

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA  
BUCOMAXILOFACIAL

VLADIMIR DOURADO POLI

**ANÁLISE DO TEMPO E DA FLUÊNCIA DA  
LLLT NO PROCESSO DE REPARO DE  
FERIDAS EM DORSO DE RATOS**

**ANALYSIS OF TIME AND LLLT FLUENCY ON  
SKIN WOUND HEALING IN RATS**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gerhardt de Oliveira

Orientadora

Porto Alegre  
2010

VLADIMIR DOURADO POLI

ANÁLISE DO TEMPO E DA FLUÊNCIA DA LLLT NO PROCESSO DE REPARO DE  
FERIDAS EM DORSO DE RATOS

ANALYSIS OF TIME AND LLLT FLUENCY ON SKIN WOUND HEALING IN RATS

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

**Orientadora:** Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira

Porto Alegre  
2010

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

P766a Poli, Vladimir Dourado

Análise do tempo e da fluência da LLLT no processo de reparo de feridas em dorso de ratos / Vladimir Dourado Poli. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

93 f.: il. graf. tab.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Gerhardt de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Doutorado. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

**English title:** Analysis of time and LLLT fluency on skin wound healing in rats.

**Medical Subjects Headings:** LASER THERAPY, LOW LEVEL; WOUND HEALING; DOSIMETRY;  
LASERS ; WOUNDS AND INJURIES; SKIN /injuries;  
ANIMAL EXPERIMENTATION; RATS; CORRECTIVE MAINTENANCE.

**Thesis:** PhD in Dentistry

**Adviser:** Marília Gerhardt de Oliveira, PhD



*Dedicatória*

---

Para Fernanda, minha esposa.

Para Marcelino, meu pai.

Para Nardila, minha mãe.

Para Débora, minha irmã.



*Agradecimientos*

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**, colega que sempre me apóia, incentiva e me acompanha em todas as fases de minha vida acadêmica.

Ao meu consultor de pesquisa, **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, pela amizade, pelos ensinamentos diários e pela ajuda indispensável para com este trabalho.

Em particular, ao **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, colega e amigo, pelo constante apoio profissional e pela grande qualificação prestada a este Programa.

Também em particular, ao **Prof. Dr. Raphael Carlos Drumond Loro**, pelo constante apoio e confiança profissional para comigo.

Em especial, à minha esposa, **Fernanda**, pelo apoio constante em minha vida, em todos seus aspectos.

## AGRADECIMENTOS

---

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS**, representada pelo Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Joaquim Clotet**.

À **Faculdade de Odontologia da PUCRS**, representada pelo seu Excelentíssimo Diretor, **Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, por capacitar a realização deste Curso.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa do **Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo**.

À **CAPES**, por viabilizar recursos para a realização deste Curso de Doutorado em Odontologia, na área de concentração em CTBMF.

Aos **Professores do Curso de Doutorado em CTBMF**, pelo empenho e dedicação demonstrados na qualificação de profissionais, investindo no ensino e na pesquisa.

Aos meus **colegas de Doutorado** em CTBMF.

Aos colegas-professores do Curso de Especialização em CTBMF, **Dra. Ângela Ehlers Bertoja, Dr. Cláiton Heitz, Dr. Fernando Santos Cauduro, Me. Guilherme Genehr Fritscher, Dr. Manoel Sant'Ana Filho, Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, Dr. Raphael Carlos Drumond Loro, Dr. Rogério Belle de Oliveira, Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli, Me. Tomás Geremia, Dr. Vinicius Nery Viegas**, pelo convívio diário gratificante e enriquecedor.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS**.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia, **Ana, Davenir, Marcos e Carlos**, pela disponibilidade, alegria, atenção e presteza para comigo.

Ao **Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS**, representado por seu chefe, **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**.

À **Vanessa**, funcionária do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, pelo brilhante trabalho na preparação e confecção das lâminas.

À cirurgiã-dentista, **Daniela Elisa Miotto**, por sua ajuda indispensável na parte prática deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Feliz Duarte de Moraes**, pelo apoio junto à parte estatística deste trabalho.

A **Profa. Dra. Fernanda Bueno Morrone**, Coordenadora do Vivário da Faculdade de Farmácia da PUCRS, pela colaboração e disponibilização deste vivário.





*Resumo*

---

## RESUMO

---

O presente estudo teve como propósito comparar, em diferentes tempos, diferentes fluências do *laser* vermelho de fosfeto de índio-gálio-alumínio ( $\lambda=685$  nm) sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas padronizadas em dorso de ratos. Foram realizadas duas feridas cirúrgicas em 36 ratos, sendo uma tratada com *laser* e a outra servindo como controle. Os ratos foram divididos em três grupos. No grupo um, as irradiações foram realizadas com dosimetria equivalente a média das doses mais utilizadas nas pesquisas recentes, determinada como  $8 \text{ J/cm}^2$ . O grupo dois foi irradiado com o dobro da dose de energia, ou seja,  $16 \text{ J/cm}^2$ , e o grupo três com metade da dose, ou  $4 \text{ J/cm}^2$ . As irradiações foram realizadas imediatamente após o término da cirurgia, em 48 horas, em quatro e sete dias, e os animais foram mortos aos quatro, sete e nove dias. Portanto, cada animal recebeu, na dependência de sua morte, duas, três ou quatro irradiações. As lesões foram excisadas e analisadas em microscopia óptica. Foram realizadas análises histomorfométricas, considerando as medidas entre as bordas epiteliais, e análises histomorfológicas. Verificou-se, utilizando-se o teste t pareado, que houve diferença significativa ( $p = 0,004$ ) entre os valores referentes às médias das medidas entre as amostras teste e controle. Ao se analisar as doses de energia utilizadas ( $4, 8$  e  $16 \text{ J/cm}^2$ ) e o tempo de observação dos animais (quatro, sete e nove dias), verifica-se que não houve diferença em relação ao fator fluência, mas ocorreu quanto ao fator tempo, sendo as alterações mais evidentes nos momentos iniciais (quatro dias) do processo de reparo. A partir das análises histomorfométrica e histomorfológica, este estudo demonstrou que a terapia a *laser* em baixa intensidade (LLLT) aumenta a velocidade de cicatrização em ferimentos produzidos em dorso de ratos quando irradiados com o *laser* de fosfeto de índio-gálio-alumínio ( $\lambda = 685$  nm). Não há diferenças entre as doses de energia utilizadas ( $4, 8$  e  $16 \text{ J/cm}^2$ ), mas há em relação ao fator tempo, sendo as alterações evidenciadas nos momentos iniciais da cicatrização.

**Descritores:** *Laser*. Cicatrização de feridas. Dosimetria. Tempo. Ratos.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> DeCS/MeSH – Descritores em Ciências da Saúde/ Medical Subject Headings, disponível em <http://decs.bvs.br>



*Abstract*

---

## ABSTRACT

---

This study aimed to compare the effects of different fluencies of indium-gallium-aluminum phosphide *laser* ( $\lambda = 685 \text{ nm}$ ) on skin wound healing in rats. Thirty six male rats were used, divided in three groups of 12 animals each. Two standardized skin wounds were created on the back of each animal, one treated with *laser* and the other serving as control. In group 1, the irradiations were performed with a dosimetry equivalent to average doses used in most recent polls, determined as  $8 \text{ J/cm}^2$ . The second group was irradiated with twice the dose of energy ( $16 \text{ J/cm}^2$ ) and group 3 with half the dose ( $4 \text{ J/cm}^2$ ). The irradiations were performed immediately after surgery, in 48 hours, on 4 and 7 days, and the animals were killed at 4, 7 and 9 days. Therefore, each animal received, depending on his death, two, three or four irradiations. The healing tissues were excised and analyzed with optical microscopy. Histomorphometric analysis was performed, considering the measures between the epithelial edges, and histomorphological analysis. Using the paired t-test, there was a significant difference ( $p = 0.004$ ) between values referring to the average of the measures between the test and control samples. When analyzing the energy doses used ( $4, 8$  and  $16 \text{ J/cm}^2$ ) and time of observation of the animals ( $4, 7$  and  $9$  days), it appears that there was no difference in the fluency factor, but it occurred on the time factor, with changes most evident in the early stages ( $4$  days) of the healing process. Based on histomorphologic and histomorphometric analysis, this study demonstrated that the Low Level *Laser* Therapy (LLLT) increases the rate of wound healing in rats when irradiated with indium-gallium-aluminum phosphide *laser* ( $\lambda = 685 \text{ nm}$ ). There are no differences between fluencies used ( $4, 8$  and  $16 \text{ J/cm}^2$ ), but the time factor seems to be relevant, with changes most evident in the early stages of the healing.

Descriptors: *Laser*. Wound healing. Dosimetry. Time. Rats. <sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> DeCS/MeSH – Descritores em Ciências da Saúde/ Medical Subject Headings, disponível em <http://decs.bvs.br>



## *Lista de Figuras e Quadro*

---

## LISTA DE FIGURAS E QUADRO

---

	Páginas
<b>Figura 01:</b> Espécimes mantidos em gaiolas.....	42
<b>Figura 02:</b> Tricotomia da região.....	46
<b>Figura 03:</b> Posicionamento do <i>punch</i> .....	46
<b>Figura 04:</b> Demarcação da lesão através do <i>punch</i> .....	47
<b>Figura 05:</b> Utilização de lâmina de bisturi para dissecção do tecido.....	48
<b>Figura 06:</b> Lesão padronizada na região dorsal dos ratos.....	48
<b>Figura 07:</b> Laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (In-Ga-Al-P) THERA LASE <sup>®</sup> , da marca DMC <sup>®</sup> .....	49
<b>Figura 08:</b> Irradiação com laser de In-Ga-Al-P.....	50
<b>Figura 09:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X demonstrando a medição entre as margens epiteliais, a predominante zona de tecido de granulação e o epitélio.....	55
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra sem tratamento com laser e morte do animal em nove dias (grupo IIC, controle).....	64
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com 16 J/cm <sup>2</sup> e morte do animal em nove dias (grupo IIC, teste).....	65
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com 8 J/cm <sup>2</sup> e morte do animal em quatro dias (grupo IA, teste).....	67
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com 8 J/cm <sup>2</sup> e morte do animal em sete dias (grupo IB, teste).....	68
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografia em aumento original de 2 X (a), 10 X (b) e 20 X (c) de uma amostra tratada com 8 J/cm <sup>2</sup> e morte do animal em nove dias (grupo IC, teste).....	69
<b>Figura 15:</b> Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com 4 J/cm <sup>2</sup> e morte do animal em nove dias (grupo IIIC, teste).....	71
<b>Quadro 01:</b> Organização dos grupos.....	43



## *Lista de Tabelas e Gráfico*

---

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

---

	Páginas
<b>Tabela 01:</b> Autores, revista de publicação, fator de impacto da revista, comprimento de onda e fluência dos <i>lasers</i> dos artigos utilizados para definição da fluência utilizada neste estudo.....	51
<b>Tabela 02:</b> Medições entre as bordas epiteliais.....	59
<b>Tabela 03:</b> Diferença entre as medidas do processo de reparo das feridas cutâneas.....	60
<b>Tabela 04:</b> Estimativa para a variável dependente diferença, segundo o fator grupo.....	60
<b>Tabela 05:</b> Estimativa para a variável dependente diferença, segundo o fator tempo.....	60
<b>Tabela 06:</b> Diferença entre as medidas das amostras teste e controle.....	61
<b>Tabela 07:</b> Média, desvio padrão e erro padrão da média das amostras teste e controle por tempo de morte dos animais.....	62
<b>Tabela 08:</b> Média, desvio padrão, média do erro padrão e significância dos valores referentes à diferença entre as medidas entre as amostras teste e controle separados por tempo de morte dos animais.....	62
<b>Gráfico 01.</b> Medidas teste e controle por grupos.....	61





## *Sumário*

---

## SUMÁRIO

---

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	21
2.1. REPARO TECIDUAL.....	22
2.2. <i>LASERS</i> .....	26
2.3. INTERAÇÃO DA LUZ <i>LASER</i> COM OS TECIDOS BIOLÓGICOS.....	28
2.4. LITERATURA ATUAL SOBRE COMPRIMENTOS DE ONDA E FLUÊNCIAS DE LLLT EM CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM DORSO DE RATOS.....	34
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	40
3.1. CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
3.2. ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	42
3.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	44
3.4. MATERIAL E INSTRUMENTAL.....	44
3.5. TÉCNICA CIRÚRGICA.....	45
3.6. IRRADIAÇÃO A <i>LASER</i> .....	49
3.6.1 Parâmetros de irradiação utilizados.....	51
3.7. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	53
3.8. PROCESSAMENTO E ESTUDO HISTOLÓGICO.....	54
<b>4 RESULTADOS</b> .....	57
4.1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	58
4.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA.....	63
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
<b>APÊNDICE</b> .....	89
APÊNDICE A: Medidas de massa dos animais.....	90
<b>ANEXOS</b> .....	91
ANEXO A: Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS.....	92
ANEXO B: Aprovação do Projeto de Tese pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCRS.....	93



# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

Uma das áreas da saúde mais interessantes e atuais diz respeito ao estudo das interações dos diversos tipos de *lasers* com os tecidos biológicos, compreendendo inúmeras pesquisas a fim de avaliar benefícios e possíveis efeitos adversos desta técnica (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

O reparo tecidual e a cicatrização de feridas na pele são processos complexos que envolvem uma série de eventos dinâmicos, incluindo coagulação, inflamação, formação de tecido de granulação, contração do ferimento e remodelação tecidual. Assim, nas últimas décadas, inúmeros estudos e pesquisas foram realizados para investigar o uso da terapia a *laser* em favorecimento do reparo tecidual (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Muitos benefícios estão associados à biomodulação através da terapia a *laser* em baixa intensidade (*Low Level Laser Therapy* – LLLT). Segundo Belkin e Schwartz (1989), os efeitos requerem um limiar de exposição à irradiação, ou seja, dependendo do efeito desejado é calculada a fluência, ou dose de energia, necessária. O limiar é específico e cada tecido responde de maneira diferente a um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ ). De acordo com a fluência, é possível ter estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Altas doses de energias, dentro de limites específicos para cada combinação tecido-*laser*, podem gerar prejuízo; logo, os efeitos são dose-dependentes (BELKIN; SCHWARTZ, 1989).

Tal relação, todavia, não é simples, mas é relatada para a maioria das irradiações e dos parâmetros teciduais. Desse modo, pesquisas com diferentes fluências das relatadas na literatura atual, assim como com variabilidade no tempo observacional, são de extrema valia para a comunidade científica, possibilitando a observação das diferentes reações do tecido frente a essas modificações de fluências e de tempo.

Com o propósito de verificar a ação local do *laser* vermelho de fosfeto de índio-gálio-alumínio ( $\lambda=685$  nm) sobre o processo de reparo em feridas cutâneas padronizadas em dorso de ratos, realizou-se esta pesquisa, a qual teve por objetivos

específicos comparar as feridas cutâneas irradiadas com o *laser* de fosfeto de índio-gálio-alumínio com fluência de  $8 \text{ J/cm}^2$  com as feridas irradiadas com fluências de 4 e  $16 \text{ J/cm}^2$  nos tempos de quatro, sete e nove dias de observação e verificar com qual dose de energia e em qual tempo as feridas cutâneas respondem melhor, considerando o processo de reparo das mesmas.



*Fundamentação Científica*

---

## 2 FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

---

### 2.1 REPARO TECIDUAL

Zanini (1990) classifica as feridas de acordo com a sua etiologia: trauma, agentes físicos e químicos e microrganismos patogênicos. Ainda segundo esse autor, nas reações regenerativas das feridas ocorre uma substituição do tecido lesado por outro do mesmo tipo, sobrevivendo à cicatrização da ferida.

O processo de reparo de feridas é um fenômeno biológico fundamental compreendendo os inúmeros aspectos de proliferação celular, diferenciação celular, síntese e secreção de proteínas, proteoglicanos e outras substâncias extracelulares, assim como o processo inflamatório em seus vários parâmetros. O estado de saúde geral do indivíduo influencia diretamente todos estes processos (ROSS, 1971).

Inúmeros são os fatores que podem interferir na velocidade do reparo de ferimentos, a saber: imunossupressão, desnutrição, doenças malignas, idade avançada, diabetes e isquemias decorrentes de doenças vasculares (JAMES, 1994).

Kwon e Laskin (1997) salientam a importância de seguir meticulosamente os princípios gerais para os cuidados das feridas. Para tanto, é necessário completo conhecimento da anatomia regional e da fisiologia, inspeção cuidadosa e palpação da lesão, debridamento de corpos estranhos e restos necróticos, hemostasia local, manuseio cauteloso do tecido, fechamento por planos e sem tensão tecidual e, quando possível, aproximação das bordas.

Segundo Robbins (2003), o crescimento e a diferenciação celular são decisivos no processo de reparação tecidual. Logo após a lesão, os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a proliferar para formar, em três a cinco dias, o tipo especializado de tecido que é a característica da cicatrização: o *tecido de granulação*.

A denominação tecido de granulação deve-se a sua aparência rósea, de consistência amolecida e granular, localizado na superfície das feridas. Entretanto, é seu aspecto microscópico que é característico:

a) Proliferação de novos pequenos vasos sanguíneos, originando-se por brotamento ou geminação de vasos preexistentes, um processo denominado *angiogênese* ou *neovascularização*. Este processo, por sua vez, apresenta quatro etapas:

- a.1) Degradação proteolítica da membrana basal do vaso original para permitir a formação de um brotamento capilar e posterior migração celular;
- a.2) Migração de células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico;
- a.3) Proliferação de células endoteliais, imediatamente atrás das células migratórias líderes, e;
- a.4) Maturação de células endoteliais e organização nos tubos capilares.

Estes novos vasos possuem junções interendoteliais com extravasamento, permitindo a passagem de proteínas e hemácias para o espaço extracelular. Assim, o novo tecido de granulação frequentemente se apresenta edemaciado. Este é o fenômeno responsável pela permanência do edema mesmo muito tempo após diminuir a resposta inflamatória aguda.

b) Proliferação de fibroblastos, ou *fibroplasia*; e

c) Celularidade: macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e mastócitos (ROBBINS et al., 2003)

Fonseca e Walker (1991) e Barros e Souza (2000) dividem o reparo de ferimentos em tecidos moles em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. A fase inflamatória é responsável pelo aumento na permeabilidade capilar e afluxo de células sanguíneas para a região da ferida; durante a fase proliferativa, os fibroblastos afluem para o local da ferida acompanhados por notável proliferação endotelial. E, por último, a fase de maturação corresponde à migração epitelial.

O tecido epitelial é constituído pelas células epiteliais, as quais estão em íntimo contato entre si. Revestindo as superfícies externas do corpo, oferecem a proteção e a impermeabilidade necessárias, apresentando-se, por este motivo, em diversas camadas nesses locais. Em virtude de sua localização e organização, os epitélios apresentam uma superfície livre, em que não existem elementos aderentes



de natureza celular ou extracelular, e uma superfície oposta, contígua ao tecido conjuntivo subjacente e aderida à membrana basal (ROSS et al., 1993).

Estruturalmente, ROSS et al. (1993) classificam o tecido epitelial da pele como *estratificado*, ou seja, constituído por duas ou mais camadas de células. Estas, por sua vez, apresentam-se com forma cilíndrica, caracterizada por apresentarem sua altura bem maior que a sua largura e seu comprimento.

O epitélio lesado tem uma capacidade regenerativa que lhe permite restabelecer a sua integridade por meio de migração e de um processo conhecido como *inibição de contato*. Em geral, uma borda livre do epitélio continua a migrar, através da proliferação de células germinativas do epitélio que empurram a borda livre adiante, até que entre em contato com a outra borda livre de epitélio, onde então se sinaliza para parar de crescer lateralmente (PETERSON et al., 2005).

Feridas em que apenas a camada superficial foi lesada (abrasões) cicatrizam pela migração do epitélio através do leito da ferida. Tendo em vista que o epitélio normalmente não contém vasos sanguíneos, nos casos em que o tecido subepitelial também foi atingido, o epitélio migra através de qualquer camada de tecido vascularizado que esteja disponível, ficando abaixo da porção do coágulo superficial que resseca (forma uma crosta), até que alcance outra margem epitelial. Uma vez que a ferida esteja completamente epitelizada, a crosta se desprende e é eliminada (PETERSON et al., 2005).

É tradicional e fundamental estabelecer a distinção entre a cicatrização de um ferimento inciso, com margens opostas bem delimitadas (*cicatrização por primeira intenção* ou *união primária*) de um ferimento lacerado, com bordas irregulares e separadas (*cicatrização por segunda intenção* ou *união secundária*) (ROBBINS, 1969).

Em ferimentos humanos de bordas bem-aproximadas, na qual a cicatrização é por primeira intenção, a hemorragia e a formação de um hematoma rico em fibrina e fibronectina são acompanhadas por inflamação aguda e dissolução do colágeno. No período de 24 horas após a lesão, as células epiteliais migram da epiderme adjacente e invadem o coágulo, os neutrófilos aparecem nas bordas da incisão e a epiderme sofre espessamento em suas bordas seccionadas em consequência da atividade mitótica das células basais. Dentro de 48 horas esporões de células epiteliais das bordas migram e crescem ao longo das bordas seccionadas

da derme. No terceiro ou quarto dia, o tecido de granulação invade o ferimento e tem início a deposição de colágeno. Em aproximadamente 15 dias, há um acúmulo contínuo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocítico, edema e aumento da neovascularização diminuem bastante. E, em cerca de 30 dias, é possível evidenciar um paralelismo entre a resistência tênsil e o conteúdo de colágeno do ferimento. O tecido de granulação impede a migração epitelial em direção à profundidade do ferimento, ocorrendo degeneração dos esporões epiteliais iniciais. As células epiteliais, na superfície, dividem e diferenciam-se, restaurando, assim, um epitélio estratificado. À medida que ocorre a reorganização vascular no tecido de granulação, a cicatriz reduz a sua dimensão e altera sua cor, de avermelhado para branco (ROBBINS, 1969).

Quando ocorre extensa perda de tecido ou simplesmente um fracasso na aproximação das bordas, o processo de reparo é mais complicado. A regeneração das células parenquimatosas não pode reconstruir completamente a arquitetura original. O tecido de granulação abundante cresce da borda para completar o reparo. Esta é a forma de cicatrização por segunda intenção. O denominador comum nestas situações é uma grande falha tecidual que deve ser preenchida (JAMES, 1994).

Robbins et al. (2003) citam 3 distinções significativas entre as cicatrizações secundárias e primárias:

- a) Grandes falhas teciduais inicialmente possuem mais fibrina, resíduos necróticos e exsudato, os quais devem ser removidos;
- b) Quantidades muito maiores de tecido de granulação são formadas, e;
- c) Fenômeno da *contração da ferida*. A contração é atribuída à presença de miofibroblastos, que são, na verdade, fibroblastos alterados e que possuem vários aspectos ultra-estruturais e funcionais das células musculares lisas contráteis.

De acordo com os resultados obtidos por Gloster (2001), em uma análise do reparo por segunda intenção em região de vermelhão de lábio após cirurgia para remoção de carcinoma de células escamosas, o reparo por segunda intenção deve ser fortemente considerado para o reparo de defeitos superficiais envolvendo mucosa labial e/ou mucosa de transição do lábio que não se estendam para a porção do músculo orbicular da boca. Esse tipo de cicatrização apresentou

resultados estéticos de bons a excelentes em 12 dos 13 casos avaliados, sem impedimento funcional ou complicações pós-operatórias.

## 2.2 LASERS

A palavra LASER é um acrônimo e é composta pelas iniciais de *L*ight *A*mplification by *S*timulated *E*mission of *R*adiation, ou seja, “amplificação da luz por emissão estimulada de radiação”.

Em 1960, Theodore Maiman, baseado na teoria quantitativa da luz, nos conceitos de emissão estimulada, absorção estimulada, decaimento espontâneo e, principalmente, na teoria específica do *laser* – amplificação da luz por emissão estimulada – desenvolve o primeiro *laser* (FREIRE Jr. et al., 1997). Este equipamento foi construído com uma barra de rubi sintético, que produzia a ação *laser*, ou emissão *laser*, quando uma luz comum intensa, por meio de bombeamento, incidia sobre essa barra (HELLWARTH, 1961).

Para entender alguns princípios da luz *laser* é importante o conhecimento de algumas características presentes em todos os tipos de luz.

A luz pode ser descrita como uma onda eletromagnética e, como tal, apresenta algumas características ondulatórias que a identificam plenamente (MELLO; MELLO, 2001).

Esta onda tem uma característica importante chamada de comprimento de onda, que nada mais é do que a distância medida entre dois picos consecutivos desta trajetória. É o comprimento de onda que define a cor da luz. A unidade utilizada para a medição deste comprimento é uma fração do metro, o nanômetro (nm), que é equivalente a  $10^{-9}$  metro. Essa característica, juntamente com a frequência e a amplitude, define a luz dentro do espectro completo de ondas eletromagnéticas (DEDERICH, 1993).

Fóton é a menor unidade da luz que é composta por um número inteiro de fótons, ou quanta de luz. Este fóton é um quantum de energia eletromagnética com polarização, direção e comprimento de onda únicos (FREIRE Jr. et al., 1997).

Segundo Mello e Mello (2001), além das características de comprimento de onda, frequência e amplitude, os *lasers* apresentam três propriedades específicas:

- **monocromaticidade**: apresenta grande pureza espectral, ou seja, cada cor é constituída de fótons de mesmo comprimento de onda e frequência, apresentando coerência temporal;

- **colimação**: os fótons viajam em uma única direção e de forma paralela, sem divergências significativas, até mesmo em grandes distâncias; e

- **coerência**: os fótons caminham em fase uns com os outros, no tempo e no espaço, e na mesma direção.

A coerência manifesta-se, simultaneamente, pela monocromaticidade (coerência temporal) e pela frente de onda unifásica (coerência espacial), permitindo que o feixe *laser* seja focalizado em regiões extremamente pequenas, até o limite teórico do comprimento de onda do *laser* (KUTSCH, 1993; RENSON, 1989).

Para uso odontológico, algumas propriedades do *laser* são úteis. A coerência temporal possibilita a emissão em um único comprimento de onda, permitindo a absorção da luz *laser* apenas por tecidos ou células (moléculas) desejadas como, por exemplo, água, hemoglobina, melanina, etc, minimizando possíveis efeitos adversos. A coerência espacial, por sua vez, possibilita concentrar em uma pequena área altas potências ou energias, permitindo um trabalho extremamente preciso e com proteção das estruturas vizinhas (POLI, 2006).

De acordo com Mello e Mello (2001), os raios absorvidos podem causar ou produzir diversas situações:

a) reações químicas (provocar transformação química), rompendo as ligações químicas;

b) oxidação calórica;

c) recombinação de elétrons;

d) ionização de átomos e/ou moléculas;

e) colisão de átomos e elétrons e;

f) excitação de átomos e/ou moléculas.

## 2.3 INTERAÇÃO DA LUZ *LASER* COM OS TECIDOS BIOLÓGICOS

Quando se discute a interação de um feixe *laser* com um tecido biológico, deve-se levar em consideração tanto as propriedades e os parâmetros da radiação *laser* como as propriedades térmicas e ópticas dos tecidos (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004; FETHERSTONE et al., 1998).

Os parâmetros e as propriedades do feixe *laser*, diretamente relacionados com a interação com os tecidos biológicos, são os seguintes:

- a) comprimento de onda do *laser*;
- b) fluência ou dose de energia;
- c) modo de ação do *laser*: contínuo, interrompido, pulsado ou *Q-switch*;
- d) potência e intensidade do *laser*;
- e) taxa de repetição ou frequência;
- f) área focalizada do feixe *laser* (densidades de energia e de potência);
- g) duração do pulso;
- h) quantidade de energia fornecida;
- i) modo de entrega: fibra óptica ou braço articulado (mais usados);
- j) modo de aplicação: com ou sem contato, focalizado ou não, em movimentos circulares ou sem deslocamento;
- k) presença ou não de sistema de refrigeração;
- l) tempo de exposição (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Em relação às propriedades ópticas e térmicas dos tecidos devem ser consideradas as seguintes:

- a) propriedades ópticas:
  - coeficiente de absorção;
  - coeficiente de reflexão;
  - coeficiente de espalhamento;
- b) propriedades térmicas:
  - condutividade térmica;
  - capacidade térmica (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

A luz *laser* interage com os tecidos biológicos basicamente de quatro formas: parte da luz é refletida; parte da luz pode ser transmitida através do tecido

sem atenuação; parte da luz pode ser absorvida pelos componentes do tecido, ocasionando, no caso dos processos ressonantes, uma transferência de energia para o tecido; e, finalmente, parte da luz pode ser espalhada dentro do tecido, podendo ocasionar interação em locais distantes da região de aparente propagação da luz (KARU, 1999).

É importante salientar que, quando se fala em feixe *laser*, na realidade, para considerar a interação com o tecido biológico, leva-se em conta um único átomo ou molécula ou, ainda, um conjunto deles, mas restrito a um único elétron e um único fóton. Para que a interação seja efetiva, os fótons oriundos dos equipamentos *laser* devem poder ser absorvidos pelos elétrons dos átomos do tecido-alvo. Se isso ocorrer, ou seja, o chamado processo de absorção, diz-se que o comprimento de onda do *laser* é ressonante com o tecido biológico irradiado (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Então, a partir da penetração dos fótons no tecido, os processos passam a ocorrer: alguns fótons isolados da luz *laser* atravessam o tecido sem produzir nenhuma reação, processo este denominado de transmissão, ou esses fótons sofrem espalhamento, caso em que mudam de direção. É possível que parte desses fótons incidentes que sofreram espalhamento voltem para a mesma direção da entrada dos raios (KARU, 1999).

Transmissão refere-se, portanto, à habilidade da energia em difundir-se por meio do tecido sem nenhum efeito. Essa habilidade, no entanto, está diretamente relacionada com o tipo de tecido e o comprimento de onda. A energia pode transmitir-se até alcançar um tecido específico, no qual as características de absorção ocorram. Só então algum efeito poderá ser observado (MELLO; MELLO, 2001).

O espalhamento da energia *laser*, no interior do tecido, é o resultado da reflexão aleatória da energia do seu ângulo original. Por exemplo, a energia luminosa, na região infravermelha, espalha-se de forma reduzida. Já a luz, na porção visível do espectro, apresenta maior espalhamento (MELLO; MELLO, 2001).

Outro processo que acontece após a penetração dos raios na intimidade dos tecidos é a refração. Esta sempre ocorre quando a luz passa de um meio para outro. Segundo O'Brien et al. (1989), a velocidade do feixe é alterada e se a incidência do raio não for perpendicular à superfície do tecido, o mesmo é desviado.

A partir da penetração dos fótons no tecido, no entanto, o processo mais relevante, para que ocorra a interação *laser*-tecido, é o fenômeno de absorção (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Quando um fóton incide sobre uma molécula, sua energia pode ser absorvida, levando a molécula ao seu estado excitado. Ela sofre, então, uma colisão inelástica (com perda de energia) com um vizinho – que pode ser um elétron, um átomo ou outra molécula – transferindo parte da sua energia e decaindo para um estado de energia mais baixo. A quantidade de energia presente na molécula excitada pelo fóton, somada à energia cinética da partícula vizinha, representa o aumento de agitação térmica dessa partícula vizinha e, conseqüentemente, o pequeno aumento de temperatura ocorrido pela absorção de energia do fóton (MCKENZIE, 1990).

Absorção e espalhamento são caracterizados pelos coeficientes de absorção ( $\mu_a$ ) e de espalhamento ( $\mu_s$ ) e representam, respectivamente, a taxa de perda de energia da radiação por unidade de comprimento de penetração, devido à absorção e ao espalhamento de fótons. Esses dois coeficientes são específicos para cada tecido e para cada comprimento de onda (MULLER et al., 1990).

Os elementos do tecido que exibem um alto coeficiente de absorção de um particular comprimento de onda, ou por uma região do espectro eletromagnético, são chamados de cromóforos. Desse modo, os cromóforos exercem papel fundamental sobre a interação da radiação com o tecido (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

A absorção da luz pela água é de fundamental importância para a aplicação dos *lasers* nas áreas biomédicas por ser o corpo humano, em grande parte, constituído por este elemento. O alto teor de água na composição dos tecidos é que determina o uso predominante dos *lasers*, emitindo no espectro infravermelho, quando se busca uma interação ressonante desse comprimento de onda com a molécula da água. Outros cromóforos, como a melanina, adenina, hemoglobina e proteínas, apresentam-se mais ressonantes com radiação *laser* emitida no espectro da luz vermelha (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Mello e Mello (2001) afirmam que a absorção depende da composição do tecido, da pigmentação e do conteúdo de água do mesmo.

Denomina-se feixe o conjunto de raios de luz que partem de uma mesma fonte. Sendo assim, chama-se a luz emergente do sistema *laser* de feixe *laser* de saída (MCKENZIE, 1990).

Os efeitos do feixe *laser* são devidos, essencialmente, a essa energia transferida dos fótons incidentes ao tecido, durante o processo de absorção. É de fundamental importância a característica do tecido quanto à sua capacidade de dispersão da luz, pois é ela que determina os locais onde se processa a absorção (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Essa interação da energia do *laser* com o tecido é determinada por três fatores principais: quantidade de energia depositada pelo *laser* no tecido, distribuição dessa energia no espaço, ou seja, o volume de absorção, e por seu tempo de permanência em contato com o tecido. Portanto, é de se esperar que os tecidos altamente absorventes apresentem volumes de absorção pequenos, pois o feixe não penetra em profundidade (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Dessa forma, para o presente trabalho, os seguintes parâmetros são importantes:

▪ **Área do feixe (A):**

É medida em centímetros quadrados (cm<sup>2</sup>) e é definida pela equação:

$$A = \pi \cdot r^2,$$

onde r é o raio do feixe *laser* em centímetros (cm).

Normalmente, costuma-se medir o diâmetro do feixe ( $\emptyset$ ), o qual pode ser também denominado de *spot size*, ou tamanho da mancha. Sabendo-se que o raio é a metade do diâmetro ( $r = \emptyset / 2$ ), tem-se:

$$A = \pi \cdot \left(\frac{\emptyset}{2}\right)^2$$

▪ **Tempo de exposição ( $\Delta t$ ):**

É o tempo de duração da exposição da amostra à radiação *laser* ou tempo total da interação *laser*-tecido, sendo medido em segundos (s).



▪ **Frequência:**

A frequência de uma onda é sua taxa de oscilação, onde um Hertz é igual a uma oscilação por segundo. A unidade é o Hertz (Hz).

▪ **Energia (E):**

É medida em Joule (J), que corresponde a W.s, e é definida multiplicando-se a potência pelo tempo de exposição.

$$E = P \cdot \Delta t$$

▪ **Potência (P):**

É medida em Watts (W), que corresponde a J/s, e é a quantidade de energia depositada por unidade de tempo em um dado processo.

$$P = \frac{E}{\Delta t}$$

▪ **Intensidade do campo ou densidade de potência ou densidade de fluxo emitido (I):**

É medida em Watts por centímetro quadrado ( $W/cm^2$ ) e corresponde à quantidade de energia por unidade de tempo que passa por uma unidade de área. No caso, a unidade de área é expressa em  $cm^2$ .

$$I = \frac{P}{A} \quad \text{ou} \quad I = \frac{E}{\Delta t \cdot A}$$

▪ **Fluência ou densidade de energia ou dose de energia (FI):**

É medida em Joules por centímetro quadrado ( $J/cm^2$ ) e corresponde a potência do *laser* multiplicada pelo tempo de exposição e dividida pela área de interação.

$$FI = \frac{P \cdot \Delta T}{A}$$

Nos tecidos, a energia absorvida se transforma em outras formas não ópticas de energia que podem afetá-los por vários mecanismos de interação (MCKENZIE, 1990). Segundo Gutknecht e Eduardo (2004), há três grupos de interações que ocorrem nos tecidos, sendo divididas de acordo com a transformação da energia absorvida:

- a) efeitos fotoquímicos;
- b) efeitos fototérmicos; e
- c) processos não-lineares que se transformam nos dois primeiros.

Nos estudos onde são utilizados *lasers* em baixa intensidade no espectro vermelho, apenas os efeitos fotoquímicos são observados.

Esses processos fotoquímicos podem ser de diversos tipos, como a terapia fotodinâmica, a fotoindução, a fotoativação e a *biomodulação*. Tais processos são o resultado da baixa absorção de energia pelo tecido, o que possibilita a ativação de processos bioquímicos no interior da célula (GUTKNECHT; EDUARDO, 2004).

Está comprovado que, nos processos fotoquímicos, o aumento da temperatura nunca é superior a 1°C; não há choque térmico, assim como nenhuma resposta térmica é observada (MELLO; MELLO, 2001).

As pesquisas que analisam os diversos tipos de reparo das feridas consideram, principalmente, o processo da biomodulação tecidual, representado pelos efeitos antiinflamatórios, antiedematosos e de trofismo celular.

O efeito antiinflamatório da terapia a *laser* em baixa intensidade é determinado pelo aumento significativo de mastócitos em degranulação. Desse modo, há um aumento na quantidade de histamina, o que provoca alterações circulatórias locais, representadas basicamente por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Em relação às prostaglandinas, a terapia a *laser* em baixa intensidade inibe e bloqueia a ação da enzima ciclooxigenase sobre o ácido aracdônico (GENOVESE, 2000).

O efeito trófico tecidual é devido a um aumento na produção de ATP mitocondrial pela energia *laser*. O estímulo trófico provém provavelmente da união do efeito em nível circulatório com o efeito potencializador da produção de energia disponível na célula. A radiação a *laser* aumenta a neoformação capilar e a multiplicação celular (GENOVESE, 2000).

Estudos realizados por Genovese (2000) sobre alguns tecidos demonstraram os seguintes efeitos:

- aumento de fibroblastos e, como consequência, de fibras colágenas;
- regeneração de vasos sanguíneos a partir dos já existentes;
- aumento da velocidade de crescimento de nervos seccionados;
- aumento da reepitelização a partir dos restos basais, como no caso de úlceras superficiais;
- como consequência, existe um aumento do ritmo de divisão celular.

A ação antiedematosa da energia a *laser* em baixa intensidade se manifesta por meio de dois fenômenos importantes:

- a) estímulo à microcirculação (dilatação dos vasos linfáticos) que irá proporcionar melhores condições de drenagem do plasma que forma o edema; e
- b) ação fibrinolítica, que irá proporcionar resolução efetiva do isolamento proporcionado pela coagulação do plasma (GENOVESE, 2000).

De acordo com Cruañes (1994) os efeitos da LLLT levam ao aumento da microcirculação local e da drenagem linfática, proliferação celular e dos fibroblastos e, por conseguinte, aumento na síntese de colágeno. A atuação nos tecidos biológicos inicia-se com uma vasodilatação periférica, degranulação dos mastócitos, estimulação mitocondrial, aumento da produção de ATP, da síntese de prostaglandinas, histamina e heparina, levando a ação antiinflamatória. Há também um aumento da síntese de DNA e do número de mitoses, com estimulação da síntese de colágeno e aumento da proliferação fibroblástica. Consequentemente, há um aumento da velocidade de regeneração epitelial e da estimulação e aceleração do processo de osteogênese (ABERGEL et al., 1996; KARU, 1999; SILVEIRA; LOPES, 1991).

## **2.4 LITERATURA ATUAL SOBRE COMPRIMENTOS DE ONDA E FLUÊNCIAS DE LLLT EM CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM DORSO DE RATOS**

A maioria das pesquisas *in vivo* demonstra a ação do *laser* em baixa intensidade sobre a síntese e a remodelação de colágeno, o número de fibroblastos, o diâmetro e a força de tração das feridas tratadas, a viabilidade dos enxertos

tratados, a vascularização, a vasodilatação, o sistema linfático e os efeitos antibacteriano e imunológico (TRELLES et al., 1996).

Trelles et al. (1983) constataram que a aplicação do *laser*, na fluência de 2,4 J/cm<sup>2</sup> e com potência de 50 mW, em língua de ratos, provocou um aumento de 30% da histamina em relação ao grupo-controle. Já no grupo irradiado com o mesmo *laser*, porém na potência de 4 mW, foi observado um aumento de 100% no nível de histamina em relação ao grupo-controle.

Os mesmos pesquisadores, ao utilizarem cortes semifinos para microscópio e análise ultra-estrutural de língua de ratos irradiada, verificaram degranulação de mastócitos significativamente aumentada nos grupos tratados com terapia a *laser* em baixa intensidade (TRELLES et al., 1989<sup>a</sup>; TRELLES et al., 1989<sup>b</sup>).

O fluxo de sangue em capilares mesentéricos aumenta após a irradiação com *laser* não-cirúrgico. O incremento do fluxo sanguíneo pode perdurar por até 20 minutos após cessar a irradiação com o *laser*, inclusive quando a área-alvo for resfriada (BENEDICENTI, 1982; MIRÓ et al., 1984). Ainda sobre os efeitos vasculares do *laser*, em um estudo realizado com 50 animais, Lievens (1991) realizou incisões na região abdominal de ratos, irradiando-as com *laser* de He-Ne (632 nm) e de As-Ga (904 nm). O autor avaliou a adesão peritoneal pós-cirúrgica, o edema local e a regeneração de veias e vasos linfáticos na região mesentérica. Após a irradiação do mesentério, o fluxo linfático instalou-se rapidamente. A neovascularização e a regeneração dos vasos linfáticos, nos animais irradiados, foram significativamente mais rápidas que nos animais do grupo-controle. A adesão peritoneal foi escassa, nos grupos tratados com *laser*, mas normal nos grupos-controle.

Anneroth et al (1988) avaliaram o efeito do tratamento com *laser* infravermelho na cicatrização de feridas em ratos, tanto histológica quanto macroscopicamente. Para o estudo, empregaram 14 espécimes *Sprague-Dawley*, nos quais produziram duas feridas bilaterais, na região caudal de cada rato. Uma ferida em cada rato recebeu tratamento com radiação *laser*. A ferida contralateral foi mantida sem tratamento, servindo como grupo-controle. O período de observação total foi de 15 dias, sendo que, a cada dia, um animal era morto para avaliação. Os animais foram irradiados diariamente com *laser* de As-Ga (904 nm), na frequência de 500 Hz e potência de 0,5 mW, por um período de oito minutos e com uma

distância de 5 mm, até o momento de sua morte. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao período de cicatrização ou à formação de crosta. Durante o período de observação, nenhuma ferida apresentou sinais de infecção. O exame histológico também não mostrou diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e as não-tratadas. Com esse estudo, os autores não confirmaram que o uso de LLLT pode melhorar o processo de cicatrização de feridas.

Al-Watban e Zhang (1999) realizaram um estudo para definir a fluência ideal no tratamento de feridas cutâneas no dorso de ratos. Utilizaram diferentes *lasers* com diversos comprimentos de onda. Nas fluências de 10, 20 e 30 J/cm<sup>2</sup>, irradiados três vezes por semana, a que apresentou os melhores resultados foi a com 20 J/cm<sup>2</sup>. Em relação ao comprimento de onda, os melhores resultados obtidos foram os seguintes, na seguinte ordem crescente: He-Ne (632,8 nm), As-Ga-Al (780 nm), argônio (488-514 nm), As-Ga-Al (830 nm), He-Cd (442 nm) e criptônio (640-670 nm). Esta última constatação comprova que a profundidade de penetração do *laser*, a qual está relacionada com o comprimento de onda, não é proporcional aos efeitos biomodulatórios da laserterapia em ferimentos superficiais, como os gerados no dorso dos ratos.

Em outro estudo realizado por Al-Watban e Zhang (2004), foram comparados os efeitos dos *lasers* contínuo e pulsátil quando aplicados em ferimentos provocados em ratos. Os autores perceberam que a laserterapia pulsada, na fluência e na frequência apropriadas, pode levar à aceleração da cicatrização dos ferimentos. Em seus resultados, os autores mostraram que o melhor efeito na cicatrização dos ferimentos foi obtida na frequência de 100 Hz.

Com base nos resultados obtidos por Al-Watban e Zhang (1999), outras pesquisas (MENDEZ, 2002; OLIVEIRA, 2002) têm utilizado a fluência de 20 J/cm<sup>2</sup> para comparar o reparo de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos. Mendez (2002) constatou, ainda, que a associação entre os comprimentos de onda de 685 nm e 830 nm (10 J/cm<sup>2</sup> para cada) foram os que promoveram os melhores resultados no reparo de feridas cutâneas pela análise óptica utilizada.

Maegawa et al. (2000) avaliaram o efeito da LLLT na microcirculação mesentérica de ratos, *in vivo*, e na concentração sistólica de cálcio em células musculares de vasos de ratos, *in vitro*. O *laser* utilizado possuía  $\lambda = 830$  nm, sendo

utilizada a fluência de 38,2 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados mostraram uma potente dilatação das arteríolas irradiadas, o que levou a um aumento marcante na circulação sanguínea arteriolar. Os autores concluíram que as alterações circulatórias observadas parecem ser mediadas amplamente pela redução do íon cálcio intracelular nas células musculares dos vasos.

Vinck et al. (2003) avaliaram a capacidade de influenciar o aumento da proliferação de fibroblastos por meio de LED (Light Emitting Diode) e LLLT. Em culturas de fibroblastos, nas quais aplicavam LLLT e LED com vários comprimentos de ondas (950 nm, 660 nm e 570 nm), perceberam que todas as irradiações provocaram aumento da proliferação de fibroblastos, *in vitro*, sugerindo possíveis efeitos de estimulação da cicatrização do ferimento.

Maiya et al. (2005) realizaram estudo para avaliar o efeito da terapia *laser* de He-Ne (632 nm) na dinâmica da cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos. Os autores observaram que a fotoestimulação com LLLT, com correto comprimento de onda, pode melhorar o reparo tecidual por liberar fatores de crescimento dos fibroblastos e facilitar o processo de reparo de ferimentos em organismos diabéticos. Na análise dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos, os ferimentos mostraram que o grupo tratado com *laser* cicatrizou de forma melhor e mais rápida quando comparado ao grupo-controle.

Procurando comparar o efeito do *laser* em baixa intensidade no processo de cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos e não-diabéticos, Rabelo et al. (2006) realizaram um experimento utilizando *laser* de He-Ne (632 nm). Utilizaram dois grupos de animais, controle e experimental, que, por sua vez, foram subdivididos em diabéticos e não-diabéticos. Foram, então, produzidos ferimentos na pele na região dorsal e avaliaram histologicamente em períodos de quatro, sete e 15 dias. Quando compararam os componentes teciduais (células inflamatórias, vasos e áreas de fibroblastos) perceberam que os animais tratados possuíam processos inflamatórios menos intensos que os animais não-tratados.

Para avaliar a cicatrização de ferimentos em pele de ratos, Araújo et al. (2007) planejaram um experimento no qual foram realizados dois ferimentos circulares em cada animal, sendo um deles irradiado com *laser* de He-Ne (632 nm) e o outro o controle do próprio animal. Os ferimentos foram analisados nos períodos de um, cinco, oito, 12 e 15 dias de pós-operatório por análise histológica. Os

pesquisadores concluíram que as lesões irradiadas apresentaram reepitelização acelerada quando comparadas com o grupo-controle. A derme irradiada continha maior número de fibroblastos ativos que no grupo-controle, e a radiação *laser* reduziu o processo inflamatório local, além de, aparentemente, organizar as fibras colágenas na área do reparo.

Al-Watban (2009<sup>a</sup>) testou vários comprimentos de onda em ferimentos cutâneos e queimaduras em ratos normais e diabéticos. Os comprimentos de onda testados foram os seguintes: 532, 633, 810, 980 e 10.600 nm. Os autores concluíram que o comprimento de onda de 633 nm, portanto um *laser* vermelho, foi o que apresentou os melhores resultados, com melhoras entre 38.5% e 53.4% nos ferimentos cutâneos. As doses de energia utilizadas foram de 4,71 J/cm<sup>2</sup> nos ratos diabéticos e 2,35 J/cm<sup>2</sup> nos ratos normais, com 3 irradiações por semana.

Al-Watban et al. (2009<sup>b</sup>) testaram vários comprimentos de onda e fluências diferentes em queimaduras em ratos diabéticos: 532, 633, 670, 810 e 980 nm com 5, 10, 20 e 30 J/cm<sup>2</sup>, sendo 3 irradiações por semana. O percentual de cicatrização foi de 78,37% para o *laser* visível e 50,68% para os *lasers* invisíveis ( $p < 0,005\%$ ). Os autores concluíram que os *lasers* visíveis produzem melhores efeitos sobre a cicatrização de queimaduras em ratos diabéticos do que os *lasers* invisíveis.

Rocha et al. (2009) avaliaram a cicatrização cutânea em dorso de ratos com a utilização de LLLT, realizando três irradiações com 3,8 J/cm<sup>2</sup> cada. Os resultados encontrados indicaram que a LLLT pode ser um importante indutor da apoptose durante o processo de reparo tecidual. Além disso, foi demonstrado que a LLLT tem um efeito imunomodulatório na expressão sobre a TGF-beta (2) nos locais de cicatrização de feridas.

Em outro estudo, foi comparada a eficácia da LLLT com a da luz polarizada em queimaduras de segundo grau em roedores. Os *lasers* utilizados foram o vermelho (660 nm) e o infravermelho (780 nm), com 4 irradiações de 5 J/cm<sup>2</sup> e intervalos de 24 hs entre as mesmas. A análise dos resultados demonstrou que os tecidos danificados foram capazes de absorver e processar eficientemente a luz em todos os comprimentos de onda testados. A LLLT com 660 nm foi a terapia que apresentou os melhores resultados nas fases iniciais da cicatrização, demonstrando um tecido recém-formado semelhante à derme normal (OLIVEIRA et al., 2008).

Medrado et al. (2008) avaliaram a cicatrização de ferimentos cutâneos em dorso de ratos submetidos a irradiação *laser* de As-Ga-Al (670 nm). A dose de energia utilizada foi de  $4 \text{ J/cm}^2$ , com tempos de observação de 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 dias. Foi demonstrado que o *laser* foi o responsável pela redução do edema local e das células inflamatórias ( $p < 0,05$ ) e um evidente aumento do número de células actina-positivo foi também observado. Por último, os autores afirmam que o tratamento com *laser* contribuiu para melhor diferenciação e modulação em todos os grupos irradiados, sendo capaz de induzir várias alterações durante o processo de cicatrização cutânea, especialmente em fibras colágenas recém formadas, organizando-as e compactando-as.

Em outro estudo, foi investigado o comportamento celular e da matriz extracelular durante as fases da cicatrização em ferimentos cutâneos em dorso de ratos, seguidos da utilização de LLLT e de dexametasona. O *laser* utilizado foi o As-Ga-Al (670 nm) com dose de energia de  $4 \text{ J/cm}^2$ . O grupo tratado com *laser* apresentou um aumento de colágeno e melhor arranjo da matriz extracelular ( $p < 0,05$ ). Os fibroblastos nestes tecidos estavam aumentados em número e tornaram-se mais ativos. No grupo tratado somente com dexametasona, o colágeno mostrou-se desorganizado e não homogêneo, com diminuição do número de fibroblastos. No grupo tratado com ambos os tipos de terapia, os fibroblastos estavam em maior quantidade e exibiam um vigoroso retículo endoplasmático rugoso. Entretanto, o tecido apresentou menor produção de colágeno em comparação ao observado no grupo tratado exclusivamente com *laser*. Os autores concluíram que a LLLT sozinha acelera a reparação tecidual pós-cirúrgica e reduz o edema e o infiltrado polimorfonuclear mesmo na presença de dexametasona (REIS et al., 2008).

Araújo et al. (2007) investigaram as características morfológicas e funcionais da cicatrização de feridas produzidas na pele de camundongos. Foi utilizado um *laser* de He-Ne (632,8 nm), com fluência de  $1 \text{ J/cm}^2$  e tempo de exposição de 3 min. As lesões do grupo irradiado mostraram uma reepitelização mais rápida, uma derme contendo um maior número de fibroblastos ativos e redução da inflamação local, parecendo influenciar na organização das fibras colágenas na área do reparo. Os autores sugerem que a radiação *laser* pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas nesse modelo animal.





*Metodologia*

---

### 3 METODOLOGIA

---

O presente estudo foi desenvolvido de acordo com o paradigma tradicional, no *design* de estudo experimental, com grupos de trabalho selecionados de forma aleatória e controle pós-teste, tendo sido aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCRS (ANEXO B).

#### 3.1 CONFIGURAÇÃO DA AMOSTRA

O modelo animal utilizado foi o rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando de 318 a 396 gramas (**apêndice A**), clinicamente sadios. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central do Campus Universitário - Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas.

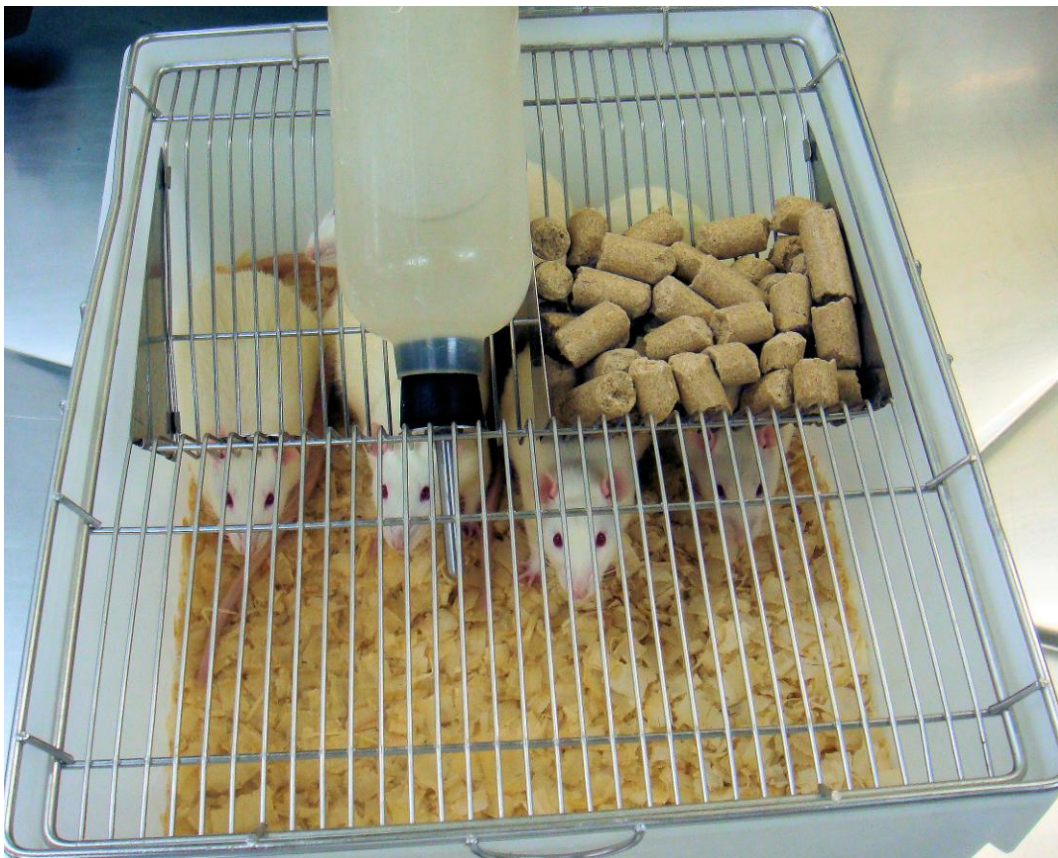
Os ratos passaram por um período de sete dias de ambientação no Vivário da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no qual permaneceram acomodados em gaiolas plásticas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação, sendo identificados e numerados de acordo com o grupo correspondente. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, e água *ad libitum*.

Respeitaram-se, aqui, os princípios éticos da experimentação animal, de acordo com a Lei Arouca (Lei N<sup>o</sup> 11.794, de 08/10/2008).

### 3.2 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS

Para determinação do tamanho da amostra deste estudo, optou-se pelo n de 12 para cada grupo, baseando-se nos estudos de Rabelo et al. (2006), Chagas-Oliveira et al. (2008), Reis et al. (2008) e Rocha et al. (2009), nos quais o n de cada grupo, seja teste ou controle, era sempre entre 08 e 15. Estas pesquisas foram realizadas em ratos, nas quais se estudou a cicatrização de feridas com a associação da LLLT e todas elas apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em três grupos distintos, com 12 animais em cada um, totalizando 36 animais. Os espécimes foram mantidos em gaiolas plásticas, com cobertura metálica e assoalho forrado por serragem de pinho (**Figura 01**).



**Figura 01:** Espécimes mantidos em gaiolas.

Em todos os grupos, o período de observação foi de quatro, sete e nove dias. Assim, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A, B e C), de acordo com período de observação (**Quadro 01**).

**Quadro 01:** Organização dos grupos.

GRUPOS	FLUÊNCIA	SUBGRUPOS	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO	FLUÊNCIA TOTAL
I (11 ratos*)	FI = 8 J/cm <sup>2</sup>	1 – A	4 dias (4 ratos)	16 J/cm <sup>2</sup>
		1 – B	7 dias (4 ratos)	24 J/cm <sup>2</sup>
		1 – C	9 dias (3 Ratos*)	32 J/cm <sup>2</sup>
II (12 ratos)	FI = 16 J/cm <sup>2</sup>	2 – A	4 dias (4 ratos)	32 J/cm <sup>2</sup>
		2 – B	7 dias (4 ratos)	48 J/cm <sup>2</sup>
		2 – C	9 dias (4 ratos)	64 J/cm <sup>2</sup>
III (12 ratos)	FI = 4 J/cm <sup>2</sup>	3 – A	4 dias (4 ratos)	8 J/cm <sup>2</sup>
		3 – B	7 dias (4 ratos)	12 J/cm <sup>2</sup>
		3 – C	9 dias (4 ratos)	16 J/cm <sup>2</sup>

\* Ocorreu a morte de um animal durante o período de observação.

Optou-se pela realização de dois ferimentos em cada animal, sendo um controle (sem irradiação) e um teste (com irradiação). Desse modo, há uma diminuição dos vieses, na medida em que teste e controle é o mesmo organismo.

As gaiolas receberam etiquetas, durante todo o período de estudo, conforme o grupo no qual pertencia cada animal. Para a identificação dos animais, foram utilizadas marcações na cauda, realizadas com caneta de tinta permanente, onde o número de marcas indicava o número do respectivo animal.

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados durante todo o período do experimento. A serragem e a água foram trocadas, assim como a lavagem das gaiolas, a cada 48 horas.

### 3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Para que os animais pudessem ser incluídos nos experimentos, todos cumpriram com os seguintes requisitos:

- ser da espécie *Rattus norvegicus*;
- da classe *Mammalia*;
- da ordem *Roedentia*;
- da linhagem *Wistar*;
- machos;
- pesar entre 300 e 400 gramas no momento do estudo;
- estar em bom estado nutricional;
- chegar ao final do período relativo aos seus grupos em bom estado de saúde.

Os animais que apresentassem qualquer uma das complicações a seguir seriam excluídos do estudo:

- infecções;
- necroses;
- debilitação do estado geral;
- desconforto durante o período dos testes.

### 3.4 MATERIAL E INSTRUMENTAL

Foram utilizados os seguintes materiais:

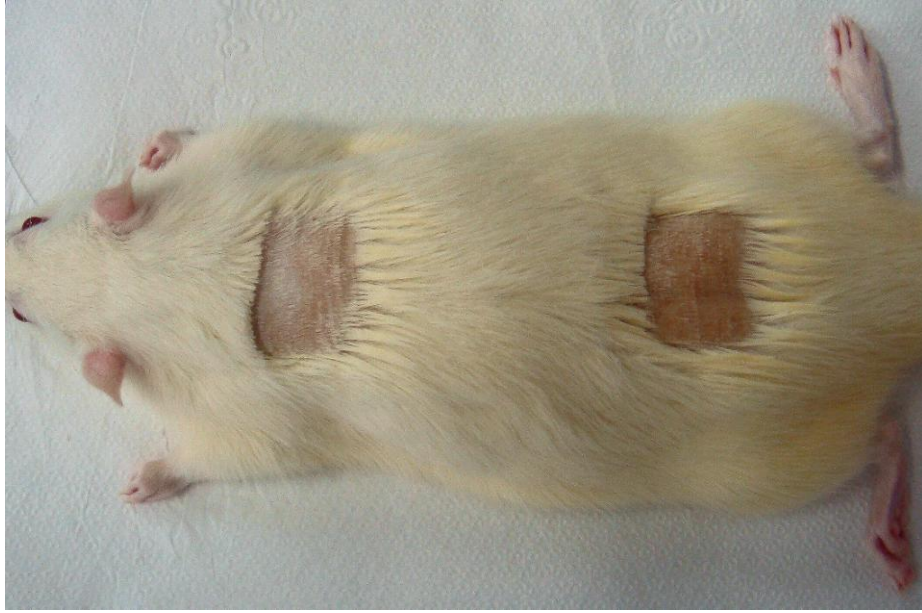
- hidrato de cloral a 10%;
- solução de formalina tamponada a 10%;
- gaze estéril;
- solução de cloreto de sódio a 0,9%;
- digluconato de clorexidina a 2%;
- seringas estéreis e descartáveis de 20 mL;

- lâminas de bisturi nº 15;
- anestésico (Zoletil®);
- mesa cirúrgica adaptada, com mantenedores de posição do rato em decúbito ventral;
- instrumental cirúrgico individualizado e esterilizado em autoclave;
- *punch* metálico com 8 mm de diâmetro e com ranhuras de 1 mm em sua superfície para marcação da profundidade de penetração;
- cabo de bisturi tipo Bard-Parker nº 3;
- porta-agulha tipo Mayo-Hegar;
- pinças tipo Adson-Brown;
- tesouras de ponta reta;
- aparelho de *laser* THERA LASE®, da marca DMC®, devidamente calibrado.

### 3.5 TÉCNICA CIRÚRGICA

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral, por meio da injeção intramuscular do anestésico Zoletil®, com uma dose de 20,0 mg/kg de peso.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal (**Figura 02**). A anti-sepsia da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%.



**Figura 02:** Tricotomia da região.

O *punch* foi posicionado perpendicularmente à superfície da pele, na região tricotomizada, junto à linha média e próximo à cabeça do animal (**Figura 03**).



**Figura 03:** Posicionamento do *punch*.

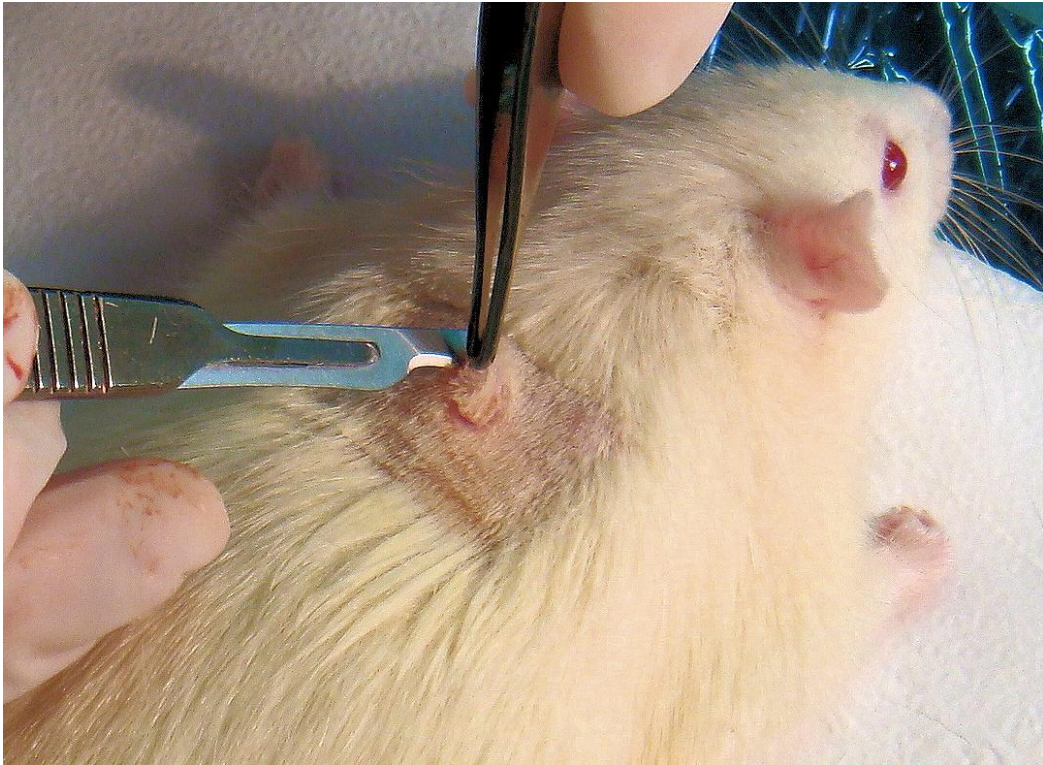
Promoveram-se movimentos giratórios para facilitar a penetração de 1 mm da lâmina, com um diâmetro de 8 mm, correspondendo às medidas do instrumental utilizado (**Figura 04**).



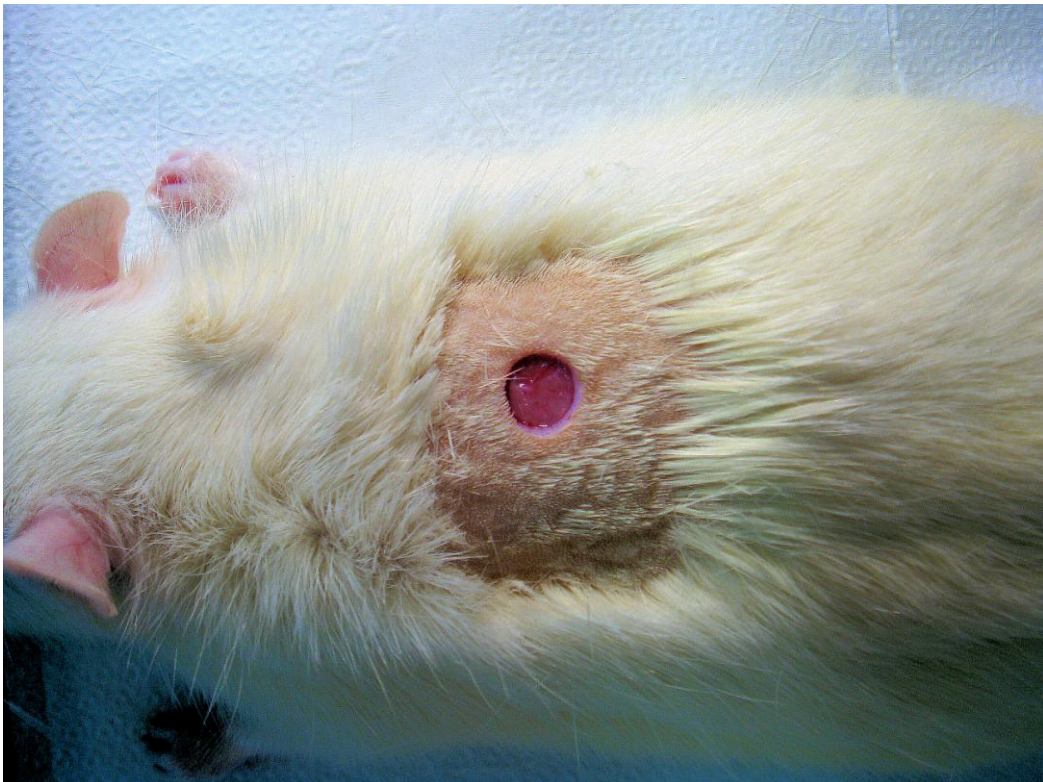
**Figura 04:** Demarcação da lesão através do *punch*.

Posteriormente, foi utilizado cabo de bisturi montado com lâmina nº 15 e pinça tipo Adson-Brown (**Figura 05**) para remover, delicadamente, a quantidade de tecido necessário à produção de uma lesão de 1 mm de profundidade e 8 mm de diâmetro (**Figura 06**).





**Figura 05:** Utilização de lâmina de bisturi para dissecção do tecido.



**Figura 06:** Lesão padronizada na região dorsal dos ratos.

O mesmo procedimento foi repetido a uma distância a cerca de sete centímetros da primeira, próximo a região caudal do animal.

### 3.6 IRRADIAÇÃO A LASER

Foi utilizado o *laser* vermelho fosfeto de índio-gálio-alumínio (In-Ga-Al-P) THERA LASE<sup>®</sup>, da marca DMC<sup>®</sup> (**Figura 07**).



**Figura 07:** Laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio (In-Ga-Al-P) THERA LASE<sup>®</sup>, da marca DMC<sup>®</sup>.

Em todos os animais padronizou-se que somente a ferida próxima à cabeça receberia irradiação. Também ficou estabelecido que a irradiação fosse de forma pontual e no centro do ferimento (**Figura 08**).



**Figura 08:** Irradiação com *laser* de In-Ga-Al-P.

As irradiações foram realizadas imediatamente após o término da cirurgia, em 48 horas, em quatro e sete dias, totalizando, na dependência da época da morte do animal, duas, três ou quatro irradiações.

Os animais receberam as irradiações seguindo as regulamentações brasileiras, ou seja, com as devidas medidas de proteção e em local isolado, com caracteres e simbologia internacionais para área em uso ou presença de radiação.

Após o procedimento cirúrgico, os animais retornaram ao Vivário da Faculdade de Farmácia da PUCRS, no qual permaneceram até o final do experimento.

### 3.6.1 Parâmetros de irradiação utilizados

Selecionaram-se, com base na literatura atual, oito artigos de relevância na comunidade científica que cumpriram os seguintes requisitos:

- Publicados no ano de 2009;
- Revistas com fator de impacto superior a 1,4;
- Serem experimentais em ratos;
- Utilizar *lasers* no espectro eletromagnético da cor vermelha ou próximo

(Tabela 01).

**Tabela 01:** Autores, revista de publicação, fator de impacto da revista, comprimento de onda e fluência dos *lasers* dos artigos utilizados para definição da fluência utilizada neste estudo.

<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Fator de impacto</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	<b>Fluência (J/cm<sup>2</sup>)</b>
<b>NUSSBAUM EL et al. (2009)</b>	Lasers Surg Med	3,539	635	1 e 20
<b>EZZATI A et al. (2009)</b>	J Rehabil Res Dev	1,446	660	2,3 e 11,7
<b>IORDANOU P et al. (2009)</b>	Photomed Laser Surg	1,785	580	2,4
<b>ROCHA Jr. AM et al. (2009)</b>	Photomed Laser Surg	1,785	635	3,8
<b>GÁL P et al. (2009)</b>	Lasers Med Sci	1,675	635	5
<b>AL-WATBAN FA et al. (2009<sup>b</sup>)</b>	Photomed Laser Surg	1,785	633 e 670	5, 10 e 20
<b>RIBEIRO MA et al. (2009)</b>	Photomed Laser Surg	1,785	660	20
<b>DALL AGNOL MA et al. (2009)</b>	Lasers Med Sci	1,675	640 e 660	6
<b>Média da fluência</b>				<b>8,93</b>

Desse modo, optou-se por utilizar a fluência de  $8 \text{ J/cm}^2$  no grupo I, o dobro da dose de energia ( $16 \text{ J/cm}^2$ ) no grupo II e a metade ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) no grupo III.

A seguir, todos os parâmetros utilizados separados por grupos:

Grupo I:

- $\lambda = 685 \text{ nm}$
- $A = 1 \text{ cm}^2$
- $E = 8,015 \text{ J}$
- $Fl = 8,015 \text{ J/cm}^2$
- $t = 229 \text{ s}$
- $P = 35 \text{ mW}$
- $I = 35 \text{ mW/cm}^2$
- $F = 437653 \text{ GHz}$
- modo de ação do *laser*: contínuo
- modo de entrega: fibra óptica
- modo de aplicação: pontual, com contato e sem deslocamento

Grupo II:

- $\lambda = 685 \text{ nm}$
- $A = 1 \text{ cm}^2$
- $E = 16,03 \text{ J}$
- $Fl = 16,03 \text{ J/cm}^2$
- $t = 458 \text{ s}$
- $P = 35 \text{ mW}$
- $I = 35 \text{ mW/cm}^2$
- $F = 437653 \text{ GHz}$
- modo de ação do *laser*: contínuo
- modo de entrega: fibra óptica
- modo de aplicação: pontual, com contato e sem deslocamento

Grupo III:

-  $\lambda = 685 \text{ nm}$

-  $A = 1 \text{ cm}^2$

-  $E = 4,025 \text{ J}$

-  $Fl = 4,025 \text{ J/cm}^2$

-  $t = 115 \text{ s}$

-  $P = 35 \text{ mW}$

-  $I = 35 \text{ mW/cm}^2$

-  $F = 437653 \text{ GHz}$

- modo de ação do *laser*: contínuo

- modo de entrega: fibra óptica

- modo de aplicação: pontual, com contato e sem deslocamento

### 3.7 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a obtenção das amostras, os animais foram mortos aos quatro, sete e nove dias de pós-operatório, por meio da administração de uma dose letal de isoflurano, por via intravenosa.

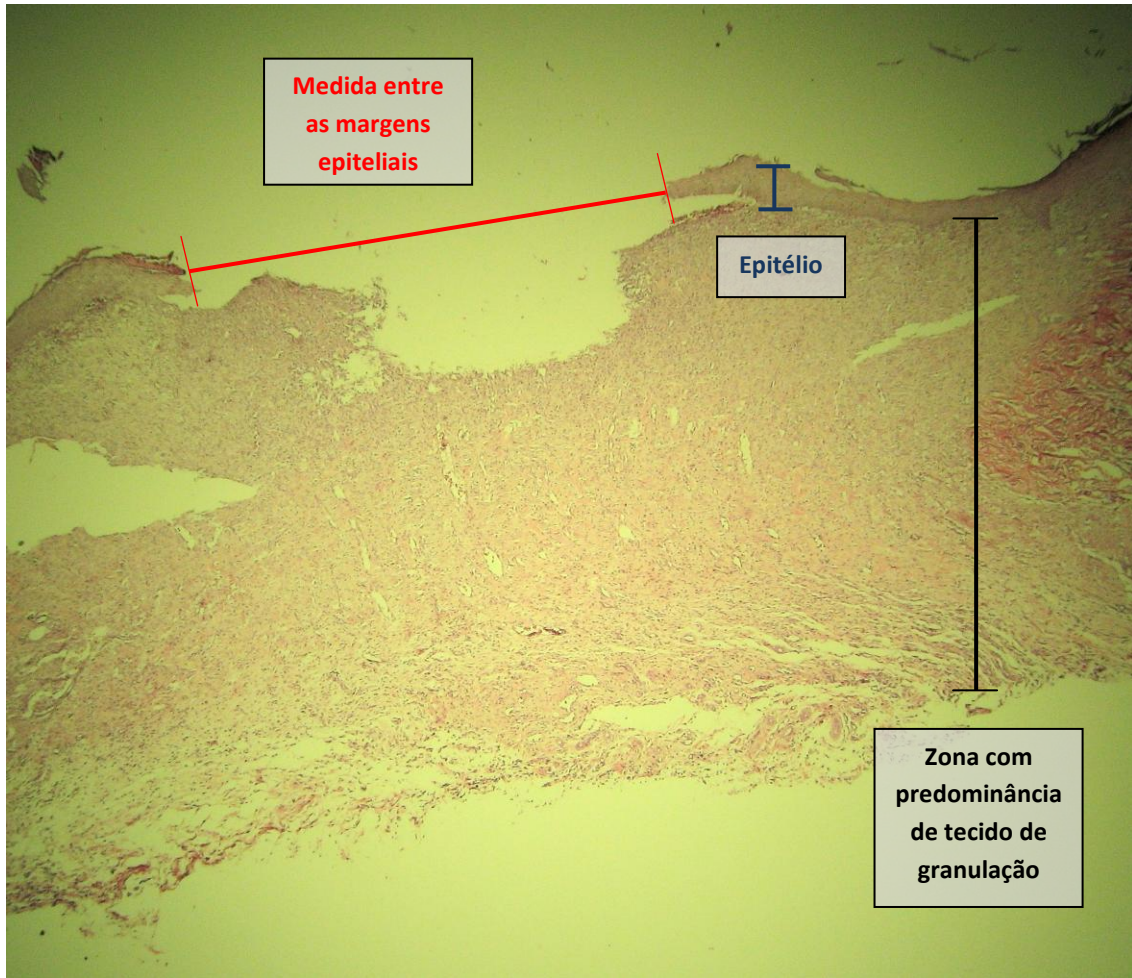
As duas lesões produzidas em cada animal foram dissecadas em forma de elipse, com uma lâmina de bisturi nº 15, observando uma margem de segurança para não danificar a peça. O material removido foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% até o momento do processamento histológico. Cada recipiente foi identificado com o número do animal, o grupo e sua zona respectiva (teste ou controle).

### 3.8 PROCESSAMENTO E ESTUDO HISTOLÓGICO

Após o período de fixação, os espécimes de tecidos foram seccionados, utilizando-se de lâmina de bisturi nº 15, na região da lesão com o maior diâmetro. Em seguida, foram processados de acordo com a rotina para inclusão em parafina.

Os blocos submetidos à inclusão foram identificados e submetidos à microtomia. Cortes de 5 µm foram assim destinados à técnica de coloração histológica HE.

A aquisição das imagens foi realizada no Parque Científico e Tecnológico da PUCRS (TECNOPUC), no Centro de Excelência em Pesquisa sobre Armazenamento de Carbono (CEPAC), no Laboratório de Petrologia. Foi utilizado um microscópio óptico petrográfico da marca Carl Zeiss®, modelo AXIO Imager.A1m®, gerando aumentos de 4 X para as medições entre as margens epiteliais (**Figura 09**) e de 20 X e 40 X para as análises descritivas do epitélio. As lâminas foram identificadas com um código para garantir que, durante a leitura, o examinador desconhecesse a qual grupo pertencia cada lâmina observada.



**Figura 09:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X demonstrando a medição entre as margens epiteliais, a predominante zona de tecido de granulação e o epitélio.

Para calibração, a qual foi supervisionada pelo patologista Manoel Sant'Ana Filho, Coordenador do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, a cada 20 lâminas observadas, o autor (examinador) repetiu, individual e separadamente, a observação de 10 lâminas, comparando as medidas obtidas entre ambas as observações e aplicando o teste *Kappa* intra-examinador a fim de verificar a veracidade das medidas. Para quantificar o grau de concordância para os resultados dos testes *Kappa* aplicados, utilizou-se a porcentagem de concordância recomendados por Landis e Koch (1977), em que são aceitos apenas os seguintes valores: 0,61 a 0,80, representando importante concordância, e 0,81 a 1,0, representando quase concordância completa (SIEGEL, 1975). Caso essas concordâncias não fossem obtidas, a análise das lâminas era repetida.



Por ser representativa no processo de cicatrização, estabeleceu-se como critério de avaliação a reepitelização da ferida. Para tanto, foi medida a distância entre as bordas epiteliais utilizando-se o programa ImageJ 1.43u<sup>®</sup>. No *software*, utilizou-se a ferramenta *Straight*, sendo considerado os números fornecidos pelo programa em relação à medida *Length* (comprimento).

O artigo base utilizado para as análises histológicas foi o estudo dirigido por Braiman-Wiksman et al. (2007).



*Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 4 X, fotografadas e inseridas no programa ImageJ 1.43u<sup>®</sup> para as medições.

Para as análises histomorfológicas, foram também realizadas fotografias com aumentos de 20 X e 40 X.

Os dados coletados referentes às medidas entre as bordas epiteliais dos grupos (I, II e III), subgrupos (A, B e C) e ferimentos tratados com *laser* (teste) e sem *laser* (controle) estão disponíveis na **tabela 02**.

**Tabela 02:** Medições entre as bordas epiteliais.

		Teste	Controle
<b>GRUPO I</b> <b>8 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 11</b>	IA (4 dias)	1.915,620	2.298,814
		1.711,683	2.702,696
		2.319,110	2.564,851
		2.181,204	2.298,691
	IB (7 dias)	1.956,343	1.565,000
		2.593,347	2.012,254
		962,469	804,955
		0,000	3.191,542
	IC (9 dias)	0,000	1.534,000
		253,178	797,577
		174,158	0,000
		3.389,620	2.499,548
<b>GRUPO II</b> <b>16 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 12</b>	IIA (4 dias)	1.995,066	3.250,931
		3.085,867	3.709,952
		2.724,951	3.418,351
		1.467,994	1.766,552
	IIB (7 dias)	1.960,839	2.023,407
		1.819,231	1.084,502
		1.329,037	2.084,026
		1.572,849	1.364,232
	IIC (9 dias)	1.067,863	505,898
		726,099	734,261
		0,000	241,471
		2.816,295	2.860,000
<b>GRUPO III</b> <b>4 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 12</b>	IIIA (4 dias)	2.557,517	3.123,165
		2.004,144	3.583,395
		2.677,889	2.871,026
		1.857,039	3.306,974
	IIIB (7 dias)	2.564,197	2.399,774
		1.824,904	2.730,823
		1.978,494	2.524,840
		904,317	697,226
	IIIC (9 dias)	0,000	787,440
		0,000	985,346
		0,000	866,678

Determinou-se a diferença entre as medidas do comprimento sobre o processo de reparo das feridas cutâneas (as bordas epiteliais), sem o uso de *laser* (controle) e com a irradiação *laser* (teste). Estas diferenças foram analisadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) fatorial univariada. As feridas cutâneas foram

irradiadas com o laser de fosfeto de índio-gálio-alumínio com fluência de 8 J/cm<sup>2</sup> (padrão), 4 e 16 J/cm<sup>2</sup> nos tempos de quatro, sete e nove dias de observação. Os resultados obtidos estão disponíveis na tabela 03.

**Tabela 03:** Diferença entre as medidas do processo de reparo das feridas cutâneas.

Fonte de variação	Estatística do teste - F	p
Grupo	1,123	0,340
Tempo	0,049	0,953
Grupo X Tempo (Interação)	0,204	0,934

Nas tabelas 04 e 05 são apresentadas as estimativas para a variável dependente “diferença” para cada um dos fatores analisados.

**Tabela 04:** Estimativa para a variável dependente diferença, segundo o fator grupo.

Grupo	n	Média	Desvio padrão	Intervalo de 95% de confiança
I – 8 J/cm <sup>2</sup>	11	528,17	262,32	(-11,03; 067,37)
II – 16 J/cm <sup>2</sup>	12	128,64	248,86	(-382,89; 640,17)
III – 4 J/cm <sup>2</sup>	12	629,32	248,86	(117,79; 1140,86)

**Tabela 05:** Estimativa para a variável dependente diferença, segundo o fator tempo.

Tempo	n	Média	Desvio padrão	Intervalo de 95% de confiança
I – 4 dias	11	483,54	248,86	(-27,99; 995,07)
II – 7 dias	12	431,73	248,86	(-79,80; 943,26)
III – 9 dias	12	370,87	262,32	(-168,33; 910,07)

De acordo com os resultados expressos na tabela 03, os efeitos isolados, grupo e tempo, não foram significativos a um nível de significância de 5% e também não há evidências de interação entre eles.

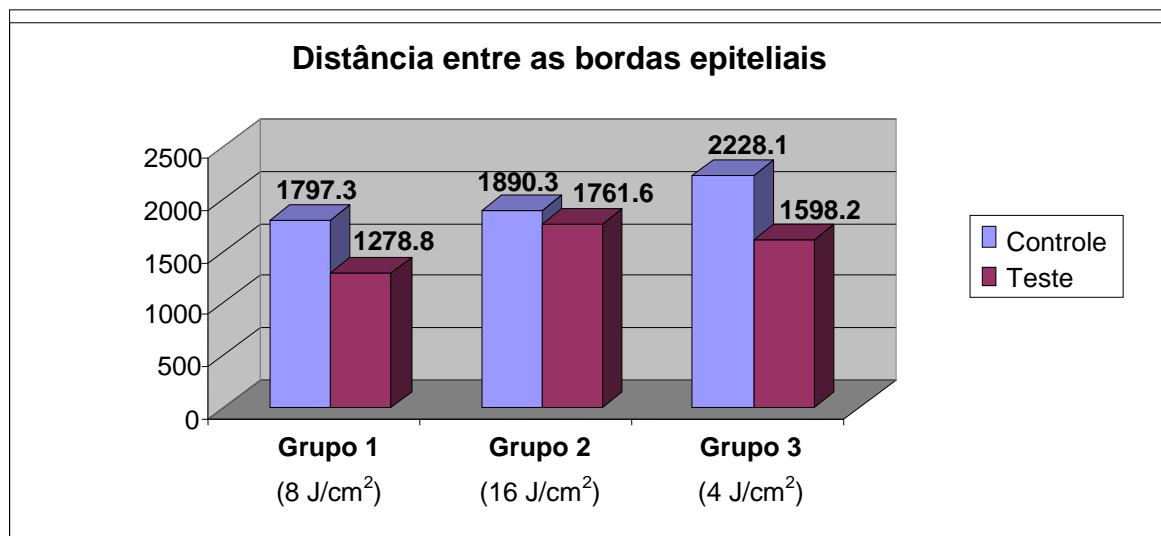
Na tabela 06 é apresentado o resultado do estudo considerando somente o uso ou não do *laser*, sem levar em conta o tempo de observação e as diferentes doses de energias utilizadas.

**Tabela 06:** Diferença entre as medidas das amostras teste e controle.

	n	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
<b>Controle (sem <i>laser</i>)</b>	35	1976,86	1058,30	178,89
<b>Teste (com <i>laser</i>)</b>	35	1554,04	1016,97	171,90
<b>Diferença</b>	35	422,82	798,42	134,96

O teste t de *Student* pareado (*laser* X sem *laser*) apresentou uma estatística de teste igual a 3,13 com um valor de  $p = 0,004$ .

No gráfico 01, observa-se a comparação entre as medidas teste e controle nos diferentes grupos.



**Gráfico 01.** Medidas teste e controle por grupos.

Na tabela 07, observam-se os valores referentes à média das medidas das amostras teste e controle, separados por tempo de morte dos animais.

**Tabela 07:** Média, desvio padrão e erro padrão da média das amostras teste e controle por tempo de morte dos animais.

Tempo		Média	n	Desvio padrão	Erro padrão da média
4 dias	Controle	2931,7850	11	485,20123	140,06553
	Teste	2448,24,72	11	512,23655	147,86995
7 dias	Controle	2124,5541	12	764,49138	220,68965
	Teste	1692,8245	12	702,94612	202,92307
9 dias	Controle	774,0117	12	440,67924	132,86979
	Teste	427,1333	12	551,97412	166,42646

Na tabela 08, observam-se os valores referentes à diferença entre as médias das medidas entre as amostras teste e controle separados por tempo de morte dos animais. Verifica-se, utilizando-se o teste t pareado, que existe diferença significativa ( $p = 0,024$ ) somente entre as medidas médias das diferenças entre as amostras teste e as amostras controle dos animais mortos no quarto dia de observação.

**Tabela 08:** Média, desvio padrão, média do erro padrão e significância dos valores referentes à diferença entre as medidas entre as amostras teste e controle separados por tempo de morte dos animais.

Tempo	Diferença			Intervalo de confiança da diferença = 95 %
	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Significância
4 dias	483,53783	638,91558	184,43904	0,024
7 dias	431,72958	1083,60931	312,81106	0,195
9 dias	346,87845	644,90079	194,44491	0,105

## 4.2 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

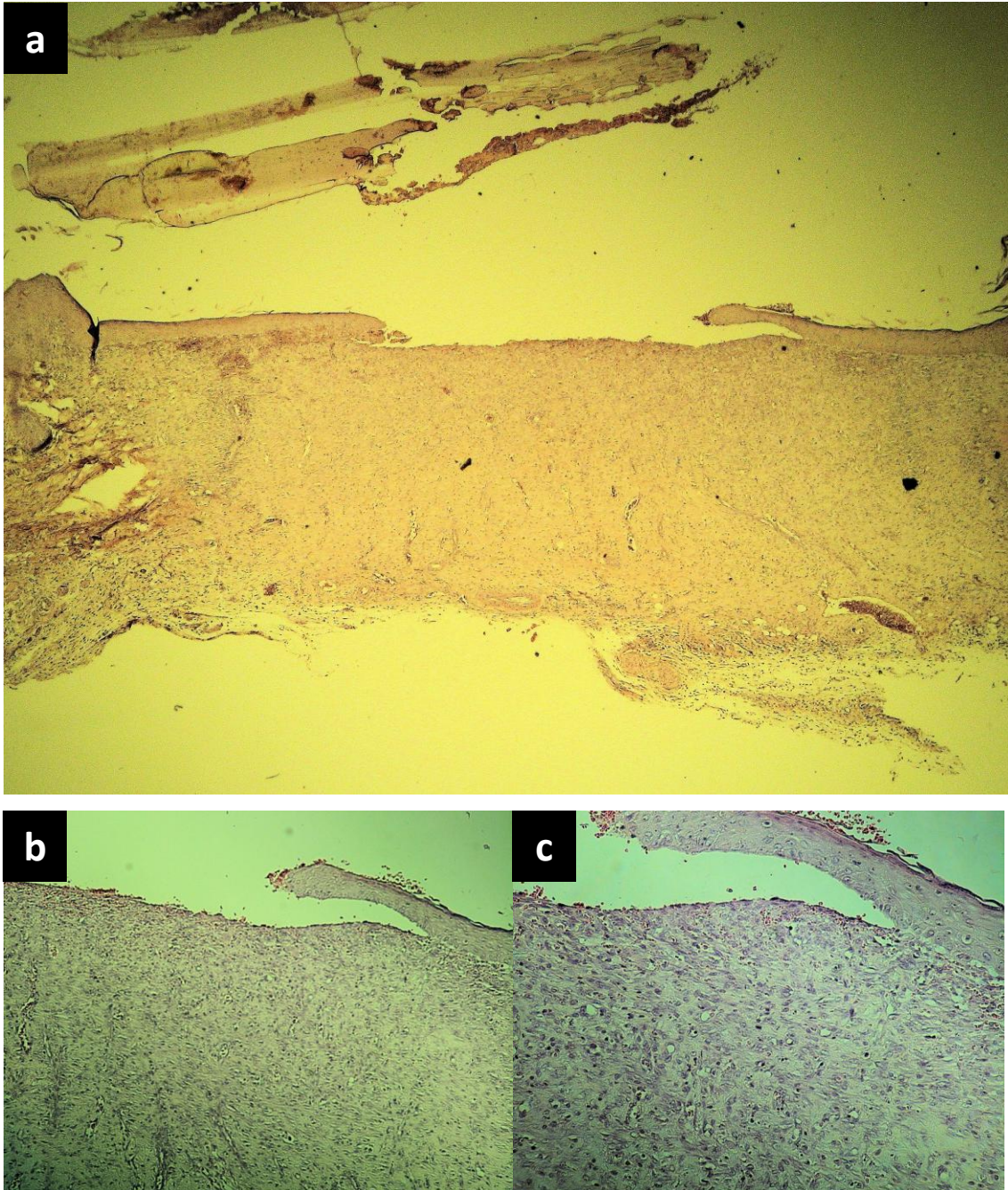
Através das imagens obtidas, podem-se estabelecer comparações entre as feridas tratadas e não tratadas com *laser*, entre as feridas tratadas com a mesma dose de energia e analisadas em tempos diferentes e entre as feridas tratadas com doses de energias diferentes e analisadas com o mesmo tempo de observação. Desse modo, avaliam-se os fatores *laser*, tempo de observação e dose de energia.

Ao analisar as figuras 10 e 11 (fotomicrografias referentes aos animais com menores valores histomorfométricos no grupo IIC), se estabelece a comparação entre as feridas tratadas sem *laser* (grupo IIC, controle) e tratadas com *laser* (grupo IIC, teste - 16 J/cm<sup>2</sup>), respectivamente. Em ambas as figuras observa-se uma área de coágulo desprendida do tecido, uma intensa área de tecido de granulação dominando praticamente toda a região de tecido subepitelial e o epitélio. O tecido cicatricial caracteriza-se por inúmeros vasos sanguíneos (neovascularização), fibroblastos ainda sem orientação (fibroplasia inicial) e intensa celularidade, com a presença significativa de células inflamatórias.

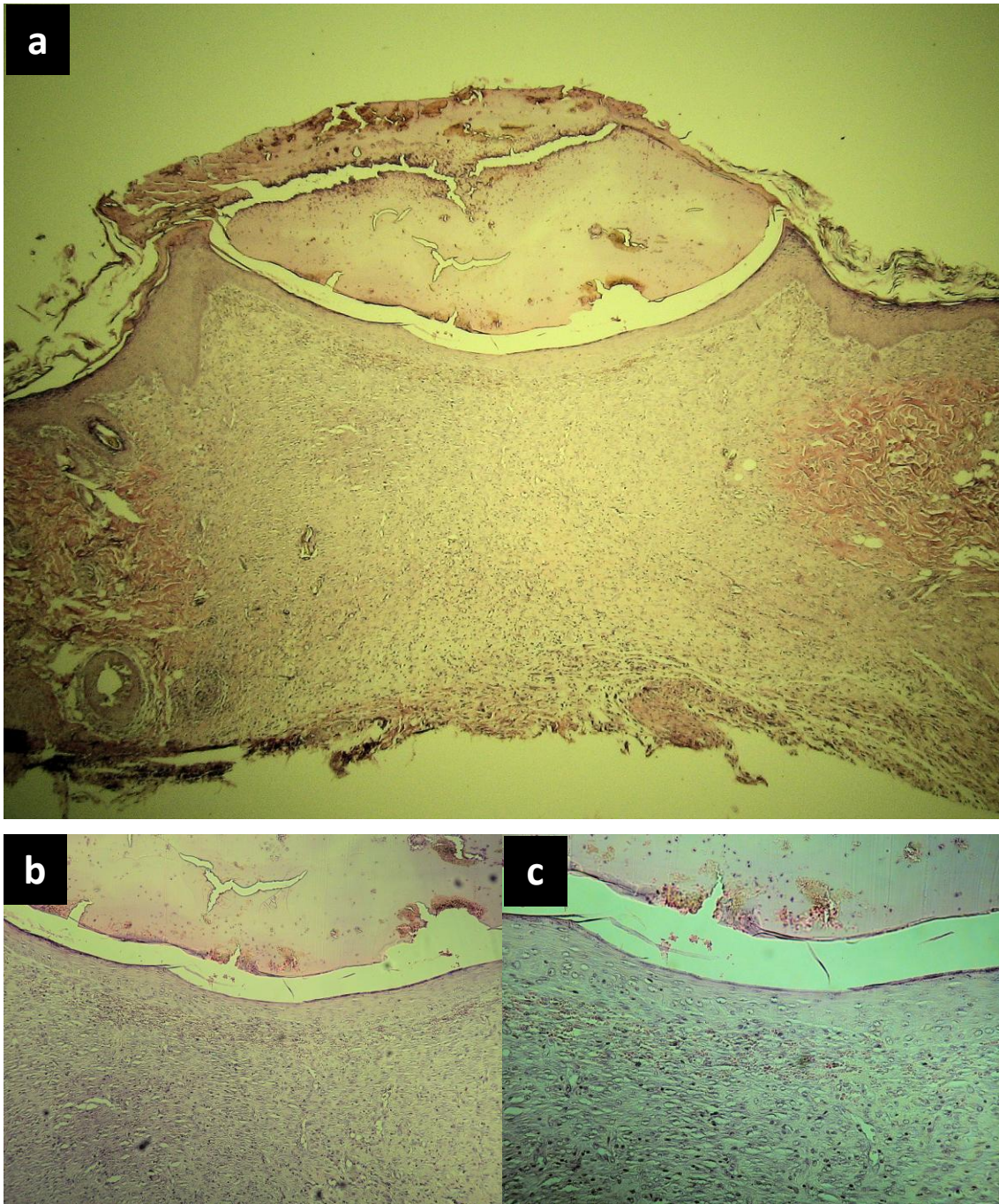
Este foi um padrão cicatricial encontrado em praticamente todos os cortes histológicos analisados, independentemente do tempo de observação, do tratamento ou não com *laser* e da dose de energia utilizada. Verificou-se sempre uma grande área de tecido de granulação sob o local do ferimento, compreendendo praticamente toda a região de tecido subepitelial. Verificaram-se diferenças na espessura do tecido epitelial e na distância entre as margens epiteliais rompidas pelo ferimento.

Em relação ao tecido epitelial observado na figura 10, verifica-se que as margens epiteliais estão em processo de migração em direção ao centro do ferimento, migrando por cima do tecido de granulação. Já na figura 11, o ferimento já se encontra epitelizado, com pequena espessura de tecido epitelial.



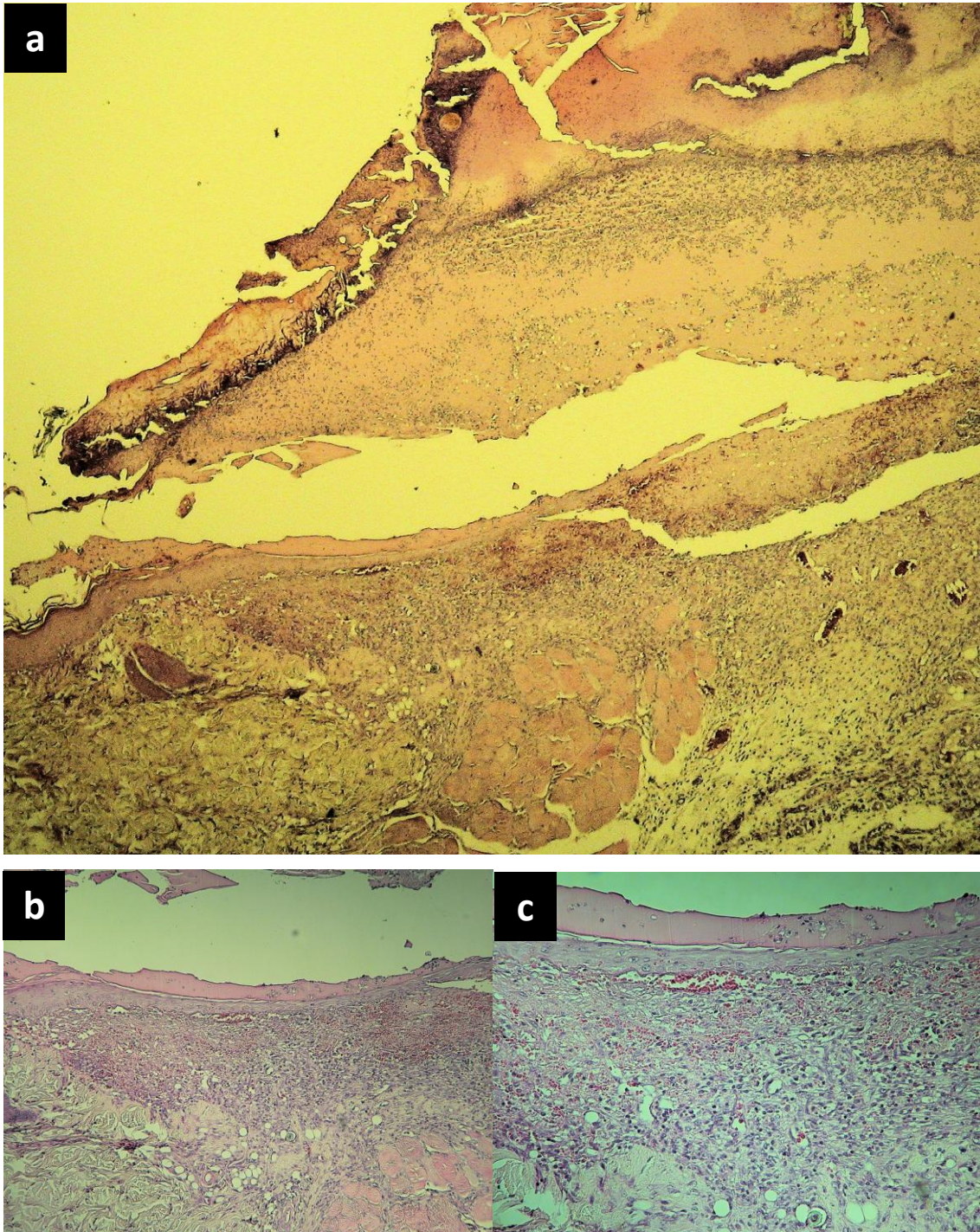


**Figura 10:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra sem tratamento com *laser* e morte do animal em nove dias (grupo IIC, controle).



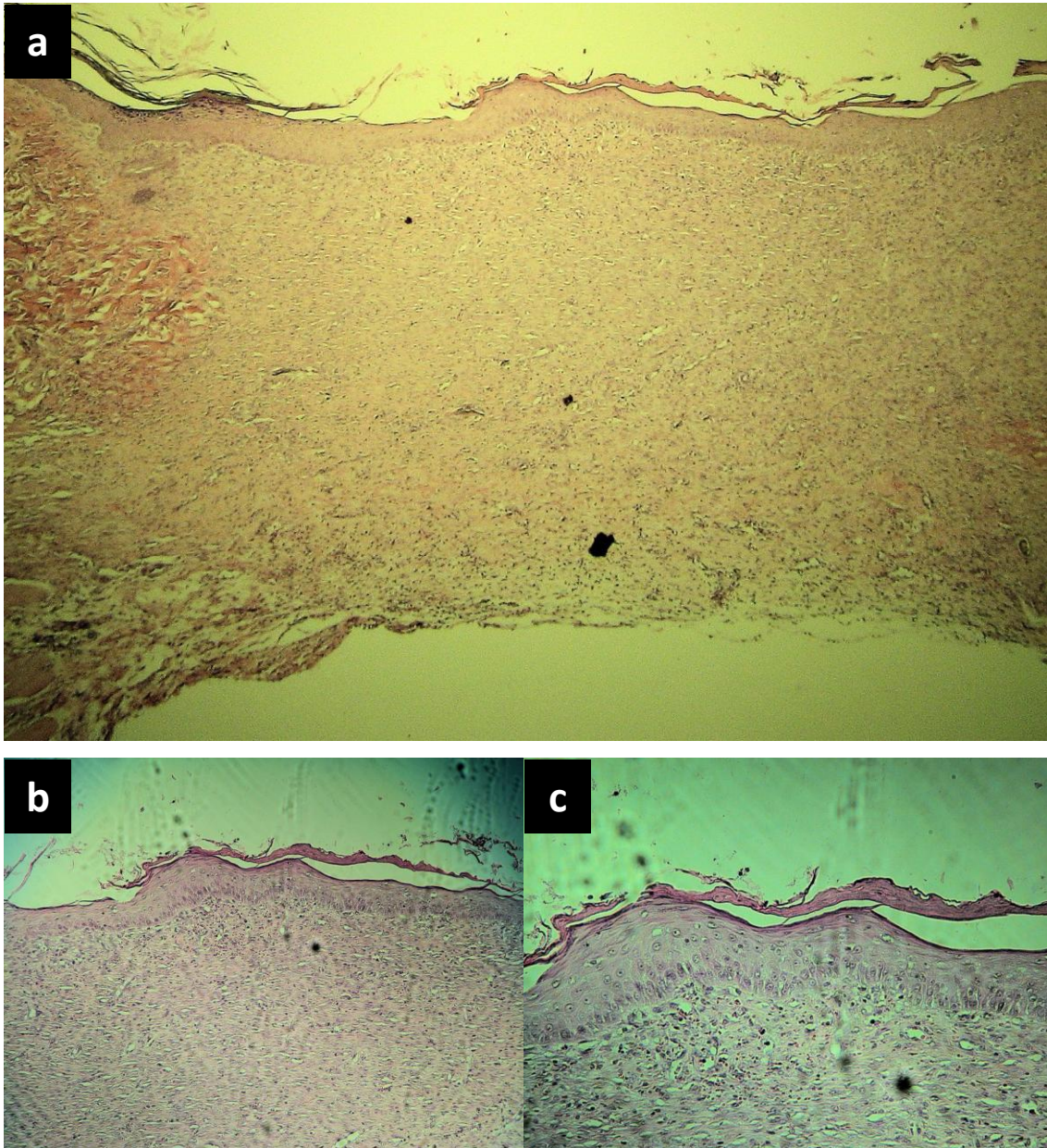
**Figura 11:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com  $16 \text{ J/cm}^2$  e morte do animal em nove dias (grupo IIC, teste).

Na análise das figuras 12, 13 e 14 (fotomicrografias referentes aos animais com menores valores histomorfométricos nos grupos IA, IB e IC, respectivamente), comparam-se as feridas tratadas com a mesma dose de energia ( $8 \text{ J/cm}^2$ ) e analisadas nos diferentes tempos. O padrão cicatricial de tecido de granulação é claramente identificado e, ao observar o tecido epitelial, nota-se que o mesmo ainda está em processo de migração apenas na figura 12 (observa-se apenas a margem epitelial esquerda da lesão), com período de observação de quatro dias, estando as feridas das figuras 13 e 14 (sete e nove dias, respectivamente) já epitelizadas.

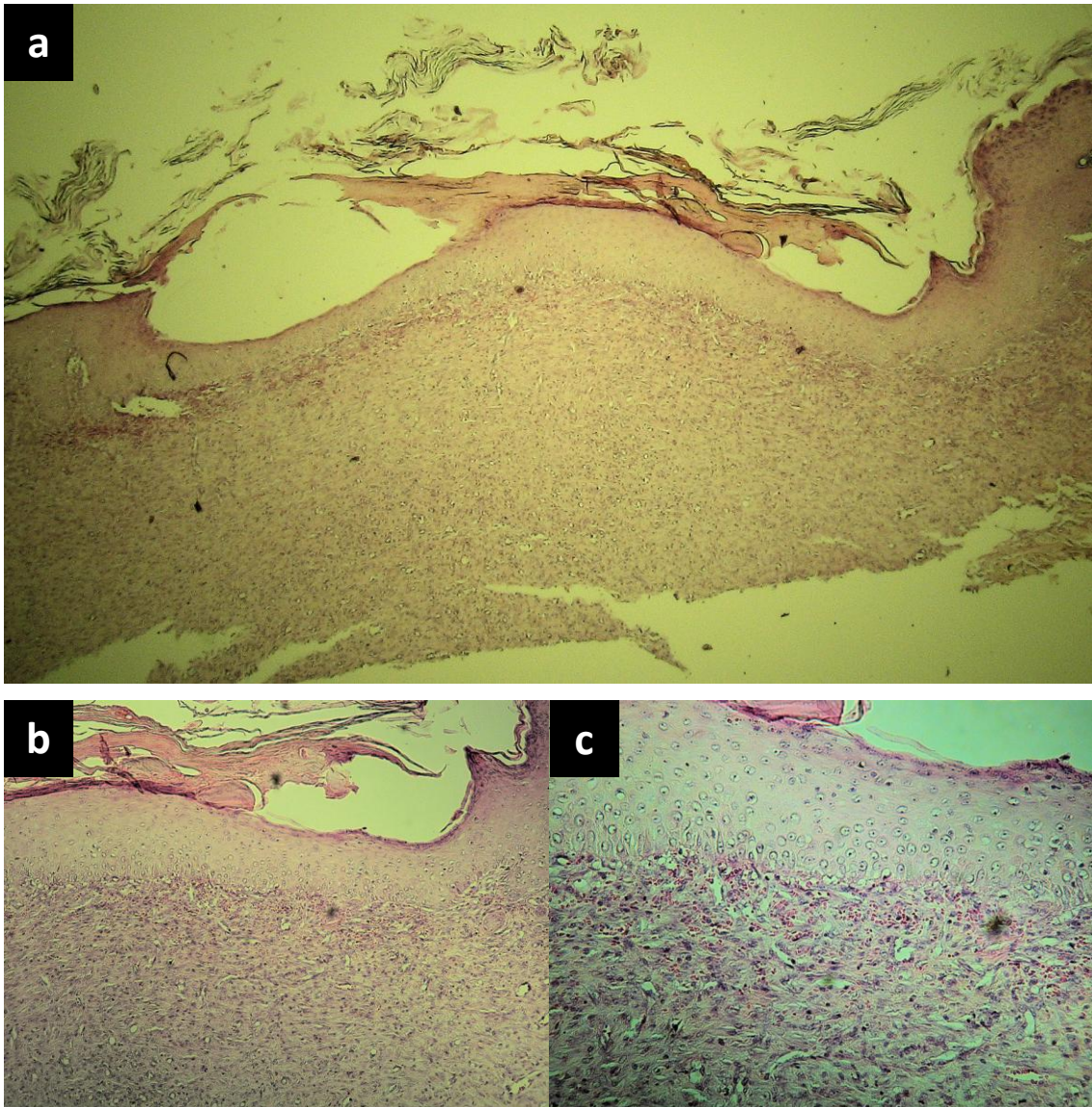


**Figura 12:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com  $8 \text{ J/cm}^2$  e morte do animal em quatro dias (grupo IA, teste).

Ao comparar o tecido epitelial das figuras 13 (sete dias) e 14 (nove dias), observa-se uma maior espessura do tecido epitelial quando analisado com nove dias de período observatório, caracterizado por um maior número de camadas de células epiteliais.



**Figura 13:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com  $8 \text{ J/cm}^2$  e morte do animal em sete dias (grupo IB, teste).

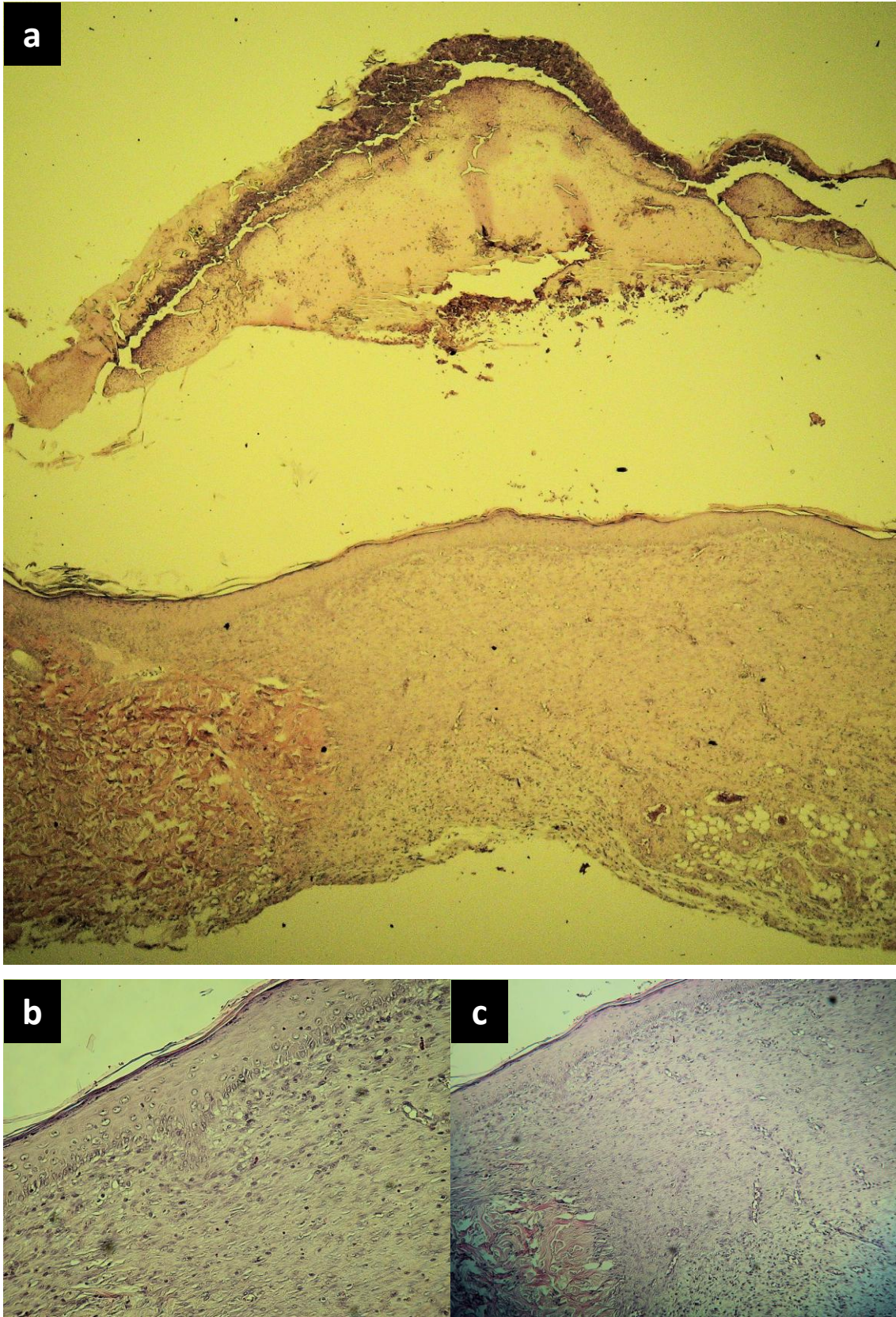


**Figura 14:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com  $8 \text{ J/cm}^2$  e morte do animal em nove dias (grupo IC, teste).

Na análise das figuras 14 ( $8 \text{ J/cm}^2$ ), 11 ( $16 \text{ J/cm}^2$ ) e 15 ( $4 \text{ J/cm}^2$ ) (fotomicrografias referentes ao animais com menores valores histomorfométricos nos grupos IC, IIC e IIIC), comparam-se as feridas tratadas com doses de energia diferentes e morte do animal no mesmo tempo (nove dias). O padrão cicatricial de tecido de granulação é novamente identificado e, ao se observar o tecido epitelial, nota-se que os três grupos apresentam as feridas já epitelizadas.

Em relação à espessura do tecido epitelial, observa-se que o epitélio correspondente a ferida tratada com  $8 \text{ J/cm}^2$  é ligeiramente maior que o da ferida

tratada com  $4 \text{ J/cm}^2$ , que por sua vez é discretamente superior a ferida tratada com  $16 \text{ J/cm}^2$ .



**Figura 15:** Fotomicrografia em aumento original de 4 X (a), 20 X (b) e 40 X (c) de uma amostra tratada com 4 J/cm<sup>2</sup> e morte do animal em nove dias (grupo IIIC, teste).





*Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

---

Al-Watban et al. (2009<sup>b</sup>) afirmam que a LLLT tem sido usada para aumentar a velocidade de cicatrização de feridas em animais e seres humanos, apresentando resultados positivos e negativos (nenhum efeito). Em concordância, Gál et al. (2009), assim como Matthews e Kahn (2009), afirmam que os parâmetros ótimos da LLLT para a cicatrização de feridas ainda são amplamente discutidos. Portanto, comprimentos de onda, doses de energia e tempos de observação têm sido utilizados nas atuais pesquisas com uma variedade extremamente alta.

A luz *laser* interage com os tecidos biológicos basicamente de quatro formas: reflexão, transmissão, espalhamento e absorção. Para que a interação seja efetiva, os fótons oriundos dos equipamentos *laser* devem ser absorvidos pelos elétrons dos átomos do tecido-alvo, ou seja, o comprimento de onda do *laser* deve ser ressonante com o tecido-alvo (KARU, 1999).

Quando sua energia é absorvida, as moléculas do tecido atingem um estado de excitação molecular. A quantidade de energia presente na molécula excitada pelo *laser*, somada à energia cinética da partícula vizinha, representa o aumento de agitação térmica dessa partícula vizinha e, conseqüentemente, o pequeno aumento de temperatura ocorrido pela absorção de energia *laser*. Essas modificações, a nível molecular, resultarão nas alterações celulares e teciduais. Desse modo, o comprimento de onda da luz *laser* que age sobre os cromóforos é o que define a interação da radiação com o tecido (MCKENZIE, 1990).

Al-Watban et al. (2009<sup>b</sup>) compararam *lasers* com diferentes comprimentos de onda (532, 633, 670 e 810 nm) no processo de cicatrização de queimaduras em ratos. O percentual de cura após LLLT foi de 78,37% para o *laser* visível e de 50,68% para o *laser* invisível. Os autores concluíram que o *laser*, tanto visível como invisível, pode acelerar a cicatrização de queimaduras e que os efeitos dos *lasers* visíveis (vermelho) foram melhores do que os *lasers* invisíveis (infravermelho).

Para avaliar a cicatrização de ferimentos em pele de ratos, Araújo et al. (2007) planejaram um experimento no qual foram realizados dois ferimentos circulares em cada animal, sendo um deles irradiado com *laser* de He-Ne (632 nm) e

o outro controle. Os ferimentos foram analisados nos períodos de um, cinco, oito, 12 e 15 dias de pós-operatório por análise histológica. Os pesquisadores concluíram que as lesões irradiadas apresentaram reepitelização acelerada quando comparadas com o grupo-controle. A derme irradiada continha maior número de fibroblastos ativos que no grupo-controle, e a radiação *laser* reduziu o processo inflamatório local, além de, aparentemente, organizar as fibras colágenas na área do reparo.

A absorção depende da composição do tecido, da pigmentação e do conteúdo de água do mesmo. Cromóforos, como a melanina, adenina, hemoglobina e proteínas, apresentam-se mais ressonantes com radiação *laser* emitida no espectro da luz vermelha (MELLO; MELLO, 2001).

O presente estudo utilizou um *laser* de fosfeto de índio-gálio-alumínio, o qual emite radiação com 685 nm de comprimento de onda. Portanto, um *laser* altamente ressonante com os tecidos que participam do processo de reparo epitelial.

Dall Agnol et al. (2009) compararam os efeitos da LLLT com LED no processo de reparo de feridas produzidas em dorso de ratos. Utilizaram 36 ratos, divididos em diabéticos e não diabéticos e os irradiaram com *laser* (660 nm e seis J/cm<sup>2</sup>) e LED, uma única vez, 30 minutos após o procedimento cirúrgico. A morte dos animais ocorreu no sétimo dia. As análises histomorfológica e histomorfométrica mostraram que tanto o *laser* como o LED promoveram uma aceleração na cicatrização das feridas cutâneas.

Rocha et al. (2009) avaliaram o efeito da LLLT na expressão da citocina imunossupressora beta-TGF no sítio de reparação tecidual, assim como a presença de células apoptóticas no tecido epitelial. Os pesquisadores realizaram ferimentos cutâneos em ratos e avaliaram a cicatrização cutânea. Foram utilizados 30 ratos, com morte no décimo dia, e os animais foram divididos em dois grupos: controle e tratamento com LLLT em 635 nm e 3,8 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados mostraram que a LLLT pode ser um importante indutor de apoptose durante o processo de reparação tecidual e que há um efeito imunomodulador na expressão da TGF-beta em locais de cicatrização de feridas.

Em outro estudo, foi comparada a eficácia da LLLT com a da luz polarizada em queimaduras de segundo grau em roedores. Os *lasers* utilizados foram o vermelho (660 nm) e o infravermelho (780 nm), sendo realizadas quatro irradiações

de cinco  $\text{J}/\text{cm}^2$  em intervalos de 24 hs. A análise dos resultados demonstrou que os tecidos danificados foram capazes de absorver e processar eficientemente a luz em todos os comprimentos de onda testados. A LLLT com 660 nm foi a terapia que apresentou os melhores resultados (OLIVEIRA et al., 2008)

Al-Watban e Zhang (1999) definiram o comprimento de onda ideal no tratamento de feridas cutâneas no dorso de ratos. Os melhores resultados obtidos foram os seguintes, na ordem crescente de efetividade: He-Ne (632 nm), As-Ga-Al (780 nm), argônio (488-514 nm), As-Ga-Al (830 nm), He-Cd (442 nm) e criptônio (640-670 nm). Comprovam que a profundidade de penetração do *laser*, a qual está relacionada com o comprimento de onda, não é proporcional aos efeitos biomodulatórios da LLLT em ferimentos superficiais, como os gerados no dorso dos ratos.

Al-Watban (2009<sup>a</sup>) testou vários comprimentos de onda *laser* em ferimentos cutâneos e queimaduras em ratos normais e diabéticos. Os comprimentos de onda testados foram os seguintes: 532, 633, 810, 980 e 10.600 nm. O autor concluiu que o comprimento de onda de 633 nm, portanto um *laser* vermelho, foi o que apresentou os melhores resultados, com melhoras entre 38.5% e 53.4% nos ferimentos cutâneos.

Soares et al. (2008) avaliaram a cicatrização de feridas que continham celulose oxidada regenerada com a utilização da LLLT. Em trinta e seis ratos foi realizada uma incisão na porção posterior da língua, na qual foi inserida a celulose oxidada regenerada (Surgicel<sup>®</sup>). Os animais foram divididos em dois grupos, teste e controle, sendo os animais do grupo teste submetidos à LLLT com 685 nm e quatro  $\text{J}/\text{cm}^2$ , com quatro irradiações em intervalos de 48 horas. Os animais foram sacrificados em três momentos distintos: um, três e sete dias. Foi observado que o grupo tratado com LLLT apresentou maior redução do edema e infiltrado inflamatório. Os autores concluíram que a LLLT com 685 nm pode melhorar o processo de cura, mesmo quando o processo inflamatório for estimulado pela celulose oxidada regenerada.

Reddy et al. (2001) estudaram a cicatrização de feridas em ratos diabéticos com a utilização da LLLT. Para tal, foram produzidas duas feridas circulares com seis mm de diâmetro cada no dorso dos animais. Uma ferida serviu como controle e a outra foi irradiada com um laser de He-Ne (632.8 nm) com fluência de  $1 \text{ J}/\text{cm}^2$ ,

durante cinco dias por semana, durante três semanas. Os autores concluíram que a fotoestimulação pelo *laser* interferiu no processo de reparação tecidual, acelerando a produção de colágeno, e promoveu uma maior estabilidade do tecido conjuntivo das feridas em ratos diabéticos.

O presente trabalho comprova os resultados apresentados pelos estudos acima citados, tanto no aspecto de aumento na velocidade de reparação tecidual nas feridas tratadas com *laser* como no aspecto da radiação emitida no espectro vermelho apresentar resultados efetivos.

Nesta pesquisa, através da análise histomorfométrica, comprovou-se a eficácia do *laser* vermelho no processo de reparo de feridas em dorso de ratos, com resultados estatisticamente significantes quando se comparou as feridas irradiadas com *laser* com as feridas sem irradiação. Na análise histomorfológica, também se comprovou estes resultados: observou-se um grau de epitelização, ou fechamento da ferida, superior nas feridas tratadas com *laser* em comparação com as não tratadas. Portanto, confirma-se com este estudo que a LLLT aumenta a velocidade de cicatrização epitelial em ferimentos em dorso de ratos, sendo o comprimento de onda de 685 nm efetivo para este fim.

Outro fator controverso nas pesquisas que avaliam a cicatrização de feridas com a utilização da radiação *laser* é a dose de energia que deve ser utilizada.

Nussbaum et al. (2009) produziram feridas cutâneas em ratos e as trataram com *laser* vermelho (635 nm) nas fluências de um e 20 J/cm<sup>2</sup>. Foi avaliado o potencial bactericida do *laser* assim como a aceleração da atividade tecidual. As feridas irradiadas com um J/cm<sup>2</sup> cicatrizaram da mesma forma que os controles. As que foram irradiadas com 20 J/cm<sup>2</sup> cicatrizaram piores que os controles no 3<sup>o</sup> dia. Com esta mesma dose de energia, os autores observaram um retardo no fechamento da ferida no 19<sup>o</sup> dia. Em relação à microbiota, verificaram diminuição da microbiota da pele sadia e aumento da colonização de *S. aureus*.

Ezzati et al. (2009) investigaram a influência da LLLT na cicatrização de feridas produzidas por queimaduras de terceiro grau em ratos. Duas queimaduras (distal e proximal) foram produzidas na pele de 74 ratos, os quais foram divididos em quatro grupos: no grupo um, o ferimento distal recebeu a LLLT com *laser* desligado, nos grupos dois e três, as queimaduras distais foram tratados com *laser* de diodo

com 660 nm e com densidades de energia de 2,3 e 11,7 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente, e no grupo quatro as queimaduras distais foram tratadas topicamente com nitrofurazona a 0,2%. O ferimento proximal foi considerado controle e os animais foram mortos todos no mesmo tempo. Foi observado que LLLT com 11,7 J/cm<sup>2</sup> aumentou significativamente a taxa de fechamento da ferida em três e quatro semanas em comparação com o controle.

Al-Watban e Zhang (1999) definiram a fluência ideal no tratamento de feridas cutâneas no dorso de ratos. Utilizaram 10, 20 e 30 J/cm<sup>2</sup>, irradiados três vezes por semana. A dose de energia que apresentou os melhores resultados foi a com 20 J/cm<sup>2</sup>.

Em outro estudo, Al-Watban et al. (2009<sup>b</sup>) utilizaram doses de energia de cinco, 10 e 20 J/cm<sup>2</sup>, com três irradiações por semana e tempo de morte único. Novamente constataram que os melhores resultados eram os obtidos com 20 J/cm<sup>2</sup>.

Diversos estudos têm utilizado a fluência de 20 J/cm<sup>2</sup> para analisar o reparo de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos (Al-Watban; Zhang, 1999; Mendez, 2002; Oliveira, 2002).

Mendez (2002) constatou que a associação entre os comprimentos de onda de 685 nm e 830 nm (10 J/cm<sup>2</sup> para cada) foram os que promoveram os melhores resultados no reparo de feridas cutâneas.

Em um estudo mais recente, Al-Watban (2009<sup>a</sup>) utilizou doses de energia de 4,71 J/cm<sup>2</sup> em ratos diabéticos e 2,35 J/cm<sup>2</sup> em ratos normais, com três irradiações por semana.

No presente estudo, através da análise histomorfométrica, ao comparar as diferentes fluências utilizadas, não se evidenciou diferenças estatisticamente significativas. Na análise histomorfológica, ao analisarmos a ferida em nove dias, evidenciou-se uma epitelização avançada, e por vezes completa, do ferimento tanto das feridas tratadas com 4, 8 ou 16 J/cm<sup>2</sup>. Portanto, neste estudo, os ferimentos responderam positivamente e sem diferenças entre eles para as diferentes fluências utilizadas.

O último fator que este estudo se propôs a analisar e comparar com a literatura atual é o tempo de observação das feridas tratadas com *laser*.

Araújo et al. (2007) utilizaram como períodos de observação um, cinco, oito, 12 e 15 dias. Oliveira et al. (2008) utilizaram um, dois, três e quatro dias e

Nussbaum et al. (2009) avaliaram três vezes por semana, entre o primeiro e o 19<sup>o</sup> dia. Dall Agnol et al. (2009) utilizaram tempo único (sete dias), assim como Rocha et al. (2009) (10 dias).

Soares et al. (2009) avaliaram a influência da LLLT no processo de cicatrização de retalhos produzidos em calvária de ratos, nos quais foi implantado por via subcutânea uma matriz dérmica acelular. O *laser* utilizado possuía 685 nm e a dose de energia utilizada foi de quatro J/cm<sup>2</sup>. Os enxertos foram colhidos em um, três, sete e 14 dias após a cirurgia e submetidos a análises histológicas. Os autores observaram que a contagem média de fibroblastos foi significativamente maior no 3<sup>o</sup> dia, mostrando uma afluência acentuada de fibroblastos na área, e concluíram que a cicatrização de retalhos com matriz dérmica acelular parece ser positivamente afetada pela LLLT.

Ribeiro et al. (2009) avaliaram o efeito biomodulatório em miofibroblastos e células T e B da terapia a *laser* em baixa intensidade durante a cicatrização de feridas cirúrgicas irradiadas com 20 J/cm<sup>2</sup> e comprimento de onda de 660 nm, sendo as feridas irradiadas diariamente, por sete dias. Ao oitavo e 14<sup>o</sup> dia de pós-operatório, as feridas foram removidas e submetidas à análise imunohistoquímica de miofibroblastos, células T e células B. A média do número de miofibroblastos foi significativamente maior no grupo irradiado do que no grupo não irradiado no oitavo dia, mas não no 14<sup>o</sup> dia. As células T e as células B foram significativamente mais visíveis no grupo irradiado, tanto no oitavo dia como no 14<sup>o</sup>. Os autores concluíram que a LLLT facilita a diferenciação de miofibroblastos durante as fases iniciais do processo de reparo cicatricial, assim como a laserterapia parece modular a resposta inflamatória positivamente.

Gál et al. (2009) compararam histologicamente os efeitos de diferentes densidades de potência da LLLT com  $\lambda = 635$  nm em ferimentos em ratos tratados ou não com esteróides. Quatro feridas na pele do dorso de 48 ratos foram produzidas, gerando dois grupos (LLLT sem esteróides e LLLT com esteróides). Três feridas foram estimuladas diariamente com um *laser* de diodo com fluência de cinco J/cm<sup>2</sup>, cada uma com diferente densidade de potência (um mW/cm<sup>2</sup>, cinco mW/cm<sup>2</sup> e 15 mW/cm<sup>2</sup>), enquanto a quarta ferida serviu como controle. Dois dias, seis dias e 14 dias após a cirurgia, oito animais de cada grupo foram sacrificados e as amostras foram retiradas para avaliação histológica. Nos ratos tratados sem

esteróides, uma aceleração significativa da síntese de colágeno e epitelização em dois e seis dias após a cirurgia foi observada. Nos ratos tratados com esteróides, em dois e 14 dias, observou-se uma diminuição de leucócitos e macrófagos, assim como redução da área de tecido de granulação. Os autores concluíram que a laserterapia melhorou a cicatrização de feridas em ratos tratados sem esteróides.

No estudo de Oliveira et al. (2008), a LLLT com 660 nm também apresentou os melhores resultados nas fases iniciais da cicatrização, demonstrando um tecido recém-formado semelhante à derme normal.

No presente estudo, ao se analisar o tempo de morte dos animais e comparar os valores referentes à diferença entre as médias das medidas entre as amostras teste e controle, verifica-se que existe diferença significativa somente nos animais mortos no quarto dia de observação.

Este resultado é corroborado com os artigos acima citados que afirmam que a LLLT tem seus efeitos mais evidentes nos momentos iniciais do processo de reparo tecidual, sendo elucidado pela análise histomorfológica, quando ao se comparar os diferentes tempos de cicatrização, observa-se que em quatro dias a ferida ainda está em processo de cicatrização, sem a epitelização completa do ferimento. Porém, em sete e nove dias observa-se o ferimento já epitelizado, distinguindo discretamente apenas em relação à espessura da camada epitelial, onde no nono dia é mais espessa em relação ao sétimo dia, porém sem significância.

Já na comparação entre os valores referentes à diferença entre as médias das medidas entre as amostras teste e controle considerando-se o tempo de morte dos animais e as fluências, verifica-se que não houve diferença significativa em nenhuma das comparações. Isto decorre do fato de os grupos, separados por dose de energia utilizada, não apresentarem diferenças entre si.

Nesta mesma comparação, através do teste ANOVA fatorial univariada, evidenciou-se que não há interação entre os fatores dose de energia e tempo de observação.

Portanto, este estudo indica a realização de novas pesquisas neste campo, considerando os parâmetros utilizados de 4, 8 e 16 J/cm<sup>2</sup>, visto que a grande maioria dos estudos demonstra diferenças entre fluências distintas, porém em um único



período observacional, devendo este ser um período curto de tempo, na qual o processo de reparo tecidual esteja em sua fase inicial.



*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

---

A partir das análises histomorfométrica e histomorfológica, este estudo demonstrou haver uma aceleração no processo cicatricial em ferimentos produzidos em dorso de ratos, quando irradiados com o *laser* em baixa intensidade de fosfeto de índio-gálio-alumínio ( $\lambda = 685$  nm). Não houve diferenças entre as doses de energia utilizadas (4, 8 e 16 J/cm<sup>2</sup>), mas o fator tempo parece ser relevante, sendo as alterações mais evidentes nos momentos iniciais do processo de reparo.



## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

---

Abergel RP, Lyons RF, Castel JC, Dwyer RM, Uitto J. Bioestimulation of wound healing by lasers: experimental approaches in animal models and in fibroblast cultures. *J Dermatol Surg Oncol*. 1987;13(2):127-33.

Al-Watban FA. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(1):127-35.<sup>a</sup>

Al-Watban FA, Zhang XY. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Ther*. 1999;11(1):6-10.

Al-Watban FA, Zhang XY. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*. 2004;22(1):15-8.

Al-Watban FA, Zhang XY, Andres BL, Al-Anize A. Visible lasers were better than invisible lasers in accelerating burn healing on diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):269-72.<sup>b</sup>

Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988;26(1):12-7.

Araújo CE, Ribeiro MS, Favaro R, Zezell DM, Zorn TM. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. *J Photochem Photobiol B*. 2007;86(2):87-96.

Barros JJ, Souza LCM. Traumatismo buco-maxilo-facial. 2<sup>a</sup>.ed. São Paulo: Roca; 2000.

Becker GD, Adams LA, Levin BC. Secondary intention healing of exposed scalp and forehead bone after Mohs surgery. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;121(6):751-4.

Belkin M, Schwartz M. New biological phenomena associated with laser radiation. *Health Phys*. 1989;56( 5):687-90.

Benedicenti A. La valutazione dell' effetto della luce Laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo. In: *Atlante di laserterapia*. 2<sup>a</sup>.ed. Genova: Langa; 1982. p.71-83.

Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights in... wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol*. 2007;35(6):767-79.

Cruañes JC. La terapia laser hoy. Barcelona: Centro de Documentación Laser de Meditec; 1984. p.39-69.

Dall Agnol MA, Nicolau RA, de Lima CJ, Munin E. Comparative analysis of coherent light action (laser) versus non-coherent light (light-emitting diode) for tissue repair in diabetic rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):909-16.

Dederich N. Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue? *J Am Dent Assoc.* 1993;124(2):57-61.

Ezzati A, Bayat M, Taheri S, Mohsenifar Z. Low-level laser therapy with pulsed infrared laser accelerates third-degree burn healing process in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2009;46(4):543-54.

Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO2 laser inhibition of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res.* 1998;77(6):1397-403.

Fonseca RJ, Walker RV. *Oral and maxillofacial trauma.* Philadelphia: Saunders; 1991.

Freire Jr O, Carvalho Neto RA. *O Universo dos Quanta: uma breve história da física moderna.* São Paulo: FTD; 1997.

Gál P, Mokrý M, Vidinský B, Kilík R, Depta F, Harakalová M, et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(4):539-47.

Genovese WJ. *Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em odontologia.* São Paulo: Lovise; 2000.

Gloster HM Jr. The use of second-intention healing for partial-thickness Mohs defects involving the vermilion and/or mucosal surfaces of the lip. *J Am Acad Dermatol.* 2001;47(6):893-7.

Goldim JR. *Pesquisa em saúde: normas leis e diretrizes.* Porto Alegre: HCPA; 1997.

Gutknecht N, Eduardo CP. *A odontologia e o laser: atuação do laser na especialidade odontológica.* Berlin: Quintessence, 2004. p. 25-43.

Hellwarth RW. Control of fluorescent pulsations. In: Singer JR, editor. *Advances in quantum electronics.* New York; Columbia University Press; 1961. p.334-41.

Iordanou P, Lykoudis EG, Athanasiou A, Koniaris E, Papaevangelou M, Fatsea T, et al. Effect of visible and infrared polarized light on the healing process of full-thickness skin wounds: an experimental study. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):261-7.

James H. Wound dressings in accident and emergency departments. *Accid Emerg Nurs.* 1994;2(2):87-93.

Karu TI. Mechanisms of interaction of monochromatic visible light with cells. In: Karu TI, Young AR, editors. V Conference on Laser in Dentistry; 1995; San Jose, California; 1995 Sep 12. p.2-9 [SPIE Proceedings. 1996;2630:2-9]. [acesso 2010 May 19]. Disponível em: <http://spiedigitallibrary.aip.org/dbt/dbt.jsp?KEY=PSISDG&Volume=2630&Issue=1&proc=year&scode=1996>.

Kutsch VK. Lasers in dentistry: comparing wavelengths. J Am Dent Assoc. 1993;124(2):49-54.

Kwon PH, Laskin DM. Clinician's manual of oral and maxillofacial surgery. 2<sup>nd</sup>.ed. Chicago: Quintessence; 1997.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33(1):159-74.

Lievens PC. The effect of i.r. laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. Lasers Med Sci, 1991;6(2):189-91.

Maegawa Y, Itoh T, Hosokawa T, Yaegashi K, Nishi M. Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. Lasers Surg Med. 2000;27(5):427-37.

Maiya GA, Kumar P, Rao L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. Photomed Laser Surg. 2005;23(2):187-90.

Matthews J, Kahn F. Low intensity laser therapy applied in the healing of wounds. Wound Repair Regen, 2009;17(2):A30-A30.

McKenzie AL. Physics of thermal processes in laser-tissue interaction. Phys Med Biol, 1990;35(9):1175-209.

Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SR, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. J Photochem Photobiol B. 2008;92(3):144-52.

Mello JB, Mello GPS. Laser em odontologia. São Paulo: Santos; 2001. p.11-38.

Mendez TMT. Avaliação da influencia da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas a laserterapia [dissertação]. São Jose dos Campos(SP): Universidade. do Vale do Paraíba; 2002.

Miró L, Coupe M, Charras C, Jambon C, Chevalier JM. Estudio capiloscopio de acción de un láser de As-Ga sobre la microcirculación. Inv Clin Laser. 1984;1(2):9-14.

Müller G, Scholz C, Ertl T. Biophysics of laser tissue ablation in bone and dental treatment. Innov Tech Biol Med. 1990;11(1):1-22.

Nussbaum EL, Mazzulli T, Pritzker KP, Heras FL, Jing F, Lilge L. Effects of low intensity laser irradiation during healing of skin lesions in the rat. *Lasers Surg Med*. 2009;41(5):372-81.

O'Brien WJ, Groh CL, Boenke KM. Optical, thermal and electrical properties. In: O'Brien WJ, editor. *Dental materials and their selection*. 2<sup>nd</sup>. ed. Chicago: Quintessence; 1997. p.36-61.

Oliveira PC, Meireles GC, dos Santos NR, de Carvalho CM, de Souza AP, dos Santos JN, et al. The use of light photobiomodulation on the treatment of second-degree burns: a histological study of a rodent model. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):289-99.

Oliveira RAP. Efeitos da fototerapia na cicatrização de feridas cirúrgicas produzidas com o laser de CO<sub>2</sub> [tese], Porto Alegre(RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2002.

Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. *Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea*. 4<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Poli VD, Freitas AZ, Samad RE, Zezell DM, Eduardo CP; Vieira Junior ND. Estudo da Interação de Laser de Femtossegundos com o Tecido Ósseo. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2006;20:165.

Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo Mda S, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006;24(4):474-9.

Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2001;9(3):248-55.

Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):307-13.

Renson CE. Lasers in dentistry. *Dent Update*. 1989;16(9):371-2.

Ribeiro MA, Albuquerque RL, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(1):49-55.

Robbins SL. *Patologia*. 3<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1969.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar VY. *Patologia básica*. 5<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

Rocha Júnior AM, Vieira BJ, de Andrade LC, Aarestrup FM. Low-level laser therapy increases transforming growth factor-beta2 expression and induces



apoptosis of epithelial cells during the tissue repair process. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(2):303-7.

Ross R. Wound healing: recent progress – future directions. *J Dent Res.* 1971;50(2):312-7.

Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histologia: texto e atlas.* 2ª.ed. São Paulo: Panamericana; 1993. p.141-80.

Siegel S. *Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento.* São Paulo: McGraw-Hill; 1975.

Silveira JC, Lopes EE. Alguns aspectos do comportamento do mastócito sob ação do raio laser de Ga-As – 904nm (estudo experimental em cobaias – *Cavia Porcellus*). *Arq. Centro. Estud. Curso Odontol.* 1991;28(1):73-96.

Soares LP, de Oliveira MG, Pinheiro ALB, Fronza BR, Maciel MES. Effects of laser therapy on experimental wound healing using oxidized regenerated cellulose hemostat. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(1):10-13.

Soares LP, de Oliveira MG, Reis SRD. Effects of diode laser therapy on the acellular dermal matrix. *Cell and Tissue Bank.* 2009;10(4):327-332.

Trelles MA, David LM, Rigau J. Penetration depth of ultrapulse carbon dioxide laser in human skin. *Dermatol Surg.* 1996;22(10):863-5.

Trelles MA, Mayayo E, Iglesias JM. Histological study of the effect of the 632 nm He-Ne irradiation on the nasal mucous of the rabbit. Its clinical interest. In: *International Congress Optoelektronik 1983. Proceedings.* p.105-9.

Trelles MA, Mayayo E, Miró L, Rigau J, Baudin G, Calderhead RG. The action of low-reactive level Laser therapy (LLLT) on Mast Cells: a possible pain relief mechanism examined. *Laser Ther.* 1989;1(1):27-30.<sup>a</sup>

Trelles MA, Mester A, Rigau J, Mayayo E, Resa A, Lapin R. Clinical use of He-Ne Laser for wound healing. *J Bloodless Med Surg.* 1989;7(1):3-7.<sup>b</sup>

Vieira S, Hossne WS. *Metodologia científica para a área de saúde.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2003.

Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci.* 2003;18(2):95-9.

Zanini SA. *Cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial.* Rio de Janeiro: Revinter; 1990.



*Apêndice*

---

## APÊNDICE A

Medidas de massa dos animais.

Grupo	Subgrupo	Peso (g)
<b>GRUPO I</b> <b>8 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 11</b>	I A (4 dias)	340
		330
		394
		392
	I B (7 dias)	368
		319
		370
		348
	I C (9 dias)	330
		364
		320
<b>GRUPO II</b> <b>16 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 12</b>	II A (4 dias)	322
		343
		396
		362
	II B (7 dias)	332
		357
		386
		382
	II C (9 dias)	318
		321
		348
<b>GRUPO III</b> <b>4 J/cm<sup>2</sup></b> <b>n = 12</b>	III A (4 dias)	346
		385
		339
		371
	III B (7 dias)	341
		338
		339
		394
	III C (9 dias)	359
		341
		371
		309



*Anexos*

---

**ANEXO A**

Aprovação do Projeto de Tese pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

---

**Porto Alegre 16 de setembro de 2009**

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0024/09  
**Intitulado:** Análise da fluência do laser fosfeto de índio-gálio-alumínio no processo de reparo de feridas em dorso de ratos  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira  
**Pesquisadores Associados** Vladimir Dourado Poli  
**Nível:** Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 16 de setembro de 2009.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS*

**Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B**

Aprovação do Projeto de Tese pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Pró-  
Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 096/09 – CEUA

Porto Alegre, 22 de outubro de 2009.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00114, intitulado: **“Análise da fluência do laser fosfeto de índio-gálio-alumínio no processo de reparo de feridas em dorso de ratos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.  
Prof. Dra. Marília G. de Oliveira  
Faculdade de Odontologia  
N/Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@puhrs.br](mailto:ceua@puhrs.br)