

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Sônia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues

**Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes
protocolos de administração, no reparo de feridas
cutâneas em ratos**

Taubaté – SP
2006

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Sônia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues

**Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes
protocolos de administração, no reparo de feridas
cutâneas em ratos**

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre pelo Curso de Mestrado em
Odontologia do Departamento de Odontologia
da Universidade de Taubaté.
Área de Concentração: Dentística
Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Taubaté – SP
2006

Rodrigues, Sônia Sotto-Maior Fortes Garcia

Efeitos do laser de baixa potência, sob diferentes protocolos de administração, no reparo de feridas cutâneas em ratos / Sônia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues. – 2006.

98f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia. 2006.

Orientação: Profa Dra Ana Lia Anbinder, Departamento de Odontologia.

1. Laser de baixa potência. 2. Biomodulação. I. Título

Dedico este trabalho à minha família:

Meu esposo Ary, base emocional das minhas mais importantes decisões, em todos os momentos.

Minha filha Elisa, que com sua juventude soube transmitir incentivo, apoio e inspiração durante esta minha jornada.

Meu pai, Prof. José Fortes, ex-professor da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e minha mãe, Zuleika que me ensinaram a ter integridade moral, honestidade, humildade e perseverança, a quem devo toda a minha vida.

Meus irmãos Adriana, Roberto e suas respectivas famílias, que sempre me incentivaram e apoiaram.

Tia Lourdes e o nosso inesquecível tio Milton, pelo carinho, alegria e convivência durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, por sua competência e conhecimento, por ter me auxiliado a conduzir esta pesquisa, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté, na pessoa do coordenador geral do Mestrado em Odontologia, Prof. Dr. Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela eficiência, presteza e cordialidade de todos os seus componentes, tornando minha estadia fora de casa muito mais agradável.

Ao coordenador da área de Dentística da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Taubaté, Prof. Dr. José Benedicto de Mello, que me recebeu com carinho, amizade e pelos profundos conhecimentos passados durante o curso.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, meu querido professor e amigo, Prof. Dr. Henrique Duque de Miranda Chaves Filho, pelo incentivo e ajuda inestimável, minha eterna gratidão.

Ao jovem Prof. Rodrigo Guerra de Oliveira, grande mestre, meu ex-aluno e que me despertou o interesse e a vontade da pesquisa sobre o tema laser, que esteve ao meu lado em todos os momentos, não medindo esforços para esclarecer todas as dúvidas que eu tivesse sobre tão fascinante tema.

À Profa. Dra. Vera Peters, diretora do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, que me recebeu com grande entusiasmo e boa vontade para a realização deste experimento com animais.

Ao Prof. Dr. Rogério Estevam Farias, do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela infra-estrutura utilizada na execução da análise histológica e por ter me auxiliado na leitura das lâminas.

À Profa. Dra. Rosângela Almeida Ribeiro, exemplo de caráter, dignidade e excelência profissional, por ter me orientado com seus valiosos ensinamentos e principalmente com sua amizade.

Ao Prof. Antonio Augusto Falci Rodrigues, por ter me recebido no laboratório sob sua responsabilidade.

Ao Prof. Alfredo Chaoubah, pelo estudo estatístico apresentado nesta dissertação.

À Profa. Lúcia Andréa Contim Moreira, pelo companheirismo e incentivo, cujo sorriso terno esteve sempre presente e necessário.

Ao técnico do laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Nelson de Paula Júnior, por toda a paciência, atenção, cuidados e eficiência com que me ajudou durante o preparo do material histológico.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, por terem colaborado para a realização deste meu trabalho.

Aos acadêmicos do curso de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, meus alunos, Bruno Sales Sotto-Maior e Thiago Fernandes que me acompanharam durante os procedimentos cirúrgicos e muito me auxiliaram, meu reconhecimento.

Aos meus amigos de mestrado, pelo privilégio de sua amizade e por tudo o que passamos juntos, desde o início. Vocês moram no meu coração.

“Em todas as atividades humanas, seja o trabalho ou qualquer outra atividade, o propósito principal deve ser beneficiar os seres humanos. Ora, o que estamos buscando em nosso trabalho, qual é o propósito do nosso trabalho? Como qualquer outra atividade humana, estamos buscando uma sensação de realização, satisfação e felicidade, não é? E, se estamos falando da felicidade humana, então é claro que as emoções humanas entram em jogo. Devemos, portanto, ter um cuidado especial com os relacionamentos humanos no trabalho, prestar atenção em como interagimos uns com os outros e tentar manter os valores humanos essenciais mesmo no trabalho.”

Dalai Lama

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar de forma biométrica e histomorfométrica os efeitos da terapia a laser de baixa potência sob diferentes protocolos, no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos. Depois de realizadas feridas padronizadas de 8 mm de diâmetro no centro do plano sagital mediano no dorso de quarenta ratos, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de dez: G1, sem exposição ao laser; G2, exposição ao laser imediatamente após o ato cirúrgico; G3, exposição ao laser conforme G2 e 48 h depois da cirurgia; G4, idem ao G3 e após sete dias a cirurgia. As áreas das feridas foram medidas imediatamente após cirurgia, 48 h, sete dias e no décimo dia (sacrifício). As amostras foram fixadas e submetidas à preparação histológica de rotina, e os cortes, corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação sob microscopia de luz. Foram quantificados número de células inflamatórias, vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos. Para a análise estatística, os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância e os não paramétricos ao teste de Kruskal-Wallis, ao nível de 5%. Os resultados mostraram que houve redução percentual das áreas das feridas estatisticamente significativa entre os grupos irradiados e o grupo controle, principalmente no intervalo entre 48 h e a cirurgia. Na contagem de células inflamatórias, os três grupos irradiados apresentaram número significativamente maior em relação ao grupo G1. Quantificados os fibroblastos apenas o grupo G3 apresentou um número significativamente maior em relação aos grupos G1 e G2. Na contagem de vasos sanguíneos neoformados observou-se um número significativamente maior entre o grupo G3 e o grupo G1 e entre o grupo G4 e os grupos G1 e G2. Concluiu-se que o laser favoreceu o processo de cicatrização das feridas e que o processo de reparação apresentou-se mais acentuado nos grupos que receberam mais de uma aplicação do laser.

Palavras-chave: Laser de baixa potência. Biomodulação. Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze biometrical and histomorphometrically the effects of the low-level laser therapy under different protocols, on skin wound healing in rats. Standardized 8 mm circular wound were made in the dorsal midline back of forty rats and after the animals were randomly divided into four groups of ten: G1, without laser; G2, laser irradiation immediately after surgery; G3, irradiation as G1 and 48 h after surgery; G4, irradiation as G3 and seven days after surgery. The wounds areas were measured immediately after surgery, 48 h, seven days and in the tenth day (sacrifice). The samples were fixed and submitted to the histological routine, and slides stained with haematoxylin and eosin (HE) for evaluation under light microscope. Inflammatory cells, blood vessels and fibroblasts were quantified. For the statistical analysis, data were submitted to the variance analysis and to Kruskal-Wallis's test, at the level of 5%. The results showed that there was reduction of the area statistically significant between the irradiated groups and the control, mainly in the interval between 48 h and the surgery. The inflammatory cells number of the three irradiated groups presented number bigger significant in compared to group G1. Fibroblasts count the G3 it just presented a number bigger significant compared to the groups G1 and G2. In the development of new blood vessels it was observed statistically significant difference among group G3 and the group G1 and among group G4 and groups G1 and G2. It was concluded that the laser favored the wound healing with better results that received more than an application of the laser.

Key-words: Low-level laser. Biomodulation. Wound healing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

cm²: centímetro quadrado

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DNA: ácido desoxirribonucléico

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assays*

GaAlAs: arseneto de gálio e alumínio

GaAs: arseneto de gálio

HE: coloração com hematoxilina e eosina

He-Ne: hélio e neônio

hz: hertz

InGaAlP: gálio-alumínio-índio-fósforo

IR: infravermelho

J/cm²: joule por centímetro quadrado

J: joule

LLLT: *low level laser therapy* - terapia com laser de baixa potência

min: minutos

ml: mililitro

mW: miliwatt

Nd: YLF: neodímio:ítrio-lítio-flúor

nm: nanômetro

PCR: proteína C reativa

Pixel: *picture element*

RFU: unidade relativa de fluorescência

RNA: ácido ribonucléico

s: segundos

UFJF: Universidade Federal de Juiz de Fora

W/cm²: watt por centímetro quadrado

W: watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Componentes e mecanismo de funcionamento da maioria dos lasers (Adaptado de DAMANTE, 2003)	18
Figura 2	Divisão dos grupos experimentais	43
Figura 3	Fonte e painel de controle do sistema laser utilizado	44
Figura 4	Ponta ativa do laser	45
Figura 5	Instrumental utilizado para realização da ferida	46
Figura 6	Remoção do fragmento circular de pele do dorso de rato	46
Figura 7	Lesão provocada no dorso de rato com auxílio de <i>punch</i> de 8mm	47
Figura 8	Aplicação puntual do laser	48
Figura 9	Representação esquemática da aplicação puntual do laser na ferida	48
Figura 10	Estativa utilizada para padronização das tomadas fotográficas	49
Figura 11	Tela do programa ImageJ mostrando delimitação da área da ferida	49
Figura 12	Aspecto histológico do tecido epitelial e conjuntivo em HE demonstrando a área selecionada – a) aumento original 50x; b) aumento original de 400x demonstrando o tecido conjuntivo	52
Figura 13	Tela do programa Axion Vision mostrando a quantificação dos componentes da imagem digitalizada, onde cada ponto azul, vermelho ou amarelo correspondem a uma estrutura celular	54
Figura 14	Fluxograma com os principais passos desenvolvidos	55
Figura 15	Grupo controle G1 – a) ferida aberta após sua execução; b) crosta de espessura fina 48 h após cirurgia; c) crosta seca com evidências de descolamento aos sete dias após cirurgia; d) reparação parcial com bordos esbranquiçados aos dez dias após cirurgia	58
Figura 16	Grupo G2 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) ausência de crosta com epitelização nos bordos aos sete dias após cirurgia; d) elevada contração da ferida aos dez dias após cirurgia	59

Figura 17	Grupo G3 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) elevada contração da ferida com bordos delgados e secos aos sete dias após cirurgia; d) nítida contração da ferida aos dez dias após cirurgia	60
Figura 18	Grupo G4 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) elevada contração da ferida com bordos delgados e secos aos sete dias após cirurgia; d) presença de cicatriz evidente com bordos bastante esbranquiçados aos dez dias após cirurgia	61
Figura 19	Gráfico representativo da curva de redução percentual média da área ferida em relação aos tamanhos iniciais, em função do tempo	65
Figura 20	Grupo G1 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x; b) aspecto histológico caracterizando edema, vasos (←), células inflamatórias (▶), fibroblastos (<), com aumento original de 400x	70
Figura 21	Grupo G2 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x; b) aspecto histológico caracterizando vasos (←), células inflamatórias (▶) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x	71
Figura 22	Grupo G3 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x destacando o epitélio diferenciado com suas camadas; b) aspecto histológico caracterizando menor edema, vasos sanguíneos (←), células inflamatórias (◀) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x	72
Figura 23	Grupo G4 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x onde se observa orientação celular no tecido conjuntivo e presença de fibras colágenas; b) aspecto histológico caracterizando menor edema, vasos sanguíneos (←), células inflamatórias (◀) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatística descritiva dos valores de redução percentual de área da ferida e resultado do teste estatístico ANOVA	63
Tabela 2	Resultado do teste de comparação múltipla de Dunnett para valores de redução percentual de área da ferida entre os grupos	64
Tabela 3	Estatística descritiva dos valores de redução percentual de área da ferida e resultado do teste estatístico ANOVA	66
Tabela 4	Resultado do teste de comparação múltipla de Dunnet para valores de redução percentual de área da ferida entre os grupos	67
Tabela 5	Resultado do teste de Kruskal-Wallis para a comparação das variáveis vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias entre os grupos	74
Tabela 6	Resultados do teste Mann-Whitney para a comparação das variáveis vasos sanguíneos, fibroblastos e células inflamatórias entre os grupos	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Biofísica do laser	17
2.1.1 Laser de baixa potência	19
2.2 Efeitos do laser de baixa potência	21
2.2.1 Estudos <i>in vivo</i>	23
2.2.2 Estudos <i>in vitro</i>	37
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Animais	42
4.2 Grupos	42
4.3 Aparelho laser	44
4.4 Procedimentos cirúrgicos	45
4.5 Aplicação do laser	47
4.6 Análise biométrica	48
4.7 Obtenção das amostras	50
4.8 Análise histomorfológica e histomorfométrica	51
5 RESULTADOS	56
5.1 Descrição clínica das feridas	56
5.2 Avaliação biométrica das áreas das feridas	62
5.3 Avaliação histomorfológica	68
5.4 Avaliação histomorfométrica	74
6 DISCUSSÃO	76
6.1 Aspectos gerais do laser de baixa potência	76
6.2 Análise clínica, biométrica e histomorfométrica	77
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO	92
APÊNDICES	93

1 INTRODUÇÃO

Através da busca de procedimentos que possam minimizar edema, dores e ainda estimular a cicatrização por meio de biomodulação celular, muitas são as terapias que surgem em decorrência dos grandes avanços nas áreas médicas e odontológicas, sendo a utilização do laser uma delas.

A palavra laser é um acrônimo com origem na língua inglesa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação). É uma radiação eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características bastante distintas daquelas de uma luz fluorescente ou de uma lâmpada comum. A emissão laser é monocromática, ou seja, emite radiação em um único comprimento de onda. É uma radiação com coerência espacial e temporal na qual as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo. Sua colimação permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos (BRUGNERA JÚNIOR; PINHEIRO, 1998).

São justamente as características especiais desse tipo de luz que as fazem ter propriedades terapêuticas importantes (laser de baixa intensidade ou terapêutico) assim como ser utilizada em cirurgias (laser de alta intensidade).

A utilização do laser operando em baixa intensidade é estudada desde os anos sessenta e vários trabalhos atualmente vêm sendo realizados para se verificar e elucidar os efeitos da radiação laser de baixa potência sobre os tecidos. A partir da década de oitenta, perspectivas da utilização dos lasers de baixa potência surgiram em decorrência dos primeiros estudos. Autores como Karu (1987; 1989; 2000) estudaram por meio de vários experimentos *in vitro*, explicações para desvendar os mecanismos de ação do laser de baixa potência.

Vários trabalhos demonstram que os efeitos terapêuticos dos lasers sobre os diferentes tecidos biológicos são muito amplos, induzindo efeitos trófico-regenerativos, antiinflamatórios e analgésicos. Tais efeitos são demonstrados em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, destacando-se os trabalhos que relatam aumento na microcirculação local (CHOMETTE et al., 1987; LONGO et al., 1987; RIBEIRO et al., 2004), efeitos analgésicos (CHOR et al., 2004; NES; POSSO, 2005) proliferação de células epiteliais (LONGO et al., 1987) e fibroblastos (ALMEIDA-LOPES, 1999; KREISLER et al., 2003; LOEVSCHELL et al., 1994; LUBART et al., 1993; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989) assim como aumento na síntese de colágeno (BISHT et al., 1994; CHOMETTE et al., 1987; PUGLIESE et al., 2003).

A utilização de laser de baixa potência como agente biomodulador em variadas situações clínicas é cada vez mais considerada positiva nos processos de aceleração da cicatrização de tecidos moles e na diminuição dos sintomas dolorosos advindos de procedimentos clínicos e cirúrgicos (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996; SIMUNOVIC, 2000).

Apesar dos numerosos estudos e trabalhos confirmando a atuação do laser de baixa potência como instrumento de potencial biomodulador, ainda não se tem, contudo, parâmetros considerados ideais para sua aplicação. Embora se demonstre através de pesquisas o poder de aceleração do processo de reparação tecidual, não foi encontrado ainda um protocolo completo que seja suficiente para compreensão destes efeitos.

O objetivo, portanto, deste trabalho, será identificar biométrica e histomorfometricamente os fenômenos presentes durante o reparo tecidual de feridas realizadas em ratos e tratadas com laser de baixa potência, sob diferentes protocolos de administração.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Achamos pertinente que sejam feitas algumas considerações a respeito da física do laser, suas propriedades e interação com os tecidos biológicos, uma vez que o laser, juntamente com suas características físicas e óticas, ainda representa um campo relativamente novo dentro da Odontologia.

2.1 Biofísica do laser

Conforme os princípios que regem sua construção, os lasers compõem-se essencialmente de três partes (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004):

- Ressonador: trata-se de um tubo ou cavidade ótica com um arranjo de espelhos que amplificam os efeitos do laser. Um dos espelhos presentes na cavidade é de reflexão total e o outro, de reflexão parcial.
- Meio ativo: é qualquer substância na qual será possível determinar o comprimento de onda da luz emitida, podendo ser sólido como nos lasers de Neodímio, Érbio e nos lasers semicondutores de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAsAl) e Arseneto de Gálio (GaAs). Entre os meios ativos gasosos estão o Argônio, Hélio-Neônio (He-Ne), Dióxido de Carbono (CO₂). Os lasers líquidos utilizam um corante orgânico diluído em solvente líquido.
- Mecanismo de bombeamento ou excitação: baseia-se no princípio da absorção, o qual consiste em uma fonte de energia externa que excita os elétrons do meio ativo. Os mecanismos de bombeamento podem ser descargas elétricas, o disparo de um flash e até uma ativação por outro laser.

Após um estímulo por alguma energia externa, os elétrons que se encontram na natureza em estado de equilíbrio passam para um estado de excitação. Quando, portanto voltam ao seu estado de equilíbrio, eles emitem um fóton, uma partícula de energia. Estando então estes fótons dentro de um ressonador, propagar-se-ão em um eixo entre os dois espelhos, deixando a cavidade e transpassando o espelho semitransparente, na forma de um feixe de luz (Figura 1).

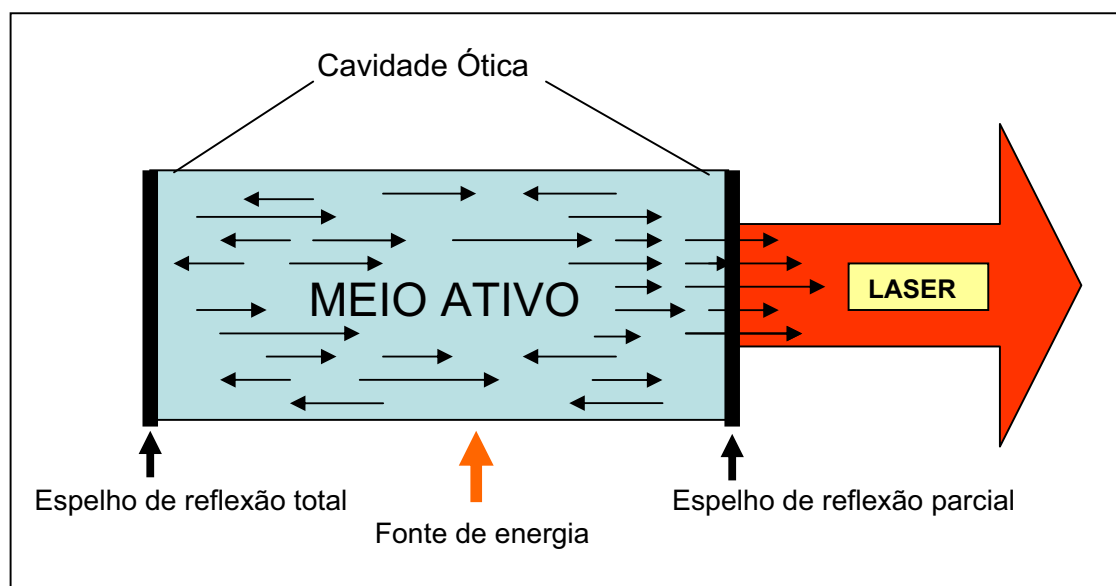


Figura 1 - Componentes e mecanismo de funcionamento da maioria dos lasers (Adaptado de DAMANTE, 2003)

A luz laser possui propriedades distintas da luz comum (MELLO; MELLO, 2001):

- Monocromaticidade: emite radiações em um único comprimento de onda, ou seja, a mesma cor;
- Coerência: o feixe se propaga na mesma direção no tempo e no espaço com a mesma frequência;
- Colimação: o feixe luminoso, devido à alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos, é unidirecional, praticamente paralelo com divergência mínima.

Um sistema laser pode ainda operar em regime contínuo ou pulsado. Quando utiliza a emissão contínua, o operador poderá monitorar o aparelho laser através da sua potência. Os feixes laser podem ser produzidos em pulsos ultrarrápidos da ordem de nanossegundos, picossegundos ou de femtossegundos, sendo estas propriedades que permitem a alta potência do sistema de laser pulsado (GUTKNECHT; FRANZEN, 2004).

Segundo Pinheiro (1998), os efeitos do laser podem ser divididos em térmicos e não térmicos. Os lasers de alta potência ou cirúrgicos apresentam a propriedade de corte, vaporização e hemostasia dos tecidos sendo, portanto, os que apresentam efeitos térmicos. Os lasers de baixa potência, cuja terapia não se baseia em desprendimento de calor, apresentam a energia dos fótons transformada em efeitos fotoquímicos e fotobiológicos nas células e nos tecidos.

2.1.1 Laser de baixa potência

A terapia com laser de baixa potência trabalha com tipo do espectro visível e infravermelho de luz. O laser de Hélio-Neônio, que nas décadas de 70 e 80, foi o mais utilizado como terapêutico, opera na região visível. Emite ondas de luz geralmente em torno de 630 nm e apresenta profundidade de penetração nos tecidos de 6 a 10 mm, dependendo de sua potência. Nas últimas décadas, os lasers de diodo semicondutor de GaAs e GaAlAs que operam dentro do espectro infravermelho, com comprimentos de ondas entre 780 nm e 904 nm, com poder de penetração entre 20 e 50 mm, vêm se tornando mais populares (DAMANTE et al., 2004).

Segundo Karu (1989), os diferentes comprimentos de onda proporcionam diferentes coeficientes de absorção para um mesmo tecido. A autora observou que as radiações emitidas na região do ultravioleta e na região do infravermelho médio apresentam um coeficiente alto de absorção na pele, sendo a radiação absorvida na superfície. Na região do infravermelho próximo, observa-se um baixo coeficiente de absorção e máxima penetração nos tecidos. Propõe um modelo de estimulação dos sistemas biológicos, levantando a hipótese de que a luz visível promove mudanças fotoquímicas nos receptores das mitocôndrias, alterando seu metabolismo e promovendo envio de sinais para outras áreas da célula, com isto gerando uma fotorresposta.

O mecanismo de funcionamento e estrutura dos lasers de diodo são um pouco diferentes da maioria dos outros lasers. São constituídos de dois pólos, um positivo e outro negativo, formando uma espécie de sanduíche, no qual a radiação será emitida pelas laterais. Sendo as laterais bem polidas, funcionam como espelhos do ressonador contribuindo para que esses aparelhos sejam compactos (MELLO; MELLO, 2001).

A fim de se obter uma resposta biológica apropriada, é preciso ajustar a dose ótima da radiação, comprimento de onda e número de aplicações necessárias para o efeito esperado. Devem ainda ser observados parâmetros como densidade de potência e tipos de entrega de operação do laser. A potência é medida em watts (W), e a potência de saída de luz por unidade de área, em watts por centímetro quadrado (W/cm^2) e é chamada de densidade de potência. A dose, fluência ou densidade de energia, geralmente expressa em joules por centímetro quadrado (J/cm^2) é a quantidade de energia por unidade de área transferida ao tecido (PINHEIRO, 1998).

2.2 Efeitos do laser de baixa potência

Atualmente são muitas as pesquisas utilizando os lasers de baixa potência relatadas na literatura. Encontra-se uma grande variação nos parâmetros de aplicação empregados e, portanto esta revisão de literatura considerará alguns entre os muitos artigos publicados internacionalmente, que tratam dos efeitos não térmicos da luz laser nos tecidos ou células.

A terapia a laser em baixa potência vem sendo estudada há muitas décadas, por meio de experimentos em animais, com a demonstração de seus efeitos não térmicos, com trabalhos publicados por Mester, Mester e Mester (1985), além de inúmeros trabalhos *in vitro*. Muitas pesquisas foram encontradas na literatura sobre efeitos não térmicos do laser, mas algumas informações obtidas são discordantes em função da inexistência de um protocolo comum. Os autores demonstraram que células em cultura, assim como tecidos, podem ser estimuladas por certa dose de luz laser.

Segundo Strang, Moseley e Carmichael (1988), muitos trabalhos publicados na literatura não apresentam rigor científico, com metodologias não reproduzíveis, estando desta forma abertos para críticas científicas. As regras para utilização dos lasers de baixa potência na cicatrização de feridas e tratamento da dor não estão ainda estabelecidas.

Basford (1989) relata que grande parte dos trabalhos utilizam-se de experimentos em animais e estudos clínicos em humanos. Descreve que os trabalhos iniciais com LLLT têm sofrido com metodologias erradas, descrições incompletas e controles não existentes. Concluiu que muitas são as evidências de que o laser de baixa potência biomodula funções celulares, porém que existe a

necessidade de pesquisas com maior eficiência para que a utilização desta modalidade de tratamento seja considerada efetiva devido às informações instigantes existentes.

Walsh (1997) escreveu um artigo sobre suas pesquisas com laser operando em baixa potência sendo utilizado em odontologia. Relata que estudos clínicos têm demonstrado que o laser de baixa potência é efetivo em muitas indicações: estimulação de cicatrização de feridas, efeito nas células ósseas, no sistema vascular, patologias musculoesqueléticas, analgesia, regeneração neural, efeitos nas células epiteliais e estimulação de fibroblastos. Considera que utilizando doses de 2 J/cm^2 os efeitos são biomoduladores enquanto que altas doses, como por exemplo, 16 J/cm^2 são supressivas em alguns casos.

Schindl et al. (2003) realizaram revisão de literatura sobre os efeitos do laser de baixa potência em experimentos *in vivo* e *in vitro*, nos processos de cicatrização de feridas. Observaram que embora havendo um enorme número de trabalhos e pesquisas ainda assim demonstram falta de precisão na dosimetria utilizada. Concluíram que apesar deste fato, os estudos consideram a fototerapia a laser de baixa potência valiosa como coadjuvante nos processos de cicatrização.

Woodruff et al. (2004) ao executarem meta-análise da literatura sobre os efeitos da terapia do laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas constataram sua eficácia. A análise revelou efeitos significativamente positivos em índices específicos observados em cicatrização, por exemplo: aumento da síntese de colágeno, aumento da força de resistência da cicatrização quando submetida a ensaios de tensão, redução do tempo de cicatrização, redução do perímetro e área da ferida. Os resultados variaram de acordo com alguns parâmetros, tais como: modo de tratamento (com contato ou sem contato da ponta emissora), densidade de

potência, dose, comprimento de onda, número e frequência de exposição ao laser, duração do tratamento.

Genot e Klastersky (2005) escreveram um artigo sobre prevenção e terapia de mucosites provocadas por quimioterapia e radioterapia em pacientes que apresentam tumores de cabeça e pescoço, utilizando o laser de baixa potência como terapia. Realizaram uma revisão de literatura na qual observaram que o laser de He-Ne é o mais freqüentemente pesquisado; que a terapia com o laser de baixa potência, foi efetiva e eficaz em pacientes que receberam quimioterapia ou radioterapia promovendo a diminuição da dor decorrente de lesões bucais e acelerando a cicatrização. Concluem, porém que ainda não existe um protocolo de aplicação do laser, que são evidentes os potenciais benefícios de sua utilização na diminuição de manifestações mórbidas, clínicas e que os riscos de toxicidade do laser inexistem, quando aplicados convenientemente, confirmando e encorajando a aplicação da técnica.

2.2.1 Estudos *in vivo*

Mester, Mester e Mester (1985) realizaram análise histológica dos efeitos do laser de rubi com 694,3 nm na cicatrização de feridas no dorso de camundongos. Foi aplicado o laser com dose de $1,1 \text{ J/cm}^2$, duas vezes por semana, por quatro sessões. Observou-se aumento da atividade celular nas bordas e base da ferida, aumento na divisão celular com formação mais rápida de tecido de granulação e clinicamente constatou-se fechamento mais acelerado nas feridas do grupo irradiado. Houve contração em torno de 50% nos diâmetros das feridas irradiadas depois de decorridos sete dias.

Chomette et al. (1987) estudaram em 14 pacientes que apresentavam periodontopatia, o processo de reparação do tecido gengival submetido à aplicação única de laser de baixa intensidade 632 nm, 6 mW de potência por dois a três minutos de exposição. Foram realizadas biópsias no primeiro, oitavo, 14º e 21º dia após a aplicação do laser. Salientaram que o laser promoveu reparação mais rápida (14 dias) do que a observada no grupo controle (21 dias) caracterizada por um aumento de novos vasos sanguíneos e de fibras colágenas, além do aumento da atividade enzimática dos fibroblastos. Informaram ainda que a presença de inflamação intensa no local retardou o processo de reparação, promovendo abertura da ferida com conseqüente formação de quelóide cicatricial e que nestas áreas o laser também teve efeitos positivos.

Longo et al. (1987) descreveram uma acentuada proliferação fibroblástica e regeneração epitelial em sítios feridos experimentalmente em ratos utilizando o laser de AsGaAl, 904 nm, 3 J/cm². No dorso de 32 ratos foram provocadas feridas de 1 cm². Os animais foram divididos em quatro grupos e as feridas tratadas uma vez ao dia por cinco dias consecutivos. Os grupos foram: G1 - controle; G2 - feridas cobertas com gaze ensopada com *phytostimulines*, extrato vegetal conhecido por suas propriedades de regeneração tecidual (Fitostimoline®, Damor Pharmaceuticals); G3 - Diodo laser GaAsAl, 10 mW/cm² por cinco minutos; G4 - Diodo laser GaAsAl, 5 mW/cm² por dez minutos. Após uma semana os animais foram sacrificados e foi realizada análise histológica. Os estudos concluíram que o grupo G3 foi o que apresentou maior regeneração epitelial, proliferação fibroblástica na porção mais profunda da ferida e ausência de infiltrado granulocitário inflamatório.

Anneroth et al. (1988) estudaram o processo de reparação de feridas abertas provocadas na região dorsal de 14 ratos e submetidas à exposição única de oito minutos de laser de AsGa, 904 nm. Utilizaram 500 hz de frequência de pulso e potência de 0,5 mW, com a ponta da fibra ótica distanciando 0,5 cm da superfície das feridas. Realizaram observações clínicas diárias para verificar sinais de sangramento, infecção, formação e perda da crosta e formação epitelial. Observaram formação de crosta em 13 animais cuja perda ocorreu entre seis e 12 dias. Não se notou nenhum sinal de infecção entre todas as feridas realizadas, e macroscópica e histologicamente, não houve diferença entre as feridas tratadas ou não com o laser.

Braverman et al. (1989) utilizaram o laser de He-Ne (632,8 nm) e GaAlAs (904 nm), em experimento com 72 coelhos. Após serem realizadas duas feridas de $1,5 \text{ cm}^2$ na região dorsal, separadas entre si por uma distância de 4 cm, os animais foram divididos em quatro grupos: G1 - controle, sem tratamento; G2 - $1,65 \text{ J/cm}^2$ HeNe; G3 - $8,25 \text{ J/cm}^2$ GaAlAs ; G4 - $1,65 \text{ J/cm}^2$ HeNe e $8,25 \text{ J/cm}^2$ GaAlAs, e submetidos as irradiações por 11 minutos diariamente por 21 dias. As feridas foram fotografadas para tomada de seus perímetros por meio de *software* nos dias um, três, sete, 11, 15 e 21, quando os animais foram sacrificados. Foram colhidas duas amostras de cada espécime. Em uma das feridas foi analisada a força de tensão entre os tecidos por tensiômetro e na outra amostra foi utilizado Tricrômio de Mallory para análise histológica do colágeno. A análise dos perímetros das feridas mostrou que não houve diferenças significantes entre os quatro grupos. Todas as amostras dos grupos tratados com laser mostraram aumento de resistência tecidual quando submetidas ao ensaio de tensão se comparadas às do grupo controle. Quanto à

análise histológica, o grupo G2 apresentou aumento de colágeno comparado aos grupos G1 e G4, sem, no entanto alcançar diferença estatística.

Garcia (1992), em sua tese de livre docência, estudou por meio de observações clínicas, biométricas e histopatológicas, o comportamento de feridas cutâneas provocadas em 36 ratos, divididos em três grupos de 12 animais. Após a remoção de dois fragmentos circulares de pele, ficou estabelecido que a ferida cirúrgica do lado direito do plano sagital mediano fosse a experimental (tratada com laser) e a da esquerda a controle (sem tratamento). Foi utilizado o laser de AsGa, 904 nm, potência média de saída entre 0,5 a 3,5 mW e com dose de 3 J/cm². A feridas experimentais receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1, potência de 1,25 mW por 19 segundos; Grupo 2, potência de 2 mW por 12 segundos e Grupo 3, potência de 2,75 mW por nove segundos. Nos intervalos de tempo de três, sete e 14 dias, as feridas controles e experimentais tiveram seus diâmetros medidos por paquímetro para análise biométrica. Após o sacrifício no 14º dia foram colhidas amostras para análise histológica das feridas. Concluiu-se que as feridas tratadas com laser demonstraram reparação mais rápida, biometricamente apresentaram maior contração e histologicamente elevada taxa de crescimento epitelial, tendo o Grupo 2, apresentado resultados mais significativos.

Honmura et al. (1992) avaliaram a capacidade terapêutica antiinflamatória da aplicação do laser diodo GaAlAs, 780 nm, 10 mW, em experimento com ratos, nos quais foram implantados, em seus dorsos, um fragmento de carragenina, um polissacarídeo extraído de musgo irlandês, que promoveu ação irritante local. Os animais foram divididos em dois grupos: G1, que recebeu irradiação de 31,8 J/cm², por três minutos diariamente, por oito dias; G2 que recebeu indometacina cristalina, um potente antiinflamatório, dose de 4 mg/Kg por via oral. No oitavo dia, os animais

foram sacrificados e logo após, removidas peças da região inflamada para análise histológica. Foi observado que o grupo que recebeu a terapêutica com laser teve uma redução de 20-30% de inflamação em relação ao outro grupo.

Senda et al. (1992) realizaram um experimento usando o laser de He-Ne, 632,8 nm, 5 Hz de frequência em feridas padronizadas na mucosa oral de ratos. Os animais foram divididos em três grupos: controle, que não recebeu tratamento; grupo I, as feridas foram irradiadas por três minutos e grupo II que teve as feridas irradiadas por dez minutos. As feridas de ambos os grupos irradiados receberam a irradiação no primeiro e terceiro dias. As áreas das feridas foram medidas nos dias um, três e sete. Os resultados mostraram que o grupo II apresentou uma maior redução percentual das feridas em todos os dias avaliados.

Bisht et al. (1994) fizeram um experimento com 38 ratos nos quais foram produzidas na região dorsal, duas feridas, uma esquerda e outra direita, com 8 mm de diâmetro. Foi utilizado o laser de He-Ne, 632,8 nm, saída de 5 mW. As feridas esquerdas foram irradiadas diariamente, por 17 dias, energia de 4 J/cm² e tempo de cinco minutos e as da direita, sem tratamento, serviram de controle. As feridas foram submetidas ao exame biométrico utilizando o paquímetro. Análise histológica foi feita após a realização de biópsias nos dias três, cinco, sete, nove, 12, 15 e 17. Os resultados biométricos mostraram que os tamanhos das feridas irradiadas foram menores que os das feridas controle. Houve formação de tecido cicatricial mais forte nas feridas que receberam tratamento, quando se avaliou o colágeno. O estudo mostrou que houve um tempo significativamente menor para a cicatrização das feridas expostas ao laser, se comparado com as do grupo controle, sendo eficiente o efeito biomodulador do laser utilizado.

Hall et al. (1994) realizaram experimento com 38 ratos, nos dorsos dos quais foram produzidas duas feridas bilaterais de 6 mm de diâmetro. Os animais foram divididos em Grupos A e B, com 19 ratos cada. O Grupo A teve as feridas do lado direito (A1), irradiadas com laser de baixa potência de GaAlAs, 904 nm, 1 mW de potência, dose de $0,2 \text{ J/cm}^2$ durante 60 s ao dia, por 20 dias. As feridas do lado esquerdo (A2), não receberam tratamento, serviram de controle para eventuais efeitos sistêmicos produzidos pelo laser. As feridas do grupo B foram subdivididas como no Grupo A, porém a irradiação utilizada foi placebo, seguindo o mesmo protocolo de aplicação. Todas as feridas foram fotografadas e medidas diariamente. Dois animais de cada grupo foram sacrificados a partir do terceiro dia, sendo que os outros sacrifícios ocorreram sempre dois dias após o último sacrifício, conseqüentemente o último rato de cada grupo foi sacrificado no 21º dia e recebeu 20 aplicações do laser. Nenhuma diferença clínica e histológica foi observada entre os quatro grupos nos períodos determinados. Concluíram com este estudo que a irradiação do laser de baixa potência não influenciou o processo de cicatrização de feridas.

Garcia, Okamoto e Kina (1996) estudaram por meio de análise histológica, o processo de reparação de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de 15 ratos. Os animais foram divididos em três grupos e realizadas duas feridas cirúrgicas, sendo uma à direita do plano sagital (tratadas com laser) e a outra à esquerda (sem tratamento). Foi utilizado o laser de AsGa, com comprimento de onda de 904 nm, com potência de 2 mW, 108 segundos de exposição em cada ferida e dose de 3 J/cm^2 . Na análise comparativa dos eventos biológicos após os períodos de três, sete e 14 dias, os autores observaram que as feridas do grupo experimental mostraram reparação mais evoluída que as do grupo controle. Houve elevada taxa de migração

epitelial, acentuada proliferação fibroblástica e vascular, evolução mais rápida do quadro agudo para o crônico nos animais tratados. Concluíram que nos períodos de três e sete dias, os eventos biológicos foram mais evidentes e que não houve nenhum sinal de efeitos indesejáveis provenientes de aplicação do raio laser sobre a reparação das feridas.

Freitas et al. (2001) avaliaram a capacidade antiinflamatória do laser diodo infravermelho de 830 nm, 40 mW, $4,8 \text{ J/cm}^2$, no pós-operatório de cirurgias para remoção de terceiros molares retidos, por meio da análise cinética da variação dos níveis da proteína C-reativa (PCR), um marcador que se mostra aumentado em decorrência de inflamação. Foi utilizada uma irradiação com distância focal de 0,5 cm por um tempo total de dois minutos em corrente contínua, em pontos pré-estabelecidos. A população alvo foi de 24 pacientes divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo teste, submetido à laserterapia nas 24 e 48 horas do pós-operatório e grupo controle, submetido a uma falsa irradiação. Foram colhidas amostras de sangue para a dosagem de PCR e após análise concluiu-se que estatisticamente, este estudo não conseguiu comprovar o efeito antiinflamatório do laser após remoção cirúrgica de dentes retidos, embora os resultados tenham mostrado redução nos níveis de PCR nos pacientes irradiados pelo laser levando a atenuação de inflamação, havendo, portanto a necessidade de uma amostra maior a fim de se confirmar o efeito antiinflamatório.

Rezende (2001), em sua dissertação de mestrado, concluiu que o laser de GaAlAs, 830 nm, acelera a resposta biológica do processo de reparação de feridas cutâneas em ratos, após realizar um experimento com 64 animais divididos em quatro grupos e submetidos a 3 J/cm^2 , com 30 mW durante sete segundos; $1,3 \text{ J/cm}^2$, com 60 mW durante 25 segundos; 3 J/cm^2 , com 60 mW durante 56 segundos

e o grupo controle, sem tratamento. O grupo irradiado com menor dose apresentou resultados mais expressivos e significativos dos pontos de vista biométrico e histológico.

Ribeiro et al. (2002) observaram que a polarização utilizada pela terapia à laser de baixa potência é uma regra importante na aceleração da cicatrização nos processos inflamatórios. Verificaram que a utilização do laser Nd:YLF, 1,047 nm permite uma maior preservação de polarização do que o laser He-Ne, 632,8 nm quando aplicado em queimaduras cutâneas. Um grupo de 12 ratos foi utilizado no experimento, sendo três queimaduras (1, 2 e 3) de 6 mm de diâmetro provocadas no dorso dos animais. As lesões 1 e 2 receberam irradiação de 1 J/cm^2 , por dois minutos, sendo que a lesão 1 recebeu a orientação da luz alinhada com a coluna vertebral e a lesão 2 recebeu orientação perpendicular. A lesão 3, considerada controle, não foi irradiada. As feridas foram tratadas nos dias três, sete, dez, 14 e 17 pós-cirurgia. Após cada irradiação, as feridas foram fotografadas, e os diâmetros das lesões foram medidos através de paquímetro para a análise biométrica. Os resultados mostraram que o alinhamento paralelo utilizado nas lesões 1 promoveu um rápido decréscimo no tamanho das feridas e acelerou a cicatrização após o 17º dia quando comparados às lesões 2 e controle.

Pugliese et al. (2003) observaram que o laser de baixa potência contribuiu para uma maior expressão de fibras colágenas e elásticas durante o processo cicatricial de ferimentos cutâneos padronizados no dorso de 72 ratos. Os espécimes foram divididos em três grupos de 24 animais cada. O grupo 1 considerado controle, não recebeu tratamento; nos grupos 2 e 3 utilizou-se laser do tipo GaAlAs, 670 nm, 9 mW de potência e com densidades de energia de 4 J/cm^2 e 8 J/cm^2 respectivamente e aplicação puntual. Em cada grupo, quatro animais foram

sacrificados com 24, 48 e 72 horas e aos cinco, sete e 14 dias. Procedeu-se à análise semiquantitativa de colágeno por meio das lâminas coradas por hematoxilina-eosina, sítius vermelho e orceína, observando-se que nos grupos submetidos ao laser houve além do aumento de colágeno, também maior redução do edema e infiltrado inflamatório.

Chor et al. (2004) relataram um caso de estomatite severa causada por terapia imunossupressora utilizada em paciente com leucemia mielóide crônica. As manifestações bucais incluíam xerostomia, queilite, úlceras com formação de pseudomembranas, além de dores, disfagia e diminuição nutricional, resultando negativamente na qualidade de vida da paciente. A mesma foi submetida ao tratamento com laser de baixa potência, 660 nm, potência de 50 mW. Foram aplicadas doses de 2 J/cm² em dez pontos de cinco regiões distintas: lábios, mucosa jugal, língua (dorso e ventre), mucosa orofaríngea e nos ângulos da boca. A mínima distância entre a ponta emissora e a região irradiada foi de aproximadamente 1 cm. Foram realizadas três aplicações, com intervalos de 48 horas. A paciente, após duas sessões, mostrou significativa redução no edema de mucosa e lábio, havendo melhora inclusive na dicção. Os autores concluíram que a utilização do LLLT é eficaz como terapia no tratamento de lesões bucais provenientes da utilização de terapêutica sistêmica imunossupressora.

Segundo Damante et al. (2004), a documentação científica sobre LLLT é ainda incompleta, havendo a necessidade de se estabelecer um protocolo efetivo para a aplicação em biomodulação. Os autores avaliaram clinicamente os efeitos do laser diodo GaAlAs, 670 nm, na cicatrização de gengivoplastias em 11 pacientes. As cirurgias foram realizadas nas regiões anterior superior e/ou inferior. O lado direito, considerado teste foi irradiado na forma puntual, com 4 J/cm² por ponto, em três

locais diferentes. A aplicação do laser foi feita a cada 48 h, durante uma semana, totalizando quatro sessões. O lado esquerdo, considerado controle não foi irradiado. Através de fotografias nos períodos pós-operatórios de sete, 15, 21, 30 e 60 dias, foi feita a avaliação clínica. A diferença encontrada entre os lados estudados não foi significativa.

Demir et al. (2004) investigaram e compararam os efeitos do ultrassom e do laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas lineares de 6 cm de comprimento e 2 cm de profundidade provocadas no dorso de 120 ratos. Após as incisões serem realizadas, as mesmas foram suturadas. Foram utilizados: o aparelho ultrassom Sonoplus 463, intensidade de $0,5 \text{ W/cm}^2$, por cinco minutos durante dez dias; e o laser GaAs, 904 nm, 6 mW de potência, dose de 1 J/cm^2 , por dez minutos e durante dez dias. Os espécimes foram divididos em quatro grupos: Grupo I, tratamento com ultrassom; Grupo II, procedimento semelhante ao tratamento de ultra-som era aplicado sem corrente (método imitado); Grupo III, tratamento com laser e Grupo IV, procedimento semelhante ao tratamento de laser era aplicado sem corrente (método imitado). Dez ratos de cada grupo foram sacrificados nos dias quatro, dez e 25, sendo realizada a remoção de peças para avaliação histológica. As amostras do 25º dia foram avaliadas por meio de tensiômetro. A duração da fase inflamatória foi diminuída em ambos os tratamentos quando comparada as seus respectivos grupos controles; porém o grupo que recebeu o laser apresentou uma resposta mais efetiva. Quanto à análise histológica em ambos os tratamentos observaram-se aumento de fibroblastos e colágeno e novamente o grupo que recebeu tratamento com laser apresentou uma resposta mais eficaz. A força para rompimento da ferida foi significativamente maior com ambos os tratamentos, que não diferiram entre si. Os autores concluíram que os dois

tratamentos podem ser benéficos quando utilizados em úlceras de decúbito e úlceras crônicas, entretanto o tratamento com laser mostrou-se mais efetivo do que o tratamento com ultrassom.

Hopkins et al. (2004) utilizaram o laser diodo, 820 nm, com o intuito de se comprovar os efeitos benéficos na cicatrização de tecidos e alívio de dor. Duas lesões circulares padronizadas de 1,27 cm², uma ao lado da outra, foram provocadas por meio de discos abrasivos nos antebraços de 22 indivíduos, com mesma idade e sexo. Os indivíduos foram divididos em dois grupos de onze cada. O grupo A, recebeu na ferida direita, doses de 8 J/cm² por dois minutos, durante dez dias, enquanto que a ferida esquerda não foi irradiada, servindo como controle. O grupo B foi submetido ao mesmo protocolo de aplicação do grupo A, porém com uma falsa irradiação. Todas as lesões foram fotografadas durante os dez dias e no vigésimo dia, sob as mesmas condições (distância, luz, posição), para posterior medição de perímetro por meio de *software*. Diariamente os indivíduos respondiam a um questionário a fim de permitir avaliar o nível de dor. Os autores concluíram ao fim do experimento que a terapêutica com laser acelerou a contração das feridas. Mesmo as feridas-controle dos indivíduos que receberam o tratamento com o laser, apresentaram contração maior que as dos indivíduos que receberam falsa irradiação, mostrando, portanto, o efeito sistêmico da LLLT. Quanto à eficácia do laser no alívio de dor, acredita-se que este estudo poderia ser um primeiro passo para formulações mais significativas, havendo a necessidade de maiores investigações.

Mendez et al. (2004) compararam histologicamente o efeito dos lasers de GaAIs, 830 nm e InGaAIP, 685 nm em experimento com sessenta ratos, nos quais foram produzidas feridas padronizadas em seus dorsos. Os animais foram divididos

em sete grupos: GI=controle, não recebeu irradiação; GII=685 nm e 20 J/cm²; GIII=830 nm e 20 J/cm²; GIV=685 nm e 830 nm com 20 J/cm²; GV=685 nm e 50 J/cm²; GVI=830 nm e 50 J/cm²; GVII=685 nm e 830 nm com 50 J/cm². Os animais receberam irradiação durante sete dias, com intervalo de 48 horas. Dois animais do grupo controle e três de cada grupo irradiado foram sacrificados nos dias três, cinco e sete após a cirurgia. Ao fim do experimento todos os grupos irradiados mostraram aumento de colágeno quando comparados ao grupo controle, porém o grupo IV apresentou melhores resultados.

Nascimento et al. (2004) estudaram o efeito de diferentes comprimentos de onda e intensidades utilizadas em laserterapia por sete dias consecutivos na cicatrização de feridas cutâneas sob o aspecto histológico. Foram usados lasers diodo com comprimento de onda de 670 nm e 685 nm. Trinta ratos adultos foram utilizados no experimento, submetidos à realização de uma ferida padronizada de 8 mm de diâmetro no dorso. Os animais foram divididos em dois grupos de quinze: G1=670 nm e G2=675 nm. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos, com cinco animais cada. Para cada cinco animais, três tiveram suas feridas irradiadas com doses de 10 J/cm² e variações de intensidade de dois, 15 e 25 mW. Os outros dois animais de cada subgrupo não foram submetidos à laserterapia. Após o sacrifício dos animais, oito dias após a cirurgia, foram colhidas amostras para análise histológica. Foram avaliados edema, hiperemia, infiltrado inflamatório, presença e distribuição de fibroblastos como parâmetros qualitativos. Os resultados mostraram que as feridas cirúrgicas que não foram irradiadas seguiram o padrão de cicatrização esperado. Entretanto, quando se utilizou o laser, o reparo foi mais acelerado. Concluiu-se que o tratamento com o laser de baixa potência produz biomodulação

positiva e é mais efetivo quando combina alta intensidade com menor comprimento de onda ou baixa intensidade com maior comprimento de onda.

Ribeiro et al. (2004) produziram três queimaduras circulares de 6 mm de diâmetro no dorso de vinte ratos. Foi utilizado o laser de He-Ne, 632,8 nm, densidade de potência de 10 mW e dose de 1 J/cm². Cada queimadura recebeu um tratamento diferenciado: a lesão L(//) foi irradiada utilizando a emissão paralela com a coluna vertebral do rato; a lesão L(⊥) foi irradiada usando o mesmo laser e dose, mas com a luz alinhada perpendicularmente à ferida; a lesão C não foi irradiada sendo, portanto a lesão controle. Quatro animais por grupo foram irradiados e sacrificados nos dias três, sete, dez, 14 e 17 após a criação da ferida. Áreas da pele contendo as feridas foram coletadas para análise histológica. Observou-se por meio de avaliação semiquantitativa que a irradiação laser produziu efeitos competentes para proliferação e migração de células epiteliais nos grupos L(//) e L(⊥), exibindo uma completa e renovada camada epitelial, enquanto que o grupo controle não apresentou reepitelização no mesmo período. O aumento significativo na espessura da camada epitelial, quantidade de vasos sanguíneos e maior organização de fibras colágenas observadas mais evidentemente nas lesões que receberam a emissão da irradiação paralela indicaram que a reparação da ferida foi dependente da orientação da luz, particularmente na formação de tecido conjuntivo.

Silva et al. (2004) estudaram a utilização de drogas fotossensibilizantes associadas à terapia a laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas cutâneas circulares de 8 mm de diâmetro provocadas no dorso de ratos. Foi avaliado o efeito do laser de baixa intensidade InGaAlP diodo, 685 nm, 35 mW de densidade de potência, dose de 2,5 J/cm² tanto sozinho quanto combinado com dois agentes tópicos utilizados em terapia fotodinâmica, cloro-alumínio ftalocianina-PS e um gel

base (23% w/w de Poloxamer 407 com Polietilenoglicol 400, pH=7.4), uma vez ao dia, por sete dias consecutivos. Sessenta ratos foram divididos em seis grupos: controle (CG) sem tratamento; gel base (GB); fotossensibilizados (PS); laser (LG); laser + fotossensibilizante (LPS); laser + fotossensibilizante + gel base (LPSG). Após o oitavo dia os animais foram sacrificados e amostras dos tecidos da área das feridas foram removidas e processadas para análise histológica. Foi avaliada a organização da derme e epiderme, assim como a deposição do colágeno. Os resultados indicaram claramente os efeitos da associação da luz com os fotossensibilizantes na cicatrização de tecidos. Os animais dos grupos LG, PS, LPS e LPSG apresentaram densidade de colágeno maior e reepitelização aumentada quando comparados com os dos grupos CG e GB. A remodelação do tecido conjuntivo foi mais evidente nos grupos LPS e LPSG.

Quadri et al. (2005) realizaram um estudo utilizando 17 pacientes com doença periodontal moderada, que receberam tratamento por meio de raspagem radicular e instruções sobre higiene bucal. Foram colhidos amostras de fluido crevicular subgingival e biofilme dental antes do início do tratamento. Uma semana depois do tratamento, as áreas gengivais correspondentes aos dentes 13, 14, 15, 16 e 17 submetidas ao tratamento periodontal foram irradiadas por laser diodo InGaAlP, 635 nm e GaAlAs, 830 nm, uma vez por semana durante seis semanas. As áreas gengivais correspondentes aos dentes 23, 24, 25, 26 e 27 consideradas controle receberam irradiação placebo. As áreas gengivais vestibulares nas regiões de papilas, de cada dente receberam irradiação de 635 nm, dose de $4,5 \text{ J/cm}^2$ durante 90 segundos. As regiões apicais de cada dente receberam laser de 830 nm, dose de $8,75 \text{ J/cm}^2$ por 25 segundos nas regiões vestibular e lingual. Uma semana após a última irradiação, amostras do fluido crevicular e biofilme foram colhidos para análise

laboratorial de atividade de elastase, interleucina 1 β e metaloproteinase, indicadores de anticorpos, e identificação de microbiota subgengival. As variáveis clínicas como profundidade de bolsa e índices do biofilme foram reduzidos no lado que recebeu laser. O decréscimo de volume do fluido crevicular também foi maior no lado irradiado. Concluíram que o tratamento adicional com os lasers de baixa potência reduziu a inflamação gengival, porém a análise dos indicadores de anticorpos e microbiológica não demonstrou diferenças significantes entre o lado que recebeu laser e o lado que recebeu placebo.

2.2.2 Estudos *in vitro*

Pourreau-Schneider et al. (1989) estudaram fibroblastos humanos em estágios iniciais de culturas celulares de amostras obtidas por meio de biópsias do tecido gengival na região retromolar, após extração do terceiro molar de paciente jovem. Submeteram ao tratamento com laser de He-Ne, 632,8 nm de comprimento de onda, 10 mW de potência, aplicado por dez minutos com dose de 1,2 J/cm². As amostras foram divididas em quatro grupos: controle, que não sofreu nenhum tratamento a laser e três grupos experimentais, sendo que estes sofreram uma, duas ou três exposições ao raio laser. O efeito de biomodulação do tratamento laser no crescimento dos fibroblastos após um único tratamento foi transitório; porém quando estas células receberam duas exposições houve estimulação adicional no crescimento dos fibroblastos, que se mostraram maiores após três exposições. No final do experimento, que durou 14 dias, as células tratadas com laser mostraram significativa multiplicação, aproximadamente duas vezes mais numerosas do que as que receberam uma só aplicação.

Van Breugel e Bär (1992) estudaram culturas de fibroblastos humanos, sob irradiação de He-Ne, 632,8 nm, utilizando doses de energia variadas e tempos de exposição distintos. Por três dias consecutivos as células foram irradiadas por um período entre 30 segundos e dez minutos, com potência variando de 0,55 a 5,98 mW. O número de células e a produção de colágeno tipo I foram observados para cada irradiação descrita pelo experimento. Potências abaixo de 2,91 mW aumentaram a proliferação celular e as mais altas não produziram efeito biomodulador. Os efeitos biomoduladores foram pronunciados quando utilizaram tempos entre 30 segundos e dois minutos. A produção de colágeno tipo I, determinado pelo teste ELISA, deu-se de maneira inversa se comparada com a proliferação celular. Concluiu-se que a densidade de potência e o tempo de exposição à luz determinam os efeitos da irradiação.

Almeida-Lopes (1999) em sua dissertação de mestrado analisou *in vitro* o efeito de lasers de baixa potência na proliferação de fibroblastos de gengiva humana simulando uma condição de normalidade (meio de cultivo contendo 10% de soro fetal bovino), outra de estresse celular, com *déficit* nutricional parcial (meio de cultivo contendo 5% de soro fetal bovino) e uma terceira com *déficit* nutricional total (meio de cultivo sem soro fetal bovino). Um primeiro experimento as placas de Petri foram divididas em nove grupos: três controles (sem irradiação), três irradiados com diodo laser operando em 670 nm e potência de 10 mW (L1) e três com diodo laser operando em 780 nm e potência de 50 mW (L2). Em outro experimento as placas foram divididas em nove grupos: três controles (sem irradiação), três irradiados com diodo laser operando em 692 nm e potência de 30 mW (L3) e três com diodo laser operando em 786 nm e potência de 30 mW (L4). Foram feitas quatro irradiações, a cada 12 horas, com a mesma fluência para L1, L2, L3 e L4 que foi de 2 J/cm². A

autora concluiu que, a dose administrada acelerou o crescimento de fibroblastos que estavam em *déficit* nutricional parcial em todos os grupos estudados. Para irradiações de células em cultivo com parâmetros idênticos, a proliferação celular foi evidenciada tanto para o comprimento de onda no visível (670 nm e 692 nm) como no infravermelho próximo (780 nm e 786 nm), porém sendo mais efetiva para o primeiro caso.

Kreisler et al. (2003), utilizando cultura de fibroblastos obtidos de ligamento periodontal de terceiros molares humanos extraídos, avaliaram o potencial de estimulação do laser de baixa potência, GaAlAs, 803 nm e 10 mW/cm². Foram aplicadas doses de 1,96 J/cm², 3,92 J/cm² e 7,84 J/cm² para tempos de irradiação de 75, 150 e 300 segundos respectivamente, por três vezes em intervalo de 24 horas. Um grupo controle, que não recebeu irradiação, foi utilizado para comparação. O índice de proliferação celular dos grupos irradiados e controle foi medido por meio de observação da atividade de redução-oxidação nas culturas celulares, expressadas por unidades relativas de fluorescência (RFU) após 24, 48 e 72 horas à irradiação. O efeito da aplicação do laser nas culturas celulares irradiadas foi claramente discernível, consideravelmente superior à cultura controle. Para todos os regimes de irradiação, a atividade celular foi maior que a do grupo controle, porém a diferença foi significativa após 72 horas à irradiação.

Schindl et al. (2003) avaliaram a influência do laser de baixa potência na estimulação de células endoteliais. Foram isoladas células endoteliais da veia umbilical humana e após cultura, irradiadas durante seis dias com laser diodo de 670 nm de comprimento de onda. Em um primeiro experimento foi utilizada intensidade constante de 20 mW/cm² para doses de dois, quatro e 8 J/cm². Um outro experimento foi conduzido comparando intensidades de dez, 20 e 65 mW/cm² com

dose de 8 J/cm². Constatou-se que doses de 8 J/cm² e intensidades de 20 e 65 mW/cm² induziram a uma maior proliferação celular. Diferenças significantes na proliferação celular foram observadas quando comparados quaisquer os grupos irradiados com o grupo controle.

Karu e Kolyakov (2005) estudaram *in vitro* as respostas biológicas de células HeLa após serem irradiadas com laser de baixa potência com comprimentos de onda compreendidos entre 580 a 860 nm, com o intuito de determinarem o exato espectro de ação necessário para estimularem os fotorreceptores envolvidos no mecanismo celular de fotobiomodulação, por meio da análise da síntese de DNA e RNA. Para a luz visível foram encontrados picos de absorção entre 613,5 e 623,5 nm e 667,5 e 683,7 nm. Para infravermelho não visível os picos de absorção estão compreendidos entre 750,7 e 772,3 nm e 812,5 e 846,0 nm.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, foi propósito do presente trabalho analisar biométrica e histomorfometricamente os efeitos da terapia a laser de baixa potência sob diferentes protocolos, no processo de reparação de feridas cutâneas em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo, foram empregados quarenta ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos, com peso variando entre 160 e 220 g, com dois meses de idade. Esses animais procederam do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal / UFJF, sob o protocolo 032/2005 (ANEXO A).

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, tratados com ração granulada comercial e água *ad libitum* antes e durante todo o experimento.

4.2 Grupos

Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos de dez animais cada conforme descrição abaixo:

Grupo 1 (G1): considerado controle, não foi submetido a nenhum tratamento.

Grupo 2 (G2): as lesões foram submetidas à aplicação do laser, imediatamente após o ato cirúrgico.

Grupo 3 (G3): as lesões foram submetidas à aplicação do laser conforme G2 e 48 h após o ato cirúrgico.

Grupo 4 (G4): as lesões foram submetidas à aplicação do laser conforme G3 e sete dias após o ato cirúrgico.

Para as aplicações do laser após 48 h e sete dias, os animais foram novamente anestesiados.

A Figura 2 ilustra a divisão dos grupos experimentais.

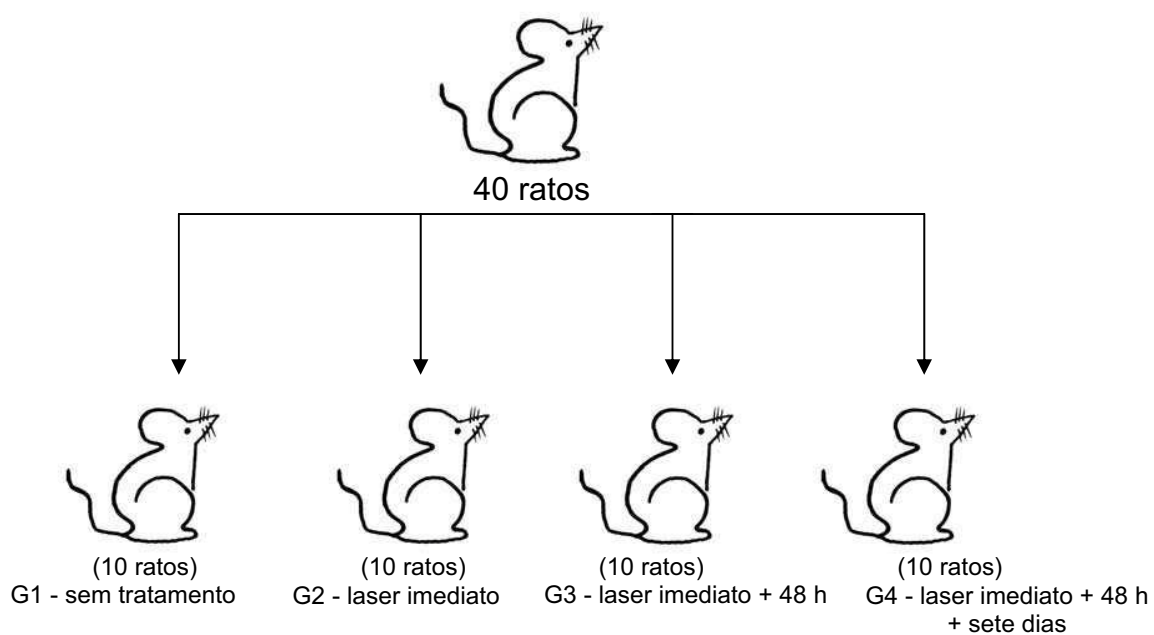


Figura 2 - Divisão dos grupos experimentais

4.3 Aparelho laser

Foi utilizado um aparelho laser de diodo de baixa potência (Twin Laser - Empresa MM Optics - São Carlos – SP), conforme Figuras 3 e 4, com as seguintes características:

- Laser de emissão infravermelho (IR) contínua;
- Semicondutores: Arsênio e Gálio;
- Comprimento de onda: 780 nm;
- Potência de Pico: 70 mW;
- Forma de aplicação: fibra óptica;
- Área da ponta emissora: 4 mm².



Figura 3 - Fonte e painel de controle do sistema laser utilizado

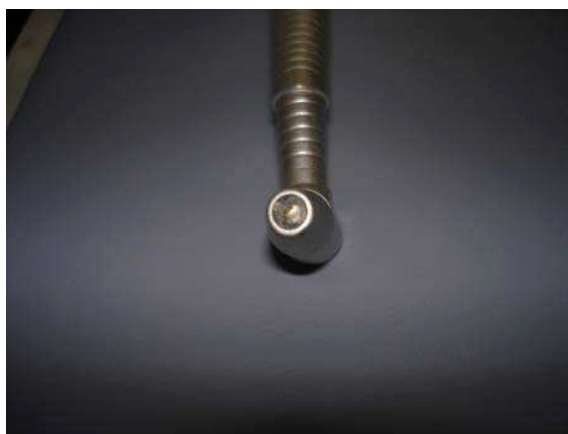


Figura 4 - Ponta ativa do laser

4.4 Procedimentos cirúrgicos

Após anestesia dos animais com cloridrato de xilasina (ROMPUM® - Bayer S.A. São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina (VETANARCOL® - König S.A. Avellaneda, Argentina), na proporção de 2:1 e 0,1 ml da mistura para cada 100 g de peso animal, via intramuscular, foi realizada antissepsia da região dorsal e tricotomia. Com auxílio de um *punch* de 8 mm de diâmetro (Figura 5), foi realizada a remoção de um fragmento circular de pele, no centro do plano sagital mediano (Figuras 6 e 7). As feridas incluíram as camadas da epiderme e da derme até atingir a fáscia muscular do animal.



Figura 5 - Instrumental utilizado para realização da lesão



Figura 6 - Remoção do fragmento circular de pele do dorso de rato



Figura 7 - Lesão provocada no dorso de rato com auxílio de *punch* de 8mm

4.5 Aplicação do laser

As lesões foram submetidas à aplicação do laser com contato entre a ponta ativa e a ferida (Figura 8), em oito localizações diferentes, da periferia da lesão e num ponto central em forma de varredura o que permitiu que toda a ferida recebesse tratamento uniforme, de acordo com Garcia (1992), conforme Figura 9. O tempo de exposição por ponto de aplicação foi de três segundos, totalizando 27 segundos de exposição por ferida. Foi utilizada a dose de energia por ponto de $3,8 \text{ J/cm}^2$ e potência de 15 mW (OLIVEIRA; SOTTO-MAIOR; FERNANDES, 2005).

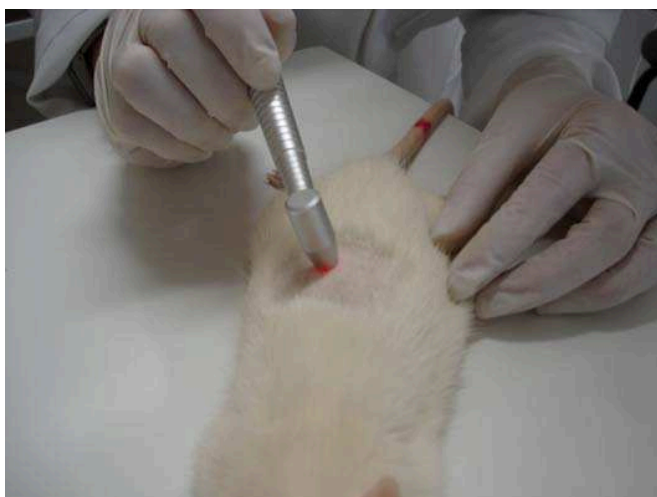


Figura 8 - Aplicação puntual do laser

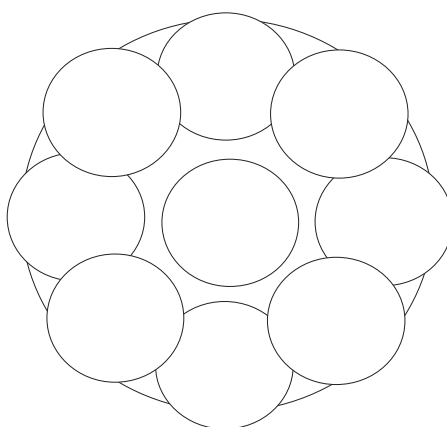


Figura 9 - Representação esquemática da aplicação puntual do laser na ferida

4.6 Análise biométrica

Todas as feridas cirúrgicas foram avaliadas clinicamente e documentadas por meio de fotografias digitais padronizadas, utilizando câmera fotográfica digital (DSC-W1 Cyber-shot 5.1 SONY) acoplada em estativa (suporte para fixação da câmera fotográfica que permite o posicionamento na distância do foco a uma altura pré-fixada), conforme Figura 10, executadas imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico, 48 h, sete dias e no décimo dia (sacrifício). A área das

feridas foi avaliada utilizando o programa ImageJ (Figura 11), programa de domínio público.



Figura 10 - Estativa utilizada para padronização das tomadas fotográficas

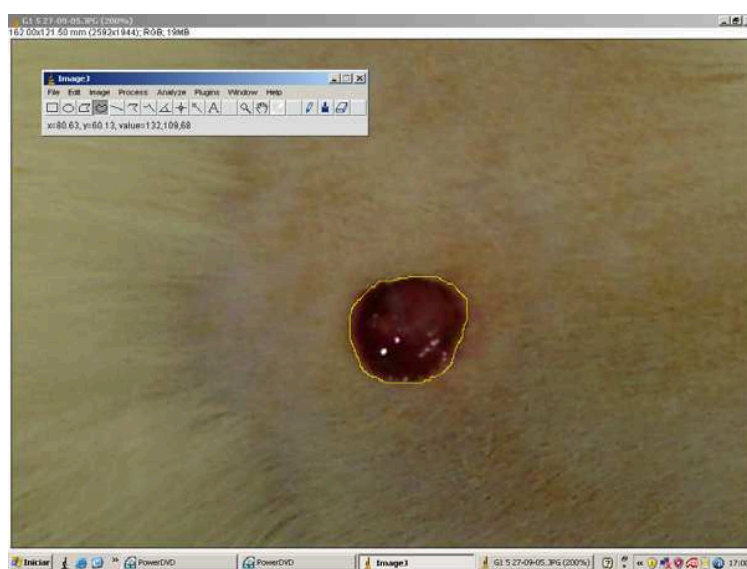


Figura 11 - Tela do programa ImageJ mostrando delimitação da área da ferida

As áreas das feridas foram medidas em quatro diferentes tempos: zero hora (T1), 48 horas (T2), sete dias (T3) e dez dias (T4). As medidas foram realizadas três vezes em momentos distintos e para a análise estatística utilizada a média. A análise do coeficiente de variação das três medidas repetidas foi realizada para avaliação da calibração intra-examinador. Todas as medidas foram realizadas por um único examinador que desconheceu o grupo ao qual pertenciam os espécimes.

A evolução das áreas das feridas foi analisada de duas formas. A primeira análise da redução percentual do tamanho das feridas foi obtida através do cálculo da diferença entre o tamanho das feridas em cada um dos tempos (T2, T3 e T4), sempre em relação ao tempo inicial T1 (REZENDE, 2001) conforme a fórmula a seguir:

$$\text{Redução percentual da área da ferida (\%)} = \frac{(\text{Área final} - \text{Área inicial}) \times 100}{\text{Área inicial}}$$

A segunda análise comparou a redução percentual dos tamanhos das feridas com relação ao instante imediatamente anterior (T2-T1, T3-T2 e T4-T3).

Os dados obtidos nas médias percentuais das áreas das feridas foram submetidos à estatística descritiva e inferencial (análise de variância – ANOVA) e utilizado o teste Dunnett, para comparações múltiplas.

O nível de significância (p) adotado foi o valor de 5% para todos os testes.

4.7 Obtenção das amostras

Decorridos dez dias, a contar do ato cirúrgico, os animais foram sacrificados por dose excessiva de anestésico.

As peças foram colhidas cuidadosamente, com uso de tesoura, de maneira a incluir parte da pele adjacente às bordas da ferida e de todo o tecido cicatricial na sua profundidade.

Todas as peças obtidas foram fixadas em formalina 10% por 24 horas no mínimo. A seguir, os espécimes foram hemisseccionados no sentido crânio-caudal e incluídos em parafina para realização na porção central de cortes transversais seriados com cinco micrometros de espessura. Os cortes receberam a coloração pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) para avaliação sob microscopia de luz.

A etapa de inclusão e corte dos blocos, montagem das lâminas e coloração foi realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais.

4.8 Análise histomorfológica e histomorfométrica

A análise histomorfológica e histomorfométrica foi realizada por um único examinador que desconheceu o grupo ao qual pertenciam os espécimes.

Foi realizada a leitura das lâminas no Centro de Biologia de Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora, para se avaliar individualmente as características histomorfológicas observadas no tecido epitelial e tecido conjuntivo, com aumento de 10x.

As imagens histológicas dos cortes corados com HE foram digitalizadas e avaliadas por sistema computadorizado de captura de imagens Axion Vision (Zeiss, Berhlim, Germany). Foi realizada captura de imagens com câmera digital, obtida pelas objetivas de 5x, 10x e 40x do microscópio modelo AXIOSTAR PLUS (Zeiss,

Berhlim, Germany). As imagens em 40x foram arquivadas e submetidas à análise histomorfométrica para contagem de vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e células inflamatórias.

Para cada animal foram confeccionadas duas lâminas, sendo uma de cada bloco, com três seções semi-seriadas de 5 μm , totalizando seis áreas de estudo para cada espécime. Para a quantificação das estruturas presentes no tecido conjuntivo, foram determinados campos de contagem na porção central da lesão, à distância de 600 μm de profundidade em relação à superfície do epitélio e padronizado para todas as amostras (Figura 12) em aumento de 40x. Cada campo apresentou uma região digitalizada de 1300 *pixels* (menor parte de uma imagem digitalizada) no sentido horizontal (paralelo à superfície do epitélio) por 1030 *pixels* no vertical correspondente a uma área de 215 μm de largura por 171 μm de altura (KATHER, 2004). Através do programa Axion Vision (Zeiss, Berhlim, Germany) foi realizada a contagem dos vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e células inflamatórias.

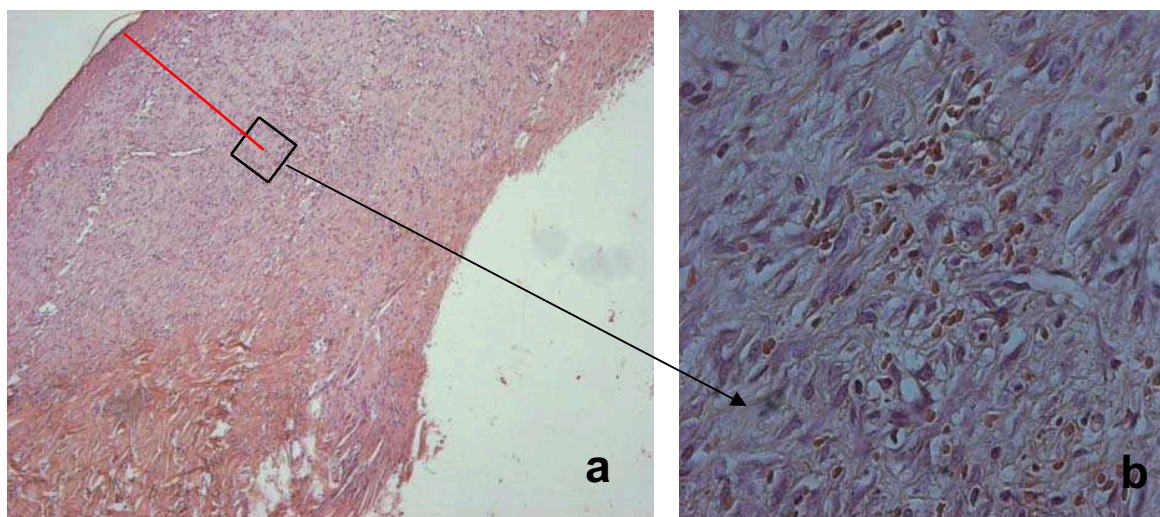


Figura 12 - Aspecto histológico do tecido epitelial e conjuntivo em HE demonstrando a área selecionada – a) aumento original de 50x; b) aumento original de 400x mostrando tecido conjuntivo

A formação de novos vasos sangüíneos a partir de brotamentos de uma árvore vascular preexistente e que participa em diversos processos fisiológicos e patológicos, cuja importância estaria em servir como fonte de nutrientes e oxigênio, além de meio de condução de células fibroblásticas, contribuindo para o processo cicatricial (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Os fibroblastos, células do tecido conjuntivo responsáveis na síntese de componentes da matriz extracelular, que é uma rede complexa de macromoléculas secretadas (colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas), têm um papel central no controle dos processos celulares básicos, como proliferação, diferenciação, migração e interações celulares. Apresentam citoplasma ramificado e rodeado de um núcleo elíptico claro, grande e de forma ovóide contendo um ou dois nucléolos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Os macrófagos, células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, fagocitam elementos estranhos ao corpo e que os diferenciam quanto à sua morfologia, que é variável conforme o estado funcional e a localização. Os macrófagos fixos são fusiformes ou estrelados, têm núcleos ovóides com cromatina condensada. No tecido conjuntivo frouxo são tão numerosos quanto os fibroblastos, com os quais podem ser confundidos. Os macrófagos móveis apresentam forma irregular devido à presença de pseudópodos, núcleo com cromatina condensada e em forma de rim. Os plasmócitos, pouco numerosos no conjuntivo normal, presentes nas áreas onde existe inflamação crônica, são células ovóides, com citoplasma basófilo e núcleo esférico com cromatina em grumos compactos, que não se localiza no centro da célula, mas em posição excêntrica. Os linfócitos, células pequenas apresentando núcleo esférico, com cromatina muito condensada, citoplasma basófilo

e escasso, reduzindo-se a uma camada delgada em torno do núcleo, são freqüentes nas áreas de inflamação crônica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Por meio do contador manual foi contado célula por célula, de forma que ao ser clicado o botão do *mouse* sobre cada estrutura celular, ao final da contagem o programa fornecia o número correspondente ao total celular da área selecionada (Figura 13).

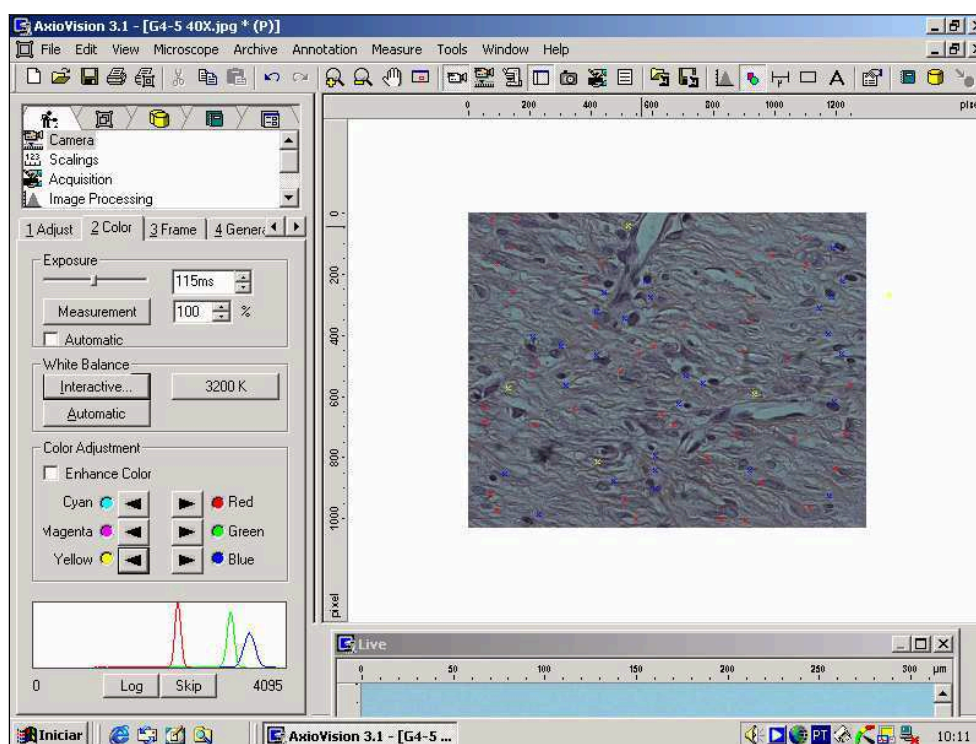


Figura 13 - Tela do programa Axion Vision mostrando a quantificação dos componentes da imagem digitalizada, onde cada ponto azul, vermelho ou amarelo corresponde a uma estrutura celular

As estruturas celulares foram contadas por um único examinador calibrado. Para a análise estatística foi utilizada a média dos valores obtidos nas contagens das seis lâminas por animal. Os dados obtidos na quantificação dos vasos sangüíneos neoformados, fibroblastos e células inflamatórias foram submetidos ao

teste não paramétrico de Kruskal-Wallis indicado para trabalhos de contagem com pouca variação e número de amostras pequeno por grupo ($n=7$). Foi utilizado o teste Mann-Whitney U não paramétrico equivalente ao teste t , pois neste caso não existe o teste *pos hoc*, ou seja, a comparação entre os grupos dois a dois. O grupo controle foi selecionado como base. O nível de significância (p) adotado foi o valor de 5% para todos os testes.

O esquema da metodologia envolvida está representado no fluxograma conforme Figura 14.

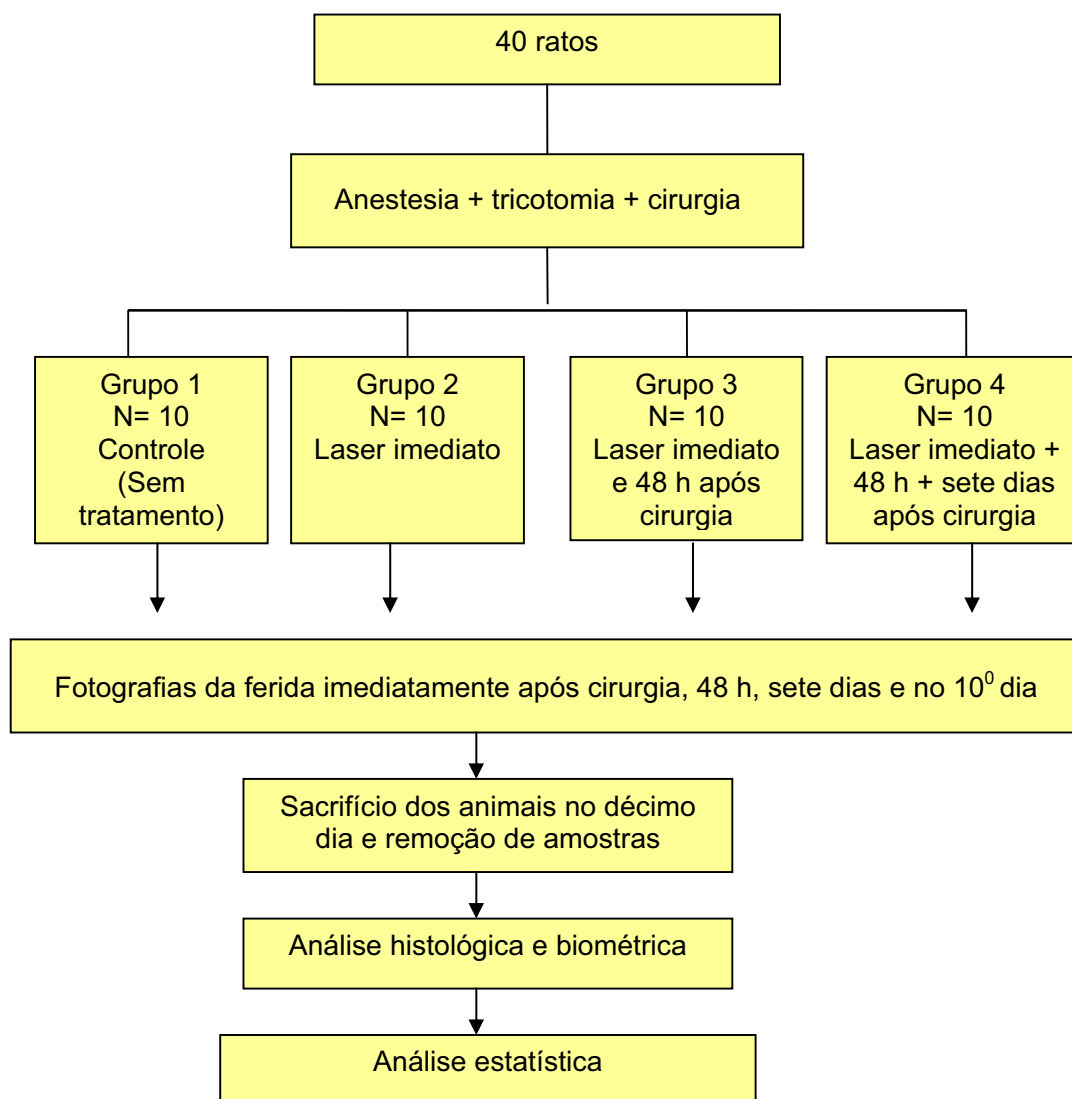


Figura 14 - Fluxograma com os principais passos desenvolvidos

5 RESULTADOS

5.1 Descrição clínica das feridas

Foram realizadas observações clínicas no dia da cirurgia (zero hora), após 48 horas, no sétimo e décimo dias para verificar sinais de sangramento, infecção, formação e perda de crosta e formação epitelial (GARCIA, 1992).

Zero Hora – T1

Foi observada em todas as feridas cirúrgicas, imediatamente após suas realizações que houve integridade do tecido de seus bordos em todas as suas extensões (Figuras 15a, 16a, 17a e 18a) e presença de coágulo ocupando o espaço entre as margens da lesão.

Em decorrência da espessura da pele dos animais, da quantidade de tecido conjuntivo e relativa mobilidade do tecido seccionado, observamos que algumas feridas apresentaram-se maiores em relação ao tamanho proposto, mesmo tomando-se os cuidados quanto à padronização do tamanho das feridas provocadas.

48 HORAS - T2

Após 48 horas à realização das feridas, as lesões do grupo controle (G1) estavam recobertas por uma crosta de espessura fina, envolvendo toda a extensão

do bordo e de sua porção central, muitas vezes com halo eritematoso (Figura 15b). Não observamos descolamento da crosta em nenhuma ferida do grupo controle.

Todas as feridas dos grupos irradiados apresentaram bordos e as porções centrais bem mais secos se comparadas com as do grupo controle. Em alguns animais, foi observado um início de descolamento das crostas na área dos bordos. Não foram observados sinais de vermelhidão nos bordos das feridas destes grupos (Figuras 16b, 17b e 18b).

Sete dias –T3

Foram observadas nas feridas do grupo controle (G1) crostas secas, com descolamento a partir da porção epitelizada. Em algumas feridas ainda foi possível identificar presença de áreas avermelhadas ao redor dos bordos (Figura 15c).

Nas feridas do grupo G2, G3 e G4 observou-se que algumas perderam suas crostas e que o tecido ao redor dos bordos apresentava-se delgado e seco. As crostas de algumas feridas eram bem delgadas e com grande descolamento evidenciando epitelização (Figura 16c, 17c e 18c).

Dez dias – T4

Nas feridas do grupo controle observamos reparação parcial das mesmas, mostrando-se, porém algumas lesões bem fechadas e notamos uma linha esbranquiçada com bordos fracamente elevados e evidenciando cicatrizes das feridas (Figura 15d).

As feridas dos grupos irradiados apresentavam-se semelhantes quando comparadas entre si neste estágio do experimento, mostrando suas áreas completamente reparadas em quase todas as feridas, evidentes com bordos esbranquiçados (Figuras 16d, 17d e 18d).

Durante o experimento, não foi observado nas feridas de nenhum dos grupos sinais clínicos de infecção ou áreas de necrose.

As fotografias de feridas provocadas no dorso de ratos são mostradas a seguir:

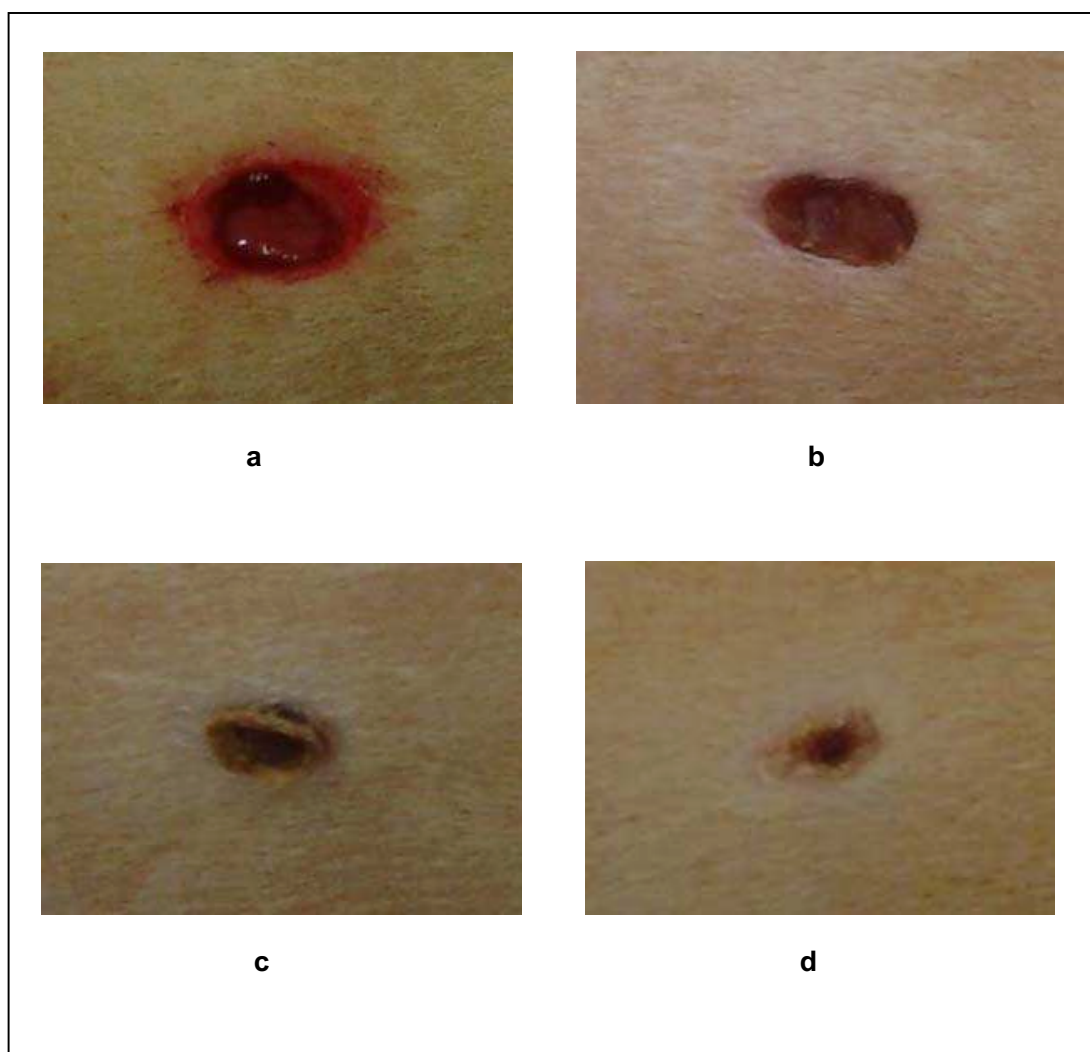


Figura 15 - Grupo controle G1 – a) ferida aberta após sua execução; b) crosta de espessura fina 48 h após cirurgia; c) crosta seca com evidências de descolamento aos sete dias após cirurgia; d) reparação parcial com bordos esbranquiçados aos dez dias após cirurgia

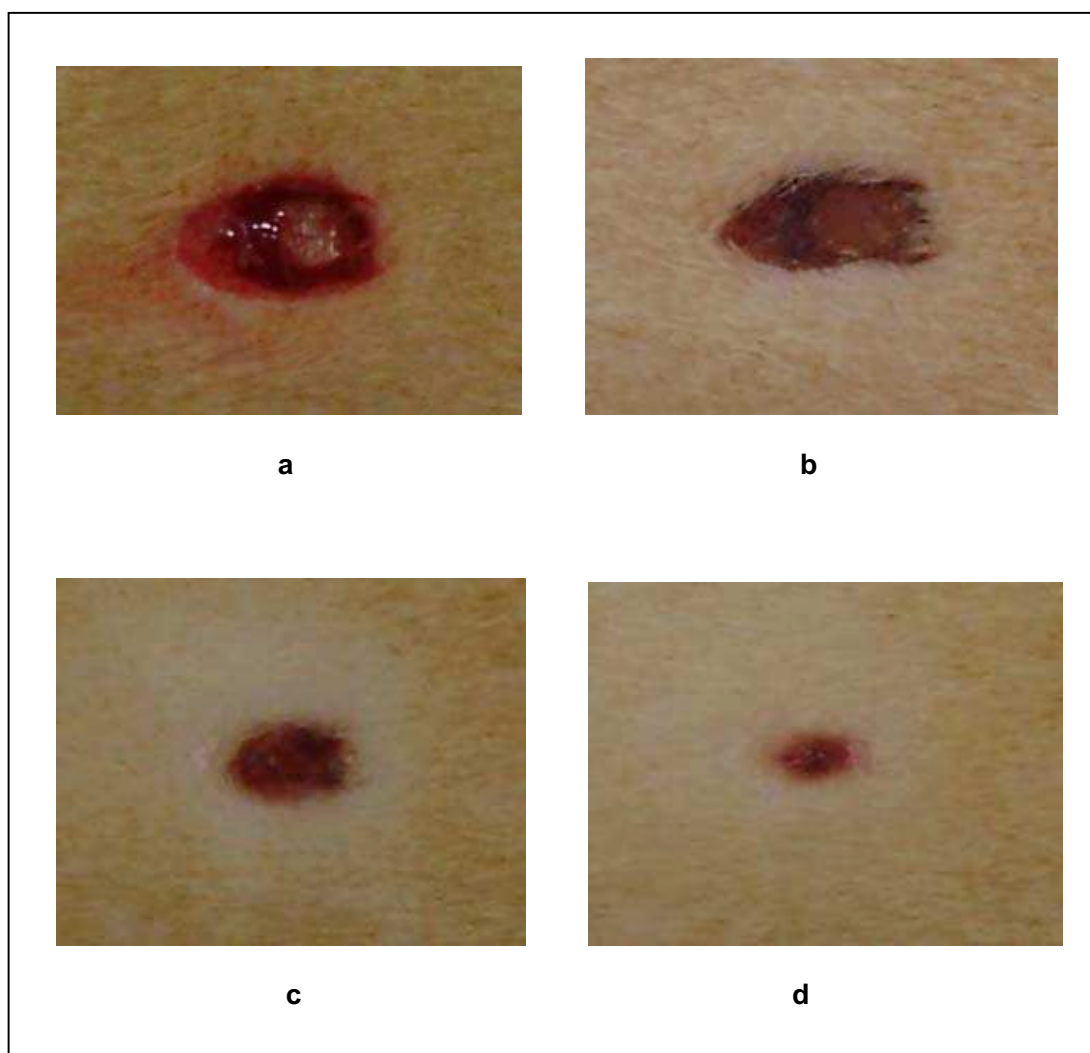


Figura 16 - Grupo G2 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) ausência de crosta com epitelização nos bordos aos sete dias após cirurgia; d) elevada contração da ferida aos dez dias após cirurgia

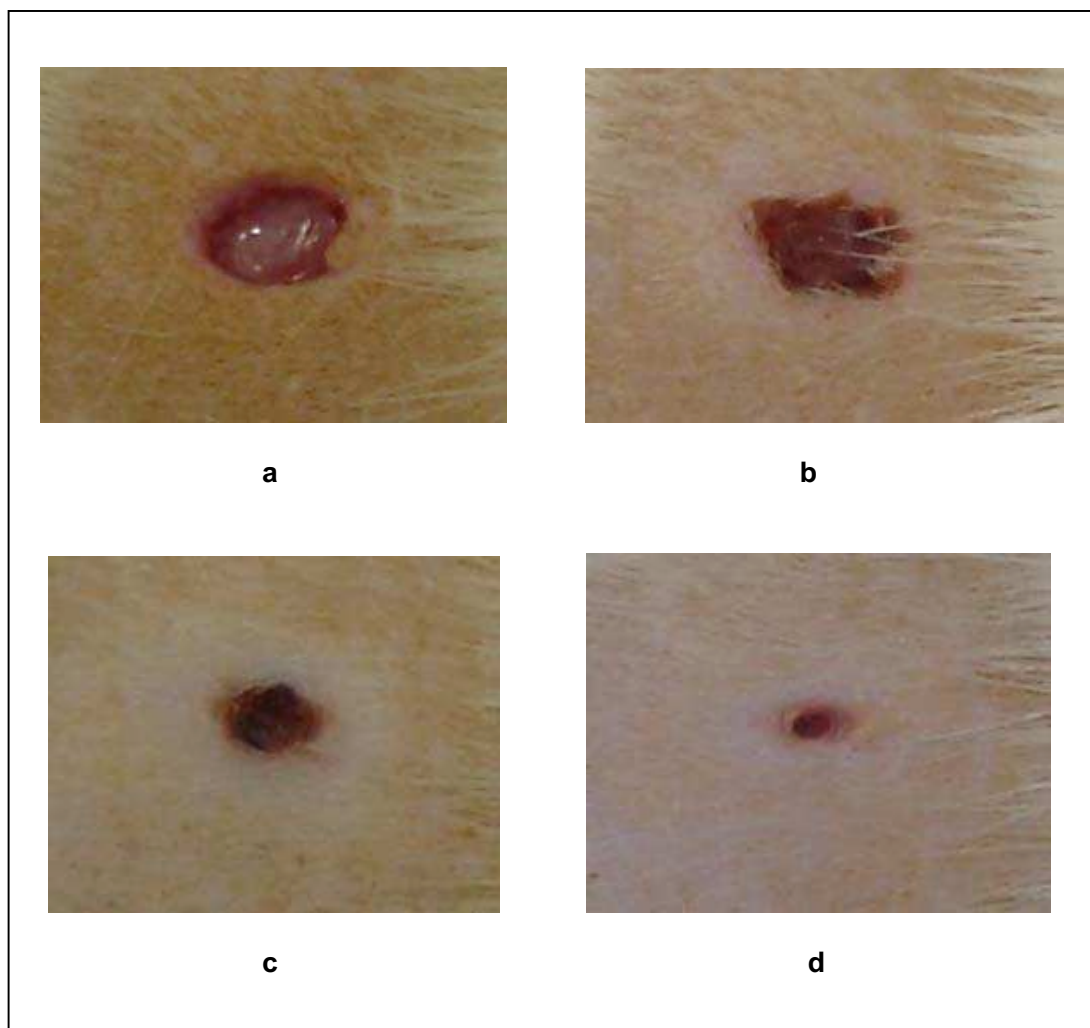


Figura 17 - Grupo G3 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) elevada contração da ferida com bordos delgados e secos aos sete dias após cirurgia; d) nítida contração da ferida aos dez dias após cirurgia

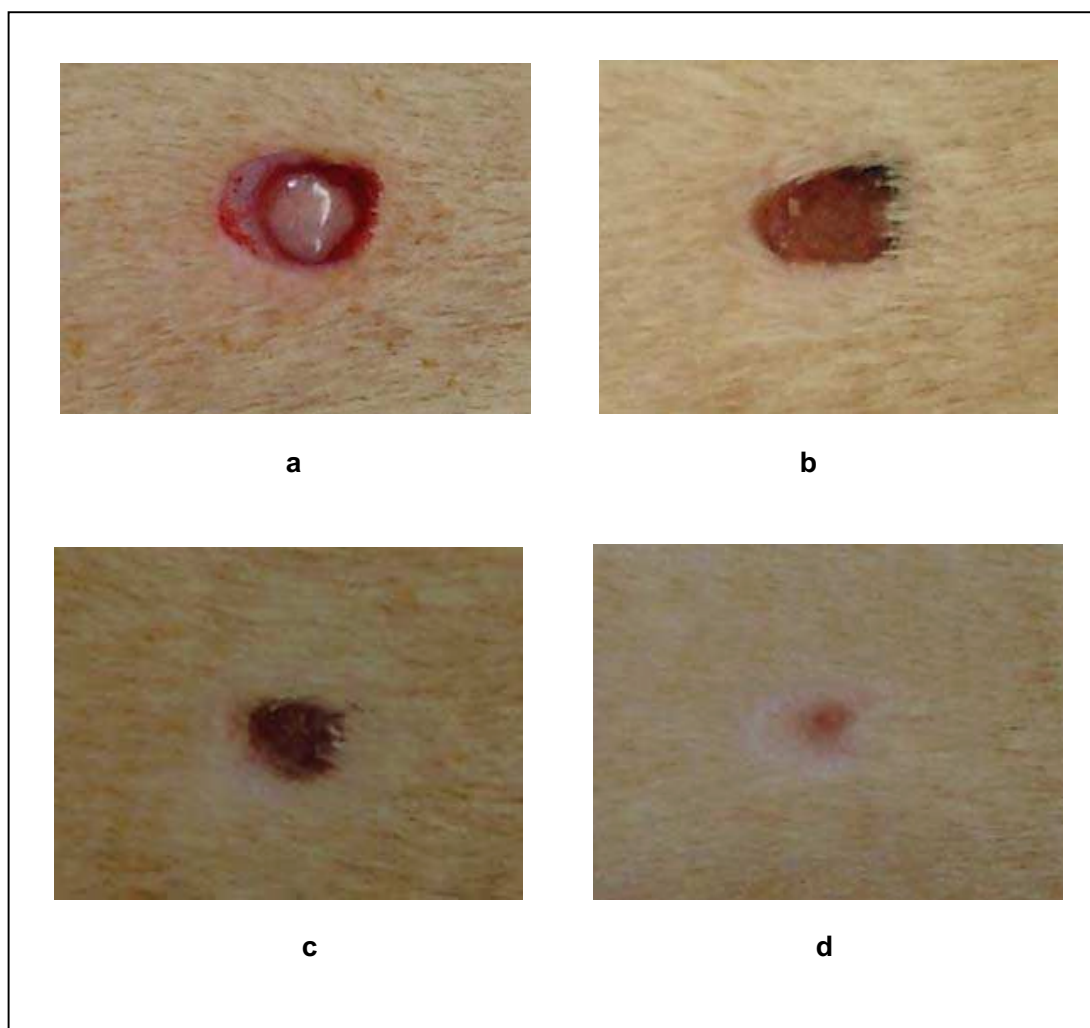


Figura 18 - Grupo G4 – a) ferida aberta após sua execução; b) crostas mais secas que as das feridas-controle 48 h após cirurgia; c) elevada contração da ferida com bordos delgados e secos aos sete dias após cirurgia; d) presença de cicatriz evidente com bordos bastante esbranquiçados aos dez dias após cirurgia

5.2 Avaliação biométrica das áreas das feridas

Os valores das áreas das feridas no instante pós cirúrgico, 48 horas, sete e dez dias (Apêndices A, B, C e D) foram transformados em porcentagem de redução de área da ferida conforme fórmula anteriormente descrita. Devido ao óbito de um animal foram utilizadas nove amostras para todos os grupos.

As medidas foram realizadas três vezes em momentos distintos e para a análise estatística, utilizada a média. A análise do coeficiente de variação das três medidas repetidas foi realizada para avaliação da calibração intra-examinador. Os coeficientes de variação obtidos situaram-se na faixa de 0,07% e 2,83%. Os maiores coeficientes de variação são observados nas leituras das menores áreas feridas, ou seja, as pequenas imprecisões são relativamente mais representativas.

Na Tabela 1 são observados as médias e desvios padrão para o percentual de redução do tamanho das lesões, em relação aos tamanhos iniciais, em função do tempo e o resultado da ANOVA.

Tabela 1 – Estatística descritiva dos valores de redução percentual de área da ferida e resultado do teste estatístico ANOVA (n=9)

Período	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
T2-T1	1	27,54	12,06	3,31	43,19	<0,001*
	2	50,86	3,51	46,34	55,71	
	3	52,57	6,78	37,39	61,10	
	4	56,73	6,64	46,45	65,15	
T3-T1	1	63,18	11,53	38,96	76,10	<0,001*
	2	77,93	6,28	65,79	87,53	
	3	82,68	8,87	61,64	90,22	
	4	88,66	2,15	84,98	91,50	
T4-T1	1	82,86	2,29	78,51	86,84	<0,001*
	2	92,13	2,21	87,99	94,22	
	3	94,55	3,24	86,81	98,53	
	4	98,57	5,67	97,40	99,13	

* p<0,05

n= número de amostras

A fim de melhor analisar as diferenças acumuladas em relação aos fatores tempo inicial e grupos, foram feitas comparações múltiplas para as médias utilizando o método Dunnett, conforme demonstrado na Tabela 2 e Figura 19.

Tabela 2 - Resultado do teste de comparação múltipla de Dunnett para valores de redução percentual de área da ferida entre os grupos (n=9)

Período	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferença entre médias (I - J)	Significância p
T2-T1	1	2	-23,32	0,002*
		3	-25,03	0,001*
		4	-29,19	<0,001*
	2	3	-1,70	0,980
		4	-5,86	0,183
		4	-4,15	0,716
T3-T1	1	2	-14,75	0,031*
		3	-19,50	0,006*
		4	-25,48	0,001*
	2	3	-4,75	0,718
		4	-10,73	0,004*
		4	-5,97	0,348
T4-T1	1	2	-9,26	<0,001*
		3	-11,68	<0,001*
		4	-15,71	<0,001*
	2	3	-2,42	0,380
		4	-6,44	<0,001*
		4	-4,03	0,033*

* p<0,05

I = Grupo referência

J = Grupo comparado

n= número de amostras

Conforme observado na Tabela 2, todas as lesões tiveram redução em suas áreas quando comparadas com o instante inicial (T1).

Os grupos G2, G3 e G4 que receberam tratamento em T1, apresentaram redução estatisticamente significante nas áreas das lesões em relação às áreas do grupo G1 no período T2-T1.

Conforme esperado não há diferenças significativas na evolução das cicatrizações das lesões entre os grupos G2, G3 e G4 no período T2-T1, uma vez que todos receberam aplicação do laser em T1.

No intervalo de tempo T3-T1 observamos que os grupos G2, G3 e G4 apresentaram resultados acumulados estatisticamente significativos em relação ao

grupo controle G1, sendo que o grupo G4 mostra evolução acumulada estatisticamente significativa em relação ao grupo G2.

Ao compararmos o intervalo de tempo T4-T1, ou seja, ao final do experimento, a evolução acumulada das reduções das áreas das lesões dos grupos que receberam a aplicação do laser, em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa. Mais uma vez também foi estatisticamente significativa o resultado acumulado do grupo G4 em relação ao grupo G2 e ao grupo G3.

No gráfico representativo (Figura 19) é demonstrada a redução percentual das áreas das lesões iniciais em relação ao período do experimento, onde ficam evidentes as reduções das áreas, principalmente nas primeiras 48 horas após a cirurgia (T2-T1).

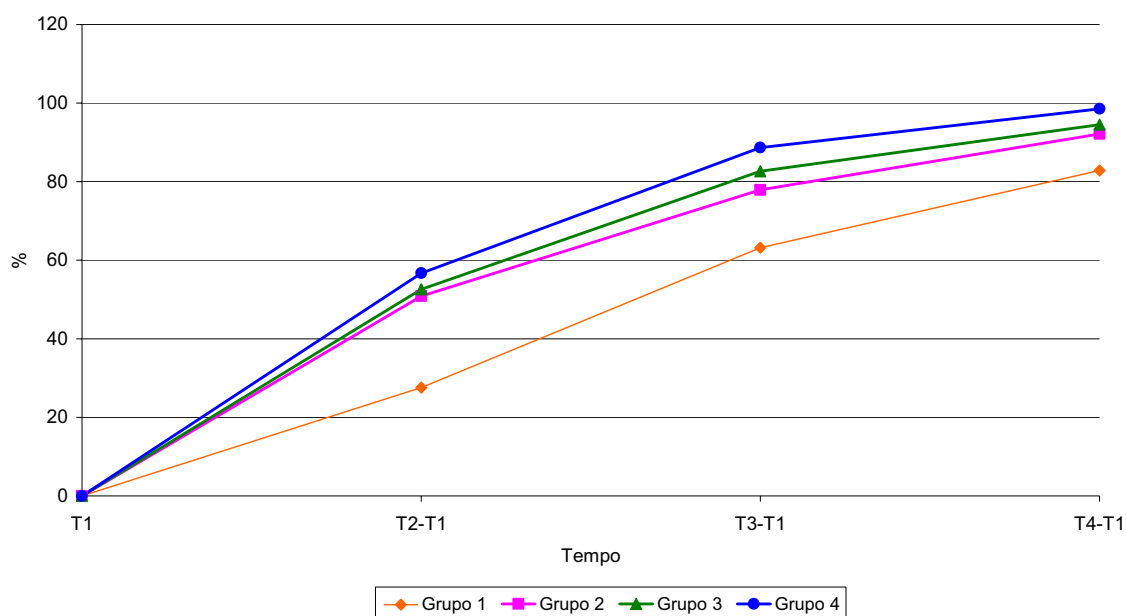


Figura 19 - Gráfico representativo da curva de redução percentual média da área da ferida em relação aos tamanhos iniciais, em função do tempo

A Tabela 3 a seguir contém as médias percentuais das reduções das áreas das feridas e os desvios padrão para os três períodos T2-T1, T3-T2 e T4-T3, no qual observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos três intervalos de tempo.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos valores de redução percentual de área da ferida e resultado do teste estatístico ANOVA (n=9)

	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
T2-T1	1	27,54	12,06	3,31	43,19	<0,001*
	2	50,86	3,51	46,34	55,71	
	3	52,57	6,78	37,39	61,10	
	4	56,73	6,64	46,45	65,15	
T3-T2	1	49,38	11,68	30,40	64,17	<0,001*
	2	54,76	14,19	25,63	74,87	
	3	64,72	12,36	38,74	79,04	
	4	73,41	5,41	67,53	82,84	
T4-T3	1	50,32	13,45	32,13	67,28	<0,001*
	2	62,31	13,02	38,53	75,85	
	3	68,25	10,55	56,15	84,96	
	4	87,40	4,48	77,22	92,58	

* p<0,05

n= número de amostras

Para melhor estudar as diferenças em relação aos fatores tempo e grupos, foram feitas comparações múltiplas para as médias utilizando o método Dunnett conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado do teste de comparação múltipla de Dunnet para valores de redução percentual de área da ferida entre os grupos (n=9)

			Diferenças entre médias (I-J)	Significância p
Período	(I) GRUPO	(J) GRUPO		
T2-T1	1	2	-23,32	0,002*
		3	-25,03	0,001*
		4	-29,19	<0,001*
	2	3	-1,70	0,980
		4	-5,86	0,183
		4	-4,15	0,716
T3-T2	1	2	-5,37	0,935
		3	-15,33	0,084
		4	-24,03	0,001*
	2	3	-9,96	0,535
		4	-18,65	0,023*
		4	-8,69	0,350
T4-T3	1	2	-11,99	0,337
		3	-17,93	0,037*
		4	-37,08	<0,001*
	2	3	-5,94	0,860
		4	-25,09	0,002*
		4	-19,15	0,002*

* p<0,05

I = Grupo referência

J = Grupo comparado

n = número de amostras

A análise entre os tempos T2-T1 para todos os grupos, já descritas na Tabela 2 permanece inalterada.

No intervalo de tempo T3-T2, o grupo G4 continuou apresentando redução das áreas das lesões em relação ao grupo G1 e ao G2.

No intervalo de tempo T4-T3, a redução das áreas das lesões do grupo G4 em relação à dos outros grupos foi significativa. Neste período o grupo G3 apresenta uma redução das áreas também significantes em relação às áreas do grupo G1.

5.3 Avaliação histomorfológica

Devido a dificuldades durante o processo de preparação histológica, alguns espécimes não puderam ser analisados e foram utilizadas sete amostras por grupo.

Em todos os grupos a região correspondente à ferida apresentava-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, de menor espessura que o epitélio adjacente. Na derme, desprovida de anexos cutâneos, a região era preenchida por tecido de granulação. Este era composto por fibras colágenas mais delicadas que as observadas no conjuntivo sadio, fibroblastos jovens, vasos sangüíneos neoformados e células inflamatórias.

Observou-se que nas feridas que receberam o tratamento com o laser houve maior proliferação fibroblástica, menor edema, formação mais acentuada de novos vasos sangüíneos mostrando um tecido conjuntivo mais organizado, rico em fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida, quando comparadas às do grupo controle.

O grupo G1 apresentava junto à borda da ferida proliferação epitelial visível. Houve evidências de edema em alguns espécimes, áreas de hemorragia. Em regiões mais profundas notou-se a presença de alguns neutrófilos e um número considerável de fibroblastos. Foram evidenciados também alguns macrófagos e células mononucleadas (Figura 20a-b).

O grupo G2 demonstrava tecido cicatricial revestido por epitélio íntegro, queratinizado, mais delgado em sua região central. Subjacente a esta área observou-se nítida proliferação vascular. Foi observada pouca quantidade ou ausência de fenômenos exsudativos plasmáticos. Foram evidenciados macrófagos

em maior quantidade e tecido de granulação. Notou-se grande número de fibroblastos, principalmente nas áreas periféricas (Figura 21a-b).

O grupo G3 quando comparado aos grupos controle e G2 apresentou em vários espécimes um menor edema, orientação de fibroblastos paralela no sentido da epiderme, processo de formação vascular mais evidente e uma maior presença de células inflamatórias determinando, portanto uma fase proliferativa e reparativa mais acentuada. Na maioria das amostras o epitélio recobria totalmente a ferida (Figura 22a-b).

O grupo G4 indicou uma maior aceleração de cicatrização em todos os espécimes analisados em relação aos outros grupos, principalmente em relação ao G1 e G2. Foi observado um maior processo de formação vascular, infiltrado inflamatório demonstrando tecido de granulação e proliferação de fibroblastos semelhantes aos do grupo G3. Notou-se organização paralela dos fibroblastos no sentido da epiderme (Figura 23a-b).

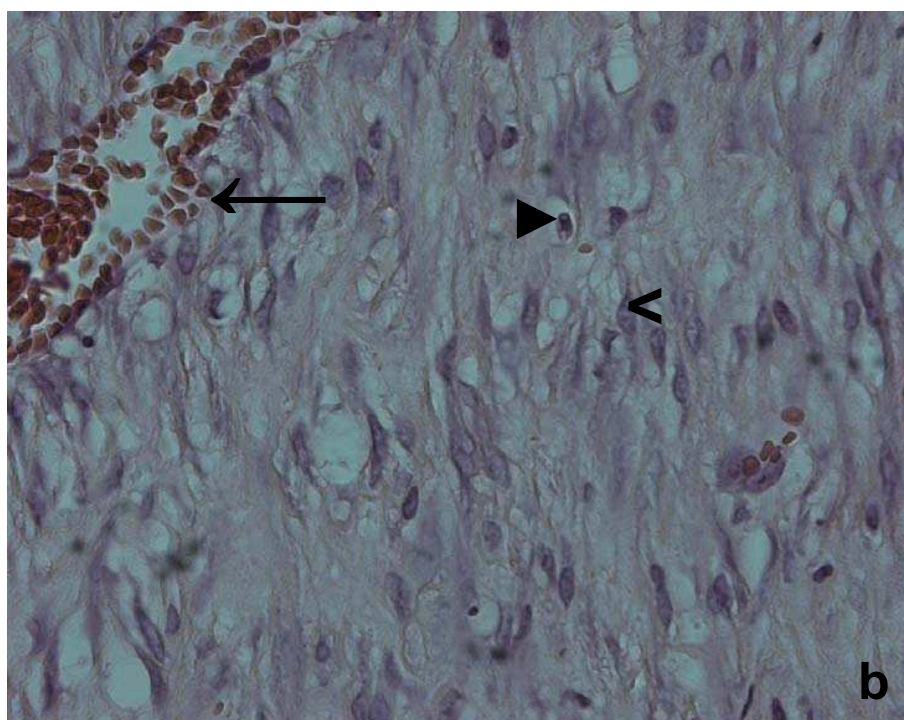
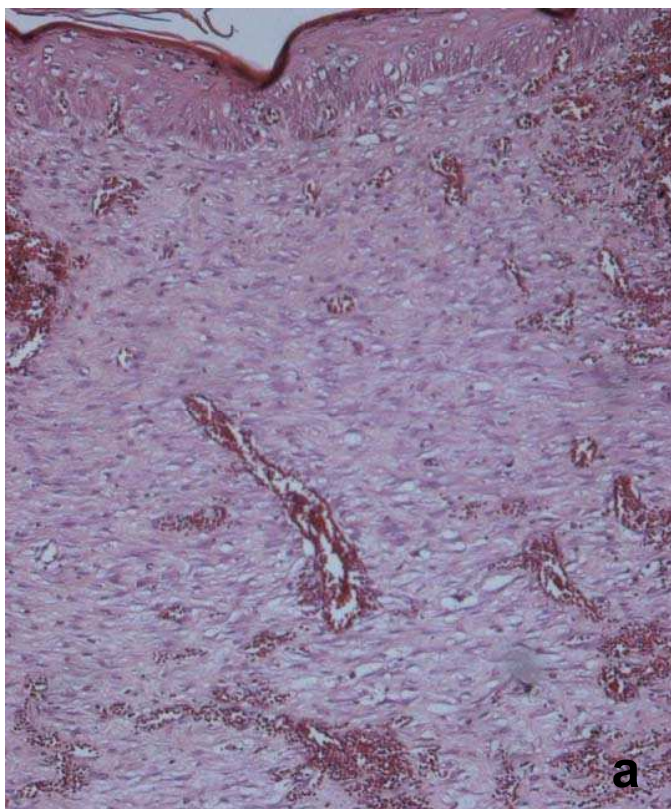


Figura 20 - Grupo G1 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x; b) aspecto histológico caracterizando edema, vasos (←), células inflamatórias (▶), fibroblastos (<), com aumento original de 400x

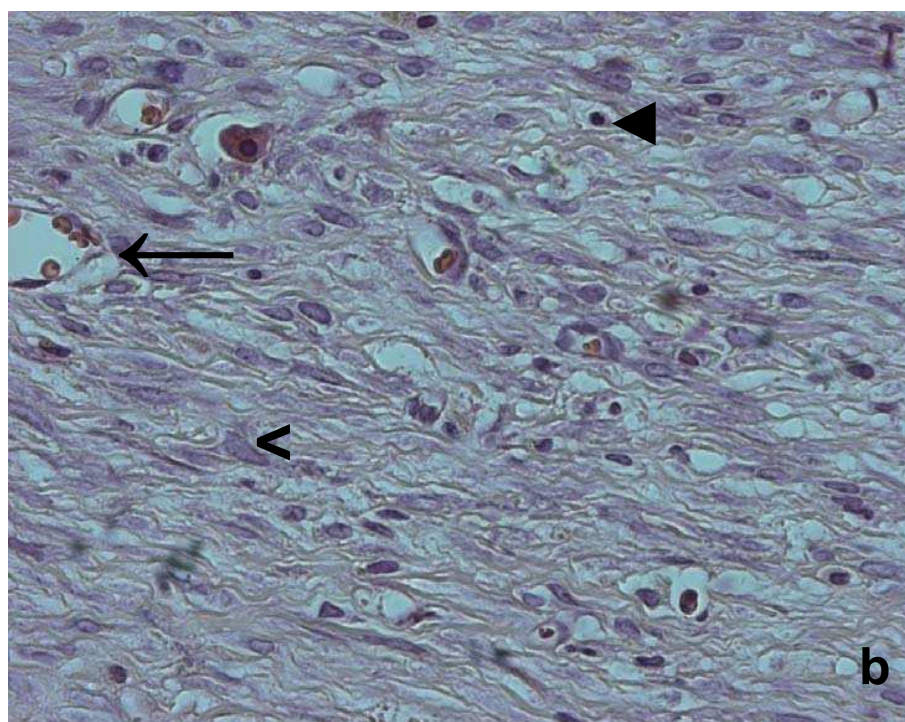
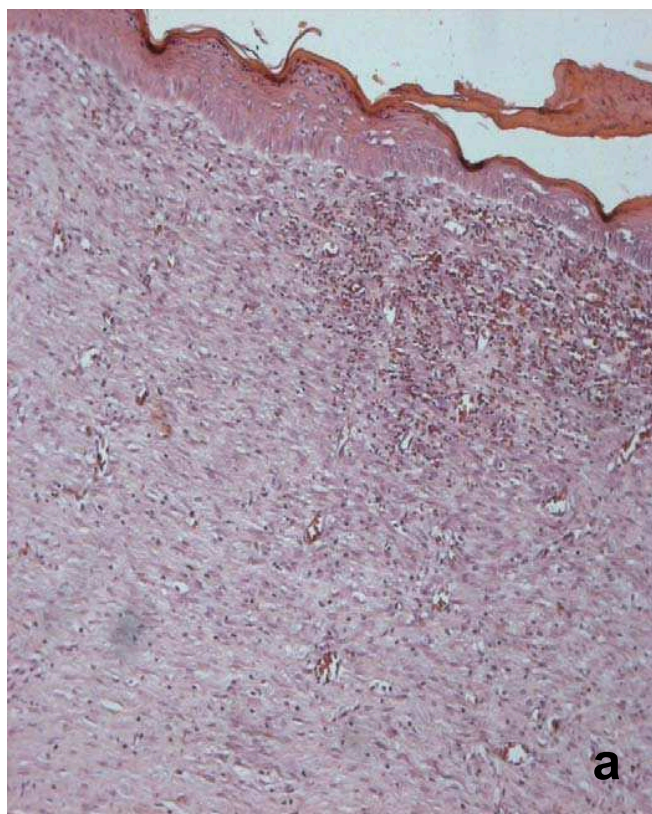


Figura 21 - Grupo G2 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x; b) aspecto histológico caracterizando vasos (←), células inflamatórias (◄) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x

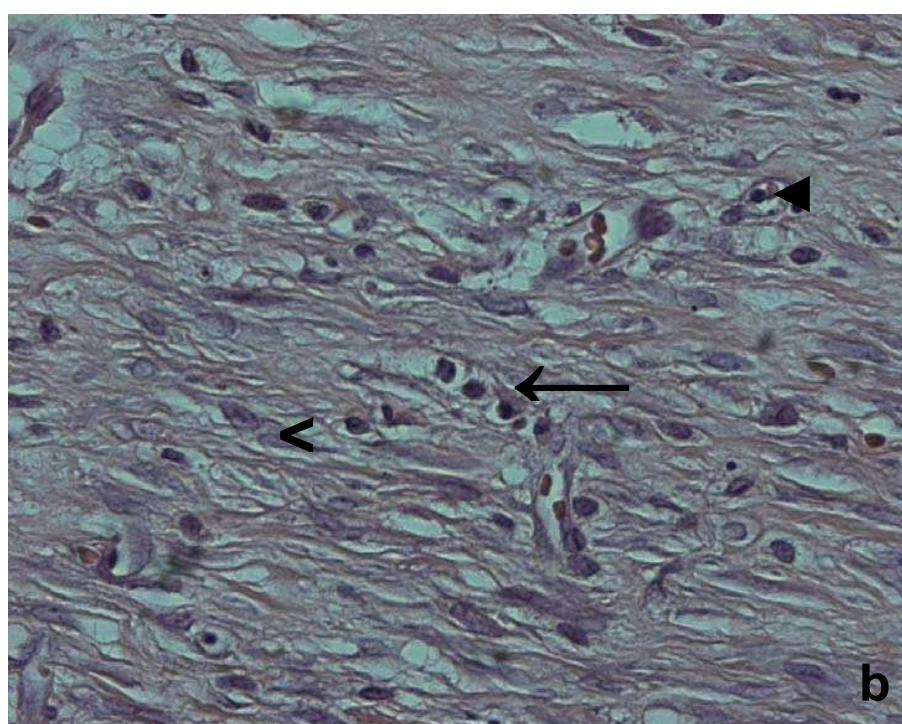
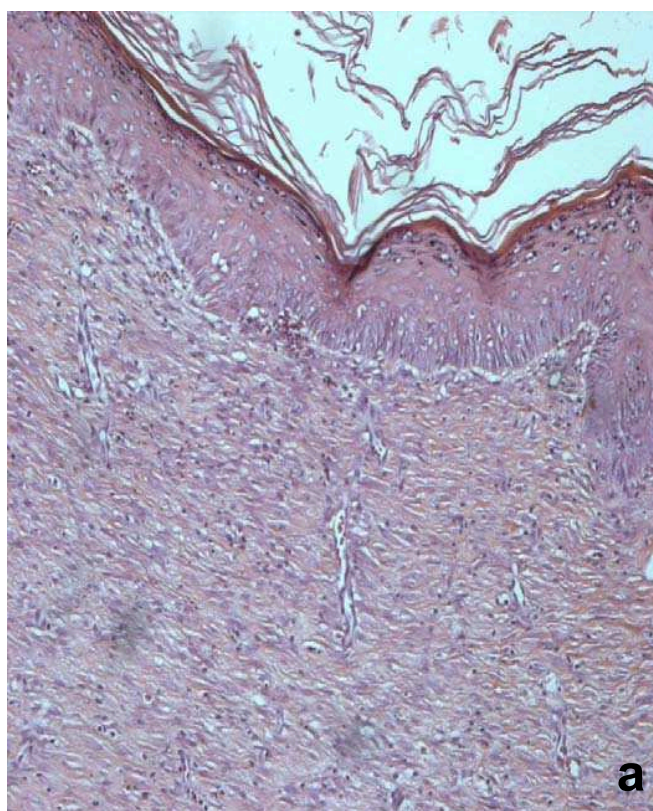


Figura 22 - Grupo G3 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x destacando o epitélio diferenciado com suas camadas; b) aspecto histológico caracterizando menor edema, vasos sanguíneos (←), células inflamatórias (◄) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x

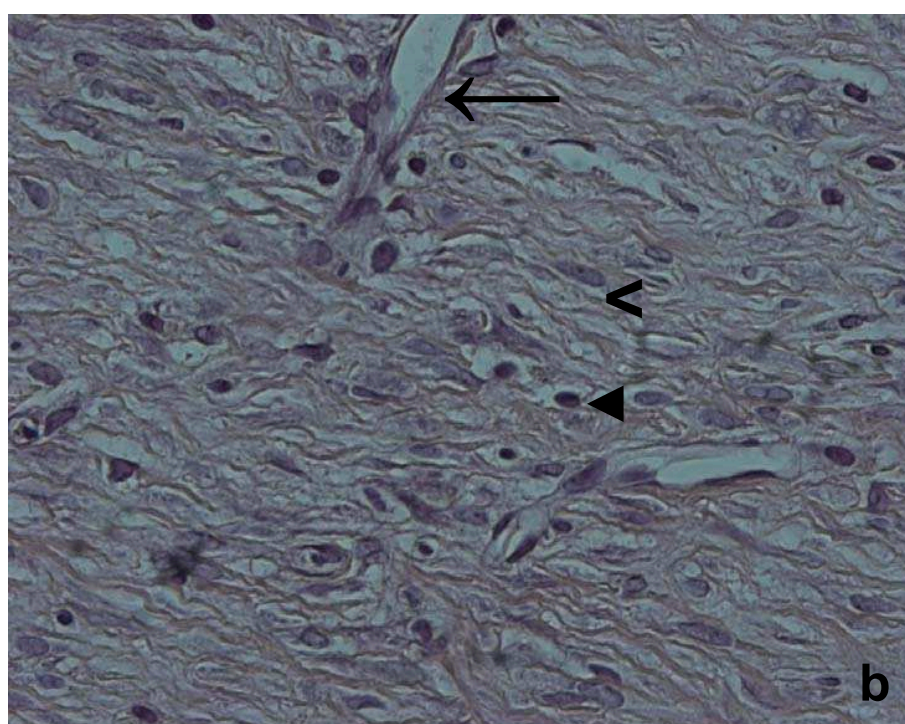
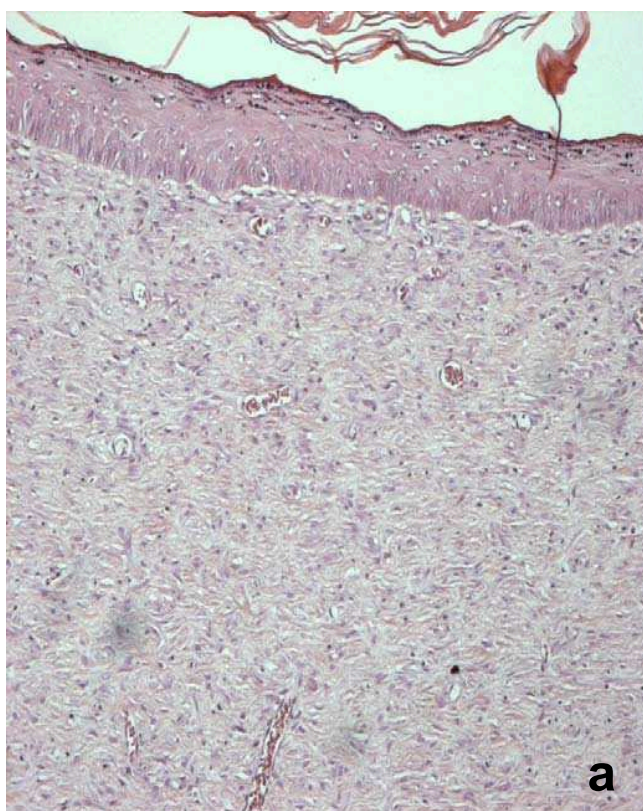


Figura 23 - Grupo G4 - a) aspecto histológico da amostra demonstrando tecido epitelial e conjuntivo com aumento original de 100x onde se observa orientação celular no tecido conjuntivo e presença de fibras colágenas; b) aspecto histológico caracterizando menor edema, vasos sanguíneos (←), células inflamatórias (◄) e fibroblastos (<), com aumento original de 400x

5.4 Avaliação histomorfométrica

Devido a dificuldades durante o processo de preparação histológica, alguns espécimes não puderam ser avaliados e foram utilizadas sete amostras por grupo.

Para comparação da contagem das estruturas celulares (Apêndice E) entre os grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e os resultados são observados na tabela abaixo, assim como os dados da estatística descritiva.

Tabela 5 – Resultado do teste de Kruskal-Wallis para a comparação das variáveis vasos sangüíneos, fibroblastos e células inflamatórias entre os grupos (n=7)

	Grupo	Minimo	Maximo	Média	Desvio padrão	p
Vasos sangüíneos	1	1	3	1,86	0,69	0,006*
	2	2	3	2,43	0,53	
	3	2	5	3,00	1,00	
	4	2	6	4,14	1,34	
Fibroblastos	1	32	43	38,86	4,05	0,033*
	2	35	49	41,86	5,49	
	3	40	50	46,86	3,23	
	4	33	50	42,43	6,21	
Células Inflamatórias	1	4	7	5,57	0,97	<0,001*
	2	6	10	8,00	1,73	
	3	11	14	12,57	1,27	
	4	6	12	9,43	2,44	

* p<0,05

Entretanto, não foi possível determinar onde está a diferença entre os grupos. A comparação dos grupos dois a dois realizada utilizando o teste Mann-Whitney, é observada a seguir na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do teste Mann-Whitney para a comparação das variáveis vasos sangüíneos, fibroblastos e células inflamatórias entre os grupos

	Diferença entre grupos	Mann-Whitney U	p
Vasos sangüíneos	1 - 2	13,50	0,165
	1 - 3	8,00	0,038*
	1 - 4	3,50	0,004*
	2 - 3	16,00	0,318
	2 - 4	6,50	0,017*
	3 - 4	12,00	0,128
Fibroblastos	1 - 2	16,00	0,318
	1 - 3	3,50	0,004*
	1 - 4	14,50	0,209
	2 - 3	8,50	0,038*
	2 - 4	21,00	0,710
	3 - 4	12,50	0,128
Células inflamatórias	1 - 2	5,50	0,011*
	1 - 3	0,00	0,001*
	1 - 4	3,00	0,004*
	2 - 3	0,00	0,001*
	2 - 4	15,00	0,259
	3 - 4	6,00	0,017*

* p<0,05

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos gerais do laser da baixa potência

O estudo do mecanismo de reparação de tecidos tem sido através dos tempos, nas áreas biomédicas, objeto de muitas pesquisas, na busca de esclarecimentos dos mecanismos que poderiam interagir no processo de cicatrização de tecidos lesados.

No que concerne ao protocolo de irradiação, há vários trabalhos na literatura que procuram abordar a aceleração da cicatrização associando dose, frequência e número de irradiações.

Foram utilizadas neste trabalho doses de $3,8 \text{ J/cm}^2$ e potência de 15 mW, parâmetros considerados baixos pela literatura e já empregados por outros autores, porém sem apresentar metodologia que determinasse o mecanismo pelo qual o laser favoreceu a epitelização mais rápida de lesões provocadas no dorso de ratos (OLIVEIRA; SOTTO-MAIOR; FERNANDES, 2005).

Autores que empregaram em suas pesquisas doses muito mais altas que as preconizadas pela literatura ou protocolos existentes mostraram que houve inibição da biomodulação celular (PUGLIESE et al., 2003; VAN BREUGEL; BÄR, 1992).

Trabalhos em que foram utilizadas as doses muito baixas não demonstraram ação efetiva da irradiação do laser de baixa potência (HALL et al., 1994).

Foram observados trabalhos que estudaram a frequência e número de irradiações (MENDEZ et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; SCHINDL et al., 2003; VAN BREUGEL; BÄR, 1992) e sugerido em outras pesquisas que apenas uma irradiação não seria suficiente para

alcançar algum efeito celular (ANNEROTH et al., 1988; CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996).

Evidências da possibilidade de surgirem efeitos sistêmicos pela exposição à luz também foram relatadas na literatura. Observou-se que não há a necessidade de irradiação direta da lesão ou tecido alvo para conseguir-se ação terapêutica do laser de baixa intensidade (BRAVERMAN et al., 1989; HOPKINS et al., 2004).

Apesar de a literatura apresentar numerosos estudos e trabalhos confirmando a utilização do laser de baixa potência na terapêutica de biomodulação, observa-se ainda não existirem parâmetros considerados ideais para sua aplicação, havendo, portanto a necessidade de maiores investigações científicas (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996; GENOT; KLASTERSKY, 2005; KREISLER et al., 2003; SCHINDL et al., 2001; STRANG; MOSELEY; CARMICHAEL, 1988; WALSH, 1997; WOODRUFF et al., 2004).

6.2 Análise clínica, biométrica e histomorfométrica

Avaliando os resultados obtidos neste estudo, observou-se sob o ponto de vista clínico, biométrico e histomorfométrico, que as feridas dos grupos irradiados, comparadas às feridas do grupo controle, demonstraram processo de reparação mais adiantado.

Na análise clínica das feridas dos grupos irradiados G2, G3 e G4, o processo de reparação apresenta mais evoluído que o das feridas controles do grupo G1, fato este que corrobora com os resultados de Bisht et al. (1994); Garcia (1992); Garcia, Okamoto e Kina (1996); Mester, Mester e Mester (1985) e Ribeiro et al. (2002). Alguns autores, como Braverman et al. (1989), não encontraram

diferenças significativas entre grupos irradiados com laser de baixa potência e grupos que não receberam tratamento, talvez pelo fato de terem utilizado o antibiótico tetraciclina na água fornecida aos animais durante seus experimentos.

Observou-se que para todos os grupos, clinicamente existiu um decréscimo no tamanho da ferida em decorrência do processo de cicatrização ao longo do tempo, o que também foi observado por outros autores (ANNEROTH et al., 1988; BISHT et al., 1994; HOPKINS et al., 2004; LONGO et al., 1987; RIBEIRO et al., 2002; SENDA et al., 1992).

Foi observada após 48 horas a presença de crosta em todas as feridas embora as do grupo controle mostraram-se mais finas, fato este também observado por Garcia (1992), que utilizou laser de AsGa, 904 nm, potência de 10 W. Entretanto, as feridas dos grupos G2, G3 e G4 mostraram neste mesmo período os bordos e a porção central bem mais seco e em alguns animais até mesmo um início de descolamento dos bordos e crosta mais escurecida.

Aos sete dias foi observado descolamento a partir dos bordos das feridas do grupo controle, fato corroborado nas experiências de Anneroth et al. (1988), que descreveram que a perda da crosta ocorreu entre seis e 12 dias e de Garcia (1992), Garcia, Okamoto e Kina (1996) e Hall et al. (1994). As feridas dos grupos G2 mostraram bordos delgados e secos, porém as dos grupos G3 e G4 comparadas com as do grupo controle e G2 demonstraram diferença clínica significativa e perda de suas crostas na maioria das feridas.

Nossos resultados estão de acordo com Anneroth et al. (1988), Garcia (1992), Hall et al. (1994) e Pugliese et al. (2003), quando também ressaltaram que tanto as feridas que foram irradiadas quanto as do grupo controle, não

demonstraram sinais evidentes de infecção e de sangramento, durante todo o período experimental de dez dias de pós-operatório.

Do ponto de vista da análise biométrica quanto à redução percentual das áreas das feridas, observou-se que todas as feridas, tanto as irradiadas quanto as que não receberam tratamento sofreram decréscimo nas suas áreas. Este fato está de acordo com Braverman et al. (1989), Garcia (1992), Longo et al. (1987), Rezende (2001) e Senda et al. (1992). Alguns autores observaram em seus experimentos que houve redução das áreas das feridas-controle e das irradiadas, mas pelo fato das mesmas terem sido realizadas no mesmo indivíduo, sugerem que o laser possa ter agido sistemicamente influenciando os resultados (HOPKINS et al., 2004; RIBEIRO et al., 2002). Entretanto observou-se que existem trabalhos que não demonstram diferenças de redução entre as feridas submetidas ou não à LLLT (ANNEROOTH et al., 1988; HALL et al., 1994).

Ao final do experimento que durou dez dias, as feridas controles apresentaram reparação bem evoluída, fato este também observado por Anneroth et al. (1988). As feridas dos grupos G2 e G3 mostraram-se semelhantes quando comparadas entre si e as do grupo G4 apresentaram em sua maioria completa reparação, conforme observado em Bisht et al. (1994), que demonstraram em seus resultados epitelização completa aos nove dias. Já nos trabalhos de Ribeiro et al. (2004), ao final de dez dias os autores relatam reepitelização acentuada tanto nos grupos irradiados quanto no grupo sem tratamento.

Na análise da redução percentual do tamanho das feridas obtida através do cálculo da diferença entre o tamanho das feridas em cada um dos tempos (T2, T3 e T4), sempre em relação ao tempo inicial T1, nossos resultados demonstraram que no tempo T2-T1, conforme esperado não há diferenças significativas na evolução da

cicatrização das lesões entre os grupos G2, G3 e G4, uma vez que todos receberam aplicação do laser em T1 e o desvio padrão dos grupos irradiados foi menor que o controle. Talvez seja possível afirmar que a evolução da cicatrização observada nestes grupos foi mais homogênea, mais previsível e menos sujeita às particularidades de cada indivíduo. No tempo T3-T1, o desvio padrão dos indivíduos do grupo G2 aumentou, o qual foi interrompido o tratamento, o mesmo acontecendo com G3. Enquanto o grupo G4 apresentou desvio padrão menor, conforme observado por Garcia (1992), Rezende (2001) e Ribeiro et al. (2002), talvez demonstrando que a continuação do tratamento ainda seria de fato recomendada. No tempo T4-T1, por ocasião da última avaliação da redução acumulada das áreas feridas, observou-se que decorridos dez dias, mesmo os grupos que não receberam três aplicações de laser não apresentaram desvios padrão elevados na evolução das feridas, ou seja, as particularidades dos elementos dos grupos não são mais tão evidentes, entretanto diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre as feridas do grupo controle e do grupo G4, fato este também ocorrido no trabalho de Ribeiro et al. (2002), que observaram redução da área das lesões irradiadas no dorso de ratos no terceiro, sétimo, décimo, 14º e 17º dias pós cirurgia.

Na segunda análise que comparou a redução percentual dos tamanhos das feridas nos instantes T em relação aos instantes T-1, ou seja, foi comparada a redução de T2 em relação a T1, T3 comparado com T2 e T4 com T3, os resultados demonstrados em nosso trabalho confirmam que a análise entre os tempos T2-T1 para todos os grupos permanece inalterada, ou seja, os grupos irradiados obtiveram benefícios em relação ao grupo controle, conforme relatado anteriormente. No intervalo de tempo T3-T2, o grupo G4 continuou apresentando redução estatisticamente significativa das áreas das lesões em relação ao grupo controle,

porém foi observado que o grupo G3 em que eram esperados resultados semelhantes aos do G4, não ficou dentro de um patamar significativo, apesar de apresentar redução. O grupo G2 não apresentou uma redução significativa das áreas das lesões em relação ao grupo G1 em função de não ter sido submetido ao laser na segunda visita, sugerindo que a interrupção do tratamento após a primeira aplicação do laser possa ser prematura. Esperava-se que os grupos G3 e G4 apresentassem evolução semelhante em relação ao G2 neste período, o que não foi observado. Somente o G4 mostrou redução de área estatisticamente significativa. No intervalo de tempo T4-T3 o grupo G3 deixou de se beneficiar devido à interrupção da aplicação do laser, o que nos parece lícito afirmar que três aplicações sejam mais eficazes que apenas duas e que uma aplicação não seria o suficiente para a obtenção de resultados estatisticamente significativos, conforme observado em trabalhos citados na revisão de literatura (ANNEROTH et al., 1988; CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996).

Baseado nos trabalhos de Pourreau-Schneider (1989), acredita-se que a maior contração das feridas dos grupos irradiados observada pela diminuição de suas áreas seja devido à ação do laser a nível celular. Conforme seus resultados e conclusões, a formação e função dos fibroblastos são alteradas pelo laser promovendo modificações intracitoplasmáticas. Este autor observou diferenciação celular do fibroblasto normal em miofibroblastos, que apresentam além da competência de formação de fibras, a de contração da ferida.

Nas análises histomorfológica e histomorfométrica das amostras correspondentes ao décimo dia após cirurgia, sob microscopia de luz, observou-se proliferação fibroblástica, formação de vasos sangüíneos e tecido de granulação, representado pela presença de células inflamatórias, em todos os grupos, embora

em nosso trabalho observamos que para todas as variáveis nos grupos irradiados há significância estatística comprovando a ação do laser.

Quando se comparam os grupos irradiados com o grupo controle observa-se que os grupos G3 e G4, que foram submetidos a duas e três aplicações do laser respectivamente, apresentaram um número estatisticamente superior de vasos sanguíneos, fato este concorde com os resultados de vários autores (BISHT et al., 1994; CHOMETTE et al., 1987; GARCIA; OKAMOTO; KINA, 1996; MENDEZ et al., 2004; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989; RIBEIRO et al., 2004). O grupo G2 não apresentou significância em relação ao G1, resultado semelhante aos obtidos nos trabalhos de autores pesquisados (ANNEROTH et al., 1988; CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996; VAN BREUGEL; BÄR, 1992). Estes autores concluíram que apenas uma aplicação não seria suficiente para a obtenção de resultados satisfatórios. A importância do aumento da vascularização nos processos de cicatrização está no fato de servir como fonte de nutrientes e oxigênio, além de meio de condução de células fibroblásticas contribuindo para o processo cicatricial (MESTER; MESTER; MESTER, 1985).

As pesquisas mostram resultados significantes em relação à proliferação de fibroblastos, quando se utiliza o laser de baixa potência acelerando a cicatrização de feridas cutâneas (NASCIMENTO et al., 2004). Pesquisas *in vitro* realizadas por Almeida-Lopes (1999), Kreisler et al. (2003) e Lubart et al. (1993), demonstraram a eficácia do laser de baixa potência na proliferação de fibroblastos. De acordo com os trabalhos de Van Breugel e Bär (1992), que utilizaram tempos de irradiação entre trinta segundos e dois minutos, o número de fibroblastos apresentou-se maior no grupo irradiado em relação ao controle quando compararam potência e tempo de aplicação. Em nosso trabalho, todos os grupos irradiados apresentaram proliferação

de fibroblastos superior ao grupo controle, resultados semelhantes encontrados nos trabalhos de Demir et al. (2004), que observaram um maior número de fibroblastos no décimo dia de seus experimentos, utilizando doses de 1 J/cm^2 por dez dias consecutivos. Já nos trabalhos de Garcia, Okamoto e Kina (1996), os autores relataram aumento de fibroblastos nos grupos irradiados e observados no sétimo dia pós-cirúrgico utilizando dose de 3 J/cm^2 , semelhante à dose empregada nesta pesquisa. Em nossos resultados, apenas o grupo G3 demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao G2. Considerando que os fibroblastos sintetizam colágeno, elastina, proteoglicanas e glicoproteínas estruturais, sendo a célula mais comum no tecido conjuntivo e a principal responsável pela formação de fibras e de material intercelular amorfo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995) os resultados obtidos da análise biométrica dos grupos irradiados são fortalecidos com os resultados histológicos descritos. Segundo resultados observados nos trabalhos de Pourreau-Schneider et al. (1989), o efeito de bioestimulação do laser no crescimento de fibroblastos após uma única irradiação, foi considerado satisfatório comparado com o grupo que não recebeu tratamento, porém quando foram feitas duas ou três aplicações houve uma maior proliferação, resultados estes de acordo com nossas avaliações.

A utilização do laser pode levar a uma aceleração no processo de cicatrização de lesões, devido à redução na duração da inflamação aguda, derivando em uma entrada mais rápida no estágio proliferativo de reparo, quando o tecido de granulação é produzido. O aumento da inflamação discorda da literatura, apesar de nas outras análises ter sido observado o melhor reparo. Isso pode ter ocorrido pelo fato das células inflamatórias, tanto crônicas como agudas terem sido contadas de maneira conjunta. A mais rápida cronificação da inflamação em nosso

estudo não foi observada porque utilizou apenas um período de sacrifício. Mudanças na metodologia, reduzindo-se os períodos de observação e sacrificando-se os animais para obtenção de cortes histológicos no início do reparo, especialmente nas primeiras 48 h poderiam indicar com maior precisão a evolução da inflamação e suas modificações com o uso do laser.

O aumento da microcirculação local origina um maior surgimento de vasos sangüíneos na região irradiada, com conseqüente aumento de elementos de defesa, assim como efeito sobre o trofismo local provocando um aumento na capacidade fagocitária pelo aumento de macrófagos na área afetada (KARU et al., 1989). Na análise das células inflamatórias encontramos diferenças estatisticamente significantes nos três grupos irradiados em relação ao grupo controle. Trabalhos como de Demir et al. (2004), não encontraram resultados significativos talvez pelo fato de os autores utilizarem doses de 1 J/cm^2 . Outros autores não observaram efeitos biológicos significantes do laser talvez por realizarem seus experimentos em um mesmo animal, ou seja, executaram as feridas controles e as experimentais em um mesmo espécime, demonstrando o efeito sistêmico do laser (HALL et al., 1994; HOPKINS et al., 2004).

Observou-se que nas feridas que receberam o tratamento com o laser houve maior proliferação fibroblástica, menor edema, formação mais acentuada de novos vasos sangüíneos mostrando um tecido conjuntivo mais organizado em relação ao grupo controle, rico em fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida, resultados corroborados por vários autores (GARCIA, 1992; GARCIA; OKAMOTO; KINA, 1996; MENDEZ et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2004). Ficou evidente que os grupos que receberam duas e/ou três aplicações do laser mostraram resultados significantes em relação ao grupo que recebeu apenas

uma aplicação (ANNEROTH et al., 1988; CONLAN; RAPPLEY; COBB, 1996; POURREAU-SCHNEIDER et al., 1989). A presença de fibroblastos e angiogênese acentuada podem aumentar a qualidade do tecido de granulação cicatricial, condição fundamental para migração epitelial e contração da ferida (RIBEIRO et al., 2004).

7 CONCLUSÕES

Mediante a metodologia empregada e a análise dos nossos resultados, conclui-se que:

- a) As feridas tratadas com laser de baixa potência no invisível demonstraram processo de reparação diferenciado, com maior diminuição percentual de suas áreas;
- b) O número de aplicações do laser influenciou diretamente o progresso de reparação, sendo o protocolo de três aplicações, o mais efetivo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 1999. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.
- ANNEROTH, G. et al. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 26, n. 1, p.12-17, Feb. 1988.
- BASFORD, J. R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 9, n. 1, p. 1-5, Jan. 1989.
- BISHT, D. et al. Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **Indian J. Med. Res.**, New Delhi, v. 4, n. 100, p. 43-46, July 1994.
- BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 9, n. 1, p. 50-58, Jan. 1989.
- BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia Moderna.** São Paulo: Pancast,1998. 356 p.
- CHOMETTE, G. et al. Effect du soft laser sur le tissu conjonctif gingival. II. Effect sur la cicatrization. Etude in microscopie optique, histoenzymologie et microscopie electronique. **J. Biol. Buc.**, Paris, v.15, n 1, p. 51-57, Mar. 1987.
- CHOR, A. et al. Succesful treatment of oral lesions of chronic lichenoid graft-vs.-host disease by addition of low-level laser therapy to systemic immunosuppression. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 222-224, Mar. 2004.
- CONLAN, M.; RAPLEY, J. W.; COBB, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. **J. Clin. Perodontol.**, Copenhagen, v. 23, n. 5, p. 492-496, May 1996.
- DAMANTE, C. A. **Avaliação clínica e histológica dos efeitos do laser em baixa intensidade (GaAIs) na cicatrização de gengivoplastia em humanos.** 2003. 114 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.
- DAMANTE, C. A. et al. Clinical evaluation of the effects of low-intensity laser (GaAIs) on wound healing after gingivoplasty in humans. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 12, n. 2, p. 133-136, Apr./June 2004.
- DEMIR, H. et al. Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. **J. Rehabil. Res. Dev.**, Washington, DC, v. 41, n. 5, p. 721-728, Sept./Oct. 2004.

FREITAS, A. C. et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830nm laser light using C-reactive protein levels. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 187-190, mar. 2001.

GARCIA, V. G. **Comportamento de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo clínico, biométrico e histológico em ratos.** 1992. 117 f. Tese (Livre Docência em Periodontia) - Universidade Estadual de São Paulo, Araçatuba, 1992.

GARCIA, V. G.; OKAMOTO, T.; KINA, J. R. Histologic study of healing process in rats cutaneous wounds treated by laser. **Rev. Odontol. UNESP**, Marília, v. 25, n. 1, p. 37-48, jan./jun.1996.

GENOT, M. T.; KLASTERSKY, J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. **Curr. Opin. Oncol.**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 236-240, May 2005.

GUTKNECHT, N.; FRANZEN, R. O laser: função, interação e segurança. In: EDUARDO, C. P.; GUTKNECHT, N. **A Odontologia e o Laser.** São Paulo: Quintessence, 2004. p. 25-60.

HALL, G. et al. Effect of low-level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, Jönköping, v. 18, n. 1-2, p. 29-34, Jan./Feb. 1994.

HONMURA, A. et al. Therapeutic effect of GaAlAs diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.12, n. 4, p. 441-449, Apr. 1992.

HOPKINS, J. T. et al. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. **J. Athl. Train.**, Dallas, v. 39, n. 3, p.223-229, Sept. 2004.

IMAGEJ. Image Processing and Analysis in Java v.1.33. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>>. Acesso em: 28 out. 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecidos conjuntivos. In: _____. **Histologia Básica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 86-115.

KARU, T. Photobiological fundaments of low-power therapy. **IEEE J. Quantum Electron.**, New York, v. 23, n. 10, p. 1703-1717, Oct. 1987.

_____. Photobiology of low-power laser effects. **Health Phys.**, New York, v. 56, n. 5, p. 691-704, May 1989.

_____. Mechanisms of low-power laser light action on cellular level. In: SIMUNOVIC, Z. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy-LLLT.** Croatia: Vitagraf, 2000. p. 97-125.

KARU, T.; KOLYAKOV, S. F. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 23, n. 4, p. 355-361, Aug. 2005.

KATHER, J. **Estudo histomorfológico e histomorfométrico dos tecidos gengivais de indivíduos portadores de fibromatose gengival hereditária**. 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, Taubaté, 2004.

KREISLER, M. et al. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **J. Clin. Periodontol.** Copenhagen, v. 30, n. 4, p. 353-358, Apr. 2003.

LOEVSCHELL, H. et al. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 14, n. 4, p. 347-354, Apr. 1994.

LONGO, L. et al. Effect of diodes-laser silver Arsenid-Aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Lasers Surg. Med.**, New York, v.7, n. 5, p. 444-447, May 1987.

LUBART, R. et al. Light effect on fibroblast proliferation. **Laser Ther.**, v. 5, n. 1, p. 55-57, Jan. 1993.

MELLO, J. B.; MELLO, G. P. S. Física e aplicações. In: _____. **Laser em Odontologia**. São Paulo: Santos, 2001. p.11-18.

MENDEZ, T. M. T. V. et al. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 22, n. 1, p. 19-25, Feb. 2004.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 5, n. 1, p. 31-39, Jan. 1985.

NASCIMENTO, P. M. et al. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, n. 6, p. 513-518, Dec. 2004.

NES, A. G.; POSSO, M. B. S. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. **Int. Nurs. Rev.**, Oxford, v. 52, n. 1, p. 68-72, Mar. 2005.

OLIVEIRA, R. G.; SOTTO-MAIOR, B. S.; FERNANDES, T. Análise histomorfométrica e avaliação sob microscopia ótica do processo de reparação tecidual em ratos após aplicação de laser de baixa intensidade. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p.203, Sept. 2005.

PINHEIRO, A. L. B. Interação tecidual – Lasers cirúrgicos. IN: BRUGNERA JÚNIOR, A.; PINHEIRO, A. L. B. **Laseres na Odontologia Moderna**. São Paulo: Pancast, 1998, p. 45-62.

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

PUGLIESE, L. S. et al. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 307-313, out./dez. 2003.

QADRI, T. et al. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, n. 7, p. 714-719, July 2005.

REZENDE, S. B. **Ação do diodo laser emitindo em 830nm, sobre o processo de cicatrização de lesões cutâneas: estudo biométrico e histológico em ratos**. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M. S. et al. Effects of 1047-nm Neodymium laser radiation on skin wound healing. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 20, n.1, p. 37-40, Feb. 2002.

RIBEIRO, M. S. et al. Effects of low-intensity polarized visible laser radiation on skin light microscopy study. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, New York, v. 22, n. 1, p. 59-66, Feb. 2004.

SCHINDL, L. et al. Low intensity laser therapy in wound healing – a review with special respect to diabetic angiopathies. **Acta Chir. Austriaca.**, Vien, v. 33, n. 3, p. 132-137, Mar. 2001.

SCHINDL, L. et al. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v. 148, n. 2, p. 334-336, Feb. 2003.

SENDA, A. et al. A study on the effect of He-Ne laser irradiation in wound healing – The effect of laser irradiation with low frequency. **Aichi Gakuin Dent. Sci.**, Nagoya, v. 5, n. 1, p. 79-84, Oct. 1992.

SILVA, J. C. E. et al. Evaluation of the use of low level laser and Photosensitizer Drugs in Healing. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 34, n. 5, p. 451-457, May 2004.

SIMUNOVIC, Z. Thesis and hypothesis about mechanisms of LLLT. In: _____. **Lasers in medicine and dentistry: basic science and up-to-date clinical application of low energy-level laser therapy-LLLT**. Croatia: Vitagraf, 2000. p. 278-301.

STRANG, R.; MOSELEY, H.; CARMICHAEL, A. Soft laser-Have a place in dentistry?. **Br. Dent. J.**, London, v. 165, n. 6, p. 221-225, Sept. 1988.

VAN BREUGEL, H. H. F. I.; BÄR, P. R. D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biomodulation of human fibroblast *in vitro*. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 12, n. 5, p. 528-537, May 1992.

WALSH, L. J. The current status of low-level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 42, n. 4, p. 247-254, Aug. 1997.

WOODRUFF, L. D. et al. The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. **Photomed. Laser Surg.**, Larchmont, v. 22, n. 3, p.241-247, June 2004.

ANEXO A – Comitê de Ética: protocolo 032/2005-CEA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comitê de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 032/2005-CEA sobre “EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOB DIFERENTES PROTOCOLOS DE ADMINISTRAÇÃO, NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS” sob a responsabilidade de Dra. Sonia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 05/09/2005.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 032/2005-CEA sobre “EFEITOS DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE SOB DIFERENTES PROTOCOLOS DE ADMINISTRAÇÃO, NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS” - Dra. Sonia Sotto-Maior Fortes Garcia Rodrigues is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 05/09/2005.

Juiz de Fora, 05 de setembro de 2005

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA

APÊNDICE A – Medidas das áreas das feridas do grupo G1

Grupo	Rato	Periodo	Área Ferida (mm ²)		Rato	Periodo	Área Ferida (mm ²)	
			Área Ferida (mm ²)	Média (mm ²)			Área Ferida (mm ²)	Média (mm ²)
G1	1	I	48,996	49,274	6	I	50,952	50,734
			49,573				50,477	
			49,252				50,772	
		II	33,316	33,408		II	37,497	37,701
	33,883	38,244						
	33,024	37,363						
	III	17,543	17,647	III	14,942	14,722		
	17,572	14,894						
	17,825	14,330						
	IV	8,901	8,760	IV	9,642	9,402		
	8,549	9,251						
	8,831	9,312						
	2	I	55,672	56,322	7	I	45,975	46,954
			56,942				47,665	
			56,352				47,223	
		II	33,951	33,707		II	32,986	33,131
	33,409	33,146						
	33,762	33,261						
	III	19,826	19,583	III	13,490	13,802		
	19,348	13,997						
19,576	13,920							
IV	7,426	7,415	IV	8,026	8,075			
7,381	8,273							
7,436	7,927							
3	I	65,022	65,271	8	I	0,000	0,000	
		65,221				0,000		
		65,570				0,000		
	II	43,580	43,421		II	0,000	0,000	
42,727	0,000							
43,955	0,000							
III	30,122	30,222	III	0,000	0,000			
30,703	0,000							
29,840	0,000							
IV	9,754	9,888	IV	0,000	0,000			
9,786	0,000							
10,123	0,000							
4	I	59,760	59,298	9	I	52,141	51,792	
		59,247				51,770		
		58,888				51,465		
	II	33,239	33,685		II	41,284	41,294	
33,893	41,146							
33,922	41,451							
III	13,875	14,171	III	22,125	22,012			
14,057	21,798							
14,580	22,112							
IV	9,844	9,617	IV	8,885	8,977			
9,459	8,831							
9,549	9,216							
5	I	52,638	53,156	10	I	48,868	48,624	
		53,469				48,515		
		53,360				48,489		
	II	42,990	42,466		II	46,645	47,015	
42,034	46,453							
42,374	47,947							
III	15,577	15,216	III	29,471	29,679			
15,125	29,462							
14,946	30,103							
IV	9,129	9,233	IV	10,325	10,448			
9,299	10,354							
9,270	10,665							

APÊNDICE B – Medidas das áreas das feridas do grupo G2

Grupo	Rato	Periodo	Área		Rato	Periodo	Área	
			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)
G2	1	I	55,544	55,843	6	I	53,010	53,347
			55,752				53,344	
			56,233				53,687	
		28,506	28,626	II		28,573		
	28,801	28,583						
	28,532	28,721						
	III	10,780	10,840	III	11,409			
		11,040			11,467			
		10,700			11,467			
		3,546		3,081	IV	3,081		
	3,598	3,024						
	3,546	3,139						
	2	I	53,677	53,613	7	I	55,633	55,901
			53,676				56,708	
			53,676				55,361	
		24,241	24,188	II		27,313		
	24,132	26,300						
	10,473	27,458						
	III	4,739	4,775	III	10,928			
		4,816			11,255			
4,768		10,819						
4,768		3,592		IV	3,591			
40,511	3,502							
40,996	3,684							
3	I	40,874	40,794	8	I	51,753	52,302	
		18,127				52,151		
		18,171				53,001		
	6,836	6,835	II		23,773			
6,949	24,559							
6,721	23,844							
IV	2,710	2,671	III	18,325				
	2,674			17,383				
	2,629			17,973				
	2,629		4,321	IV	4,303			
58,785	4,271							
58,779	4,390							
4	I	59,125	58,897	9	I	50,262	50,097	
		30,719				49,865		
		31,963				50,163		
	31,251	31,311	II		25,960			
15,632	25,425							
15,654	25,585							
III	15,632	15,503	III	11,079				
	15,221			11,123				
	3,899			11,024				
	4,011		3,977	IV	5,999			
4,021	6,051							
4,021	5,996							
5	I	47,675	47,476	10	I	54,793	54,902	
		47,088				54,944		
		47,665				54,970		
	21,256	21,248	II		27,563			
21,343	26,890							
21,144	27,272							
III	12,178	12,448	III	6,827				
	12,618			6,814				
	12,547			6,897				
	5,204		5,245	IV	4,181			
5,236	4,326							
5,294	4,117							

APÊNDICE C – Medidas das áreas das feridas do grupo G3

Grupo	Rato	Periodo	Area		Rato	Periodo	Area	
			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)
G3	1	I	52,568	52,609	6	I	48,332	48,457
			52,305				48,617	
			52,953				48,422	
		33,505	23,199					
	II	32,700	32,939	II	23,289	23,146		
		32,610			22,949			
		20,451			4,787			
		19,903		4,868	4,851			
	20,185	4,900						
	III	7,022	20,180	IV	2,087	2,063		
		6,814			2,097			
		6,974			2,004			
		55,088		55,078	7		50,240	49,783
	55,181	49,515						
	54,963	49,887						
	24,854	25,094	25,111					
	25,325	25,094						
	II	24,238	24,806	III	4,627	4,661		
		6,949			4,333			
		6,907			1,645			
7,006		1,671		1,673				
3,107	3,049							
III	3,033	3,049	I	1,703	57,386			
	3,008			57,679				
	48,784			57,285				
	48,829		57,195					
IV	48,762	48,792	II	26,528	26,211			
	23,892			25,979				
	23,728			26,127				
	23,831		8,369	8,451				
9,838	8,484							
I	9,629	9,749	III	8,501	3,519			
	9,780			3,450				
	2,944			3,540				
	3,072		3,566					
II	2,992	3,002	IV	57,679	57,386			
	52,279			57,285				
	52,132			57,195				
	52,241		26,528					
I	22,712	22,474	II	25,979	26,211			
	22,221			26,127				
	22,487			8,369				
	9,860		8,484	8,451				
9,597	8,501							
II	9,616	9,691	III	8,501	3,519			
	1,821			3,450				
	1,808			3,540				
	1,869		3,566					
III	1,808	1,833	IV	53,767	53,937			
	1,869			54,017				
	52,279			54,027				
	52,132		20,865					
I	52,241	52,217	II	21,365	20,984			
	22,712			20,721				
	22,221			20,721				
	22,487		5,233	5,274				
9,860	5,377							
II	9,597	9,691	III	5,211	5,274			
	9,616			0,808				
	1,821			0,798				
	1,808		0,773					
III	1,869	1,833	IV	0,798	0,793			
	49,615			0,773				
	51,003			50,955				
	49,676		50,394					
I	49,676	50,098	I	50,548	50,632			
	25,495			50,394				
	26,274			50,548				
	25,944		21,817	21,947				
10,181	22,080							
II	10,107	10,098	II	21,942	21,947			
	10,008			5,987				
	2,434			5,961				
	2,325		5,746	5,898				
2,370	2,097							
III	2,370	2,376	III	2,052	2,071			
	2,325			2,052				
	2,370			2,065				
	2,370		2,065					
IV	2,370	2,376	IV	2,052	2,071			
	2,325			2,052				
	2,370			2,065				
	2,370		2,065					

APÊNDICE D – Medidas das áreas das feridas do grupo G4

Grupo	Rato	Periodo	Área		Rato	Periodo	Área	
			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)			Ferida (mm ²)	Média (mm ²)
G4	1	I	49,291	49,126	6	I	49,743	49,189
			48,858				48,852	
			49,230				48,973	
		19,679	22,350					
	II	19,643	19,710	23,017	22,746			
		19,807		22,872				
		4,284		7,436				
	III	4,120	4,174	7,516	7,387			
		4,117		7,208				
		0,481		0,827				
	IV	0,468	0,476	0,818	0,827			
		0,478		0,837				
		53,799		54,979				
	2	I	52,218	53,261	7	I	55,319	55,143
			53,764				55,130	
			24,084				21,493	
		24,331	21,782	21,631				
	24,985	21,618						
	6,666	6,705						
	III	6,721	6,673	6,971	6,788			
6,631		6,689						
1,020		0,738						
IV	1,055	1,050	0,760	0,759				
	1,074		0,779					
	56,477		53,014					
3	I	57,262	57,014	8	I	52,057	52,850	
		57,304				52,057		
		29,664				26,970		
	29,580	29,501	8,744					
29,260	27,151							
6,769	6,710							
III	6,573	6,710	6,545	1,285				
	6,788		1,251					
	0,510		1,292					
IV	0,484	0,498	1,311	1,285				
	0,500		1,311					
	60,350		60,347					
4	I	60,931	60,347	9	I	49,823	50,542	
		59,760				50,936		
		25,354				26,967		
	26,037	25,577	27,066					
25,341	27,294							
7,798	4,512							
III	7,500	7,603	4,775	4,644				
	7,510		4,646					
	0,738		0,487					
IV	0,750	0,733	0,478	0,477				
	0,712		0,465					
	51,221		51,318					
5	I	51,458	51,318	10	I	53,777	54,043	
		51,276				53,835		
		18,191				19,143		
	18,521	18,171	18,836					
17,803	18,293							
5,833	4,656							
III	5,836	5,852	4,871	4,739				
	5,887		4,691					
	1,356		0,657					
IV	1,328	1,333	0,670	0,654				
	1,315		0,635					

APÊNDICE E – Contagem das estruturas celulares

Grupo 1				Grupo 2				Grupo 3				Grupo 4			
	V	F	CI		V	F	CI		V	F	CI		V	F	CI
1	2	45	7	1	4	47	5	1	2	49	17	1	3	42	11
	1	45	7		3	45	7		4	48	11		3	43	13
	2	36	11		3	47	9		6	50	22		2	46	14
	2	35	6		2	45	9		4	46	15		4	47	11
	2	50	8		2	47	8		2	47	8		2	45	11
	1	43	7		3	46	6		2	45	14		2	45	11
	4	40	6		1	45	7		3	44	9		3	48	12
2	3	45	4	EX 2	3	41	8	2	4	47	11	2	2	49	11
	2	41	3		3	50	11		3	48	11		3	46	12
	3	30	10		4	43	11		2	47	9		3	47	12
	2	16	7		1	46	7		5	47	10		2	48	11
	3	18	7		2	44	6		3	50	15		2	45	10
	2	36	3		3	28	8		6	41	14		1	55	11
	3	36	5		4	47	10		5	50	9		3	51	15
3	3	36	4	3	3	50	11	EX 3	5	49	12	3	3	50	12
	1	33	7		3	43	11		4	46	15		8	47	12
	3	35	5		1	46	7		4	51	15		4	49	11
	2	37	4		2	44	6		7	37	10		7	50	10
	3	45	5		2	51	6		3	48	13		4	45	6
	3	42	4		3	49	6		3	49	12		4	37	7
	3	38	8		3	47	9		2	51	10		4	41	7
4	4	40	6	4	1	50	6	4	3	45	15	4	5	31	12
	3	42	4		2	49	6		2	46	15		4	41	8
	3	42	4		2	46	5		2	47	11		5	43	9
	5	40	5		3	38	11		3	50	13		7	43	6
	3	39	4		2	35	7		5	47	10		7	45	7
	3	37	3		3	40	10		2	53	11		8	28	8
	2	37	5		3	40	12		4	48	13		7	32	6
5	1	36	2	EX 5	3	42	10	5	3	47	11	5	5	41	9
	2	36	4		3	42	7		3	45	10		5	35	9
	2	35	6		3	44	11		2	51	16		3	26	5
	1	42	5		4	46	11		3	52	12		5	27	5
	2	40	6		3	45	10		3	50	11		7	28	5
	1	42	7		1	45	14		3	50	14		4	40	8
	1	43	5		2	48	9		2	46	14		6	40	8
6	1	41	7	6	1	47	8	6	2	48	12	6	6	36	7
	1	43	6		4	35	5		7	39	16		0	0	0
	1	43	6		1	40	9		2	42	17		0	0	0
	1	41	7		2	35	10		11	35	13		0	0	0
	1	43	6		3	38	14		5	38	12		0	0	0
	1	41	7		3	35	11		2	43	12		0	0	0
	1	43	6		2	37	13		2	45	10		0	0	0
EX 7	1	36	9	7	4	35	11	7	0	0	0	EX 7	0	0	0
	2	40	11		3	37	11		0	0	0		6	49	9
	2	36	10		3	38	7		0	0	0		5	47	10
	1	35	8		5	37	10		0	0	0		7	45	16
	2	33	7		2	36	8		0	0	0		3	46	10
	2	33	8		1	37	9		0	0	0		5	45	8
	2	33	8		0	0	0		0	0	0		5	48	9
EX 8	0	0	0	8	0	0	0	EX 8	0	0	0	8	0	0	0
	0	0	0		3	37	11		0	0	0		6	49	9
	0	0	0		3	38	7		0	0	0		5	47	10
	0	0	0		5	37	10		0	0	0		7	45	16
	0	0	0		2	36	8		0	0	0		3	46	10
	0	0	0		1	37	9		0	0	0		5	45	8
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		5	48	9
9	1	42	8	EX 9	0	0	0	9	3	51	14	EX 9	0	0	0
	1	40	6		0	0	0		3	52	12		0	0	0
	2	43	4		0	0	0		3	51	15		0	0	0
	2	41	8		0	0	0		3	50	13		0	0	0
	2	45	8		0	0	0		2	47	14		0	0	0
	2	46	7		0	0	0		2	50	16		0	0	0
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0
EX 10	1	37	11	10	2	37	6	EX 10	0	0	0	EX 10	0	0	0
	1	34	4		1	34	5		0	0	0		0	0	0
	1	33	5		2	36	6		0	0	0		0	0	0
	0	0	0		1	37	7		0	0	0		0	0	0
	0	0	0		1	35	5		0	0	0		0	0	0
	0	0	0		3	35	6		0	0	0		0	0	0
	0	0	0		0	0	0		0	0	0		0	0	0

V = vasos sanguíneos; F = fibroblastos; CI = células inflamatórias; EX = animal excluído

