatriz para o estudo (Figura 5).

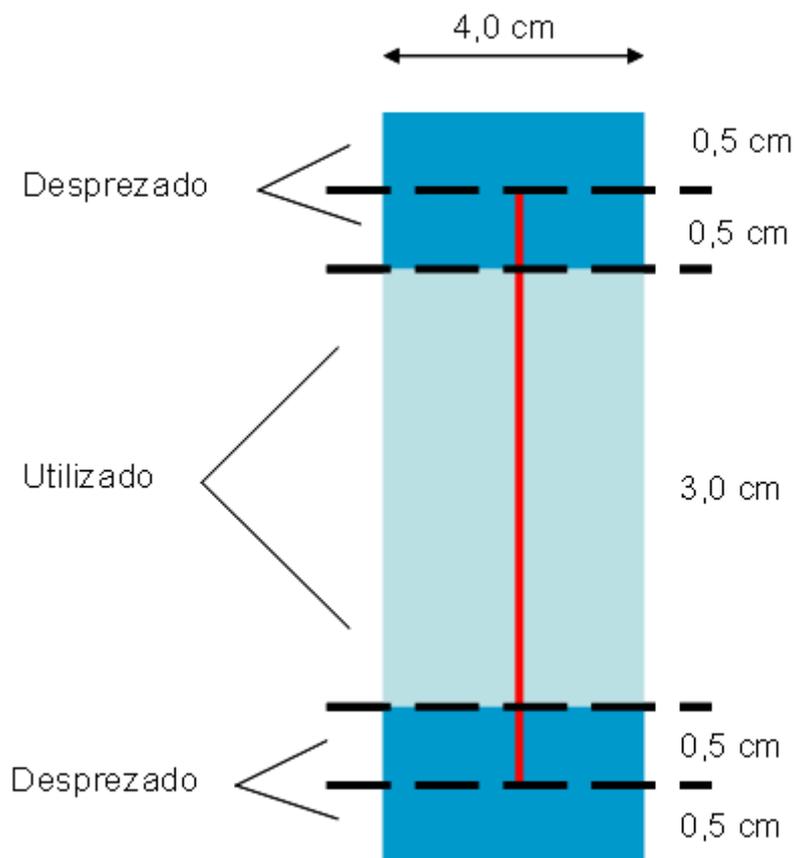


Figura 5 - Esquema da delimitação do retalho ressecado e do segmento da cicatriz utilizado para exame

3.4 MÉTODO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As peças foram estendidas em papel filtro, mergulhada em formalina tamponada a 10%, em frascos numerados e assim encaminhadas ao estudo histopatológico. A fixação se deu por 24 horas.

Após este período, as peças preparadas foram incluídas em blocos de parafina e submetidas a cortes transversais de cinco micrômetros, confeccionando-se três lâminas com dois cortes em cada uma. Os cortes histológicos foram corados pela Hematoxilina Eosina para identificação dos aspectos gerais, pela técnica do Sirius Red para a identificação dos colágenos I e III e uma das lâminas foi destinada para estudo imunoistoquímico para identificação das células inflamatórias.

Os cortes histológicos, corados pela Hematoxilina-eosina, foram analisados por meio do microscópio óptico marca Olympus® modelo BX-51.

Avaliaram-se campos representativos da área da cicatriz e neles os achados de reação inflamatória, edema, congestão vascular e presença de tecido de granulação, baseados em protocolo proposto em estudo de Vizzotto *et al.*⁴⁴ seguindo escore numérico, com notas negativas para as variáveis agudas e notas positivas para as crônicas (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Classificação e atribuição de índices aos achados histológicos nos cortes corados pela Hematoxilina-eosina (HE)

Parâmetros	Intensidade			
	Acentuada	Moderada	Discreta	Ausente
Neutrófilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão	-3	-2	-1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tecido de granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

Quadro 2 - Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com escores final de cada grupo

Fase do processo inflamatório	Escore final de classificação
Agudo	-9 a -3
Subagudo	-2,9 a 3
Crônico	3,1 a 9

Para a visualização do colágeno, baseado nos estudos de Junqueira⁴⁵, escolheu-se o método Picrosírius (*Picrosirius-red F3BA*), que em combinação com a microscopia de polarização (videomorfometria), permite identificar as fibras colágenas, quantificá-las, qualificá-las e determinar a sua extensão. Nessa técnica, as fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes apresentam-se coradas de tons de laranja a vermelho e representam o colágeno

I, enquanto as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes apresentam-se coradas de verde e representaram o colágeno III (Figura 6).

As imagens foram captadas por uma câmera Sony[®] CCD 101, enviadas a um monitor Sony Trinitron[®] colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa digitalizadora Oculus TCX[®] (coreco), foram analisadas pelo aplicativo Image Plus 4.5 para Windows em computador Pentium III. Para cada lâmina foi realizada a leitura de três campos, com ampliação de 200 X, sobre a área da cicatriz e foi obtida a média da leitura.

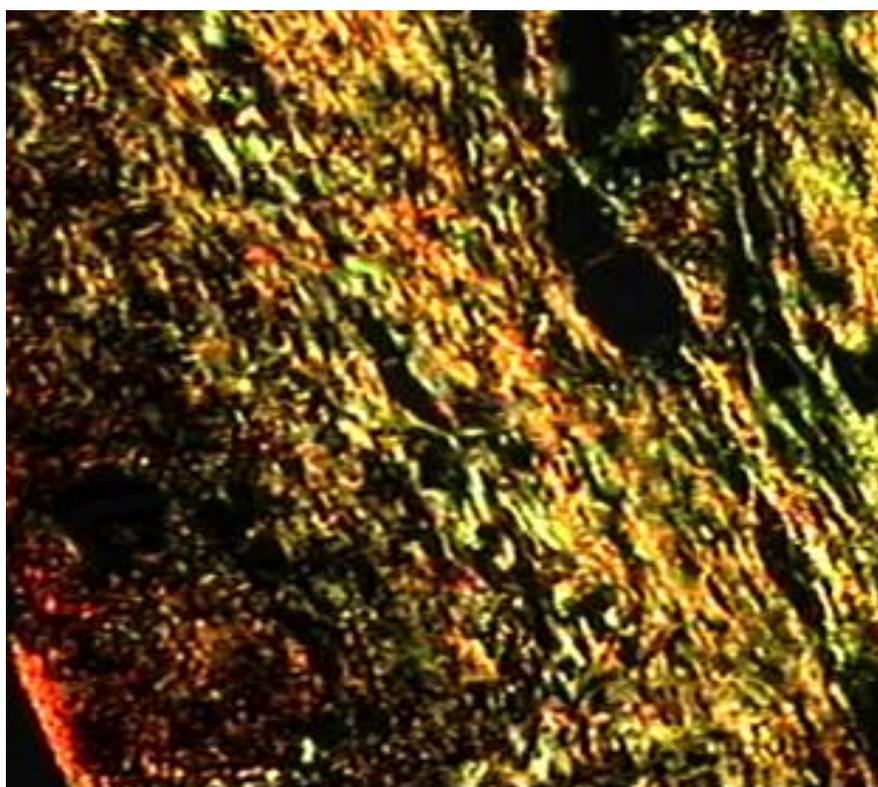


Figura 6 - Fotomicrografia de corte histológico de área de cicatriz, corado pelo Sirius Red, sob luz polarizada, mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III (200X)

Para a análise imunoistoquímica utilizou-se o anti CD45 (LCA – Antígeno Leucocitário) para avaliação da fase inflamatória da cicatrização⁴⁶.

O grupo de anticorpos CD45 (antígeno comum do leucócito) reconhece uma família de proteínas tirosina fosfatases que são expressas em todas as células hematolinfóides e suas precursoras (com a exceção de eritrócitos e megacariócitos maduros) e que não estão presentes em qualquer célula não-hematolinfóide. A coloração positiva é usualmente membranosa na distribuição,

mas ocasionalmente coloração paranuclear é observada. Há vários subgrupos de anticorpos que detectam diferentes isoformas de proteínas CD45^{14,46}.

Do material selecionado, na avaliação histológica, foi preparada uma lâmina para a imunistoquímica. Os cortes de tecido para reação CD-45 (LCA clone 136-4B5 IV WS- IgG1 da FK-Biotec[®]), em diluição 1:100, foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria com tampão citrato a 10 mmol/L em pH 6,0 para posterior processamento imunistoquímico.

Para garantir a veracidade da coloração foram realizados controles. Para controle externo positivo foi utilizado um fragmento de linfonodo. A derme e o epitélio serviram de controle interno negativo.

Para análise foram contadas as células positivas, coradas em marrom, para LCA por campo de grande aumento, num total de 10 campos, conforme procedimento realizado no estudo de Barbosa⁴⁷.

3.4.1 Índice de Maturidade da Cicatriz

Baseando-se nos percentuais de colágeno tipo I e tipo III, foi criado o índice da maturação da Cicatriz – IMaC⁴⁸, definido como a razão entre o percentual de colágeno tipo I sobre o percentual de colágeno tipo III. Este índice varia entre zero (percentual de colágeno tipo I=0 e percentual de colágeno tipo III=100) e mais infinito (percentual de colágeno tipo I=100 e percentual de colágeno tipo III=0). Valores maiores do que um indicam que o percentual de colágeno tipo I é maior do que o percentual de colágeno tipo III, como pode se verificar na equação (Quadro 3)⁴⁹.

Quadro 3 – Equação para cálculo do índice de Maturação da Cicatriz (IMaC)

$$\text{IMaC} = \frac{\% \text{ de Colágeno Tipo I}}{\% \text{ de Colágeno Tipo III}}$$

Quadro 4 - Variações do índice de maturidade da cicatriz (IMaC) – de 0 a mais infinito ($+\infty$)

IMaC	% Colágeno Tipo I - Maduro	% de Colágeno Tipo III - Imaturo
0	0	100
$+\infty$	100	0

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados descritivos obtidos do estudo foram expressos por médias e desvios padrões. Para a avaliação do efeito de grupo e do dia de avaliação sobre as variáveis do estudo, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores (grupo e dia de avaliação).

A condição de normalidade das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks e, para avaliação da homogeneidade das variâncias, foi usado o teste de Lèvene. Nos casos em que houve interação significativa entre os fatores, a análise foi feita dentro de grupos e dentro de dia, considerando-se o teste t-Student para a comparação dos grupos e a ANOVA com um fator para a comparação dos dias de avaliação. Para as comparações múltiplas foi usado o teste LSD. Para as análises das tabelas do IMaC foi utilizado o teste de Fischer. O nível de significância estatística adotado foi de $p \leq 0,05$.

4 Resultados

Durante o período de experimento não houve óbito.

Na observação macroscópica, das feridas dos animais sorteados para a análise no 3.º dia, tinham-se feridas com crostas em toda a extensão. Nos sorteados para o 7.º dia pós-operatório, o animal de número 10 do GE apresentava ferida com pequena deiscência distal. As demais cicatrizes eram limpas e reepitelizadas. Entre os sorteados para o 14.º dia, o animal de número seis do GE apresentava deiscência da parte média superior da ferida e o animal de número nove do GC apresentava deiscência mediana. As demais feridas estavam limpas e reepitelizadas.

4.1 ASPECTOS MICROSCÓPICOS GERAIS

Nos cortes histológicos das cicatrizes, com três dias de evolução, pôde-se verificar que, nos dois grupos de estudo, o processo inflamatório tinha características de processo agudo (Quadro 5). No sétimo dia, passou a ter características de sub-agudo (Quadro 6) e no décimo-quarto dia, de crônico (quadro 7)

Quadro 5 - Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com 3 dias de evolução

	Grupo	Processo inflamatório		
		Agudo	Sub-agudo	Crônico
Dia 3	Experimento	10	0	0
	Controle	9	1	0
	Total	19	1	0

Quadro 6 - Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com 7 dias de evolução

	Grupo	Processo inflamatório		
		Agudo	Sub-agudo	Crônico
Dia 7	Experimento	0	10	0
	Controle	0	9	1
	Total	0	19	1

Quadro 7 - Escore inflamatório obtido na análise histológica, para os dois grupos, com 14 dias de evolução

	Grupo	Processo inflamatório		
		Agudo	Sub-agudo	Crônico
Dia 14	Experimento	0	4	6
	Controle	0	2	7
	Total	0	6	13

Observação: perda de uma amostra histológica do grupo controle por artefato de técnica. Não foi possível avaliação.

No quadro 8 são apresentados os valores de mediana, valor mínimo e valor máximo do escore, nos três momentos avaliados (Figura 7). A comparação entre os grupos, nestes momentos não demonstrou diferenças significantes (Quadro 9).

Quadro 8 - Média dos valores totais dos escores nos três momentos de avaliação

Momento	Grupo	n	Mediana	Mínimo	Máximo
Dia 3	Controle	10	- 4,5	-6	-1
	Experimento	10	- 4	-8	-3
Dia 7	Controle	10	1	-1	5
	Experimento	10	1,5	-1	3
Dia 14	Controle	9	4	3	4
	Experimento	10	4	0	5

Quadro 9 - Valores de p para a comparação do escores entre o grupo controle e experimentos nos três momentos de avaliação

Momento de avaliação	Valor de p (controle x experimento)
Dia 3	0,579
Dia 7	0,912
Dia 14	0,661

Foi possível observar um processo progressivo significativo, dentro de cada um dos grupos (Quadro 10).

Quadro 10 - Valores de p para a comparação dos escores nos três momentos de avaliação, dentro de cada grupo

Grupo	Valor de p (3°. PO x 7°. PO x 14°. PO)
Controle	<0,001 *
Experimento	<0,001 **

(*) 3°. PO x 7°. PO: $p < 0,001$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p = 0,003$

(**) 3°. PO x 7°. PO: $p < 0,001$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$

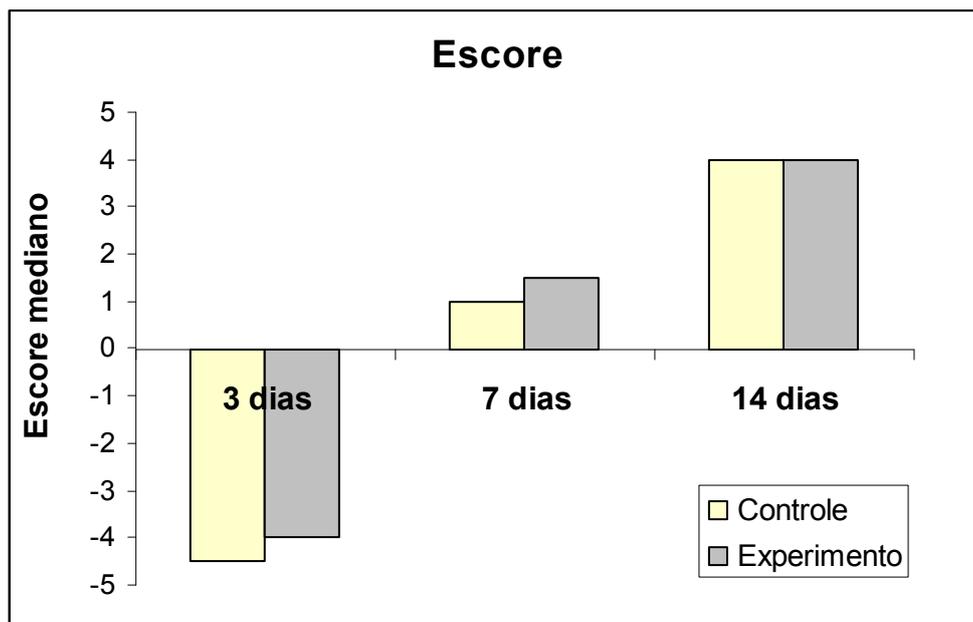


Figura 7 - Demonstração gráfica da evolução inflamatória nos grupos controle e experimento, nos três tempos avaliados (Fonte: quadro 8)

Nas figuras 8, 9 e 10 podem ser observados aspectos do infiltrado de polimorfonucleares, congestão vascular, edema e fibrose.

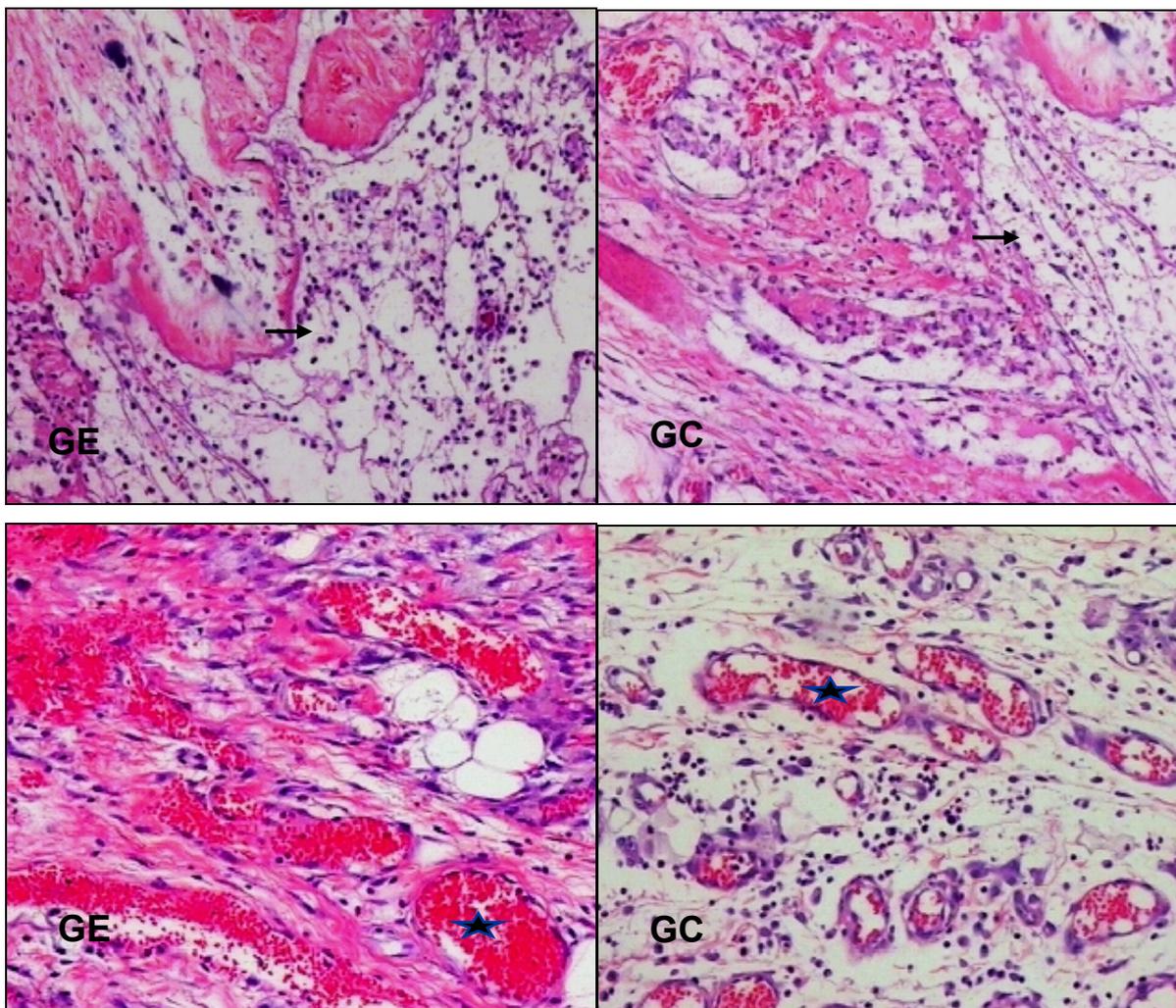


Figura 8 – Aspectos histológicos observados no terceiro dia, demonstrando a presença de células inflamatórias (PMN) (→) e congestão vascular (*), nos cortes histológicos das cicatrizes dos grupos experimento e controle (HE – 100 X)

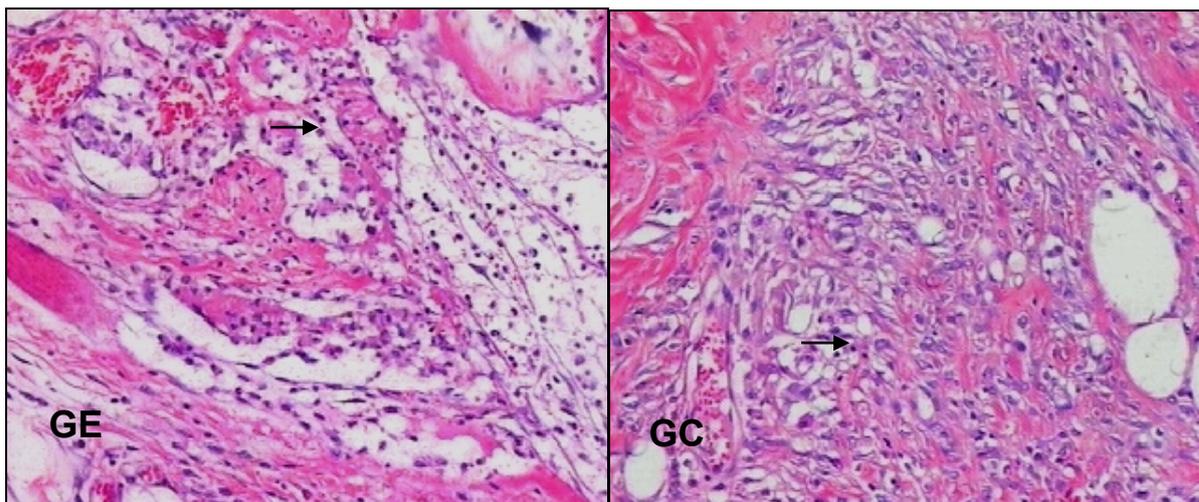


Figura 9 – Fotomicrografias demonstrando o processo inflamatório (→) com 7 dias de evolução, em cortes obtidos de cicatrizes de GE (Experimento) e de GC (Controle) (HE – 100 X).

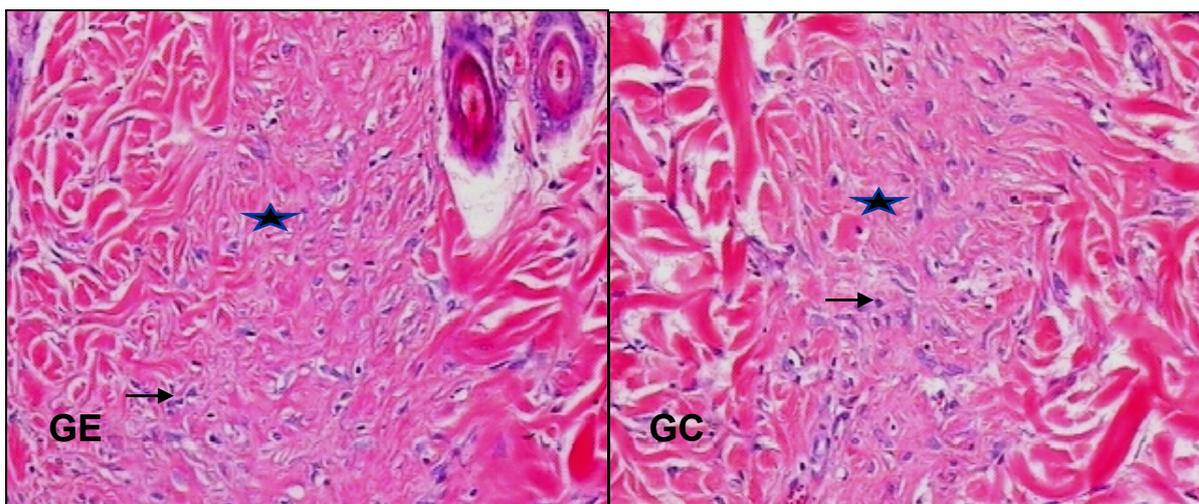


Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos de cicatrizes dos grupos GE (Experimento) e de GC (Controle) com 14 dias de evolução onde se pode observar redução do infiltrado de células inflamatórias (→) e fibroplasia (*) (HE – 100 X)

4.2 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE COLÁGENO NAS CICATRIZES

4.2.1 Colágeno Tipo I

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de que não existe interação entre grupo e momento de avaliação, versus a hipótese alternativa da existência da interação. O resultado do teste indicou a não rejeição da hipótese nula ($p = 0,527$). Não se observou diferença significativa entre os grupos, nos três momentos analisados (Figura 11)

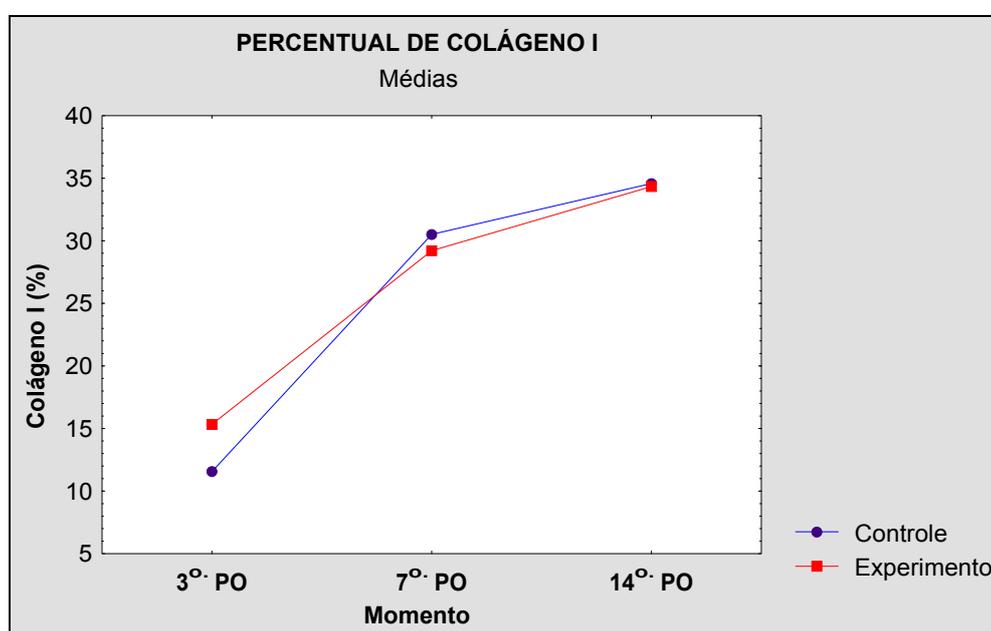


Figura 11 - Relação das médias percentuais de colágeno I dos dois grupos em cada momento de avaliação (Fonte: quadro 11)

Considerando-se esse resultado, testou-se a hipótese nula de que as médias nos três momentos de avaliação são iguais, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos momentos tem média diferente dos demais. Também se testou a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de que os grupos têm médias diferentes.

No quadro 11, são apresentadas as estatísticas descritivas de cada grupo, em cada momento de avaliação.

Quadro 11 - Estatísticas descritivas do percentual de colágeno I

Momento	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Dia 3	Controle	10	11,56	10,56	4,88	19,51	5,01
	Experimento	10	15,34	14,84	6,60	22,89	6,29
Dia 7	Controle	10	30,51	31,94	16,96	45,02	9,33
	Experimento	10	29,21	27,94	20,53	42,64	7,14
Dia 14	Controle	10	34,58	34,70	20,91	46,31	7,41
	Experimento	10	34,35	35,88	15,01	46,02	8,64

Na comparação dos momentos, em cada um dos grupos, o resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula ($p < 0,001$) (Figura 12).

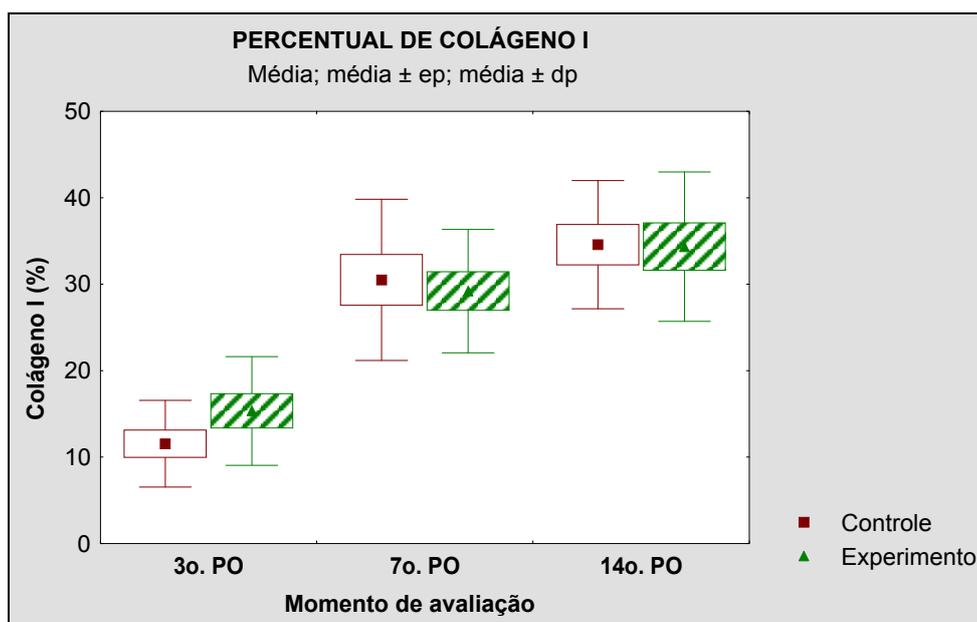


Figura 12 - Comparação das médias do colágeno I nos três momentos, dos dois grupos. Observa-se média crescente dentro de cada grupo, mas não entre os grupos (Fonte: Quadro 11)

Na comparação dos grupos, o resultado do teste estatístico indicou a não rejeição da hipótese nula ($p = 0,698$).

4.2.2 Colágeno Tipo III

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de que não existe interação entre grupo e momento de avaliação, versus a hipótese alternativa de existência de interação. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula ($p=0,023$) (Figura 13).

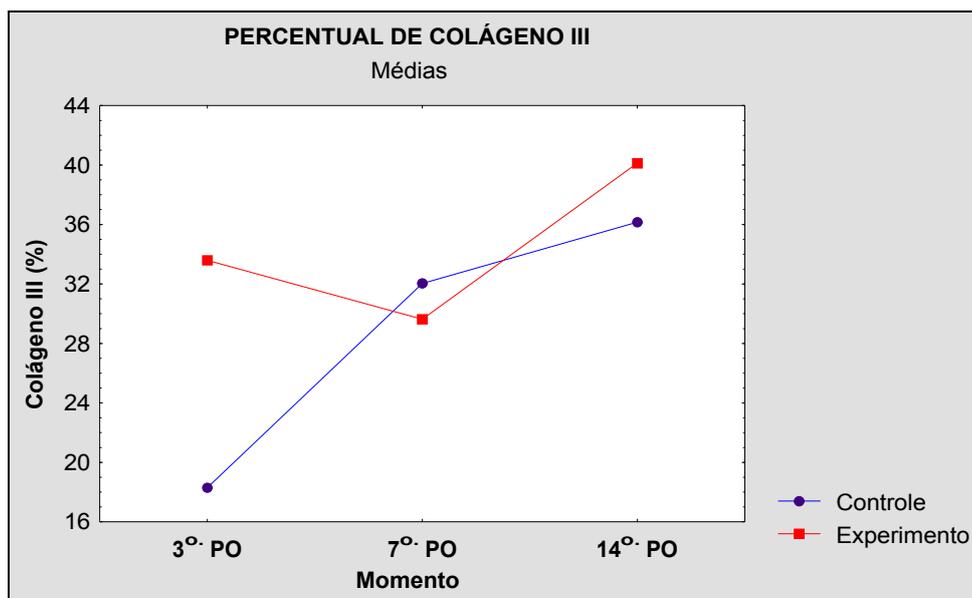


Figura 13 - Relação das médias percentuais do colágeno III, dos dois grupos, em cada momento de avaliação (Fonte: quadro 12)

Considerando-se esse resultado, a comparação dos grupos e dos momentos foi feita separadamente, ou seja, os grupos foram comparados dentro de cada momento e os momentos foram comparados dentro de cada grupo (Quadro 12).

Quadro 12 - Estatísticas descritivas do percentual de colágeno III

Momento	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Dia 3	Controle	10	18,30	17,26	6,97	29,68	7,66
	Experimento	10	33,59	31,29	16,41	52,63	10,18
Dia 7	Controle	10	32,04	33,97	8,86	43,02	10,15
	Experimento	10	29,63	27,47	14,62	49,27	10,34
Dia 14	Controle	10	36,16	37,21	25,76	45,56	6,15
	Experimento	10	40,13	38,64	14,29	60,59	13,65

A comparação entre os dois grupos, demonstrou haver maior densidade de colágeno do tipo III no grupo experimento, no terceiro dia ($p = 0,001$) que deixa de existir no sétimo e no décimo-quarto dia (Quadro 13).

Quadro 13 - Comparação das médias do colágeno III, dos dois grupos, em cada momento de avaliação

Momento de avaliação	Valor de p (controle x experimento)
Dia 3	0,001
Dia 7	0,605
Dia 14	0,412

O grupo controle mostra ganho gradual de colágeno III do terceiro para o sétimo dia ($p = 0,001$), não havendo ganho significativo do sétimo para o décimo-quarto dia ($p = 0,269$). Já o grupo experimento apresenta densidade maior no terceiro dia e permanece com densidade semelhante nos demais tempos de observação (Quadro 14).

Quadro 14 - Comparação das médias do colágeno III, nos momentos de avaliação, em cada grupo

Grupo	Valor de p (3°. PO x 7°. PO x 14°. PO)
Controle	< 0,001 *
Experimento	0,139

(*) 3°. PO x 7°. PO: $p=0,001$

3°. PO x 14°. PO: $p<0,001$

7°. PO x 14°. PO: $p=0,269$

Para cada momento, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de que os grupos têm médias diferentes. Só ocorreu diferença significativa no terceiro dia (Figura 14).

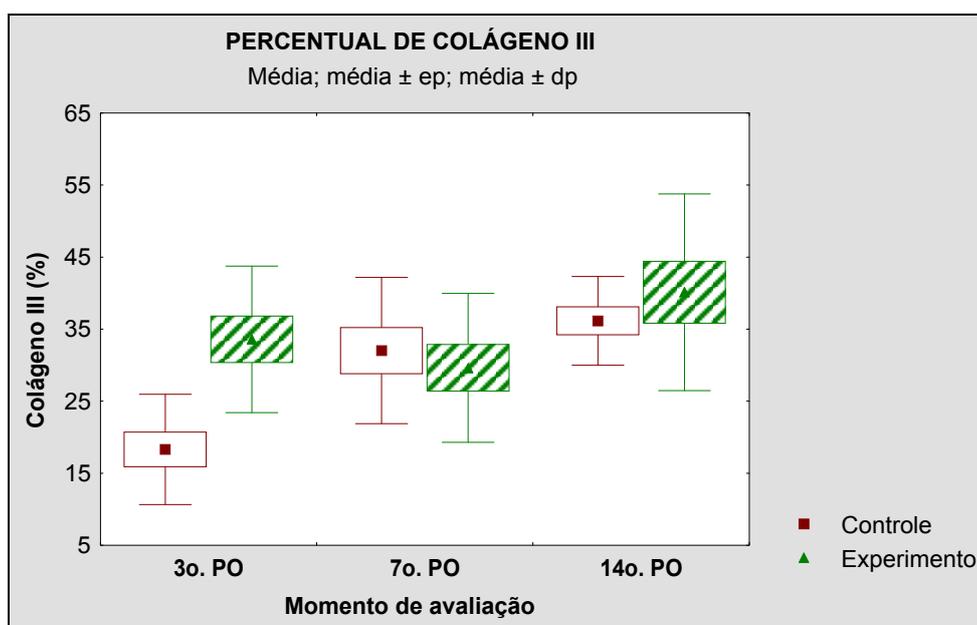


Figura 14 - Comparação das médias do colágeno III, nos três momentos (Fonte: quadro 12)

4.2.3 Colágeno Total

Embora existam outros tipos de colágeno, considerando que suas proporções nos tecidos são muito pequenas, utilizou-se a somatória dos colágenos do tipo I e III para a análise do colágeno total.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de que não existe interação entre grupo e momento de avaliação, versus a hipótese alternativa de existência de interação. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula ($p = 0,014$) (Figura 15).

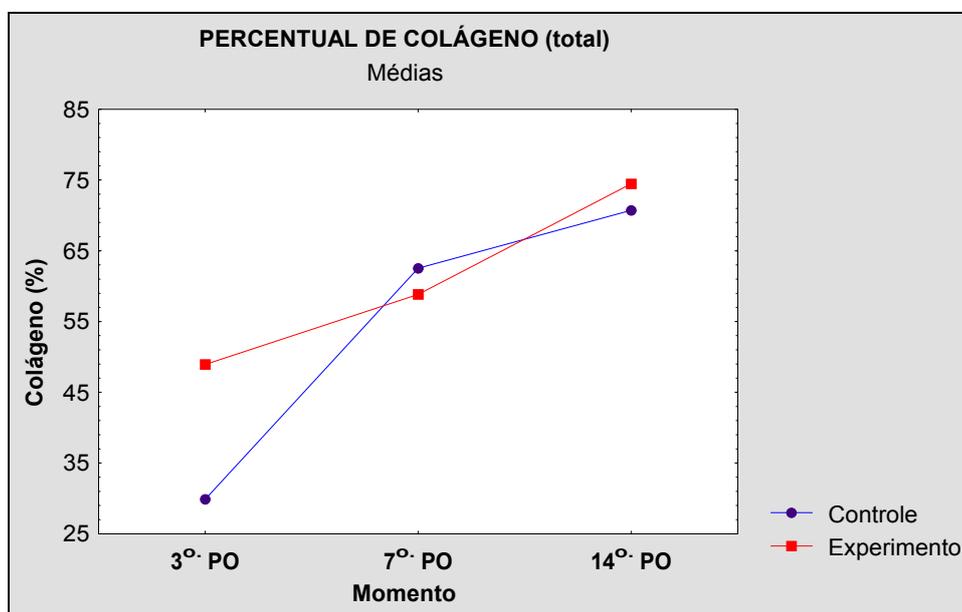


Figura 15 - Relação das médias percentuais de colágeno total, dos dois grupos, em cada momento de avaliação (Fonte: quadro 15)

Considerando-se esse resultado, a comparação dos grupos e dos momentos foi feita separadamente, ou seja, os grupos foram comparados dentro de cada momento e os momentos foram comparados dentro de cada grupo (Quadro 15) (Figura 16).

Quadro 15 - Estatísticas descritivas do percentual de colágeno total

Momento	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Dia 3	Controle	10	29,86	25,87	19,85	49,19	10,12
	Experimento	10	48,92	49,40	23,01	63,15	12,51
Dia 7	Controle	10	62,54	64,88	25,82	84,91	17,43
	Experimento	10	58,83	58,14	44,98	78,45	11,69
Dia 14	Controle	10	70,73	72,72	49,68	85,79	10,86
	Experimento	10	74,47	76,56	60,31	83,12	7,53

Na análise de cada momento pode-se observar que o grupo experimento tinha maior densidade de colágeno com três dias de evolução ($p = 0,001$). Esta vantagem não se manteve nos demais tempos de avaliação (Quadro 16). A observação intra-grupo mostrou ganho significativo com o evoluir do tempo (Quadro 17).

Quadro 16 - Comparação das médias do colágeno total, nos dois grupos, em cada um dos momentos de avaliação

Momento de avaliação	Valor de p (controle x experimento)
Dia 3	0,001
Dia 7	0,583
Dia 14	0,383

Quadro 17 - Comparação das médias do colágeno total, nos três momentos de avaliação, em cada grupo

Grupo	Valor de p (3°. PO x 7°. PO x 14°. PO)
Controle	< 0,001 *
Experimento	< 0,001 **

(*) 3°. PO x 7°. PO: $p < 0,001$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p = 0,177$

(**) 3°. PO x 7°. PO: $p = 0,0499$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p = 0,003$

Para cada momento, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de que os grupos têm médias diferentes.

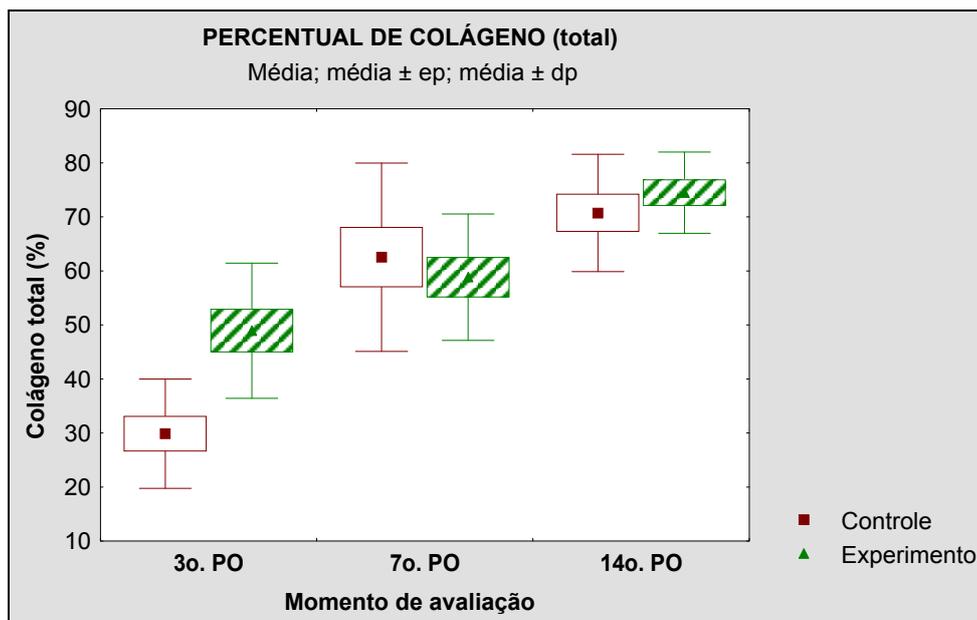


Figura 16 - Comparação das médias do colágeno total, nos três momentos de avaliação, dos dois grupos (Fonte: quadro 15)

Nas figuras 17, 18 e 19 pode-se observar aspectos histológicos da densidade dos colágenos do tipo I e do tipo III nos três momentos avaliados corados pelo método Picrosirius, como mencionado anteriormente, a cor laranja representa o colágeno tipo I, enquanto que a cor verde, a densidade do colágeno tipo III.

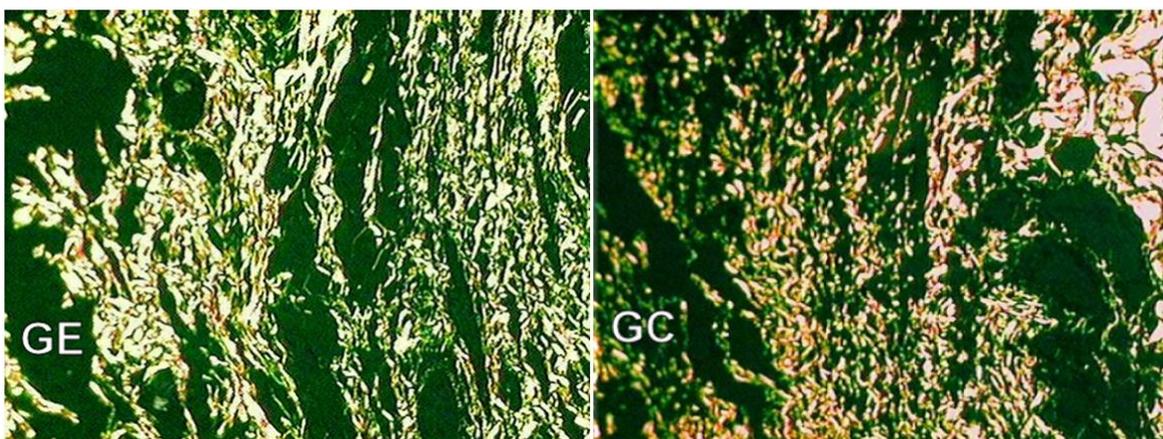


Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos de áreas de cicatrizes dos grupos GE e GC, coradas pelo Sirius Red, sob luz polarizada, mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III (200X), na avaliação do 3.º dia.

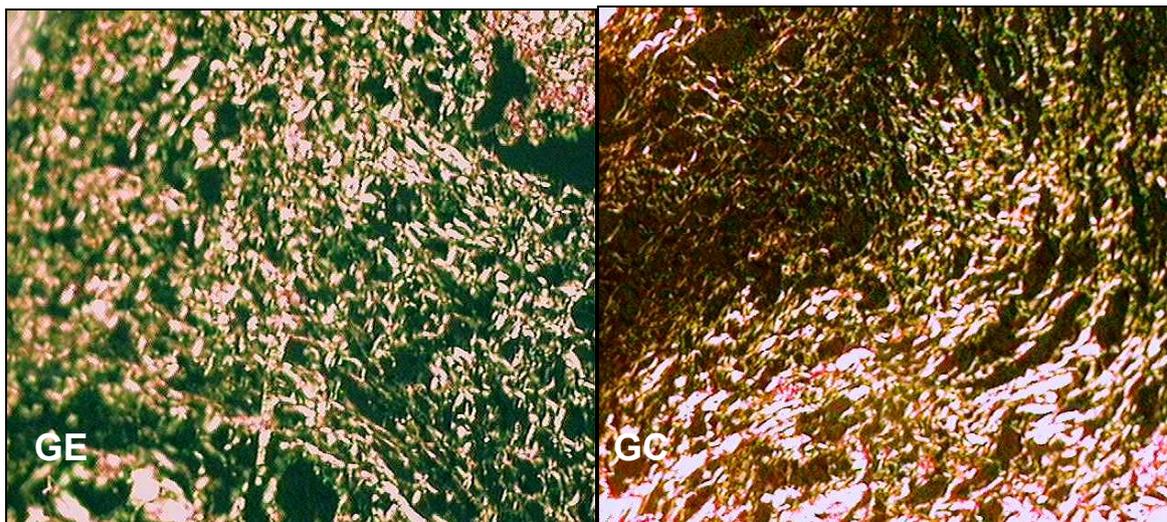


Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos de áreas de cicatrizes, corados pelo Sirius Red, sob luz polarizada, mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III (200X) no 7º dia de avaliação, no GE e GC.

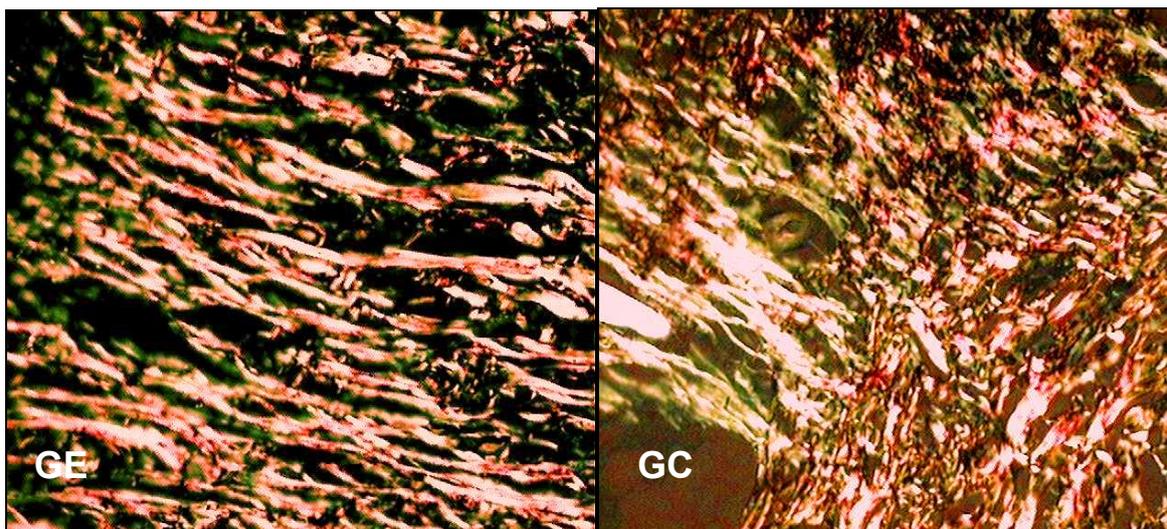


Figura 19 - Fotomicrografias de cortes histológicos de áreas de cicatrizes, coradas pelo Sirius Red, sob luz polarizada, mostrando em tons de laranja a vermelho o colágeno tipo I e em verde o colágeno tipo III (200X) no 14º dia de avaliação no GE e GC.

4.2.4 Índice de Maturidade da Cicatriz (IMaC)

No quadro 18, são apresentadas as estatísticas descritivas do IMaC de cada grupo, em cada momento de avaliação.

Quadro 18 - Índice de maturidade das cicatrizes nos três tempos estudados e nos dois grupos

Momento	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
3	Controle	10	0,79	0,53	0,29	2,67	0,70
	Experimento	10	0,48	0,50	0,16	0,78	0,20
7	Controle	10	1,04	1,01	0,56	1,91	0,39
	Experimento	10	1,14	0,88	0,57	2,92	0,69
14	Controle	10	0,97	0,87	0,66	1,32	0,24
	Experimento	10	1,08	0,94	0,25	3,22	0,82

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de que não existe interação entre grupo e momento de avaliação, versus a hipótese alternativa de existência de interação. O resultado do teste indicou a não rejeição da hipótese nula ($p=0,408$) (Figura 20).

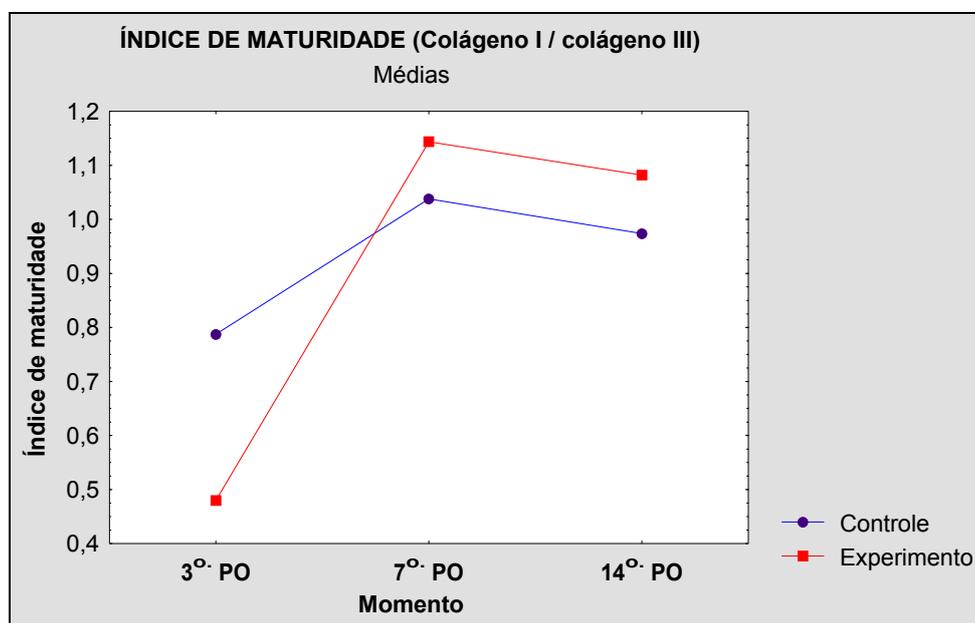


Figura 20 - Relação das médias do IMAc do grupo experimento e controle nos três momentos de pós-operatório.(fonte: quadro 18)

Considerando-se esse resultado, testou-se a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de que os

grupos têm médias diferentes. Também se testou a hipótese nula de que as médias nos três momentos de avaliação são iguais, versus a hipótese alternativa de que pelo menos um dos momentos tem média diferente dos demais.

Na comparação dos grupos, o resultado do teste estatístico indicou a não rejeição da hipótese nula ($p = 0,834$).

Na comparação dos momentos, o resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula ($p = 0,026$) (Figura 21).

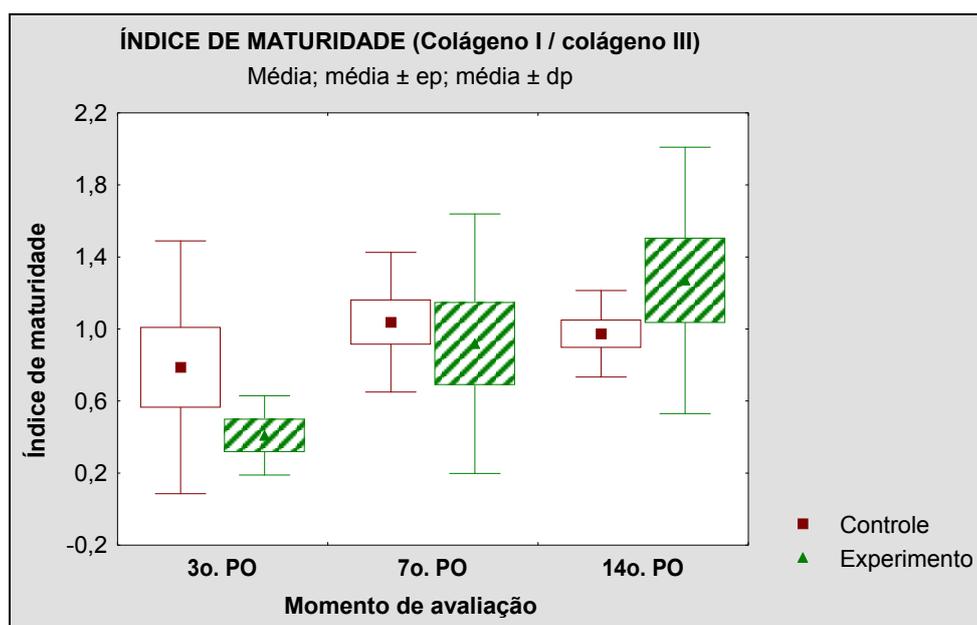


Figura 21 - Comparação das médias do IMAc dos dois grupos, nos três momentos do pós-operatório. (Fonte: quadro 18)

4.2.4.1 Análise do índice de maturidade dicotomizado

Entende-se como índice dicotomizado a avaliação, separando o número de cicatrizes com índice até 1 e as com índice maior do que 1.

Para cada momento de avaliação (3 dias, 7 dias e 14 dias), testou-se a hipótese nula de que a proporção de casos com índice de maturidade maior do que 1 no grupo controle é igual à proporção de casos com índice de maturidade maior que 1 no grupo estudo, versus a hipótese alternativa de proporções diferentes. Na avaliação do 3.º dia, não existiu diferença entre os grupos ($p=0,474$) (Tabela 1). Também não existiu diferença na avaliação do 7.º dia ($p=1$) (Tabela 2) e do 14.º dia ($p=1$) (Tabela 3) (Figura 22).

Tabela 1 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 3º dia, nos dois grupos

Índice de maturidade	GRUPO	
	Controle	Experimento
Até 1	8 80,00%	10 100,00%
Maior que 1	2 20,00%	0 0,00%
Total	10	10

$p = 0,474$

Tabela 2 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 7º dia, nos dois grupos

Índice de maturidade	GRUPO	
	Controle	Estudo
Até 1	5 50,00%	6 60,00%
Maior que 1	5 50,00%	4 40,00%
Total	10	10

$p = 1$

Tabela 3 – Índice de maturidade da cicatriz na avaliação do 14º dia, nos dois grupos

Índice de maturidade	GRUPO	
	Controle	Estudo
Até 1	6 60,00%	5 50,00%
Maior que 1	4 40,00%	5 50,00%
Total	10	10

$p = 1$

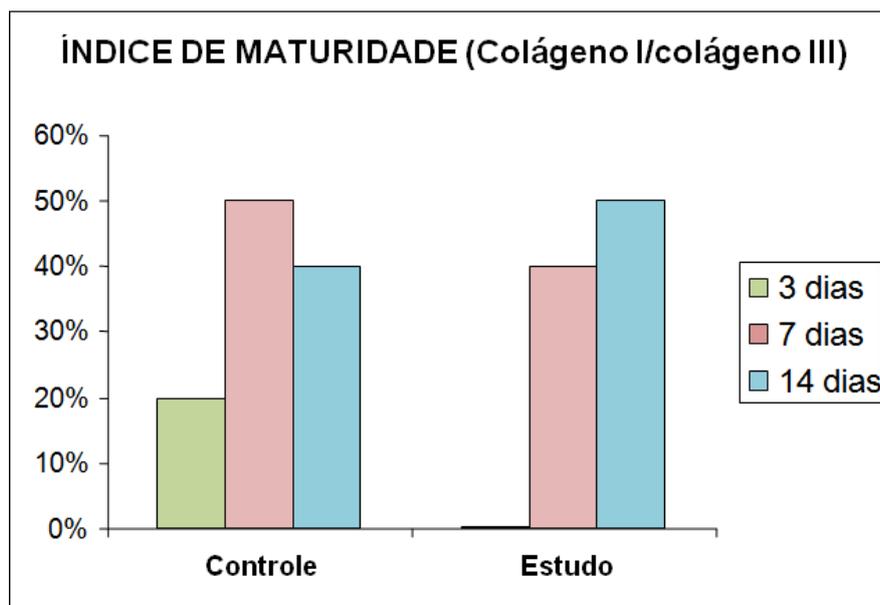


Figura 22 - Percentual do IMaC do grupo controle e experimento nos 3 momentos do pós-operatório

4.3 REAÇÃO INFLAMATÓRIA AVALIADA PELA IMUNOISTOQUÍMICA

Para a análise histomorfométrica do infiltrado inflamatório utilizou-se a marcação dos leucócitos pelo anti-CD45⁴⁶.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de que não existia interação entre grupo e momento de avaliação, versus a hipótese alternativa de existência de interação. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula ($p < 0,001$) (Figura 23).

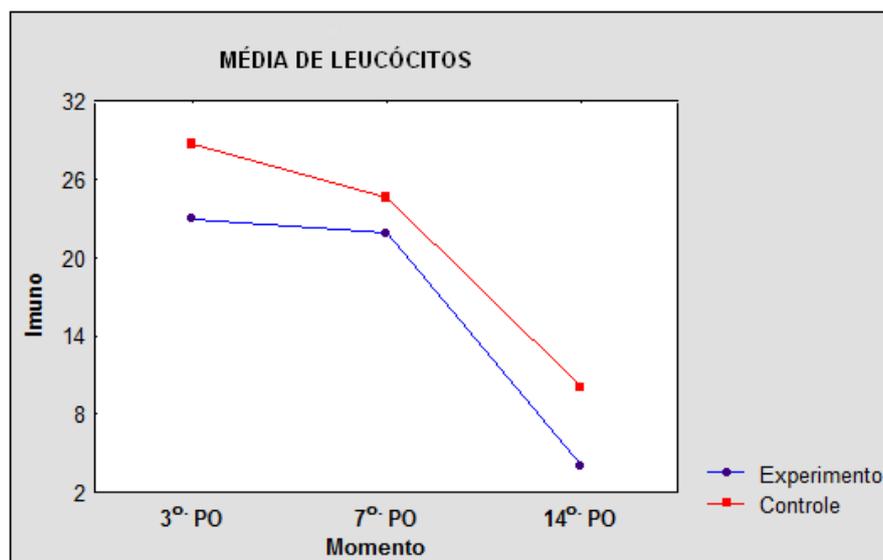


Figura 23 - Relação das médias percentuais de leucócitos, nos dois grupos em cada momento de avaliação (Fonte: quadro 19)

Considerando-se este resultado, a comparação dos grupos e dos momentos foi feita separadamente, ou seja, os grupos foram comparados dentro de cada momento e os momentos foram comparados dentro de cada grupo (Quadro 19).

Quadro 19 - Estatísticas descritivas das médias do número de leucócitos de cada grupo, em cada momento de avaliação

Momento	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Dia 3	Controle	10	28,70	28,55	26,70	31,90	1,50
	Experimento	10	22,97	22,80	21,10	25,70	1,57
Dia 7	Controle	10	24,61	25,25	22,40	26,60	1,36
	Experimento	10	21,84	21,90	20,30	23,30	1,15
Dia 14	Controle	9	10,06	9,90	8,40	11,90	1,10
	Experimento	9	4,07	4,30	2,50	4,90	0,74

A análise das médias do número de leucócitos em cada um dos tempos permitiu verificar que, no grupo experimento, a intensidade do processo inflamatório foi menor nos três tempos (Quadro 20) e a regressão foi mais rápida (Quadro 21) (Figura 24).

Quadro 20 - Comparação das médias do número de leucócitos, nos dois grupos em cada um dos momentos de avaliação

Momento de avaliação	Valor de p (controle x experimento)
Dia 3	< 0,001
Dia 7	< 0,001
Dia 14	< 0,001

Quadro 21 – Comparação das médias de leucócitos presentes nos três momentos, em cada grupo

Grupo	Valor de p (3°. PO x 7°. PO x 14°. PO)
Controle	< 0,001 *
Experimento	< 0,001 **

(*) 3°. PO x 7°. PO: $p < 0,001$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$

(**) 3°. PO x 7°. PO: $p = 0,048$
 3°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$
 7°. PO x 14°. PO: $p < 0,001$

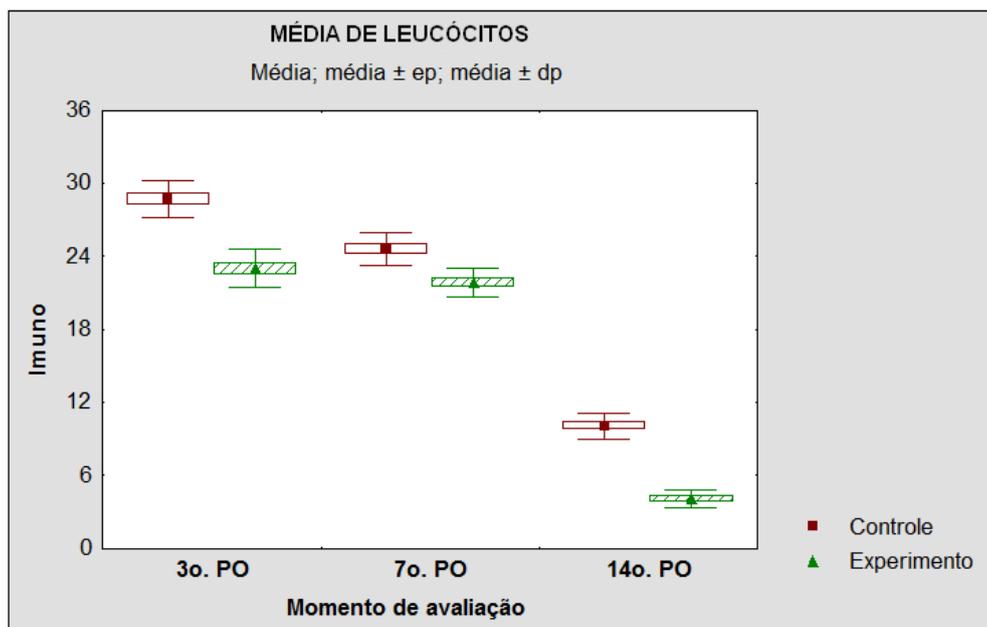


Figura 24 - Comparação das médias do número de leucócitos presentes nos cortes histológicos, nos três momentos de avaliação, nos dois grupos (Fonte: Quadro 19)

As figuras 25, 26 e 27 demonstram a infiltração de leucócitos nos três momentos de avaliação.

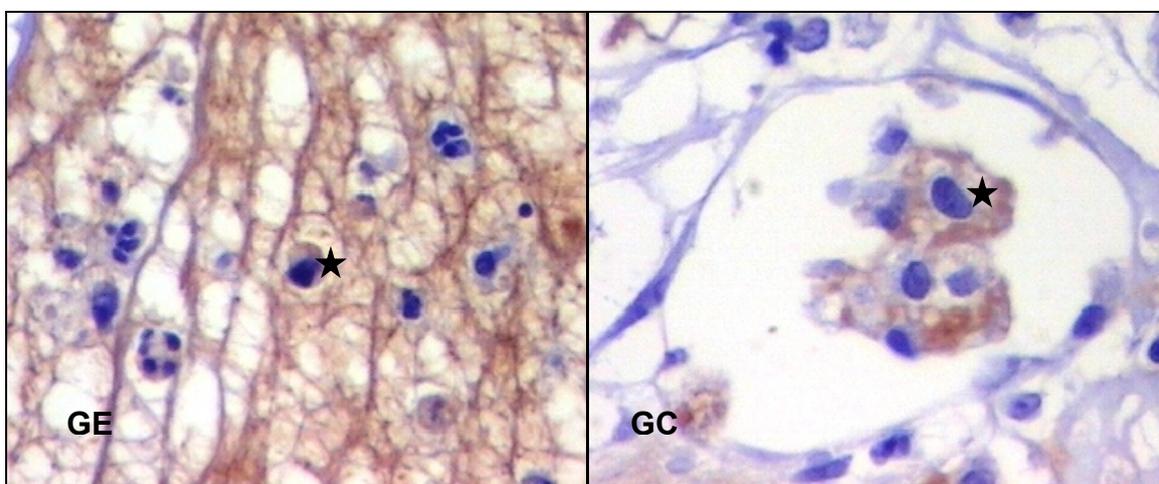


Figura 25 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45 (*), na avaliação do terceiro dia (400 X)

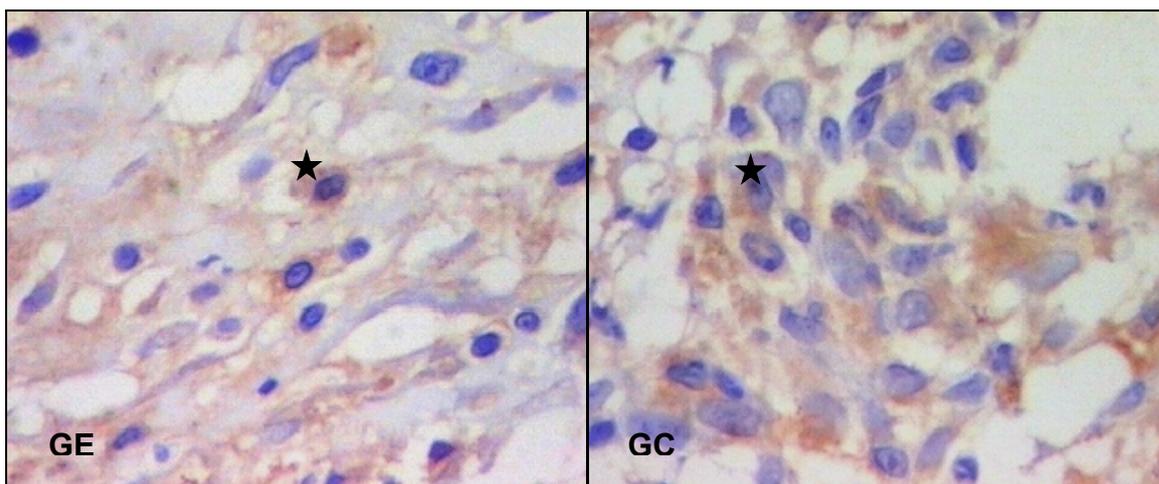


Figura 26 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45 (*), na avaliação do sétimo dia (400 X)

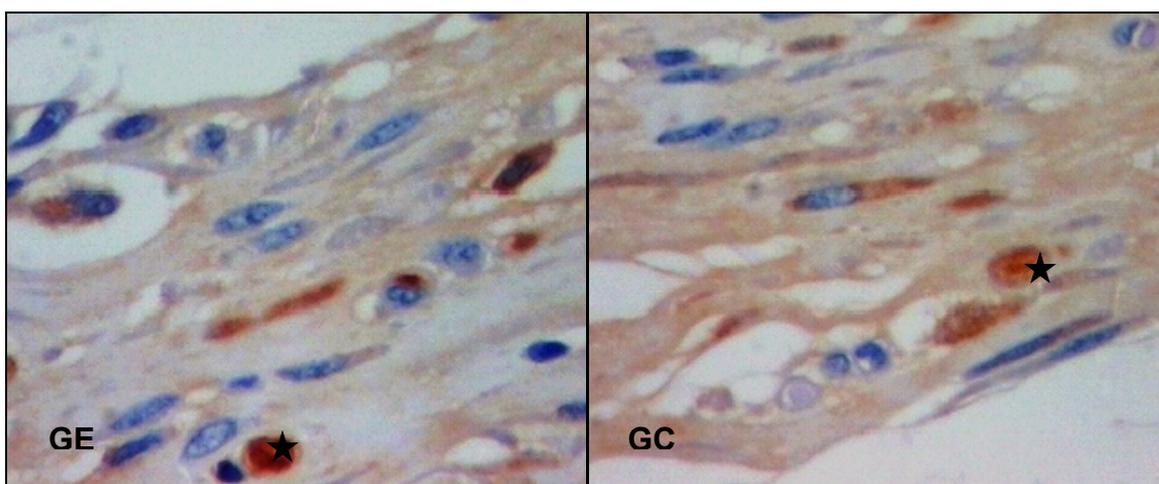


Figura 27 – Fotomicrografias de cortes histológicos demonstrando os leucócitos marcados pelo anti CD45 (*), na avaliação do décimo-quarto dia (400 X)

5 Discussão

A cicatrização de feridas pode ser beneficiada quando os principais eventos que a possibilitam são estimulados, ou seja, nutrição, proliferação celular e controle da inflamação e infecção, por exemplo^{13,14,30,50}. O *laser* de baixa intensidade tem sido identificado em diversos estudos com modelo de animais, ratos e coelhos, como coadjuvante na cicatrização devido ao incremento da revascularização, da energia em forma de ATP às células de reparo, à proliferação de fibroblastos e à inibição de mediadores químicos da inflamação⁵¹.

Diante dos principais fatores envolvidos no processo cicatricial, buscou-se identificar neste estudo a influência do *laser* na cicatrização em seus aspectos gerais. Os fatores escolhidos na análise procuraram observar a resolução do processo inflamatório, considerando a congestão vascular, o edema e o infiltrado inflamatório na lesão; o reparo tecidual, com a observação da densidade do colágeno e os tipos predominantes e ainda a regressão da inflamação por meio da presença de leucócitos.

O modelo animal em rato tem sido o mais usado pela maioria dos pesquisadores, quando pretendem avaliar a cicatrização da pele e da tela subcutânea^{13,14,18,39}, pois este animal tem ciclo de vida curto, é de fácil aquisição e uniformização da amostra, é de baixo custo tanto de aquisição quanto de manutenção e exige simples hospedagem. Já o modelo animal em coelhos é preferido quando a cicatrização a ser observada dá-se em músculos ou tendões^{30,52}.

O modelo *in vivo* foi preferido ao *in vitro* devido à maior possibilidade de considerar os efeitos de atenuação da densidade energética no tecido do que na aplicação direta na célula.

Segundo Ortiz *et al.*⁵³ o êxito do *laser* de baixa intensidade na cicatrização de feridas deve-se às respostas biológicas que esta luz induz nos tecidos como: redução do edema, resolução precoce de processo inflamatório, aumento na síntese de colágeno e epitelização.

Quanto à escolha do comprimento de onda do *laser* para realização deste estudo, a emissão da luz vermelha do He-Ne foi preferida, uma vez que King *et*

*al.*¹⁶ comprovaram que este comprimento de onda é adequado para o tratamento de lesões mais superficiais como as lesões de pele, pois sua energia penetra em torno de 2 milímetros, enquanto que a emissão do *laser* de Ga-As infravermelho penetra de 2 a 4 milímetros na tela subcutânea sendo indicado para tratamento de lesões mais profundas.

Na avaliação dos achados de reação inflamatória, no presente estudo, foram utilizados os seguintes parâmetros: edema, congestão vascular e presença de tecido de granulação, baseado em estudos anteriores seguindo escore numérico, com notas negativas para as variáveis agudas e notas positivas para as crônicas⁴⁹. Os resultados demonstram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e experimento com relação ao *score* da reação inflamatória. O grupo controle teve *score* mediano no 3.º dia de -4,5 o que caracteriza processo inflamatório agudo, enquanto que o grupo experimento apresentou *score* de -4,0, também reação inflamatória aguda. Quanto ao 7.º dia, o grupo controle e experimento apresentavam características de processo inflamatório subagudo e, no 14.º dia, ambos os grupos apresentavam o mesmo *score* de 4, caracterizado como processo inflamatório crônico.

Com relação ao percentual de colágeno tipo I, na comparação dos grupos controle e experimento, não houve diferença significativa. Porém, quando comparados os momentos de avaliação 3.º, 7.º e 14.º dia, em cada grupo, o percentual de colágeno tipo I apresentou aumento, porém não significativo no 3º dia. Quanto ao percentual do colágeno tipo III, foi observado aumento significativo também no 3º dia de avaliação no grupo irradiado. Na comparação dos grupos, controle e experimento, o percentual total de colágeno foi maior no grupo experimento sendo que no 3º dia apresentou significância estatística. Os resultados confirmam que o *laser* de baixa intensidade com densidade energética de 4 J/cm² promove aumento na deposição de colágeno tipo III no 3.º dia pós-operatório.

Carvalho *et al.*¹³ realizaram uma análise morfométrica do percentual das fibras colágenas por densidade de cor em 48 ratos. Utilizaram o *laser* He-Ne com dose de 4 J/cm² no grupo experimento. Avaliaram os resultados no 3.º, 7.º e 14.º dia do pós-operatório e também constataram aumento significativo no percentual de colágeno do 3.º ao 7.º dia. Quando comparado o 14.º com o 7.º dia observaram uma desaceleração no percentual de colágeno no grupo I

(experimento), Os autores atribuem esta desaceleração ao estado de maturação destas feridas, uma vez que há relatos de que na fase de remodelagem/maturação a proliferação celular diminui assim como, o número e o tamanho dos fibroblastos. No presente estudo, há evidências de diminuição no percentual de colágeno tipo III a partir do sétimo dia.

Pugliese *et al.*¹⁴ estudaram os efeitos do *laser* de baixa intensidade sobre os ferimentos cutâneos padronizados em 62 ratos Wistar. Foi utilizado o *laser* de Ga-Al-As com diferentes densidades energéticas. Nas análises morfológicas observaram uma maior expressão de fibras colágenas, embora sem significância estatística. Constataram também que os melhores resultados ocorreram nos grupos irradiados com 4 J/cm² do que os grupos irradiados com 8 J/cm². Na avaliação da reação inflamatória observaram que nos grupos irradiados ocorreu uma redução no edema, congestão e infiltrado inflamatório. Quanto ao incremento da cicatrização, os autores atribuíram ao *laser* um aumento significativo no depósito de colágeno que pode acontecer por indução da proliferação celular ou ainda por um aumento no processo de síntese e secreção proteica, existindo também a possibilidade de ambos os mecanismos ocorrerem simultaneamente.

Sobre a maturidade da cicatriz, o índice de maturação do colágeno foi avaliado pelo método Picrosírius. As lâminas coradas pelo Sirius Red possibilitaram avaliar o tipo de colágeno e quantificá-lo nas amostras. Diversos autores compararam vários métodos de coloração para análise do colágeno e concluíram que o corante Picrosírius é o mais seletivo, de fácil execução e interpretação, sendo específico para o estudo do colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma^{49, 48, 54}.

Apesar dos resultados do IMaC não conferirem significância estatística, notou-se no grupo experimento no 7.º e 14.º dia uma desaceleração do processo de cicatrização, estes achados corroboram com estudos anteriores¹³ e podem ser justificados pela diminuição da proliferação dos elementos celulares nesta fase.

Quando analisadas por meio da imunoistoquímica, as quantidades de células inflamatórias presentes nas lesões de ambos os grupos apresentaram um aumento nas amostras do grupo controle, quando comparada com o grupo experimento (tratado com *laser*), fato este que determina a diminuição significativa do processo inflamatório. É importante salientar que os resultados apontaram

maior infiltrado de células inflamatórias no grupo controle. No grupo experimento, além de ser menor, ocorreu precoce resolução do processo inflamatório. Esses achados também foram verificados por outros autores^{14,39} os quais também observaram redução do edema inflamatório nos grupos irradiados com *laser* de baixa potência.

Na comparação dos momentos de avaliação 3.º, 7.º e 14.º dia, observou-se também redução significativa das células inflamatórias no grupo irradiado. Estes achados corroboram com estudos anteriores^{34,35}. Os autores concluíram que os efeitos positivos do *laser* na cicatrização tecidual se devem ao incremento da proliferação celular e à expressiva redução do infiltrado inflamatório.

Exames realizados por laboratórios têm determinado que a fotoestimulação do *laser* reduz a inflamação pela diminuição do nível de prostaglandina E2 (PGE2) e inibição da ciclooxigenase-2, em culturas. São atribuídas outras explicações para defender os mecanismos analgésico e neuro-farmacológico do *laser* que são bem documentados, quando o mesmo é aplicado sobre pontos específicos ou chamados *trigger points*, agindo na liberação de endorfina, substância neuroquímica que tem ação de inibição da dor^{30,55}.

Artijo *et al.*³⁹ observaram que o processo de reepitelização ocorreu precocemente no grupo irradiado com *laser* He-Ne. Verificaram que na derme das feridas irradiadas continha mais fibroblastos grandes ativados, bem como um maior número de miofibroblastos. Além disso, constataram que os fibroblastos das lesões irradiadas apresentaram uma maior densidade de colágeno contendo fagossomos. Concluíram ainda que a irradiação inibe as respostas inflamatórias, pois observaram o precoce desaparecimento de neutrófilos, necrose nos primeiros dias de cicatrização e discreto edema intersticial nos últimos dias da inflamação.

Rocha *et al.*³⁵ investigaram o comportamento de feridas cutâneas provocadas, na região dorsal de 12 ratos Wistar, as quais foram submetidas à irradiação com *laser* de baixa intensidade, com dosagem energética de 3,8 J/cm², com tempo total de aplicação de 15 segundos. Os animais foram alocados em dois grupos, controle e experimento e este último foi tratado por três vezes, imediatamente após o ato operatório, 48 horas e sete dias após a realização de feridas cirúrgicas. Dez dias após o ato cirúrgico, foram colhidas amostras das lesões de ambos os grupos para realização do estudo histopatológico e

histomorfométrico. Foram evidenciados aumentos da neovascularização e da proliferação fibroblástica, e diminuição do infiltrado inflamatório nas lesões do grupo experimento. Os autores concluíram que a terapia a *laser* de baixa intensidade é um método eficaz no processo de modulação da reparação tecidual, o que contribui de forma significativa para uma cicatrização tecidual precoce.

O recurso do *laser*, apesar de ser empregado desde a década de 70 na prática médica, é ainda objeto de estudo. Na presente pesquisa, verificou-se o incremento da densidade de colágeno tipo III no 3º dia pós-operatório, aumento no percentual total de colágeno, diminuição do infiltrado inflamatório e precoce resolução da fase inflamatória nas feridas irradiadas, fatos esses, que justificam a utilização do *laser* em cicatrização de feridas.

Embora tenham sido realizados e publicados muitos estudos clínicos favoráveis ao uso do *laser*, seus mecanismos que aceleram o processo de cicatrização ainda não estão totalmente elucidados. Ficam outras hipóteses a serem testadas como: o *laser* melhora a transcrição de RNA ao mesmo tempo que reduz a fase inflamatória e antecipa a fibroplasia? Para verificar a ação do *laser* na transcrição de RNA se faz necessário novas pesquisas utilizando de um imunomarcador para RNA. O incremento de oxigênio e ATP favorecido pelo uso do *laser* é fator determinante para uma angiogênese precoce? Para confirmar essa hipótese, faz-se necessário o uso do imunomarcador específico para vaso sanguíneo. Para assegurar os efeitos do *laser* de baixa intensidade no processo de cicatrização falta ainda consenso e padronização das variáveis físicas: tempos e técnicas de aplicação, densidades de energia, potências de saída e comprimentos de onda.

6 Conclusões

A análise dos resultados permite concluir que, nas condições do experimento, a laserterapia com He-Ne, com potência contínua máxima de 5 mW, comprimento de onda de 632,8 nm, visível com densidade de energia de 4 J/cm², aplicada em feridas de ratos:

1. não modifica a qualidade da reação inflamatória, encontrando-se no 3.º dia reação inflamatória do tipo agudo, no 7.º dia do tipo sub-agudo e no 14.º do tipo crônico;
2. leva à maior densidade de colágeno no início do processo, verificado na avaliação do 3.º dia em virtude da maior densidade de colágeno tipo III;
3. não interfere no IMaC de forma significativa em todos os momentos avaliados; e
4. diminui a intensidade do infiltrado inflamatório, verificado em todos os tempos avaliados.

7 Referências

1. Fazio MJ, Zitelli JA, Goslen JB. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.p.18-23.
2. Mandelbaum SH, Mandelbaum MHS, Di Santis, EP. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. An. Bras. Dermatol. 2003; 78(5):1-23.
3. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Patologia estrutural e funcional. 5th ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2000. p.79.
4. Guirro R, Guirro E. Fisioterapia dermatofuncional. 3rd ed. São Paulo:Manole; 2002. p.559.
5. Low J, Reed A. Eletroterapia explicada: princípios e prática. 3rd ed. São Paulo: Manole; 2001. p. 472.
6. Kitchen S, Bazin S. Eletroterapia: prática baseada em evidências. 2nd ed. São Paulo:Manole; 2003. p.171-87.
7. Mester E, Nagylucskay S, Döklen A, Tisza S. Laser stimulation of wound healing. Acta Chir Acad Sci Hung. 1976; 17 (1):49-55.
8. Karu TI. Photobiological fundamentals of low power laser therapy. J Quantum Electronics. 1987; 10(1):1703-06.
9. Averbakh MM, Sorkin MJ, Dobkin BG. The influence of helium neon laser on healing of aseptic experimental wounds. Eksp N Khirur Anestez. 1976; (3): 56-9.
10. Santoianni P, Monfrecola G, Martellotta D, Ayala F. Inadequate effect of Helium-Neon lasers on venous leg ulcers. Photodermatol. 1984; 1 (5):245-249.
11. Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF. Effects of low level energy lasers on the healing of full thickness skin defects. Lasers Surg Med. 1983; 2(3):267-74.
12. Jongsma FHM, Rogaard AEJM, van Gemert MJC, Hulsbergen-Henning JP. Is closure of open skin wounds in rats accelerated by argon *laser* exposure? Lasers Surg Med. 1983; 3(1):75-80.
13. Carvalho PT, Mazzer N, Siqueira JFR, Ferreira JVL, Silva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser He-Ne. Rev bras fisioter. 2003; 4 (4):253-8.
14. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level *laser* therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. Pesqui Odontol Bras. 2003; 17 (4):307-13.
15. England S. Introduction to mid laser therapy. Physiotherapy. 1988; 74 (3):100-103.

16. King CE, Clelland JA, Knowles CJ, Jackson JR. Effects of helium-neon *laser* on experimental pain. *Phys Ther.* 1990; 70(3):24-30.
17. Rocha, JCT. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogênese. *RBPS.* 2004; 17 (1): 44-48.
18. Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density *laser* radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg.* 1981; 116(3):293-6.
19. Saperia D, Glassberg E, Lyons RF, Abergel RP, Baneux P, Castel JC, Richard M, Vitto J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium-neon laser. Proposed mechanism for enhanced wound healing. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 138(3):1123-8.
20. Colver GB, Priestley GC. Failure of a helium-neon *laser* to affect components of wound healing in vitro. *Br J Dermatol.* 1989; 21(2):179-86.
21. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA. A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture. *Aust Dent J.* 1996;41:188-92.
22. Young S, Bolton P, Dyson M, Harvey W, Diamantopoulos C. Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med.* 1989; 9(5):497-505.
23. Bibikova A, Belkin V, Oron U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo Viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat Embryol. (Berling).* 1994; 190(6):597-602.
24. Azevedo LH, de Paula Eduardo F, Moreira MS, de Paula Eduardo C, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured Human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers Med Sci.* 2006; 21(2):86-9.
25. Rajaratnam S, Bolton P, Dyson M. Macrophage responsiveness to Laser therapy with varying pulsing frequencies. *Laser Ther.* 1994; 6:107-112.
26. Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 1994;59:167-70.
27. Hardy LB, Hardy FS, Fine S. Effect of ruby laser radiation on mouse fibroblast culture. *Fed Proc.* 1967; 26:668-72.
28. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. Low-energy helium neon laser irradiation stimulated interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996; 107:593-6.
29. Lubart R, Wollman Y, Friedmann H, Rochkind S, Laulicht I. Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *Photochem Photobiol.* 1992; 12 (3): 305-310.
30. Reddy KG. Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J Clin Laser Med Surg.* 2004; 22(2):141-50.
31. Silva Júnior NA, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low

- level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg*. 2002; 20(2):83-7.
32. David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats *laser*. *Lasers Surg Med*. 1996; 19(4): 458-64.
 33. Gomez-Villamandos RJ, Valenzuela JMS, Calatrava IR. He-Ne laser therapy by fibroendoscopy in the mucosa of the equine upper airway. *Lasers Surg Med*. 1995; 16:184-8.
 34. Bisht D, Gupta SC, Misra V. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res*. 1994;100:43-6.
 35. Rocha J, Andrade LC, Oliveira GR, Aarestrup M, Farias RE. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(2):150-156.
 36. Carvalho PTC, Mazzer N, Corazza AV, Raduam RM. Os efeitos do *laser* de baixa intensidade em feridas cutâneas induzidas em ratos com diabetes mellitus experimental. *Rev bras fisioter*. 2001; 2 (4):241-46.
 37. Ribeiro MS, Silva DFT, Araujo CEN, Oliveira SF, Pelegrini CMR, Zorn TMT, Zezell DM. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin burns: a light microscopy study. *J Clin Laser Med Surg*. 2004; 22(1): 59-66.
 38. Arruda ERB, Rodrigues NC, Tarciro C, Parizotto NA. Influência de diferentes comprimentos de onda da laserterapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. *Rev bras fisioter*. 2007; 11(4):283-288.
 39. Aratijo CEN, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TMT. Análises ultrarestruturais e autoradiográficas mostram maior rapidez na recuperação da pele ferida com tratamento a laser He-Ne. *Photochem Photobiol*. 2007; (86):87-96.
 40. Hunt TK, Dumphy, JE. Fundamentals of wound healing and wound infections: theory and surgical practice. Applentor-Century Croft, New York. 1980.
 41. Odlan G, Ross R. Human wound repair 1: epidermal regeneration. *J. Cell Biol*. 1977; 30:135-151.
 42. Clark, RAF. Cutaneous tissue repair: basic biological considerations. *J Am Acad Dermatol*. 1985; 13: 701-725.
 43. Sharp PE, LaRegina MC. The laboratory rat. Washington. CRC Press. 1998; p.103.
 44. Vizzotto O, Noronha I, Scheffel DLH e Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(2): 143-149.
 45. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979; 11(4):447-55.

46. Alves VAF, Bacchi C E, Vassallo J. Manual de imunoistoquímica. São Paulo. Sociedade Brasileira de Patologia. 1999. p. 270.
47. Barbosa RPXGM. Expressão de citoqueratina 7 e dosagem de alfa-fetoproteína em seminomas puros e mistos [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2002.
48. Coelho, ICML. Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2003.
49. Alves, MRA. Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfométrico e imunohistoquímico [tese de doutorado]. Curitiba: Universidade federal do Paraná; 2006.
50. Damante, CA. Avaliação clínica e histológica dos efeitos do *laser* em baixa intensidade (GaAIAs) na cicatrização de gengivopatias em humanos [dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.
51. Pinheiro ALB, Meireles GCS, Vieira ALB, Almeida D, Carvalho CM, Santos JN. Phototherapy improves healing of cutaneous wounds in nourished and undernourished wistar rats. *Braz Dent J.* 2004;15 Suppl: 21-28.
52. Enwemeka CS. Ultrastructural morphometry of membrane-bound intracytoplasmic collagen fibrils in tendon fibroblasts exposed to helium laser beam. *Tissue and Cell.* 1992; 24 (4):511-523.
53. Ortiz MCS, Carrinho PM, Santos AAS, Gonçalves RC, Parizzoto NA. Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – parte II. *Fisioter Bras.* 2001; 2 (6):337-352.
54. Trubian, PS. Influência do octreotide na cicatrização de sutura gástrica em ratos: estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2004.
55. Gam AN, Thorsen H, Lonnberg F. The effect of low-level laser therapy on musculoskeletal pain: a meta-analysis. *Pain.* 1997; 52 (1):63-66.

Anexos



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa
Núcleo de Bioética

Curitiba, 11 de dezembro de 2006.

PARECER N. 181.06/CEUA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética No Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em reunião realizada no dia 11 de dezembro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "O efeito do laser- helio-neonimo de baixa potencia na cicatrização de lesões induzidas, em ratos", sob o registro no CEUA /PUCPR nº 181

O experimento classificado como de categoria C, será realizado com 60 Ratos Wistar, os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEUA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,



Prof.ª Dr.ª Antonia Maria Binder Prado
Presidente do Comitê de Ética No Uso de Animais da PUCPR

Ilma Sra.

Maria de Lourdes Penssole Biondo Simões

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)