



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**ANÁLISE DO LASER AIGaInP  
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE LESÕES  
CUTÂNEAS**

**Bianca de Almeida Bortot**

**Piracicaba**

**2005**

**UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA – UNIMEP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**ANÁLISE DO LASER AIGaInP  
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE LESÕES  
CUTÂNEAS**

**Bianca de Almeida Bortot**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisioterapia – Mestrado – da Universidade Metodista de Piracicaba, para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine C. O. Guirro

**Piracicaba  
2005**

## Dedicatórias

Dedico este trabalho aos meus pais, Gisleine e Ricardo, que sempre com simplicidade, dedicação e muita luta, me proporcionaram uma boa educação e caráter para que eu pudesse concretizar mais um passo importante em minha vida, passo este, que é o impulso que faz com que minha caminhada fique mais próxima de um fim repleto de desejos e sonhos a se realizarem.

À minha avó Helena, minha segunda mãe, por fazer parte de todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado Serginho, por ter compreendido as minhas ausências e por ter estado nos momentos mais difíceis que passei, sempre ao meu lado, com muito carinho, dedicação e amor, se preocupando e realizando tudo o que podia e até mesmo o impossível para me fazer feliz.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Profa. Elaine Caldeira de Oliveira Guirro por ter me orientado, mostrando e ensinando a arte da pesquisa. Vibrou e viveu as minhas conquistas.

À Profa. Maria Luiza Ozores Polacow, obrigada por ter me ajudado, estando disponível em todos os momentos.

À Marina Aparecida da Costa Betito Torres, que colaborou na realização deste trabalho, obrigada por todos os momentos.

Externo também os agradecimentos às funcionárias: Maria Cristina de Almeida Prado Ribeiro e Patrícia Carla Paulino Belotto, por terem colaborado na realização desta pesquisa.

## Resumo

O Laser de Baixa Potência (LBP) é um recurso físico bastante utilizado como coadjuvante em processos de reparação tecidual. A proposta deste estudo foi analisar os efeitos do laser AlGaInP, de 670 nm, com dose de 7 J/cm<sup>2</sup>, irradiados por 7 ou 14 dias, no processo de reparação tecidual de feridas cirúrgicas induzidas. Foram utilizados 45 ratos machos adultos da linhagem Wistar. Para análise histológica 20 animais foram submetidos a incisões cirúrgicas de 1 cm<sup>2</sup>, divididos aleatoriamente em 4 grupos distintos com 5 animais cada (GL7, GL14, GL7m e GL14m), estimulados sem e com fita cirúrgica hipoalergênica respectivamente. O grupo controle, GC (n=10), com simulação de tratamento (sham), foi dividido em dois grupos iguais (GC7 e GC14). Para análise biomecânica, quinze ratos tiveram o dorso tricotomizado e foram submetidos à incisão cirúrgica cutânea linear, perpendicular à coluna vertebral, com dois centímetros de comprimento. A amostra foi dividida em grupo tratado, GRL (n=10), dividido em dois grupos iguais (GRL14, GRL14m) com e sem fita cirúrgica respectivamente, e grupo sham, GRC (n=5). Imediatamente após o sacrifício dos animais, as amostras foram coletadas e submetidas ao ensaio de tração para a análise da força máxima (FM), força de ruptura (FR) e deformação (D), em Máquina Universal de Ensaio Mecânico (DL 2000 EMIC®). Para as estatísticas descritivas das variáveis relacionadas aos valores morfométricos e histométricos, bem como dos intervalos de confiança, foi utilizado o procedimento PROC UNIVARIATE do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0. Para avaliação da análise morfométrica (re-epitelização), segundo os diferentes tratamentos, utilizou-se o Método de Quadrados Mínimos, por meio do procedimento PROC GLM do mesmo programa. Para comparações múltiplas foi utilizado o Teste *t* de Student, com ( $p < 0,05$ ). Os resultados da análise morfométrica apontam que os GL7 e GL7m não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os GL7 e GL7m diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do GC7. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos tratados e o controle para os valores da FM (Kgf), FR (Kgf) e D (mm). Conclui-se pela análise histológica e biomecânica, que o LBP parece ter maior interferência no processo de reparo com 7 dias de estimulação.

**Palavras – chave:** reparação tecidual, laser de baixa potência

## Abstract

Low Power Laser (LBP) is a physical resource quite used as accomplice in the processes of tissue healing. The purpose of this study was to analyze the effects of the laser ALGaInP, of 670 nm, with dose of 7 J/cm<sup>2</sup>, irradiated for 7 or 14 days, in the process of tissue repairing of induced surgical wounds. Forty five adult male rats of the lineage Wistar were used. For histological analysis 20 animals were submitted to surgical incisions of 1 cm<sup>2</sup>, randomly divided in 4 different groups with 5 animals each (GL7, GL14, GL7m and GL14m), stimulated without and with hipoalergenic paper tape, respectively. The control group, GC (n=10), with treatment simulation (sham), was divided in two groups alike (GC7 and GC14). For biomechanics analysis, fifteen rats had the back tricotomized and they were submitted to the cutaneous surgical incision lineal, perpendicularly to the spine, with two centimeters of length. The sample was divided in treated group, GRL (n=10), divided in two groups alike (GRL14, GRL14m) with and without paper tape respectively, and group sham, GRC (n=5). Immediately after euthanizing the animals, the samples were collected and submitted to the traction rehearsal for the analysis of the maximum force (FM), rupture force (FR) and deformation (D), in Universal Machine of Mechanical Rehearsal (DL 2000 EMIC®). The PROC UNIVARIATE procedure, version 8.0 of the Statistical Analysis System was used for the descriptive statistics of the variables related to the values morfometrics and histometrics, as well as of the trust intervals. The Minimum Squares Method was used, through the procedure PROC GLM of the same program for evaluation of the morfometric analysis (epitelization), according to the different treatments. For multiple comparisons the Test was used t of Student, with (p<0,05). The results of the morfometric analysis point that GL7 and GL7m did not present significant differences amongst themselves (p>0,05). However, GL7 and GL7m differed significantly (p<0,05) from GC7. There wereno statistical changes (p>0,05) among the treated groups and the control for the values of FM (Kgf), FR (Kgf) and D (mm). It is concluded by the histological and biomechanics analysis that morfometric and histometric LBP seems to have larger interference in the repair process with 7 days of stimulation.

**Key words:** wound healing, low power laser.

## **Lista de Figuras**

<b>Figura 01 – Equipamento Laserpulse Ibramed® com a caneta aplicadora de comprimento de onda 670 nm (laser AlGaInP).....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 02 – LASER CHECK – analisador de potência digital : acoplamento do emissor de laser ao sensor do analisador de potência digital.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 03 – Máquina Universal de Ensaio Mecânico, DL 2000 Emic®, conectado ao microcomputador com o programa de coleta de dados Tec. Versão 1. 1 – Laboratório de Materiais de Construção Mecânica da UNIMEP – Santa Bárbara do Oeste – SP.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 08 – Corpo de prova (pele de rato) fixado à Máquina Universal de Ensaio Mecânico, sendo submetido a uma força axial de tração pré teste de 150 kgf.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 04 – Ferida cirúrgica de 1cm<sup>2</sup> nos dorsos dos ratos, dos grupos: GC e GL.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 05 – Ferida cirúrgica linear, perpendicular à coluna vertebral, com 2 cm de comprimento, GRL.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 06 – Forma de corte para a padronização das amostras (corpo de prova).....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 07 – Esboço representativo do corpo de prova, especificando as suas áreas: cabeça, raio de concordância e Lo ( parte útil ). .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 09 – Corpo de prova (pele de rato), fixado à Máquina Universal de Ensaio Mecânico, rompendo-se devido a força axial de tração exercida, determinando a finalização do teste.....</b>	<b>47</b>

**Figura 10 – Gráfico Força x Deformação, a partir do qual são obtidas as principais propriedades mecânicas do ensaio de tração.....48**

**Figura 11 – Esquema demonstrando as três áreas estudadas em cada lesão..... 50**

**Figura 12 – Comportamento do processo de re-epitelização (em  $\mu\text{m}$ ) nos diferentes tratamentos avaliados: GC7, GL7 e GL7m.....55**

**Figura 13 – Imagens de lesões mostrando a re-epitelização nos grupos: controle (GC7), laser (GL7) e laser + micropore (GL7m).....57**

**Figura 14 – Comportamento de leucócitos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m)...60**

**Figura 15 – Comportamento de fibrócitos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m)... 60**

**Figura 16 – Comportamento de fibroblastos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m)... 61**

**Figura 17 – Imagens de áreas de lesão de grupos tratados por 7 dias - coluna da esquerda e 14 dias – coluna da direita, representando os grupos: GC7, GC14, GL7, GL14, GL7m e GL14m (400x, HE).....64**

**Figura 18 – Relatório de Ensaio: Gráfico força x deformação adquirido durante um dos ensaios mecânicos de tração em pele de rato.....65**

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1 – Números de observação (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX), bem como, o intervalo de confiança inferior (LINF) e superior (LSUP) valores de re-epitelização (R-EP).....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 2 – Resumo da análise de variância para a variável, de acordo com o Modelo I. ....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 3 – Estimativas de médias de quadrados mínimos para variável R-EP de acordo com os tratamentos avaliados.....</b>	<b>55</b>
<b>Tabela 4 – Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), mínimos (MIN) e máximos (MAX) e intervalos de confiança inferior (LINF) e superior (LSUP) para leucócitos, fibrócitos e fibroblastos.....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 5 – Resumo das análises de variância para as variáveis leucócito, fibrócito e fibroblasto, de acordo com o modelo II. ....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 6 – Estimativas de médias de quadrados mínimos para variáveis: leucócito, fibrócito e fibroblasto de acordo com os Tratamentos e os Dias de avaliação.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 7 – Valores médios <math>\pm</math> dp da força máxima (FM), força de ruptura (FR) e deformação (D), dos grupos controle (GRC), grupo laser 14 dias (GRL14) e grupo laser com micropore (GRL14m).....</b>	<b>64</b>

## Lista de Abreviaturas e Siglas

**LBP:** Laser de Baixa Potência

**PDGF:** Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

**TGF -  $\beta$ :** Fator de Crescimento Transformador Beta

**TGF -  $\alpha$ :** Fator de Crescimento Transformador Alfa.

**FGF - 2:** Fator de Crescimento Fibroblástico Dois

**EGF:** Fator de Crescimento Epidermal Derivado de Plaqueta

**VEGF:** Fator de Crescimento Vascular Endotelial

**HeNe:** Hélio - Neônio

**nm:** nanômetro

**AsGa:** Arseneto de Gálio

**AsGaAl:** Arseneto - Gálio - Alumínio

**AlGaInP:** Alumínio - Gálio - Índio - Fósforo

**LLLT:** Low Level Laser Therapy

**HILT:** High Intensity Laser Therapy

**J/cm<sup>2</sup>:** Joules por centímetro quadrado

**J:** Joules

**ATP:** Adenosina Tri - Fosfato

**RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucléico Mensageiro

**mW:** miliWatts

**cm:** centímetro

**mW/cm<sup>2</sup>:** miliWatts po centímetro quadrado

**Kgf:** Kilograma força

**UNIMEP:** Universidade Metodista de Piracicaba

**mg/kg:** miligrama por kilograma

**mg/mL:** miligrama por mililitros

**IP:** intraperitonal

**cm<sup>2</sup>:** centímetro quadrado

**ABNT:** Associação Brasileira de Normas Técnicas

**CM:** Coeficiente Micrométrico

**Lo:** Parte útil do corpo de prova

**mm:** milímetro

**mm/min:** milímetro por minuto

**µm:** micrômetro

**GC:** Grupo Controle

**GC7:** Grupo Controle - 7 dias de simulação da irradiação laser

**GC14:** Grupo Controle - 14 dias de simulação da irradiação laser

**GL:** Grupo Tratamento Laser

**GL7:** Grupo Tratamento Laser - 7 dias de irradiação laser

**GL14:** Grupo Tratamento Laser - 14 dias de irradiação laser

**GL7m:** Grupo Tratamento Laser - 7 dias de irradiação laser com fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica.

**GL14m:** Grupo Tratamento Laser - 14 dias de irradiação laser com fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica.

**GRL:** Grupo Resistência Tênsil

**GRL14:** Grupo Resistência Tênsil - 14 dias de irradiação laser.

**GRL14m:** Grupo Resistência Tênsil - 14 dias de irradiação laser com fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica.

**GRC:** Grupo Resistência Tênsil - 14 dias de simulação da irradiação laser

**N:** Números de Observação

**MED:** Média

**DP:** Desvio Padrão

**CV:** Coeficiente de Variação

**MIN:** Mínimo

**Máx:** Máximo

**LINF:** Intervalo de Confiança Inferior

**LSUP:** Intervalo de Confiança Superior

**R-EP:** Valores de Re-epitelização

## Sumário

<b>1 – Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 – Revisão de Literatura.....</b>	<b>18</b>
2.1 – Reparação Tegumentar.....	18
2.2 – Laser: Breve Histórico.....	22
2.3 – Parâmetros: Interação Fotobiológica .....	23
2.4 – Efeitos do Laser de Baixa Potência no Reparo Tecidual.....	26
<b>3 – Objetivo.....</b>	<b>32</b>
<b>4 – Material e Método.....</b>	<b>34</b>
4.1- Material.....	34
4.1.1 Animais de Experimentação.....	34
4.1.2 Curativo Oclusivo.....	35
4.1.3 Equipamentos Utilizados.....	35
4.1.3.1 Laser de Baixa Potência.....	35
4.1.3.2 Analisador de Potência Digital.....	36
4.1.3.3 Máquina Universal de Ensaio Mecânico.....	36
4.1.3.4 Paquímetro Digital.....	37
4.1.3.5 Microscópio Óptico, Analisador de Imagem e Ocular Milimetrada.....	38
4.2- Métodos.....	38
4.2.1 Grupos Experimentais.....	38
4.2.2 Procedimento Cirúrgico.....	39
4.2.3 Tratamentos - Métodos de Aplicação.....	41

4.2.4 Ensaio Mecânico de Tração.....	42
4.2.4.1 Corpo de Prova.....	42
4.2.4.2 Ensaio Mecânico.....	44
4.2.4.3 Propriedades Mecânicas.....	47
4.2.5 Processamento Histológico.....	48
4.2.5.1 Análise Morfométrica .....	49
4.2.5.2 Análise Histométrica.....	49
4.2.6 Análise Estatística.....	50
<b>5 – Resultados.....</b>	<b>53</b>
5.1 - Resultados Morfométricos (Re-epitelização).....	53
5.2 - Resultados Histométricos (Leucócitos, Fibrócitos e Fibroblastos).....	57
5.3 – Resultados do Ensaio de Tração.....	64
<b>6 – Discussão.....</b>	<b>67</b>
6.1 – Da Metodologia.....	67
6.2 - Dos Resultados.....	71
6.3 – Do Ensaio de Tração.....	74
<b>7 – Referências Bibliográficas.....</b>	<b>76</b>

## 1 – Introdução

A pele humana é interface entre o meio interno do corpo humano interno e o ambiente, assim a perda de sua integridade pode levar à um aumento da perda de fluidos, infecção, comprometimento do sistema imunológico, invasões por células carcinogênicas e hipotermia. Além disso, resulta-se em cicatriz, podendo ocorrer aumento ou diminuição da sensibilidade e mudança na imagem corporal (WYSOCKI, 1999).

Perante um traumatismo tecidual, há o desencadeamento de um complicado conjunto de eventos vasculares, celulares e bioquímicos que objetivam substituir as células mortas ou imperfeitas por células saudáveis, ocorrendo o processo de reparação tecidual (THOMAZ et al., 1996). Este processo, não é completamente regenerativo, pois a integridade dérmica é estabelecida, mas com fechamento da ferida por tecido cicatricial, faltando folículos pilosos e outros apêndices dérmicos, exibindo um padrão desorganizado de deposição de colágeno e menor resistência tênsil ao compararmos com a pele intacta (DANG e BEANES et al., 2003).

No processo de cicatrização tecidual, as falhas de reparo mais importantes são as que ocorrem nos estágios iniciais, levando a acentuação de edema, reduzida proliferação vascular e diminuição dos elementos celulares, tais como: leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Conseqüentemente, ocorrendo baixa síntese de colágeno e aumento do risco de infecção. Tendo em vista estes agravantes, estudos norteiam-se na busca de novos métodos terapêuticos que possam solucionar, ou ainda, minimizar, as falhas no processo de reparo tecidual. Entre tais métodos a terapia com Laser de Baixa Potência (LBP) tem ocupado lugar de destaque (CARVALHO et al., 2003). Seu êxito deve-se as particularidades de respostas que induz nos tecidos, como redução de edema, diminuição do processo inflamatório,

aumento da fagocitose, aumento da síntese de colágeno e epitelização (GOGIA, 1995).

O LBP é um aliado do profissional da saúde nos cuidados de uma variedade de feridas na pele, entre elas: esfoladuras, queimaduras, incisões cirúrgicas e, talvez a mais difícil de se tratar, as ulcerações (TY HOPKINS et al., 2004).

O tratamento ideal de uma ferida cutânea é a instituição de medidas profiláticas, porém uma vez instalada, deve-se intervir precocemente, objetivando evitar ou minimizar os riscos recorrentes, bem como facilitar o processo de cicatrização (GUYTON et al., 1998).

A incorporação do laser como instrumento terapêutico tem sido acompanhada, na área da saúde, com pouca comprovação experimental, o que gera de um lado, incertezas quanto às suas reais ações e de outro, atribuições não pertinentes a essa forma de radiação. Entretanto, tornou-se um método terapêutico muito utilizado pelos profissionais (WALKER et al., 2000; REDDY et al., 2001; GUIRRO e GUIRRO, 2002).

O reparo tecidual mediado pelo LBP têm sido bastante estudado, porém com resultados controversos e pouco reprodutíveis, devido a falta de detalhes sobre os parâmetros físicos utilizados nos experimentos. Muitos autores (BISHT et al., 1999; ALLENDORF et al., 1997; TY HOPKINS et al., 2004) concordam que há necessidade de protocolos padronizados e melhor investigação controlada de alterações nos níveis celulares, antes da difusão do uso clínico.

Diante dos fatos apontados, e da dificuldade da definição de parâmetros físicos do LBP na prática clínica, justifica-se a necessidade de pesquisas controladas que fundamentem seus efeitos histológicos e biomecânicos no processo de cicatrização de ferida, além de analisar a relação dose-efeito nos tecidos.

**Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!**

16

**Created by eDocPrinter PDF Pro!!**

## **2 – Revisão de Literatura**

### **2.1 – Reparação Tegumentar**

A reparação tegumentar apresenta três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora, sendo estas distintas e superpostas (MCCULLOTH E KLOTH et al., 2002), pois não há delimitação exata entre elas (COTRAN et al., 2000). Entretanto estas fases seguem uma seqüência temporal específica; a menos que fatores interfiram, como vários fatores patológicos: diabetes, perfusão arterial diminuída, desnutrição e sepsia (SCHAFFER e NANNEY, 1996; SCHINDL et al., 1998).

- Fase Inflamatória

A fase inflamatória é uma fase essencial da cicatrização, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia das células da circulação para o meio ambiente da ferida, liberação de citocinas e fatores de crescimento, além da ativação de células migrantes (HOUGLUM, 1992; SCHAFFER e NANNEY, 1996).

Imediatamente após a lesão, a fase inflamatória começa com a homeostasia (COLLIER, 2003). Os contribuintes para a homeostasia incluem a vasoconstrição, agregação plaquetária e deposição de fibrina, resultante da cascata de coagulação. O produto final deste processo é a formação da crosta; esta é composta primariamente por concentração de fibrina e agregação plaquetária embebidos em células sanguíneas (MARTIN, 1997). Este processo previne a ampla perda de fluido e eletrólitos do local da ferida e limita a contaminação por agentes nocivos (MONACO e LAWRENCE, 2003).

Uma vez que a homeostasia é realizada, a inflamação tardia, 24 a 96 horas após a lesão, envolve a liberação de agentes vasodilatadores, histamina e serotonina, os quais aumentam a permeabilidade capilar local do leito da ferida (COLLIER, 2003) e fatores de crescimento, reguladores do recrutamento de células inflamatórias da circulação para o local da ferida, ambos liberados pela desgranulação plaquetária (MARTIN, 1997), permitindo que leucócitos (primeiro neutrófilos, mais tarde monócitos) e proteínas plasmáticas penetrem no local da ferida (ADZICK, 1999; O'LEARY et al., 2002).

Pelo menos três tipos de organelas de armazenamento estão envolvidas na desgranulação das plaquetas: grânulos alfa, que contêm fatores de crescimento, como: fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fatores beta e alfa de crescimento transformador (TGF –  $\beta$  e TGF –  $\alpha$ ), fator 2 de crescimento fibroblástico (FGF – 2), fator de crescimento epidermal derivado de plaqueta (EGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); sendo que destes fatores, PDGF, TGF –  $\beta$  e FGF – 2 são os mais importantes. Além disso, há a liberação de glicoproteínas adesivas, como fibronectina, fibrinogênio, trombospondina e fator de Von Willebrand; corpúsculos densos, que armazenam aminas vasoativas como serotonina, que aumentam a permeabilidade da microvasculatura; e lisossomas, que contêm hidrolases e proteases (MONACO e LAWRENCE, 2003).

O infiltrado de neutrófilos “recolhe” os restos celulares, materiais contaminantes e bactérias, e os monócitos, infiltram no local da ferida mais tarde e se diferenciam em macrófagos, que são cruciais na orquestração da restauração tecidual (ADZICK, 1999), pois seus lisossomas são excessivamente carregados com enzimas hidrolíticas as quais são essenciais na digestão e transporte de células e restos orgânicos do local da ferida (SCHILLING, 1976). Em adição á isto, contribuem para a degradação da matriz, angiogênese e remodelação. Suas

citocinas estimulam a proliferação fibroblástica, as quais resultam na cicatrização e remodelação completa da ferida (SCHAFFER e NANNY, 1996). Já as células plasmáticas aparecem com produção de antibióticos específicos para bactérias específicas e antígenos externos presentes e persistentes no local da ferida (SCHILLING, 1976).

- Fase Proliferativa

Após a lesão tecidual ocorre estímulo desconhecido provocando proliferação de fibroblastos e de células epitelial e endotelial no local da ferida (SCHILLING, 1976), sendo esta crucial para o processo de angiogênese (IRUELA – ARISPE e DVORAK, 1997).

A fase proliferativa é uma fase de predominante atividade celular direcionada á reparação do tecido traumatizado (MCCULLOTH e KLOTH, 2002). Neste período inicia-se a formação do tecido de granulação, ou seja, da matriz da reparação tecidual. Para isso, são necessárias grande proliferação fibroblástica e migração celular para dentro da matriz provisória (O'LEARY et al., 2002).

O epitélio se regenera rapidamente para reassumir sua função de barreira. Isto começa com a mitose das células basais da epiderme, e é seguido pela migração do epitélio, pelos bordos da ferida abaixo, e atravessando a incisão. O epitélio migra sobre a forma de uma lâmina até que entre em contato com outras células epiteliais, momento no qual toda a movimentação cessa. Á medida que a ferida matura, o epitélio se espessa (CRUSE e MCPHEDRAN, 1991).

O estímulo para a migração e proliferação durante a fase proliferativa não foi ainda determinado, porém há várias possibilidades e uma destas, é a liberação local

de fatores de crescimento e o aumento da expressão dos receptores destes fatores (SINGER e CLARK, 1999).

É ressaltada a importância dos fibroblastos, por sintetizarem o colágeno, que é a substância responsável pela força tênsil e integridade do tecido, que sustenta uma recente e frágil rede de capilares e mantém a base para a formação do tecido de granulação (MODOLIN e KAMAKURA, 1981).

Próximo ao final da fase proliferativa, o colágeno sintetizado passa por mudanças, transformando-se em colágeno tipo I e este processo torna-se contínuo até que uma abundante matriz de colágeno seja depositada no local da ferida (O'LEARY et al., 2002).

- Fase Remodelagem

Durante a fase de remodelagem, o tecido de granulação é substituído por tecido cicatricial e a crosta, rica em fibrina, é substituída por tecido cicatricial maduro devido uma deposição ordenada de fibronectina e colágeno tipo III, e finalmente, por colágeno tipo I, ácido hialurônico e proteoglicanas (O'LEARY et al., 2002).

Com o tempo, ocorre entrecruzamento de diferentes padrões das fibras de colágenos, sendo este responsável pela força e integridade do repouso (GONÇALVES e PARIZOTTO, 1998).

Durante a fase de remodelação, o tamanho da ferida é diminuído substancialmente, como resultado de células mediadoras de contração da matriz. Isto é primariamente caudado pelos fibroblastos que se encontram no tecido de granulação e muitos dos quais se diferenciam em um fenótipo, que são referidos como miofibroblastos (O'LEARY et al., 2002).

A contração da ferida e a síntese da matriz são regulados por muitas citocinas, mas em particular pelo TGF –  $\beta$  (BETTINGER et al., 1996) e a diferenciação de fibroblasto em miofibroblasto (DESMOULIERE et al., 1993).

Apesar de uma longa fase de remodelagem permanente, as fibras colágenas no tecido cicatrizado não se tornarão tão organizadas como na derme intacta; da mesma forma, a resistência tênsil da cicatriz, também não será igual (MONACO e LAWRENCE, 2003).

## 2.2 – Laser: Breve Histórico

Em 1917, Albert Einstein apresentou os princípios teóricos sobre a amplificação da luz pela emissão estimulada da radiação (CARVALHO et al., 2001).

Townes, Gordon e Zeiger, em 1950, desenvolveram o primeiro trabalho com radiação eletromagnética amplificada, construindo o *MASER* (oscilador que operava na faixa microondas), criando assim, a possibilidade de trabalhar na região visível de radiação (SILVA et al., 1998; KLOTH, 1997).

Em 1958, Townes e Schawlow demonstraram a possibilidade de construir um laser, e em 1960, Theodoro Maiman viabilizou na prática esta comprovação teórica, produzindo o primeiro feixe de luz de laser de rubi, nos Estados Unidos (SILVA et al., 1998; BAXTER, 1997).

Foi desenvolvido, em 1961, o laser de baixa potência Hélio - Neônio (HeNe), emitindo a radiação visível vermelha, com 632,8 nm de comprimento de onda, tornando-se o laser mais freqüentemente empregado para a realização de aplicações atérmicas. (BAXTER, 1997). No final da década 70, os lasers Arseneto de Gálio (AsGa) e Arseneto de Gálio e Alumínio (AsGaAl), faixa infravermelha, fora do alcance da emissão visível, foram produzidos (TUNÉR e HODE, 1999).

A atividade inicial da terapia laser começou na Europa Oriental, pelo pesquisador Endre Mester, considerado o pai da bioestimulação (MESTER et al., 1971), pois foi quem primeiramente se voltou para as possíveis aplicações clínicas das interações atérmicas da luz do laser com os tecidos (CARVALHO et al., 2003). Desde então, o laser tornou-se uma modalidade terapêutica, principalmente na antiga União Soviética e no Oriente (BAXTER et al., 1991).

Dr. Friedrich Plog, do Canadá, realizou em 1973, no Ocidente, um dos primeiros trabalhos com laser, verificando o uso do mesmo na acupuntura (KITCHEN e PARTRIDGE, 1991). A partir daí se inicia a aplicação do laser terapêutico em diversas patologias, como também em pesquisas experimentais, obtendo desta maneira, avanços no conhecimento dos efeitos fisiológicos, mecânicos de produção e no aperfeiçoamento do aparelho (ORTIZ et al., 2001).

Atualmente novos instrumentos estão disponíveis no mercado, possibilitando otimizar as respostas dos tecidos superficiais. São equipamentos que, além de gerarem respostas semelhantes ao do HeNe, pela proximidade do comprimento de onda, necessitam de um menor tempo de irradiação, por apresentarem maior potência média. Dentre os lançamentos atuais do mercado nacional pode-se citar os emissores de Arseneto – Gálio – Alumínio, AsGaAl, e Alumínio–Gálio–Índio–Fósforo, AlGaInP (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

Com o acelerado desenvolvimento tecnológico, o profissional da saúde, sempre deverá estar atualizado e atento ao completo entendimento da terminologia laser, aos parâmetros de tratamento mais adequados e a interação laser – tecido, para assim, em seus tratamentos, alcançar resultados favoráveis.

### **2.3 – Parâmetros: Interação Fotobiológica**

Os lasers podem ser classificados em Laser de Baixa Potência (LBP) ou Low Level Laser Therapy (LLLT),  $< 1\text{ W}$ , considerados não-cirúrgicos, ou de alta potência,  $> 1\text{ W}$ , cirúrgicos, denominados de HILT, High Intensity Laser Therapy (BRUGNERA e PINHEIRO, 1998).

A potência de radiação do LBP é baixa (2 a 30 mW), sugerindo que os efeitos biológicos ocorrem devido aos efeitos diretos da irradiação e não como resultado do aquecimento (GUIRRO e GUIRRO, 2002; SCHINDL et al., 2000).

A determinação dos efeitos terapêuticos específicos produzidos pelos tratamentos por LBP é regida conforme o comprimento de onda, pois este parâmetro determina quais as biomoléculas específicas que absorverão a radiação incidente, e portanto, a interação fotobiológica subjacente a qualquer efeito terapêutico específico (BAXTER, 1998). Em particular as radiações laser com comprimento de onda de 670.0, 830.0, 904.0 e 632.8 nm apresentam a característica bioestimulatória, ou seja, estimulam o processo de cicatrização tecidual (GUIRRO e GUIRRO, 2002).

Ao incidir a luz laser em uma ferida, com comprimento de onda que se enquadra na faixa terapêutica, pode ocorrer a excitação de cromóforos específicos, destacando-se a hemoglobina e a melanina. Ambos são fortes absorventes da irradiação e estão presentes em muitos tecidos em altas concentrações; porém, em concentrações menores, uma grande variedade de outros cromóforos está presente no sistema biológico, podendo também ser importantes ao tecido (HILLENKAMP, 1989). Conseqüentemente, ocorre a indução de reações fotoquímicas específicas e incrementação do fluxo de sangue, iniciando o efeito de fotoestimulação que desencadeia o incremento do metabolismo celular (KARU, 1987). Sugere-se que o metabolismo celular é aumentado devido os fotorreceptores mitocondriais de luz monocromática, aumentando o metabolismo respiratório de certas células, afetando

assim, suas propriedades eletrofisiológicas (MEYERS, 1990). O resultado final destes processos é a reparação tecidual e a estimulação do sistema imune, linfático e vascular (MEJÍA et al., 1999).

A dosimetria é outro fator importante, e deve ser observada para cada tipo de lesão, relacionando-a com a profundidade, características teciduais, estágio da lesão e condições fisiológicas dos pacientes, como idade, cor, grau de nutrição e hidratação, assim como o estado físico e imunológico do indivíduo (PARIZOTTO et al., 2001). Entretanto, a dosimetria ótima para terapia laser e a relação dose – efeito é ainda desconhecida e mal documentada, sendo portanto, uma questão controversa (BECKERMAN et al., 1992; KANA et al., 1981).

Baseando-se em estudos prévios, Kitchen e Partridge (1991), relataram que efeitos maléficos possivelmente crescem com os resultados das aplicações do LBP, por não se saber a dose da aplicação deste laser nas regiões onde se inserem, assim afirmaram que a densidade média de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> ou acima, pode resultar em um processo inibidor e danoso, sendo o mais seguro a diminuição da dose. Baxter (1998), citou que a dose para o tratamento das margens da ferida não deve ser mais de 1J por ponto, ou aproximadamente 10J/cm<sup>2</sup>, entretanto no leito da ferida, a dose da irradiação mais comumente recomendada é de 4J/cm<sup>2</sup>.

Sasaki e Ohshiro et al., (1997) relatam que o comprimento de onda e a densidade média de energia são fatores preponderantes para o sucesso da terapia laser no que tange a cicatrização de feridas.

Dependendo da dose, duração, comprimento de onda e tipo de tecido, o efeito da irradiação pode ser estimulante, inibitório ou às vezes lesivo (BASFORD, 1995).

Apesar da extensa disponibilidade de lasers dentro da área clínica, há ainda incertezas á respeito dos parâmetros mais adequados para tratamento (SHIELDS e

O'KANE, 1994). A dificuldade de compreender os efeitos fisiológicos do tecido irradiado pelo LBP é devido a grande diversidade de animais utilizados, a variedade de tipos de laser e suas distintas dosagens, o que dificulta a comparação de resultados em diferentes estudos (MEYERS, 1990; KITCHEN e PARTRIDGE, 1991; GARCIA et al., 1996; MEJÍA et al., 1999; SCHINDL et al., 2000),

## **2.4 – Efeitos do Laser de Baixa Potência no Reparo Tecidual**

Mester et al., (1971) foram os pioneiros na investigação do uso da irradiação laser como uma modalidade fototerapêutica para a indução ou aceleração da cicatrização de ferida (SCHINDL et al., 2000). Esta, foi uma das primeiras áreas na qual o efeito do LBP foi investigado, especulando-se a melhora da cicatrização através de mudanças dos níveis celulares, como os aumentos do metabolismo do tecido lesado, síntese de colágeno, proliferação celular, resistência tênsil e da fase proliferativa da reparação (BABAPOUR et al, 1995).

Pesquisas prévias sugerem que o LBP induz a proliferação celular (LAM et al., 1986; MESTER et al., 1971), transformação de fibroblasto em miofibroblasto (POURREAU-SCHNEIDER et al., 1990), aumento da capacidade fagocitária dos leucócitos (MESTER et al., 1985), o aumento da síntese de ATP, a estimulação da produção de ácido nucléico e o aumento da divisão celular (MORIMOTO et al., 1994; PASSARELA et al., 1984). Além disso, o aumento da resistência tênsil do tecido cicatricial, pois ocorre a estimulação da síntese de colágeno (KOVÁCS et al., 1974; LYONS et al., 1987) e a estimulação da cicatrização da ferida através do aumento da expressão do gene procolágeno, pois o nível de RNAm tipo I e tipo II aumentam significativamente no grupo que recebeu a estimulação ao compará-lo com o grupo controle. (SAPERIA et al., 1986).

Mais recentemente, estudos de Baxter (1998), examinaram os efeitos da radiação por LBP, em diversas linhagens celulares e em células explantadas, para que fosse estabelecida a base fotobiológica do uso clínico desta modalidade, especialmente para a produção da cicatrização de ferida. Nestes estudos, foram empregados diversos indicadores possíveis na avaliação dos efeitos bioestimulatório da radiação por laser, inclusive a proliferação celular, produção de colágeno e alterações ultra-estruturais.

Medrado et al., (2003), analisaram os efeitos do laser Arseneto-Gálio-Alumínio (AsGaAl) em diferentes doses, 4J/cm<sup>2</sup> e 8J/cm<sup>2</sup>, na cicatrização de ferida induzida, em ratos. Observaram que nos animais tratados, a extensão do edema e o número de células inflamatórias foram reduzidos precocemente, além de ter sido induzido o aumento da deposição de colágeno e a melhora da proliferação de miofibroblastos, quando comparado com o grupo controle. Também foi verificado que o tratamento com a dosagem de 4J/cm<sup>2</sup> foi superior ao de 8J/cm<sup>2</sup>, pois apresentou maior quantidade de células que são correlacionadas com a maior proliferação vascular e manteve uma maior redução do diâmetro da área da ferida em todos os instantes da análise. Este resultado, entretanto, não foi alcançado no estudo de Walker et al., (2000), pois não houve diferença significativa na redução do diâmetro da ferida entre os grupos de ratos que foram submetidos ao laser AsGaAl, com doses de 0.5, 1.5 e 4J/cm<sup>2</sup>.

Hüseyin et al., (2004) verificaram a atuação do laser Arseneto de Gálio (As-Ga), com dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , densidade de energia de 6 mW por 10 minutos/dia, durante 10 dias consecutivos, nas distintas fases do processo de reparação tecidual de feridas em ratos. As análises histológicas foram realizadas no 4° e 10° dia de tratamento e a análise da resistênsia tênsil, no 25° do estudo. Comparando-se o grupo tratado ao controle, observou-se efeito benéfico significativo do LBP nas três fases do processo de cicatrização: inflamatória, proliferativa e remodeladora.

Anteriormente, Garcia et al., (1996), também desenvolveram um estudo em rato, utilizando o laser As-Ga, para analisar histologicamente os seus benefícios na cicatrização. Foram provocadas feridas cirúrgicas no dorso de cada rato, sendo uma à direita, a qual foi irradiada com dosagem de  $3\text{J}/\text{cm}^2$  durante 108 segundos, e a outra à esquerda, servindo como controle. Na análise comparativa dos eventos biológicos entre as feridas tratadas e controle após os períodos de observação de 3, 7 e 14 dias, observou-se que as feridas tratadas apresentaram elevada taxa de migração epitelial, acentuada proliferação fibroblástica e vascular, sendo estes mais evidentes nos períodos de 3 e 7 dias. Também, observou-se que houve uma evolução mais rápida do quadro agudo para o crônico nas feridas tratadas, além de não ter ocorrido nenhum sinal de efeito indesejável da aplicação do raio laser sobre a reparação das feridas.

Utilizando o laser Hélio-Nêonio (HeNe), Kana et al., (1981), submeteram 96 ratos com feridas cirúrgicas, uma de cada lado do dorso, a irradiação, com dosagens de 4, 10 e  $20\text{J}/\text{cm}^2$  durante 17 dias. Apenas as feridas do lado esquerdo foram tratadas, enquanto as do lado direito passaram a ser controle. Todas as feridas, de ambos os grupos cicatrizaram até o final do período proposto, apresentando processo cicatricial otimizado com laser HeNe na dose de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ .

Bisht et al., (1999) irradiaram o laser HeNe, com densidade média de energia de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , sobre uma ferida induzida. Verificou – se que houve epitelização precoce, aumento da atividade fibroblástica, infiltração leucocitária, neovascularização e aumento da força tênsil.

Pesquisadores para avaliar a reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos, realizaram duas feridas cirúrgicas circulares de 1cm na região dorsal, sendo uma mais posterior, utilizada para o controle, pois não recebeu tratamento, e a outra mais próxima da cervical, submetida à irradiação laser de HeNe na dose diária de  $2,7\text{ J}/\text{cm}^2$  durante 10 minutos, iniciando-se a aplicação logo após a realização das lesões. No 7, 14 e 21 dias pós-operatório as feridas foram analisadas, verificando que as feridas tratadas apresentaram epitelização e contração mais precoce, além de uma maior proporção de fibras colágenas nos três períodos estudados e proporção otimizada de fibroblastos no 7º dia. Assim, os pesquisadores concluíram que o processo de reparação evoluiu de forma mais rápida nas feridas irradiadas em relação ao controle (SOARES et al., 1989).

Em outro estudo comparativo, foram analisadas fibras colágenas, através da morfometria computadorizada, de feridas cutâneas em ratos Wistar, submetidos a irradiação diária do laser HeNe com dosagem de  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , durante 36 segundos, com as do grupo controle. As análises morfométricas foram realizadas no 3, 7 e 14 dias após a lesão. Foi verificado que o laser se mostra eficiente no tratamento de feridas cutâneas, acelerando seu processo de reparo, pois houve um incremento do processo cicatricial com uma rede de fibras colágenas melhor elaborada do que no grupo controle (CARVALHO et al., 2003).

Allendorf et al., (1997) realizaram um estudo experimental com ratos, em dois grupos: o primeiro, para analisar a aceleração da cicatrização e o grau de contratura, sofreu uma lesão excisional de 1.5 cm de diâmetro na região dorsal,

sendo subdividido em um grupo que foi submetido á irradiação do laser HeNe com dose de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e outro com  $4\text{J}/\text{cm}^2$ , além do grupo controle. Já o segundo, para analisar a resistência tênsil, sofreu uma lesão incisinal longitudinal de 2cm na região dorsal, sendo que foi subdividido em um grupo que recebeu irradiação do laser HeNe com dose de  $2\text{J}/\text{cm}^2$  e outro a simulação deste. Em ambos grupos, não houve diferenças bioquímicas e biomecânicas significativas. Diferentemente do estudo acima citado, Reddy et al., (2001) através de seu estudo com ratos diabéticos induzidos, verificou que os efeitos bioquímicos e biomecânicos do laser HeNe com dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , apresentaram diferenças significativas quando comparado ao grupo controle, pois observou-se maior quantidade, solubilidade e distribuição do colágeno, e através da análise de resistência tênsil foi constatado maiores valores para carga, tensão e força máxima, além da energia absorvida.

Há uma escassa literatura científica sobre o laser AlGaInP. Assim, Schindl et al., (2003) tornaram-se pioneiros no estudo dos efeitos bioestimulatórios deste laser, através da análise dose-dependente, utilizando doses de 2, 4 e 8  $\text{J}/\text{cm}^2$ , com constante densidade de potência de  $20\text{ mW}/\text{cm}^2$ ; e densidade de potência dependente, utilizando densidade de potência de 10, 20 e  $65\text{ mW}/\text{cm}^2$ , com dose determinada de  $8\text{ J}/\text{cm}^2$ , na proliferação de células endoteliais da veia umbilical humana. Observou-se que houve um efeito dose-dependente, pois a proliferação de células endoteliais foi diretamente proporcional ao aumento da dose utilizada, e da mesma forma, no outro estudo, verificou-se a densidade de potência-dependente. Em ambos estudos, na comparação com os grupos controles, observou-se um efeito benéfico significativo do laser na proliferação das células endoteliais, com exceção o grupo irradiado com densidade de potência de  $10\text{ mW}/\text{cm}^2$ , que apresentou uma melhora, porém não significativa.

Mendez et al., (2004) investigaram a influência LBP em diferentes comprimentos de onda (685 nm, AlGaInP, e 830 nm, AsGaAl), com densidades médias de energia de 20 e 50 J/cm<sup>2</sup> fracionados em quatro pontos ao redor da ferida, durante 7 dias, com intervalos de 48 horas. Os grupos estimulados com densidade média de energia 20 J/cm<sup>2</sup>, nos dois comprimentos de onda, apresentaram melhores resultados.

Observa-se que alguns trabalhos demonstram o poder de aceleração do processo de reparação promovido pelo LBP nos seus diferentes níveis; outros, no entanto, são incapazes de documentar efeitos benéficos deste tipo de laser sobre o processo de reparação de feridas.

Embora muitas publicações sobre os efeitos do LBP apresentem-se disponíveis, a grande maioria das investigações não especifica fidedignamente os procedimentos e os seus parâmetros para a reprodução experimental (ROCHKIND et al., 1989; RATZ, 1995; EICHLER, 1990).

**Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!**

31

**Created by eDocPrinter PDF Pro!!**

### **3 – Objetivo**

Analisar aspectos histológicos e biomecânicos da reparação tecidual de feridas cutâneas em ratos, com e sem fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica, após a irradiação do laser de baixa potência AlGaInP, com densidade média de energia de 7J/cm<sup>2</sup>.

**Buy Now to Create PDF without Trial Watermark!!**

33

**Created by eDocPrinter PDF Pro!!**

## **4 – Material e Método**

### **4.1- Material**

#### **4.1.1 Animais de Experimentação**

A amostra foi composta de 45 ratos adultos machos, da linhagem Wistar, com peso médio  $\pm$  235 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, Piracicaba, SP.

#### **4.1.2 Curativo Oclusivo**

Para o teste de barreira a transmissividade do Laser, utilizou-se fita adesiva cirúrgica hipoalergênica microporosa, marca 3M®.

#### **4.1.3 Equipamentos Utilizados**

##### **4.1.3.1 Laser de Baixa Potência**

O equipamento utilizado foi o laser AlGaInP, modelo Laserpulse Ibramed® (Figura 01), com feixe visível, regime de pulso contínuo, potência de 30mW e comprimento de onda de 670 nm.

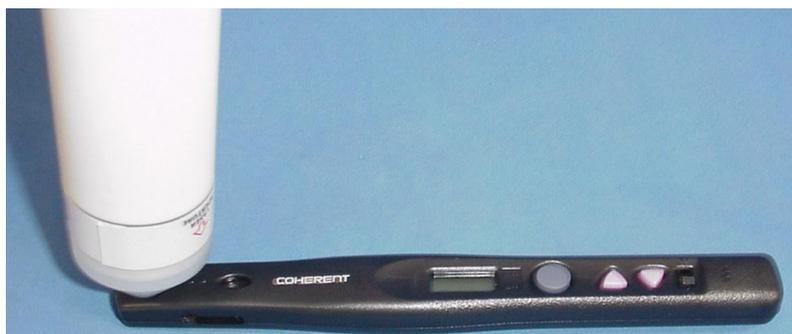
O equipamento foi calibrado antes e após o procedimento experimental.



**Figura 01** – Equipamento Laserpulse Ibramed® com a caneta aplicadora de comprimento de onda 670 nm (laser AlGaInP).

#### 4.1.3.2 Analisador de Potência Digital

Analisador de Potência Digital (Figura 02), modelo Laser Check, marca Coherent®, utilizado para averiguar a potência de saída do aparelho laser, teve como finalidade garantir a fidedignidade da densidade média de energia emitida.



**Figura 02** – LASER CHECK – analisador de potência digital : acoplamento do emissor de laser ao sensor do analisador de potência digital.

#### **4.1.3.3 Máquina Universal de Ensaio Mecânico**

Para análise das propriedades mecânicas da pele obtidas em ensaio de tração axial, utilizou-se a Máquina Universal de Ensaio Mecânico, modelo DL 2000, marca Emic® (Figura 03), equipada com célula de carga com capacidade de 5 Kgf (Emic® Trd 24). A calibração da célula foi efetuada segundo Norma Brasileira ABNT NBR NM-ISO 7500-1, (certificado nº 777/04), e esta foi conectada a uma ponte de extensometria (Trd 15) para a realização das leituras das cargas aplicadas, do Laboratório de Materiais de Construção Mecânica da Universidade Metodista de Piracicaba, Campus Santa Bárbara do Oeste – SP.

Para a obtenção gráfica do diagrama de deformação e força, foi utilizado o programa Tec versão 1.10.



**Figura 03** – Máquina Universal de Ensaio Mecânico, DL 2000 Emic®, conectado ao microcomputador com o programa de coleta de dados Tec. Versão 1. 1 – Laboratório de Materiais de Construção Mecânica da UNIMEP – Santa Bárbara do Oeste – SP.

#### **4.1.3.4 Paquímetro Digital**

O paquímetro digital, modelo Absolute Digimatic, marca Mitutoyo®, utilizado para a mensuração da largura e espessura dos corpos de provas, teve como finalidade garantir uma maior padronização das amostras.

#### **4.1.3.5 Microscópio Óptico, Analisador de Imagem e Ocular Milimetrada**

O microscópio óptico, modelo ICS Standard 25, marca Zeiss®, realizou as imagens das lâminas que foram analisadas histometricamente, por digitalização de imagens através de um software de análise de imagens, Image Pró-Plus, marca Media Cybernetics®, ou morfometricamente, por ocular milimetrada, marca Zeiss®.

## 4.2- Métodos

### 4.2.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em três grupos distintos: grupo controle (GC), grupo tratamento laser (GL) e grupo resistência tênsil (GRL).

O GC (n = 10), que foi submetido à simulação do tratamento (sham), foi dividido em dois subgrupos estimulados por 7 (GC7) e 14 (GC14) dias. O GL, 24h após o ato cirúrgico, foi submetido à estimulação com laser AlGaInP e dividido em quatro subgrupos de acordo com o tempo de tratamento e uso da fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica microporosa (GL7, GL14, GL7m e GL14m), contendo cinco ratos cada.

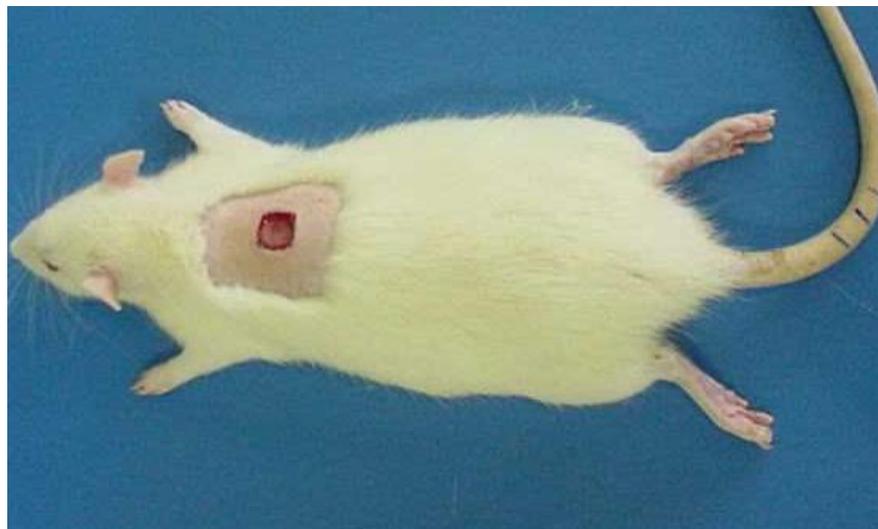
Por fim, o GRL (n = 15) foi dividido em dois subgrupos submetidos ao tratamento laser durante 14 dias após cirurgia, sem (GRL 14) e com fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica microporosa (GRL14m); além do GRC, o qual foi submetido à simulação do tratamento laser (sham), durante o mesmo período de tempo.

Todos os animais, de cada grupo experimental, foram confinados individualmente em gaiolas, com fotoperíodo de 12 horas, temperatura constante, ração e água *ad libitum*.

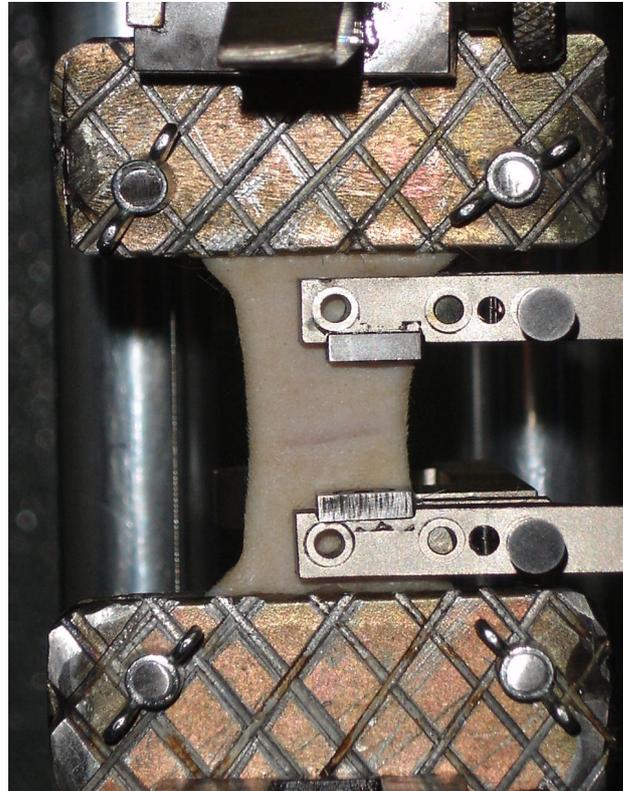
### 4.2.2 Procedimento Cirúrgico

Os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (Thionembutal®), dose de 50 mg/Kg, concentração 20 mg/mL, via intraperitoneal (IP), e tiveram o dorso tricotomizado para serem submetidos à incisão cirúrgica.

Nos grupos GC e GL, foram removidos cirurgicamente 1cm<sup>2</sup> de pele (Figura 04), mediante gabarito vasado desenvolvido para o experimento. O grupo GRL foi submetido à incisão cirúrgica cutânea linear, perpendicular à coluna vertebral, com dois centímetros de comprimento (Figura 05).



**Figura 04** – Ferida cirúrgica de 1cm<sup>2</sup> nos dorsos dos ratos, dos grupos: GC e GL.



**Figura 08** – Corpo de prova (pele de rato) fixado à Máquina Universal de Ensaio Mecânico, sendo submetido a uma força axial de tração pré teste de 150 kgf.



**Figura 05** – Ferida cirúrgica linear, perpendicular à coluna vertebral, com 2 cm de comprimento, GRL.

### 4.2.3 Tratamentos - Métodos de Aplicação

.Os animais foram estimulados de forma seqüencial, iniciando-se 24 hs após a cirurgia, por 7 e 14 dias, pela manhã.

Para as aplicações, os animais foram imobilizados pelo examinador. Para os grupos GC e GL, utilizou-se a técnica de contato, com aplicação perpendicular dividida em 4 pontos nos bordos da ferida, com tempo de 7 segundos por ponto, e varredura em seu leito, por 240 segundos. O tempo de aplicação foi estimado pela fórmula abaixo, segundo Baxter (1997) e Tunér e Hode (1999):

$$T(s) \cong \frac{\text{Densidade Média de Energia (J/cm}^2\text{)} \times \text{Área (cm}^2\text{)}}{\text{Potência (W)}}$$

No GRL, a aplicação foi efetuada em seis pontos divididos bilateralmente à incisão. A efetividade do LBP aplicado sobre curativo oclusivo, usualmente empregado em procedimentos pós-cirúrgicos, foi analisada. Desta forma, foi colocada sobre a ferida apenas no momento do tratamento dos respectivos grupos: GL7m e GL14m.

Guirro e Guirro (2004), verificaram em estudo sobre a transmissividade do LBP em diferentes curativos oclusivos, que a transmissividade da fita adesiva cirúrgica hipoarlegênica microporosa, marca 3M<sup>®</sup>, é de 36%.

Após a finalização dos procedimentos experimentais os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo imediatamente efetuada a retirada das amostras de pele.

#### **4.2.4 Ensaio Mecânico de Tração**

##### **4.2.4.1 Corpo de Prova**

Após o sacrifício, foi efetuada a ressecção de grande extensão da pele do dorso do animal, incluindo a cicatriz cirúrgica. A pele retirada foi submetida a uma forma de corte (Figura 06), desenvolvida especialmente para o estudo, com o formato do corpo de prova, de forma que a cicatriz foi posicionada no centro da mesma, com a finalidade de padronização das amostras.

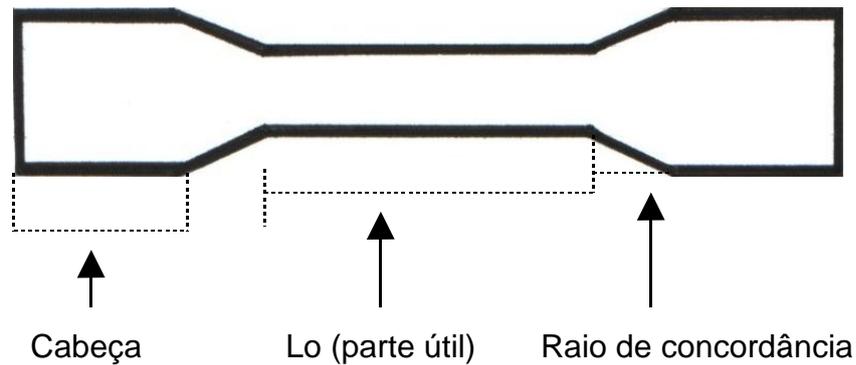


**Figura 06** – Forma de corte para a padronização das amostras (corpo de prova).

O formato do corpo de prova (Figura 07) foi baseado nas características especificadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de seção retangular. A parte útil do corpo de prova, identificada na figura 03 como  $L_0$ , é a região onde são feitas as medidas das propriedades mecânicas da pele; as cabeças, são as regiões extremas que servem para fixar o corpo à máquina de modo que a força de tração atuante seja axial e elas devem ter seção maior do que a parte útil para que a ruptura do corpo de prova não ocorra nelas. Entre as cabeças e a parte útil há um raio de concordância para evitar que a ruptura ocorra fora da parte útil do mesmo.

Através de um paquímetro digital, modelo Absolute Digimatic, marca Mitutoyo®, foi verificado que a largura e espessura dos corpos de prova, foram 18 mm e 1,4 mm, respectivamente.

Após a coleta do corpo de prova, o ensaio mecânico de tração foi realizado imediatamente.



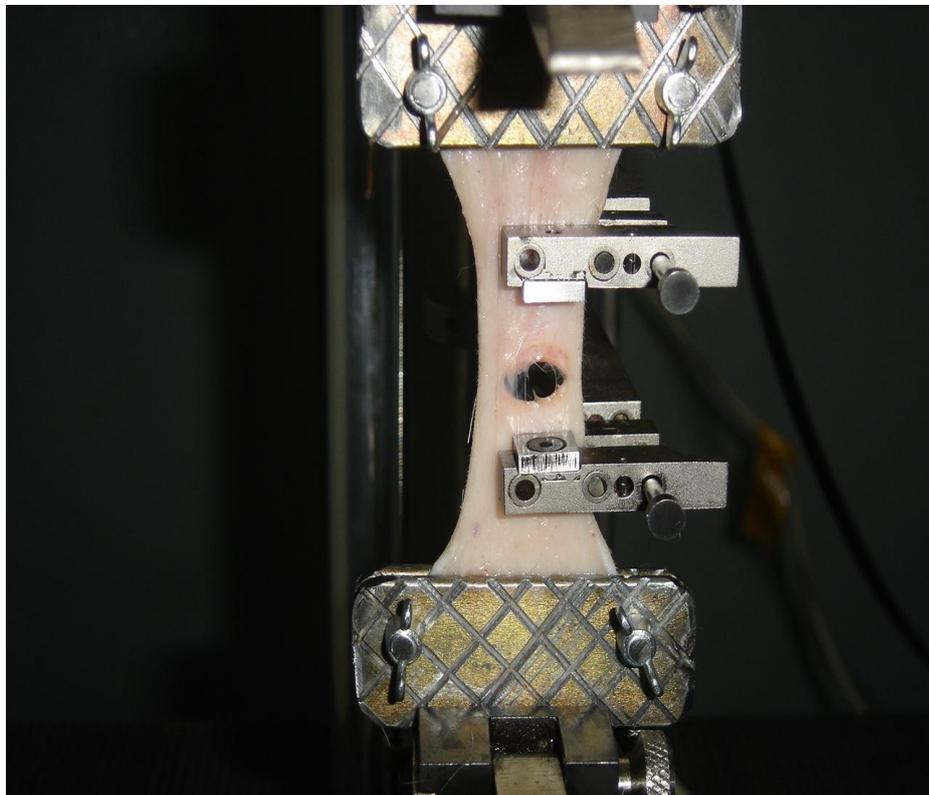
**Figura 07** – Esboço representativo do corpo de prova, especificando as suas áreas: cabeça, raio de concordância e Lo ( parte útil ).

#### 4.2.4.2 Ensaio Mecânico

Para o ensaio mecânico de tração, o corpo de prova foi preso em cada extremidade a acessórios confeccionados especificamente para a promoção de uma maior estabilização da pele, não ocorrendo a possibilidade de deslizamento. Estes acessórios foram fixados às flanges da Máquina Universal de Ensaio, por suas extremidades, em posição perpendicular (Figura 08). Em seguida, a pele de rato foi submetida à força axial de tração, de modo a aumentar o seu comprimento, durante o ensaio até o momento de sua ruptura (Figura 09). O método de fixação do corpo de amostra no tensiômetro é de grande importância. Hollander et al. (2003) relata que a amostra deve ser fixada firmemente, o suficiente para não escorregar dos fixadores no momento em que é submetida ao aumento de tensão. A amostra não deve sofrer lesão devido a fixação.

A velocidade estabelecida para o ensaio foi de 5 mm/min e as medidas foram realizadas a cada 0,5 mm. Os ensaios foram realizados após o limite máximo,

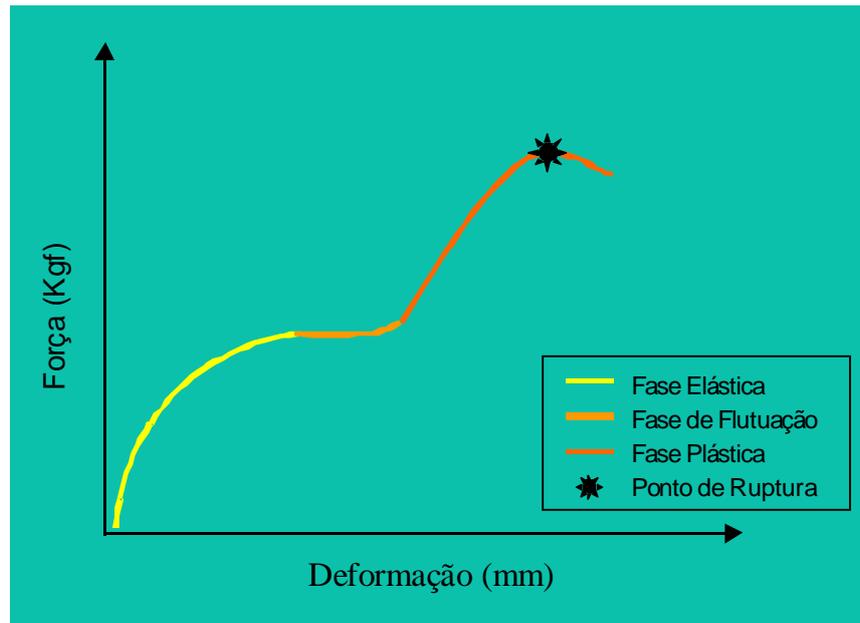
registrando-se as cargas correspondentes a cada deformação medida. Após a realização de cada ensaio, foi realizada inspeção do local de ruptura do corpo de prova.



**Figura 09** – Corpo de prova (pele de rato), fixado à Máquina Universal de Ensaio Mecânico, rompendo-se devido a força axial de tração exercida, determinando a finalização do teste.

#### **4.2.4.3 Propriedades Mecânicas**

No momento da realização do ensaio de tração do material (pele de rato), a máquina de ensaio exibe o comportamento do material por meio de uma curva traçada à partir da função força (Kgf) x deformação (mm), Figura 10, obtidos de cada ensaio, onde são fornecidos dados referentes a: Força máxima (FM), Força de Ruptura (FR) e Deformação (D).



**Figura 10** – Gráfico Força x Deformação, a partir do qual são obtidas as principais propriedades mecânicas do ensaio de tração.

#### 4.2.5 Processamento Histológico

Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, as lesões foram removidas, contendo pele intacta ao redor das mesmas. Estes segmentos foram fixados em solução tamponada de formol a 10% por 48 horas e tratados convenientemente para inclusão em parafina e coloração em Hematoxilina Eosina e Picro Sírius para análise histopatológica e morfométrica.

##### 4.2.5.1 Análise Morfométrica

A análise micrométrica (  $\mu\text{m}$  ) do tecido cicatricial, foi realizada no oitavo dia após a lesão, e foi obtida pela utilização de medidas lineares por meio de um micrômetro ocular da Zeiss®, segundo Mandarim-de-Lacerda (1994). Tais medidas foram obtidas através da soma dos dois bordos laterais da lesão até o limite distal da epiderme regenerada, em nove cortes por animal. Em cada corte foi realizada a mensuração dos dois bordos laterais, utilizando-se a objetiva de menor aumento (4X). A calibração de acordo com a objetiva utilizada, foi feita com um micrômetro objeto para a obtenção do coeficiente micrométrico (CM), determinado pela seguinte equação, conforme Mandarim-de-Lacerda (1994):

$$CM = \left( \frac{MOb}{MOc} \right) \times 10, \text{ sendo } MOb: \text{ micrômetro objeto} \\ MOc: \text{ micrômetro ocular}$$

#### 4.2.5.2 Análise Histométrica

Foram examinados em microscópio da Zeiss®, ligado a um sistema de análise de imagens (Software Image - PróPlus®) conectado a um microcomputador, três cortes não-seriados por animal. O mesmo sistema foi utilizado em objetiva de 40 vezes, para captar imagens de 3 áreas em cada corte (Figura 11). As dimensões foram padronizadas e conhecidas (10.772,96  $\mu\text{m}$ ): duas áreas próximas aos bordos lateral e uma central, como mostra a Figura 11. Portanto, para cada animal, foram analisadas 9 áreas (3 áreas x 3 cortes). Foram computados também os números de fibroblastos, fibrócitos e leucócitos através do sistema de análise de imagens.

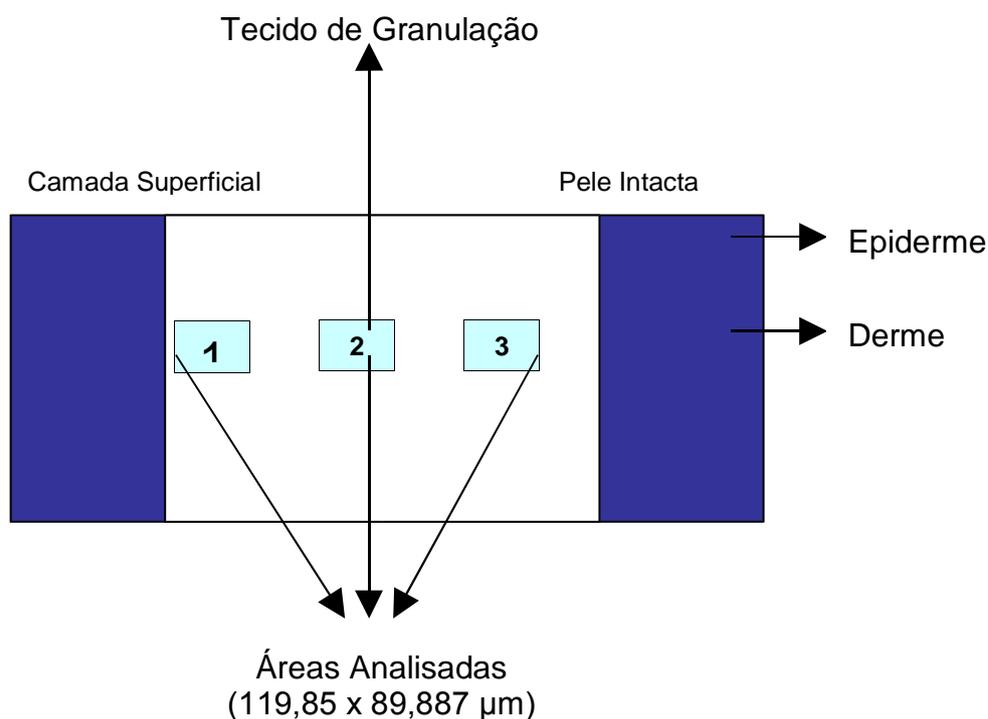


Figura 11 – Esquema demonstrando as três áreas estudadas em cada lesão.

#### 4.2.6 Análise Estatística

Para obtenção das estatísticas descritivas, bem como dos intervalos de confiança, para as variáveis relacionadas aos valores morfométricos e histométricos, foi utilizado o procedimento PROC UNIVARIATE do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0 (SAS, 1995).

Para avaliação da análise morfométrica (re-epitelização), segundo os diferentes tratamentos, utilizou-se o Método de Quadrados Mínimos, por meio do procedimento PROC GLM do programa acima citado. Foram considerados os tratamentos (GC7, GL7 e GL7m), adotando-se o modelo I, descrito abaixo:

**Modelo I:  $y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$**

em que,

$y_{ij}$  = valores médios de epitelização no animal  $j$ , e no Tratamento  $i$ ;

$\mu$  = constante inerente a todas observações;

$T_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Tratamento, sendo  $i = 1$  (GC7), 2 (GL7) e 3 (GL7m);

$e_{ij}$  = efeito aleatório residual associado às observações do animal  $j$ , no Tratamento  $i$ .

Para avaliação das análises histométricas (leucócito, fibrócito e fibroblasto), segundo os diferentes tratamentos e dias avaliados, adotou-se o mesmo método e procedimento do programa supracitado. Foram considerados os tratamentos (GC, GL e GLm) e os dias de avaliação (7° e 14°), bem como, a interação entre Tratamentos *versus* Dias. Nestas análises adotou-se o modelo II, descrito a seguir:

**Modelo II:  $y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + TD_{ij} + e_{ijk}$**

em que,

$y_{ijk}$  = valores médios de leucócito, fibrócito e fibroblasto no animal  $k$ , do Dia  $j$  e no Tratamento  $i$ ;

$\mu$  = constante inerente a todas observações;

$T_i$  = efeito do  $i$ -ésimo Tratamento, sendo  $i = 1$  (GC), 2 (GL) e 3 (GLm);

$D_j$  = efeito do  $j$ -ésimo Dia de avaliação, sendo  $j = 1$  (7 dias) e 2 (14 dias);

$TD_{ij}$  = efeito da interação do Tratamento  $i$  com o Dia  $j$ ;

$e_{ijk}$  = efeito aleatório residual associado às observações do animal  $k$ , no Dia  $j$  e no Tratamento  $i$ .

Para o modelo II, em virtude de serem verificados resultados significativos ( $p < 0,05$ ) para fonte de variação interação Tratamentos *versus* Dias, foram realizados os desdobramentos de duas formas distintas:

- (i) Desdobramentos da interação dos Tratamentos dentro de cada Dia avaliado;
- (ii) Desdobramentos da interação dos Dias dentro de cada Tratamento avaliado.

Para ambos os modelos, em caso de resultados significativos ( $P < 0,05$ ) para as diferentes fontes de variações avaliadas nas análises de variância, adotou-se como procedimento para comparação múltiplas o Teste *t* de Student.

## **5 – Resultados**

### **5.1 - Resultados Morfométricos (Re-epitelização)**

Os números de observações, as estimativas de média, desvios padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo, bem como os intervalos de confiança (inferior e superior) para os valores relativos a re-epitelização (R-EP), são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Números de observação (N), média (MED), desvio padrão (DP), coeficiente de variação (CV), mínimo (MIN) e máximo (MAX), bem como, o intervalo de confiança inferior (LINF) e superior (LSUP) valores de re-epitelização (R-EP).

R-EP	N	MED	DP	CV	MIN	MAX	LINF	LSUP
	15	1.844,97	1.119,41	60,67	493,52	4.147,51	1.225,00	2.465,00

Observa-se que a variável R-EP apresentou coeficiente de variação relativamente alto, fato este comum em se tratando de contagens que envolvem avaliações teciduais.

O resumo da análise de variância para a variável R-EP, de acordo com o modelo I proposto, encontra-se na Tabela 2.

**Tabela 2** – Resumo da análise de variância para a variável, de acordo com o Modelo I.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios	
Tratamentos	2	3.815.505,74	*
Resíduo	12	826.017,19	

\* Os resultados foram significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) pelo Teste F.

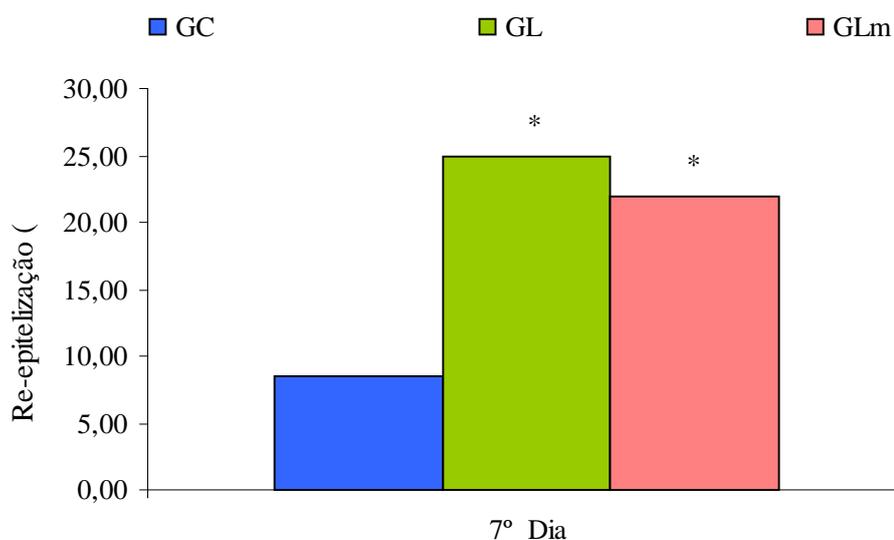
Pela Tabela 2, observa-se que a fonte de variação “Tratamentos” apresentou resultado significativo ( $p < 0,05$ ), indicando a existência de diferenças entre os tratamentos avaliados em relação a re-epitelização.

As estimativas de médias de quadrados mínimos para a variável R-EP de acordo com os tratamentos, estão apresentados na Tabela 3 e Figura 12.

**Tabela 3** – Estimativas de médias de quadrados mínimos para variável R-EP de acordo com os tratamentos avaliados

Tratamentos <sup>+</sup>	R-EP	
<b>GC7</b>	851,94	<b>B</b>
<b>GL7</b>	2.494,8 2	A
<b>GL7m</b>	2.188,1 6	A

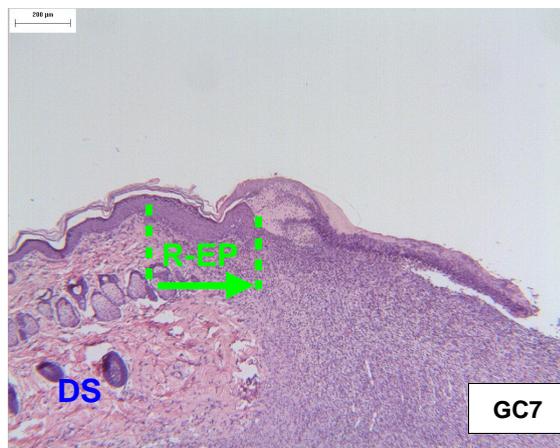
\* Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, em uma mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste *t* de Student ao nível de 5% de probabilidade.

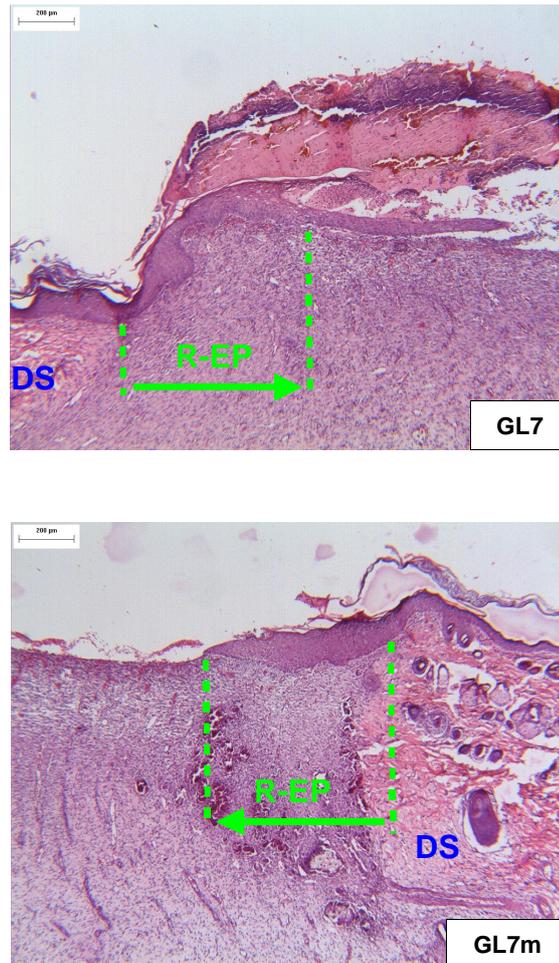


**Figura 12** – Comportamento do processo de re-epitelização (em µm) nos diferentes tratamentos avaliados: GC7, GL7 e GL7m.

\*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

Pela Tabela 3 e Figura 13, verifica-se que os GL7 e GL7m não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os GL7 e GL7m diferiram significativamente do GC7 ( $p > 0,05$ ).





**Figura 13** – Imagens de lesões mostrando a re-epitelização nos grupos: controle (GC7), laser (GL7) e laser + micropore (GL7m).

→ A seta aponta a distância mensurada desde a borda saudável, até a extremidade da re-epitelização.

**R-EP** Re-epitelização

**DS** Derme saudável.

Observa-se que nos grupos GL7 e GL7m a epiderme avançou mais sobre a ferida do que no grupo GC7 (HE, 50x).

## 5.2 - Resultados Histométricos (Leucócitos, Fibrócitos e Fibroblastos)

Os números de observações, as estimativas de média, desvios padrão, coeficiente de variação, mínimo e máximo, bem com os respectivos intervalos de confiança (inferior e superior) para as variáveis histométricas: números de leucócitos, fibrócitos e fibroblastos avaliadas, são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Números de observações (N), médias (MED), desvios padrão (DP), coeficientes de variação (CV), mínimos (MIN) e máximos (MAX) e intervalos de confianças inferior (LINF) e superior (LSUP) para leucócitos, fibrócitos e fibroblastos.

	<b>N</b>	<b>MED</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>LINF</b>	<b>LSUP</b>
<b>Leucócito</b>	30	12,7	8,84	69,7	2,67	41,78	9,38	15,98
<b>Fibrócito</b>	30	3	2,2	73,5	0,22	8,44	2,18	3,82
<b>Fibroblasto</b>	30	29,8	8,99	30,1	14,1	53	26,5	33,2

Observa-se que as variáveis leucócito e fibrócito apresentaram coeficientes de variação relativamente altos quando comparados aos valores de fibroblasto. Entretanto estes achados não são raros quando são avaliados tratamentos que envolvem quantificações relacionadas a diferentes tipos celulares.

O resumo das análises de variância para as variáveis leucócito, fibrócito e fibroblasto, de acordo com o modelo II proposto, são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Resumo das análises de variância para as variáveis leucócito, fibrócito e fibroblasto, de acordo com o modelo II.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrados Médios</b>					
		<b>Leucócito</b>		<b>Fibrócito</b>		<b>Fibroblasto</b>	
<b>Tratamentos (T)</b>	2	399,51	**	36,69	**	309,84	**
<b>Dias (D)</b>	1	808,81	**	2,13	NS	607,23	**

<b>Interação T x D</b>	2	64,36	*	6,02	*	10,78	*
<b>Resíduo</b>	24	22,17		2,22		45,55	

\* = Resultado significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ) pelo Teste F.

\*\* = Resultado significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $P < 0,01$ ) pelo Teste F.

<sup>NS</sup> = Resultado não-significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ) pelo Teste F.

Verifica-se pelos resultados da Tabela 5 que as variáveis leucócito, fibrócito e fibroblasto apresentaram resultados significativos ( $p < 0,05$ ) para a fonte de variação interação Tratamentos *versus* Dias, indicando dependência dos tratamentos avaliados em relação aos diferentes dias de monitoramento.

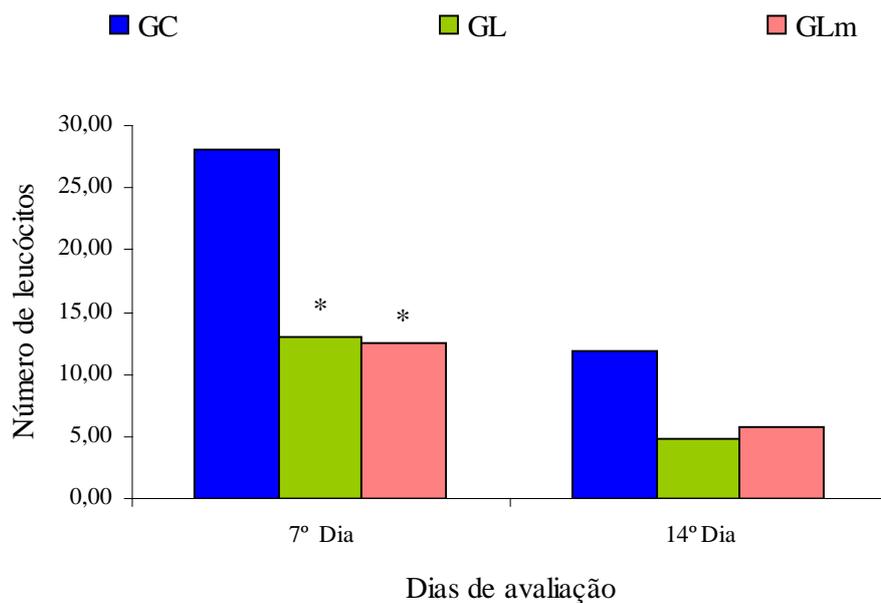
As estimativas de médias de quadrados mínimos para as variáveis leucócito, fibrócito e fibroblasto de acordo com os tratamentos e os dias de avaliação, são apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 14, 15 e 16.

**Tabela 6** – Estimativas de médias de quadrados mínimos para variáveis: leucócito, fibrócito e fibroblasto de acordo com os Tratamentos e os Dias de avaliação.

Tratamentos <sup>+, **</sup>	Leucócito				Fibrócito				Fibroblasto			
	7º Dia		14º Dia		7º Dia		14º Dia		7º Dia		14º Dia	
<b>GC</b>	28,07	A, a	11,89	A, b	6,18	A, a	4,24	A, a	27,91	B, a	18,98	A, b
<b>GL</b>	13,04	B, a	4,80	A, b	1,27	B, a	2,40	A, B, a	36,05	A, B, a	29,09	A, a
<b>GLm</b>	12,51	B, a	5,78	A, b	2,36	B, a	1,56	B, a	39,09	A, a	27,98	A, b

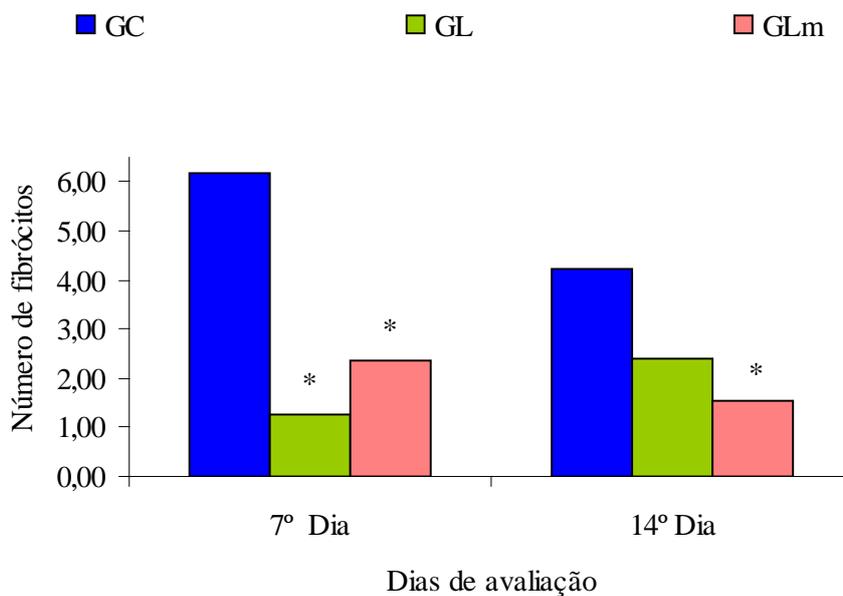
+ Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, em uma mesma coluna, não diferem entre si, pelo Teste *t* de Student ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* Médias seguidas por uma mesma letra minúscula, em uma mesma linha, não diferem entre si, pelo Teste *t* de Student ao nível de 5% de probabilidade.



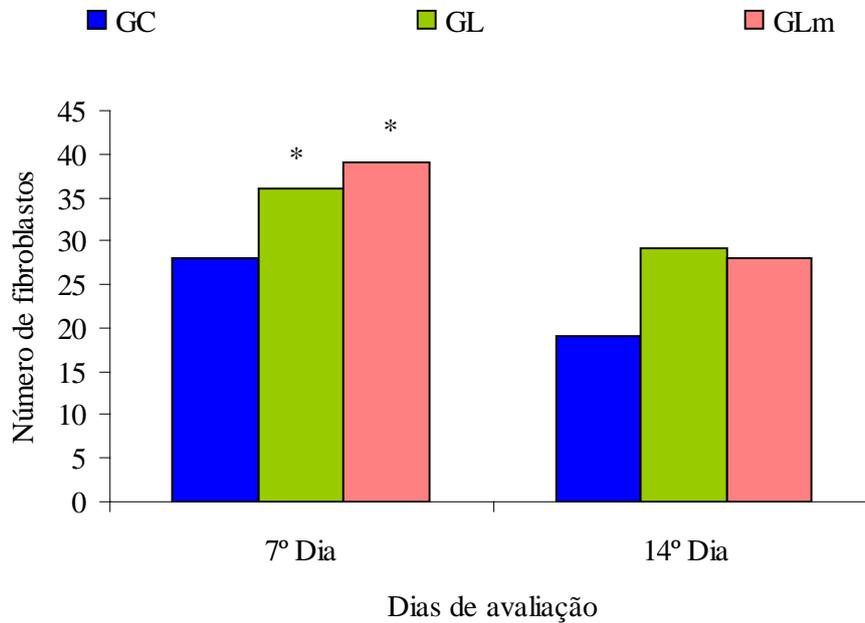
**Figura 14** – Comportamento de leucócitos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m)

\*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle.



**Figura 15** – Comportamento de fibrócitos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m).

\*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle.



**Figura 16** – Comportamento de fibroblastos (em unidade) nos diferentes tratamentos durante 7 (GC7, GL7 e GL7m) e 14 dias (GC14, GL14 e GL14m).

\*  $p \leq 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

**Variável** – Tratamento: GC, GL e GLm (Figura 17)

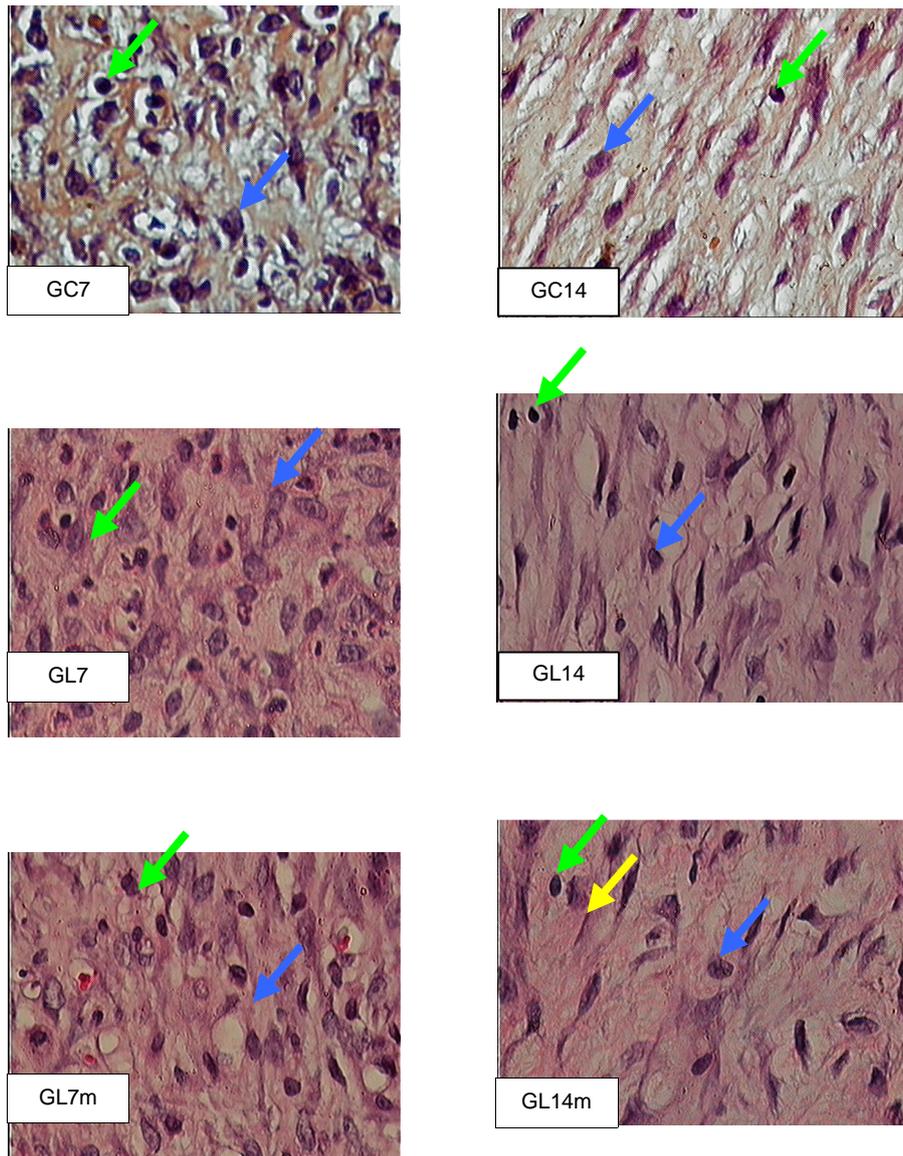
Para as variáveis leucócito e fibrócito, os desdobramentos da interação dos tratamentos dentro de cada dia avaliado (médias observadas nas colunas), revelaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) no 7º dia do GC em relação aos GL e GLm, os quais não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). No 14º dia, para a variável leucócito, os três tratamentos avaliados, não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). Entretanto, para fibrócito, os grupos GC e GL não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ) no 14º dia de avaliação. Verificou-se ainda que, os tratamentos GL e GLm não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Para a variável fibroblasto, o desdobramento da interação dos tratamentos dentro de cada dia avaliado, revelou efeito significativo ( $p < 0,05$ ), no 7º dia, dos grupos GL e GLm (de maiores médias) em relação ao grupo GC. Destaca-se que os grupos GL e GLm não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) significativamente. No 14º dia, os três tratamentos avaliados, não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ).

#### **Variável – Dia: 7º e 14º (Figura 17)**

Os desdobramentos da interação dos dias dentro de cada tratamento avaliado (médias observadas nas linhas), demonstraram comportamentos distintos para as variáveis histométricas. Para leucócito, foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os dias avaliados para todos os tratamentos, sendo o 7º dia apresentando diferenças significativas em relação ao 14º dia. Os valores médios de leucócito foram sempre superiores no 7º dia em relação ao 14º dia. Para fibrócito, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dias para os diferentes tratamentos avaliados. Para a variável fibroblasto, o grupo GC e o grupo GLm apresentaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) entre o 7º e o 14º dia de avaliação,

sendo que os valores observados diminuíram do 7º dia em relação ao 14º dia. Para o GL, não foram detectadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dias avaliados.



**Figura 17** – Imagens de áreas de lesão de grupos tratados por 7 dias - coluna da esquerda e 14 dias – coluna da direita, representando os grupos: GC7, GC14, GL7, GL14, GL7m e GL14m (400x, HE).

- fibroblasto
- leucócito
- fibrócito

- Observa-se nos grupos com 7 dias, maior número de fibroblastos e leucócitos, sendo que este apresenta-se em grande quantidade no GC7.

### 5.3 – Resultados do Ensaio de Tração

Os valores das propriedades mecânicas, obtidos a partir dos ensaios de tração, estão dispostos na tabela abaixo:

**Tabela 7** – Valores médios  $\pm$  dp da força máxima (FM), força de ruptura (FR) e deformação (D), dos grupos controle (GRC), grupo laser 14 dias (GRL14) e grupo laser com micropore (GRL14m).

Variáveis	Grupos		
	GRC	GRL14	GRL14m
<b>FM (Kgf)</b>	1,89 ( $\pm$ 0,40)	1,78 ( $\pm$ 0,24)	1,85 ( $\pm$ 0,22)
<b>FR (Kgf)</b>	1,63 ( $\pm$ 0,29)	1,65 ( $\pm$ 0,36)	1,49 ( $\pm$ 0,32)
<b>D (mm)</b>	4.50 ( $\pm$ 1,12)	4,16 ( $\pm$ 1,06)	3,75 ( $\pm$ 1,42)

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os dados adquiridos durante os ensaios de tração, foram ilustrados através de gráficos força *versus* deformação (Figura 18).

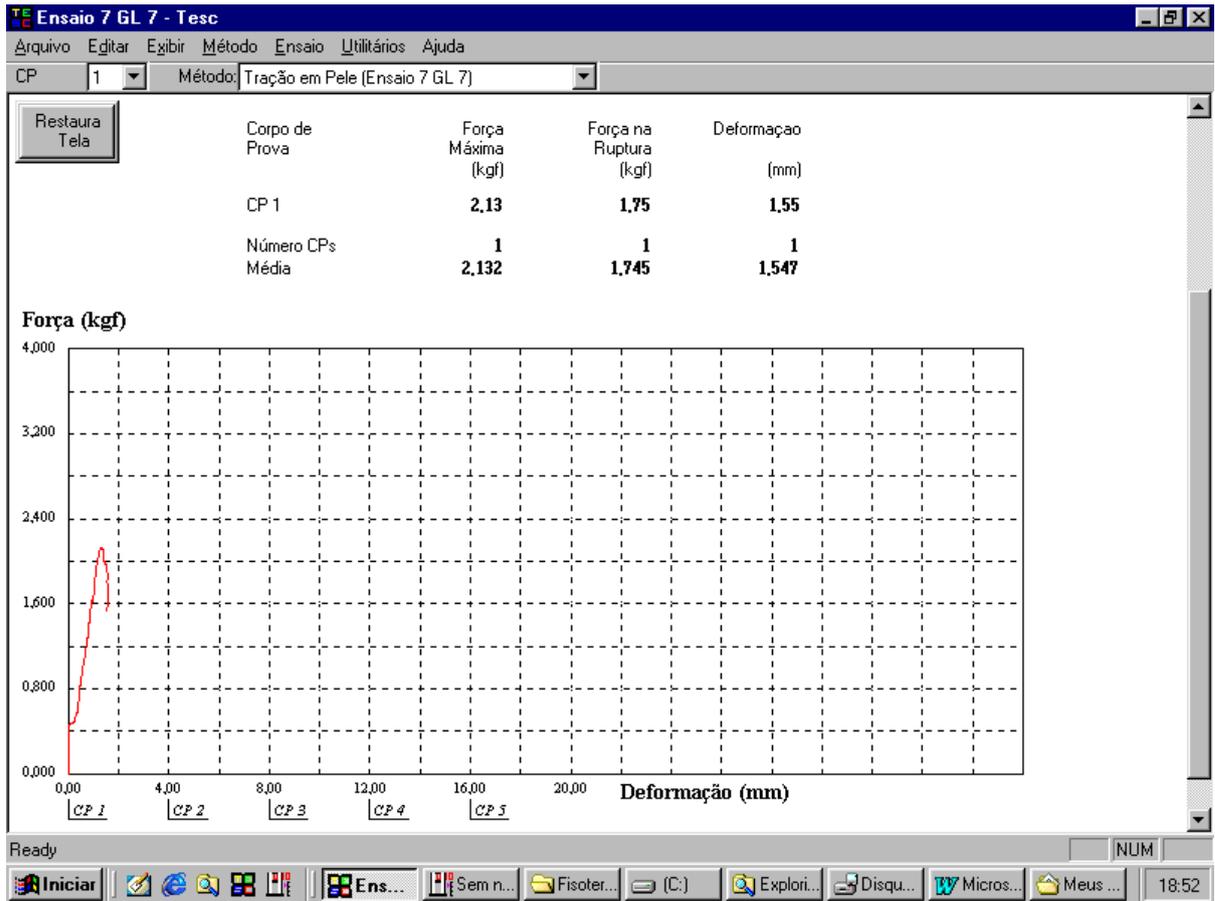


Figura 18 – Relatório de Ensaio: Gráfico força x deformação adquirido durante um dos ensaios mecânicos de tração em pele de rato.

## **6 – *Discussão***

## 6.1 – Da Metodologia

Os mamíferos de pele solta (roedores, coelhos e porquinhos da índia) contrastam com os humanos e outros mamíferos com pele aderida, porém são muito utilizados em estudos que envolvem cicatrização de feridas, pois padrões éticos impossibilitam a utilização de humanos para a realização de alguns tipos de pesquisas. Portanto, modelos alternativos são necessários, levando à utilização de diferentes espécies animais (KASHYAP et al., 1995; KOEKE, 2003).

Optou-se utilizar ratos neste estudo devido a possibilidade de um maior número de amostragem por grupo, além da verificação de resultados em curto período resultante do acelerado metabolismo, quando comparado aos demais animais utilizados, como: porco, coelho, etc. A sexualidade do animal foi propositalmente definida devido a variabilidade no ciclo hormonal das fêmeas, optando-se apenas por ratos machos.

Embora o rato não seja o animal mais adequado para pesquisas, as vantagens de sua utilização superam as inadequações dos resultados com aplicações diretas em seres humanos (SHIELDS e O’KANE, 1994). Assim, as conclusões extraídas dos estudos com estes animais, não podem ser totalmente redirecionadas aos seres humanos, mas sim, utilizadas como guia para novos estudos (WALKER et al., 2000).

A opção de contenção manual durante as estimulações foi baseada no fato do procedimento não produzir dor ou incômodo, e nos estudos de Cross et al. (1995) com ratos, onde afirmam que a exposição repetida do animal a procedimentos anestésicos pode ser deletéria à sua saúde, consome tempo, produz estresse, e pode causar danos a ferida durante a indução da anestesia.

No presente trabalho foram tomados todos os cuidados necessários para diminuir o estresse, sendo que o temperamento dócil dos animais facilitou a manipulação diária sem anestesia, evitando-se lesão adicional à ferida.

O dorso do animal foi o local escolhido para indução da ferida, sendo que Kashyap et al. (1995) consideram o local como melhor sítio de incisão, pois evita a irritação por contato e autocanibalismo.

Para a observação real das ações do LBP no processo de cicatrização tecidual, realizou-se apenas uma ferida cirúrgica intencional no dorso de cada rato; selecionando um grupo de animais que serviu como controle. BISHT et al., (1999) optaram como metodologia a realização de duas feridas cirúrgicas induzidas no mesmo rato, sendo uma submetida à irradiação e a outra, simulação deste; utilizada como controle. Os autores alertaram para o fato de que embora os efeitos do laser sejam predominantemente locais, os efeitos bioestimulatórios podem ser observados na ferida contralateral não irradiada, suspeitando-se que fatores teciduais liberados da ferida irradiada na circulação sanguínea pode ter um efeito no local da ferida contralateral. Este efeito sistêmico pode provocar uma falha na observação dos efeitos significantes ao comparar o tecido tratado com laser com o lado oposto do mesmo animal (JAYASREE et al., 2001). Rochkind et al. (1989) afirmaram que o LBP apresenta efeito sistêmico, pois através de radiações não locais, patologias apresentaram melhora.

Apesar do grande número de publicações sobre as ações do LBP (KANA et al., 1981; GARCIA et al., 1996; WALKER et al., 2000; CARVALHO et al., 2003), os mecanismos ainda não são esclarecidos (RIBEIRO et al., 2002), bem como o comprimento de onda, número de aplicação, tempo de irradiação e densidade média de energia mais apropriada (TATARUNAS et al., 1998). Tünér e Hode (1998) realizaram uma análise crítica dos estudos da terapia LBP e concluíram que os parâmetros para a irradiação são determinantes para validação da terapia.

No presente estudo, optou-se por utilizar o laser AlGaInP, pois este apresenta regime de pulso contínuo e potência de saída de 30 mW, o qual é muito superior ao do HeNe (2 mW) ou mesmo do AsGa (15 a 30 mW).

Antes e durante a realização do experimento, o equipamento laser foi submetido a análise de calibração, sendo que não houve necessidade de correções. Realizou-se este procedimento para garantir a confiabilidade em relação aos parâmetros empregados e conseqüentemente, obter resultados fidedignos das ações do LBP. A importância deste procedimento é relatada por Nussbaum et al. (1999), em um estudo que salienta a importância da avaliação dos sistemas de terapia laser, ressaltando que, em sua maioria, a potência de rendimento do equipamento não é uma medida confiável, o que dificulta a reprodução dos protocolos de aplicação clínica.

Grande parte das pesquisas dá ênfase para outros parâmetros, destacando-se comprimento de onda e densidade média de energia (MENDEZ et al., 2004; MEDRADO et al., 2003; MORIMOTO et al., 1994). Além disso, o laser AlGaInP possui comprimento de onda entre 630 – 685 nm, o que lhe determina a característica visível e a ação bioestimulante (GUIRRO e GUIRRO, 2001). Cada tecido possui diferentes cromóforos e em quantidades distintas, capazes de

absorver a radiação, o que resulta na importância em identificar um comprimento de onda adequado para determinado tecido (LABBE et al., 1990).

Há relatos na literatura, que densidade média de energia muito alta ou muito baixa não apresentam resultados favoráveis (AI-WATBAN e ZHANG, 1996), porém não há dados conclusivos a esse respeito, dando margem a especulações sobre qual a dose ótima para promover efeitos benéficos na cicatrização tecidual. Por esse motivo, determinou-se utilizar elevada densidade média de energia, 7 J/cm<sup>2</sup>, para verificar a atuação da radiação laser com alta dosagem no processo de cicatrização tecidual. Conforme Kitchen e Partridge (1991) a densidade média de energia de 4 J/cm<sup>2</sup> e acima desta, poderiam resultar em um processo inibidor e danoso.

Para o método contato, o tempo de aplicação foi calculado pelo equipamento, conforme os dados dos parâmetros fornecidos; já para o método varredura, o cálculo baseou - se na fórmula descrita por Kitchen e Partridge (1991), a qual multiplica-se densidade média de energia por área irradiada, dividido pela densidade de potência. Para uma metodologia confiável, o tempo de exposição deve ser calculado em base científica rigorosa (GARCIA et al., 1996).

Duas formas de aplicação da radiação laser foram utilizadas sobre a ferida aberta: contato, na margem da ferida, proporcionando uma maximização da irradiância, e varredura, no leito. Esta foi aplicada para não haver contaminação e aumento da dor local.

Na prática clínica, o ato de retirar sucessivamente o micropore da ferida cirúrgica para esta ser submetida à tratamentos, desencadeou o interesse em analisar se o micropore bloqueia a radiação laser durante o ato terapêutico, interferindo a conquista de um efetivo processo de reparação tecidual.

## 6.2 - Dos Resultados

A análise morfométrica do processo de re-epitelização foi realizada apenas nos grupos submetidos à sete dias de tratamento, sendo que os de quatorze, já apresentavam o avanço total do epitélio, dificultando a mensuração, pois os epitélios laterais já se tocavam. Nos grupos submetidos a irradiação, GL7 e GL7m, a re-epitelização foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo GC (Figura 13). Várias pesquisas relatam a ação do LBP na aceleração do avanço do epitélio (MEDRADO et al., 2003; CARVALHO et al., 2003; BISHT et al., 1999; SOARES et al., 1989). A radiação laser aumenta o número de células do estrato basal, denominada germinativa, e do estrato espinhoso, acelerando o processo de re-epitelização (MESTER et al., 1971).

Os grupos irradiados, durante 7 dias, apresentaram maior número de células de fibroblasto ( $p < 0,05$ ) do que o grupo GC; coincidindo assim, com os resultados encontrados para a re-epitelização. Sabe-se, que neste processo, os fibroblastos apresentam importante papel. Os fibroblastos apresentam várias funções, sendo que a principal é a síntese, especificamente de colágeno, matriz extracelular e citocinas de efeitos parócrinos e autócrinos (SCHAEFFER e NANNEY, 1996). Estas apresentam como exemplo: o fator de crescimento fibroblástico (FGF-7), conhecido como fator de crescimento queratinócito (KGF-1), e fator de crescimento fibroblástico (FGF-10), conhecido como fator de crescimento queratinócito (KGF-2), os quais apresentam efeito sobre células vizinhas, estimulando a migração de células epiteliais; acelerando assim, o processo de reparação epiteliais (TAGASHIRA et al., 1997). Entretanto, com 14 dias de tratamento, a não diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) sugere-se que o laser não apresenta, na fase inicial de remodelagem, tanta influência como na proliferativa. Pesquisadores relatam que a influência da radiação laser é mais

acentuada na fase proliferativa da cicatrização (MEYERS, 1990; KOVACS et al., 1974).

Analisou-se também o número de fibrócitos nos grupos experimentais com 7 dias de tratamento, verificando menor quantidade significativa ( $p < 0,05$ ) nos grupos submetido á radiação, GL7 e GL7m, quando comparado ao grupo GC7. Este resultado coincide ser inversamente proporcional ao do fibroblasto, já que o fibrócito é uma condição inativa deste. Assim, sugere-se que o LBP estimulou a diferenciação dos fibrócitos em fibroblastos ativos, porém ao analisarmos a diferença entre as médias do número de fibrócitos reduzidos ao aumento de fibroblastos, nos grupos irradiados, suspeita-se que não só apenas houve uma transformação de fibrócitos em fibroblastos, mas também da atuação dos fatores de crescimentos responsáveis pelo controle da migração e proliferação fibroblástica, destacando-se os fatores de crescimento PDGF, fatores de crescimento derivados de plaqueta, e TGF- $\beta$ , fator de crescimento transformador  $\beta$  (Singer e Clark, 1999).

Os leucócitos são células de suma importância para o processo de cicatrização tecidual. Estes são responsáveis pela ingestão de agentes ofensivos, destroem bactérias e outros micróbios, degradam o tecido necrótico e antígenos estranhos (COTRAN et al., 2000). Submetidos à 7 dias de tratamento, os grupos irradiação, GL7 e GL7m, apresentaram menor quantidade de leucócitos ( $p \leq 0,05$ ) do que o grupo controle, GC7. Este fato é atribuído a ação do LBP em acelerar o processo de reparação tecidual, diminuindo assim o período da fase inflamatória tardia, sendo esta já sobreposta à fase proliferativa (SCHAEFFER e NANNEY, 1996). O LBP, na fase inflamatória, aumenta a infiltração de leucócitos (BISHT et al., 1999), porém a análise histométrica foi realizada após 7 dias da lesão. Já com 14 dias de tratamento, a não diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ) sugere-se,

novamente, que o laser não apresenta, na fase inicial de remodelagem, tanta influência como na fase proliferativa.

As imagens da Figura 17, dos experimentos submetidos ao tratamento por 7 dias, demonstram características típicas do processo proliferativo da reparação tecidual, apresentando abundante concentração de tecido de granulação, sendo este evidenciado pela grande proliferação de fibroblasto. Schaffer e Nanney (1996) relatam que entre o período de 5 à 7 dias, as células predominantes são os fibroblastos. Também, evidencia-se quantidade elevada de leucócitos, mesmo sendo esta apenas exacerbada, aproximadamente, no terceiro dia após a lesão (SCHILLING, 1976). Entretanto, ao compará-las com as imagens dos experimentos submetidos ao tratamento por 14 dias, podemos observar características que evidenciam a fase inicial do processo de remodelagem, como: diminuição de fibroblasto e leucócito, além de matriz extracelular melhor orientada.

A remodelação ou maturação é a fase tardia da cicatrização tecidual. O desenvolvimento mais importante é a maturação e remodelação do colágeno durante esta fase (DEMIR et al., 2004). A resistência tênsil da ferida pode ser usada para avaliação biomecânica do tecido cicatricial desta fase. Optamos por realizá-la no décimo quinto dia, ou seja, após 14 dias de tratamento. Os resultados não revelaram aumento significativo ( $p > 0,05$ ) da resistência tênsil nos tecidos submetidos à irradiação, GL7 e GL7m, ao compará-los com o GC. Sugere-se que se deva ao fato que a análise foi feita antes do período apropriado, pois pesquisadores relatam que a resistência tênsil é aumentada significativamente por volta da terceira semana da cicatrização (MENECHIN e VATTIMO, 2003).

### 6.3 – Do Ensaio de Tração

Diversos métodos físicos têm sido desenvolvidos para medida da resistência cicatricial (GUIMARÃES et al., 1998), e dentre estes, o ensaio de tração, baseado na medida da deformação produzida em um corpo elástico, foi o que melhor atendeu os propósitos deste estudo.

A escolha adequada do tipo de ensaio depende do material, do tipo de esforço que o material vai sofrer, e das propriedades mecânicas que se deseja medir. A aplicação de uma força em um corpo elástico, promove a deformação do material, e o ensaio de tração consiste em submeter a amostra a um esforço que tende a alongá-lo (SOUZA, 2004).

Geralmente o ensaio tração é realizado em um corpo de prova de forma e dimensões padronizadas, para que os resultados obtidos possam ser reproduzidos, ou simplesmente comparados.

A dificuldade em se cortar a pele de rato com formato padronizado de um corpo de prova, levou ao desenvolvimento e confecção de um instrumento de corte, que permitiu amostras fidedignas, e confiabilidade dos ensaios.

Durante a determinação da força de ruptura, foram realizados cuidados rigorosos na fixação e no posicionamento dos fragmentos teciduais na máquina de ensaio, com padronização da distância entre a cicatriz cirúrgica e as pinças de fixação (também desenvolvidas especialmente para o estudo), condição necessária para avaliação precisa do material.

A avaliação da pele lesada pelo ensaio de tração, apesar de expor a cicatriz a situações extremamente adversas, que dificilmente são observadas no pós-operatório, tem sido um parâmetro bastante empregado para avaliar a coesão dos

tecidos da ferida cirúrgica nas diferentes fases do processo de cicatrização (SCOTT et al., 1985, SPYROU et al., 2002).

No presente estudo, como não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de força máxima, força de ruptura e deformação dos três grupos estudados, pode-se inferir que o laser, com a densidade média de energia utilizada, não produz alterações expressivas quanto à resistência da cicatriz, no período de tempo estipulado. Estes achados devem estimular novos estudos com aplicação de diferentes parâmetros, visando melhor fundamentar a aplicação do LBP no reparo tecidual.

## **7 – Referências Bibliográficas**

ADZICK, N. S. Cicatrização da Ferida – Características Biológicas e Clínicas. In: JR. SABISTON, D. C; LYERLY, H. K. **Sabiston – Tratado de Cirurgia – As Bases Biológicas da Prática Cirúrgica Moderna**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, v.1 , 15ª edição, 1999.

AL – WATBAN, F. A. H; ZHANG, Z. Comparison of Effects of Laser Therapy on Wound Healing Using Different Laser Wavelengths. **Laser Therapy**, v. 8, n. 2, p. 127-135, 1996.

ALLENDORF, J.D.F; BESSLER, M; HUANG, J; KAYTON, M.L; LAIRD, D; NOWYGRD, R; TREAT, M.R. Helium-Neon Laser Irradiation at Fluences of 1, 2 and 4 J/cm<sup>2</sup> Failed to Accelerate Wound Healing as Assessed by Both Wound Contracture Rate and Tensile Strength. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.20, p.340-345, 1997.

BABAPOUR, R; GLASSBERG, E; LASK, G. P. Low – Energy Laser Systems. **Clinics in Dermatology**, v.13, p. 87-90, 1995.

BASFORD, J. R. Low-Intensity Laser Therapy: Still not an Established Clinical Tool. **Lasers Surg Med**, v. 16, p. 331-342, 1995.

BAXTER, G. D. **Therapeutic Lasers: Theory and Practice**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, 1997.

BAXTER, D. Laserterapia de Baixa Intensidade. In: KITCHEN, S; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. Editora Manole, São Paulo-SP, 10<sup>o</sup> edição, 1998.

BAXTER, G.D; BELL, A. J; ALLEN, J. M; RAVEY, J. Low Level Laser Therapy: Current Clinical Practice in Northern Ireland. **Physiotherapy**, v. 77, p. 171-178, 1991.

BECKERMAN, H. et al. The Efficacy of Laser Therapy for Musculoskeletal and Skin Disorders: A Criteria – Based Meta – Analysis of Randomized Clinical Trials. **Physical Therapy**, v. 72, p. 483 – 491, 1992.

BETTINGER, D. A; YAGER, D. R; DIEGELMANN, R. F; COHEN, I. K. The Effect of TGF –  $\beta$  on Keloid Fibroblast Proliferation and Collagen Synthesis. **Plast Reconstr Surg**, v. 98, p. 827-833, 1996.

BISHT, D; MEHROTRA, R; SINGH, P.A; ATRI, S.C; KUMAR, A. Effect of Helium – Neon Laser on Wound Healing. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p. 187-189, 1999.

BRUGNERA, JR. A; PINHEIRO, A. L. B. **Lasers na Odontologia Moderna**. Editora Pancast, São Paulo-SP, p. 356, 1998.

CARVALHO, P.T.C; MAZZER, N; CORAZZA, A. V; RADUAM, R. M. Os Efeitos do Laser de Baixa Intensidade em Feridas Cutâneas Induzidas em Ratos com Diabetes Mellitus Experimental. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, p.241-246, 2001.

CARVALHO, P.T.C; MAZZER, N; SIQUEIRA, J.F.R; FERREIRA, J.V.L; SILVA, I.S. Análise de Fibras Colágenas Através da Morfometria Computadorizada em Feridas Cutâneas de Ratos Submetidos a Irradiação do Laser HeNe. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, p. 253-258, 2003.

COLLIER, M. Understanding Wound Inflammation. **Nursing Times**, v. 99, n. 25, p. 63 , 2003.

COTRAN, R. S; COLLINS, T; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 6ª edição, 2000.

CROSS, SE, NAYLOR, IL, COLEMAN RA, et al. An Experimental Model to Investigate the Dynamics of Wound Contraction. **British J of Plastic Surgery**, v. 48, p.189-197, 1995.

CRUSE, P.J.E; MCPHEDRAN, N. T. Cura e Tratamento das Feridas. In: JR. SABISTON, D. C. **Fundamentos de Cirurgia de Sabiston**. Editora Manole, São Paulo – SP, v. 1, p. 143-148, 1991.

DEMIR, H.; BALAY, H.; KIRNAP, M. A Comparative Study of the Effects of Electrical Stimulation and Laser Treatment on Experimental Wound Healing in Rats. **Journal of Rehabilitation Research & Development**, v. 41, p. 147-154, 2004.

DANG, C. M; BEANES, S. R; SOO, C; TING, K; BENHAIM, P; HEDRICK, M. H; LORENZ, H. P. Decreased Expression of Fibroblast and Keratinocyte Growth Factor Isoforms and Receptors During Scarless Repair. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 111, p. 1969-1979, 2003.

DESMOULIERE, A; GEINOZ, A; GABBIANI, F; GABBIANI, G. Transforming Growth Factor –  $\beta$  - 1 Induces  $\alpha$  - Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 122, p. 103-111, 1993.

EICHLER, J. Bioestimulation by Weak Laser Radiation – A Survey. **Ciência e Cultura (Revista Brasileira para o Progresso da Ciência)**, v. 42, p. 922-924,1990.

GARCIA, V.G; OKAMOTO, T; KINA, J.R. Reparação de Feridas Cutâneas Submetidas ao Tratamento com Raio Laser. Estudo Histológico em Ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 25, p. 37- 48, 1996.

GOGIA, P.P. **Laser Treatment. Clinical Wound Management.** United States of America; Slack Incorporated, p. 177-178, 1995.

GONÇALVES, G; PARIZZOTTO, N. A. Fisiopatologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 3, p. 5-13, 1998.

GUIMARÃES, M A, FORTES, J V, LUCCHIARI, P H, et al. Otimização da Medida de Força de Ruptura em Processos de Cicatrização. **Arch Vet Sci**, v. 3, p. 123-128, 1998.

GUIRRO, R. R. J; GUIRRO, E. C. O. Analysis of the Transmissivity of Low Power Laser Radiation in Different Occlusive Dressings. In: **5<sup>th</sup> Congress of the World Association for Laser Therapy.** Guarujá – SP, Brasil, Nov. 25-24, p. 19, 2004.

GUIRRO, E. C. O, GUIRRO, R. R. J. **Fisioterapia Dermato-Funcional – Fundamentos, Recursos e Patologias.** Editora Manole, São Paulo-SP, 3ª edição, 2002.

HOLLANDER, D. A; ERLE, H.J; THEISON, A; FALK, S; KRECK, T; MÜLLER, S. Standardized Qualitative Evaluation of Scar Tissue Properties in an Animal Wound Healing Model. **Wound Repair an Regeneration**, v. 11, p. 150-157, 2003.

HILLENKAMP, F. Laser Radiation Tissue Interaction. **Health Physics**, v. 56, p. 613-616, 1989.

HOUGLUM, P. A. Soft Tissue Healing and Its Impact on Rehabilitation. **Journal of Sport Rehabilitation**, v. 1, p. 19-39, 1992.

IRUELA-ARISPE, M.L.; DVORAK, H.F. Angiogenesis: A Dynamic Balance of Stimulators and Inhibitors. **Thromb Haemost**, v. 78, p. 672-677, 1997.

JAYASREE, R. S; GUPTA, A. K; RATHINAM, K; MOHANAN, P. V; MOHANTY, M. The Influence of Photodynamic Therapy on the Wound Healing Process in Rats. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 15, p. 176-186, 2001.

KANA, J. S; HUTSCHENREITER, R. Effect of Low-Power Density Laser Radiation on Healing of Open Skin Wounds in Rats. **Arch Surg**, v. 116, p. 293-296, 1981.

KARU, T. I. Photobiological Fundamentals of Low – Power Laser Therapy. **IEEE Journal of Quantum Electronics QE**, v. 23, n. 10, p. 1703 – 1717, 1987.

KASHYAP, A., BEEZHOLD, D, WISEMAN, J, et al. Effect of Povidone Iodine Dermatologic Ointment on Wound Healing. **The American Surgeon**, v. 61, p. 486-491, 1995.

KITCHEN, S.S; PARTRIDGE, C.J. A Review of Low Level Laser Therapy – Part 1: Background, Physiological Effects and Hazards. **Physiotherapy**, v. 77, p. 161-168, 1991.

KLOTH, L. **Wound Healing: Alternatives in Manegement**. United States of America: Ed. Churchill Livingstone, p. 347-364, 1997.

KOEKE, P. U. Estudo Comparativo da Eficácia da Fonoforese, do Ultra – Som Terapêutico e da Aplicação Tópica de Hidrocortisona no Tratamento do Tendão de Rato em Processo de Reparo Tecidual. 2003. 152 f. **Dissertação (Mestrado) – Área de Inter - Unidades em Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC – Universidade de São Paulo – USP**.

KOVÁCS, I; MESTER, E; GOROG, P. Stimulation of Wound Healing with Laser Beam in the Rat. **Experimentia**, v. 30, p. 1275-1276, 1974.

LABBE, R; SKOGERBOE, K. J; DAVIS, H. A; RETTMER, R. Laser Photobioactivation Mechanisms: In Vitro Studies Using Ascorbic Acid Uptake and Hydroxyproline Formation as Biochemical Markers of Irradiation Response. **Lasers Surg. Med.**, v. 10, p. 201 – 207, 1990.

LAM, T.S; ABERGEL, R.P, CASTEL, J.C; DWYER, R.M; LESAVOY, M.A; UITTO, J. Laser Stimulation of Collagen Synthesis in Human Skin Fibroblast Cultures. **Lasers Life Sci**, v. 1, p. 61-77, 1986.

LYONS, R.F; ABREGEL, R.P; WHITE, R.A; DWYER, R.M; CASTEL, J.C; UITTO, J. Biostimulation of Wound Healing in Vivo by a Helium – Neon Laser. **Annals of Plastic Surgery**, v. 18, p. 47-50, 1987.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. **Manual de Quantificação Morfológica: Morfometria, Halometria e Esterologia**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: CEPIO, p. 8-12, 1994.

MARTIN, P. Wound Healing – Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-80, 1997.

MCCULLOTH, M. J; KLOTH, C. L. **Wound Healing Alternatives in Management**. Philadelphia: Davis Company, 3ª edição, 2002.

MEDRADO, A.R.A.P; PUGLIESE, L.S; REIS, S.R.A; ANDRADE, Z.A . Influence of Low Level Laser Therapy on Wound Healing and Its Biological Action Upon Myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, p. 239-244, 2003.

MEJÍA, P.A.L; BUTRÓN, H.L; HERNÁNDEZ, A.M.M; RUÍZ, A.R; LÓPEZ, E.S.G. Reducción del Tiempo de Cicatrización por Medio de Laser de Helio-Neón. Modelo Experimental en Conejos. **Rev. Mex. Ortop. Traum**, v. 13, p. 455–458, 1999.

MENDEZ, T. M. T. V; PINHEIRO, A. L. B; PACHECO, M. T. T; NASCIMENTO, P. M; RAMALHO, L. M. P. Dose and Wavelength of Laser Light Have Influence on the Repair of Cutaneous Wounds. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v. 22, p. 19-25, 2004.

MENEGHIN, P; VATTIMO, M. F. F. Fisiopatologia do Processo Cicatricial. In: Jorge, S. A; Dantas, S. R. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. Editora Atheneu, São Paulo – SP, 1ª edição, p.31 – 42,

MESTER, E; MESTER, A.F; MESTER, A. The Biomedical Effects of Laser Application. **Lasers Surgery Medicine**, v. 5, p. 31-39, 1985.

MESTER, E; SPIRY, T; SZENDE, B. Effect of Laser Rays on Wound Healing. **Am J Surg**, v. 122, p. 532-535, 1971.

MEYERS, A. D. Lasers and Wound Healing. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 116, p. 1128, 1990.

MONACO, J.L; LAWRENCE, W. T. Acute Wound Healing – An Overview. **Clin Plastic Surg**, v. 30, p. 1-12, 2003.

MODOLIN, M; KAMAKURA, L. Aspectos Gerais da Cicatrização das Feridas. In: SUCENA, R. C: **Contribuição para o Ensino da Especialidade**. São Paulo: Fundo Editorial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, cap. 9, p. 91-02, 1981.

MORIMOTO, Y; ARAI, T; KIKUCHI, M; NAKAJIMA, S; NAKAMURA, H. Effect of Low-Intensity Argon Laser Irradiation on Mitochondrial Respiration. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 15, p. 191-199, 1994.

NUSSBAUM, E. L; ZUYLEN, J.V; BAXTER, G.D. Especification of Treatment Dosage in Laser Therapy: Unreliable Equipment and Radiant Power Determination as Confounding Factors. **Physiotherapy Canada**, p. 157-167, 1999.

O'LEARY, R; WOOD, E. J; GUILLOU, P. J. Pathological Scarring: Strategic Interventions. **Eur J Surg**, v. 168, p. 523-534, 2002.

ORTIZ, M. C. S; CARRINHO, P. M; SANTOS, A. A. S. D; GONÇALVES, R. C; PARIZOTTO, N. A. Laser de Baixa Intensidade: Princípios e Generalidades – Parte 1. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, p. 221-240, 2001.

PARIZOTTO, N. A; GONÇALVES, R. C; SANTOS, A. A. S; CARRINHO, P. M; ORTIZ, M. C. S. Laser de Baixa Intensidade: Efeitos sobre os Tecidos Biológicos - Parte 2. **Fisioterapia Brasil**, v. 2, p 337-352, 2001.

PASSARELA, S; CASAMASSIMA, E; MOLINARI, S; PASTORE, D; QUAGLIARIELLO, E; CATALANO, I.M; CINGOLANI, A. Increase of Proton Electrochemical Potential and ATP Synthesis in Rat Liver Mitochondria Irradiated in Vitro by Helium – Neon Laser. **FEBS Lett.**, v. 175, p 95-99, 1984.

POURREAU-SCHNEIDER, N; AHMED, A; SOUDRY, M; JACQUEMIER, J; KOPP, F; FRANQUIN, J. C; MARTIN, P. M. Helium-Neon Laser Treatment Transforms Fibroblasts into Myofibroblasts. **American Journal of Pathology**, v. 134, p. 171-178, 1990.

RATZ, J.L. Laser Physics. **Clinics in Dermatology**, v. 13, p.11-20, 1995.  
REDDY, G.K; STEHNO-BITTEL, L; ENWEMEKA, C.S. Laser Photostimulation Accelerates Wound Healing in Diabetic Rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, p. 248-255, 2001.

RIBEIRO, M. S; SILVA, D. F. T; MALDONADO, E. P; ROSSI, W; ZECELL, D. M. Effects of 1047- nm Neodymium Laser Radiation on Skin Wound Healing. **Journal of Clinical Laser Medicine e Surgery**, v. 20, n. 1, p. 37-40, 2002.

ROCHKIND, S; ROUSSO, M; NISSAN, M; VILLARREAL, M; BARR-NEA, L; REES, D.G. Systemic Effects of Low Power Laser Irradiation on the Peripheral and Central

Nervous System, Cutaneous Wound and Burns. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 9, p.174–182, 1989.

SAPERIA, D; GLASSBERG, E; LYONS, R.F; ABERGEL, R.P; BANEUX, P; CASTEL, J.C; DWYER, R.M; UITTO, J. Demonstration of Elevated Type I and Type III Procollagen mRNA Levels in Cutaneous Wounds Treated with Helium – Neon Laser – Proposed Mechanism for Enhanced Wound Healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 138, p.1123-1128, 1986.

SAS. **User's Guide: Basic and Statistic**. Cary: SAS, 1.686 p, 1995.

SASAKI, K; OHSHIRO, T. Assisment in the Rat Model of the Effects of 830 nm Diode Laser Irradiation in a Chronic Wound Healing Study. **Laser Therapy**, v. 9, p. 25-32, 1997.

SCHAFFER, C. J; NANNEY, L. B. Cell Biology of Wound Healing. **Internacional Review of Cytology**, v. 169, p. 151-177, 1996.

SCHILLING, J. A. Wound Healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 56, p. 859-875, 1976.

SCHINDL, A.; MERWALD, H., SCHINDL, L., KAUN, C.; WOJTA, J. Direct Stimulatory Effect of Low-Intensity 670 nm Laser Irradiation on Human Endothelial Cell Proliferation. **British Journal of Dermatology**, v. 148, p. 334-336, 2003.

SCHINDL, A; SCHINDL, M; SCHON, H, KNOBLER, R; HAVELEC, L; SCHINDL, L. Low-Intensity Laser Irradiation Improves Skin Circulation in Patients with Diabetic Microangiopathy. **Diabetes Care**, v. 21, p. 580-584, 1998.

SCHINDL, A; SCHINDL, M; PERNERSTORFER-SCHÖN, H; SCHINDL, L. Low-Intensity Laser Therapy: A Review. **Journal of Investigative Medicine**, v. 48, p. 312-326, 2000.

SCOTT PG, CHAMBERS M, JOHNSON BW, WILLIAMS HT. Experimental Wound Healing: Increased Breaking Strength and Collagen Synthetic Activity in Abdominal Fascial Wounds Healing with Secondary Closure of the Skin. **Br J Surg**; v. 72, p. 777-779, 1985.

SHIELDS, D; O'KANE, S. Laser Photobiomodulation of Wound Healing. In: BAXTER, G. D. **Therapeutic Lasers: Theory and Practice**. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 89-138, 1994.

SILVA, E. C; HAIDAR FILHO, A; MUSSKOPF, D. E. Radiação Laser. In: RODRIGUES, E. M; GUIMARÃES, C. S. **Manual de Recursos Fisioterapêuticos**, Editora Revinter, Rio de Janeiro – RJ, 1ª edição, p.17, 1998.

SINGER, A.J; CLARK, A.F. Cutaneous Wound Healing. In: EPSTEIN, F.H. Mechanisms of Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 34, p. 738-745, 1999.

SOARES, J.H; TARDIVO, J.P; GOLDENBERG, S; KATZ, S; MOURA, L.A.R. Aspectos Morfológicos e Histométricos da Reparação Tecidual das Feridas Cutâneas de Ratos Após Irradiação com o Laser de Hélio-Nêonio. **Acta Cir. Bras.**, v. 4, p. 56-60, 1989.

SPYROU GE, NAYLOR IL. The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. **Br J Plast Surg**, v. 55, p. 275-282, 2002.

SOUZA, S A. **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos – Fundamentos Teóricos e Práticos**. Ed. Edgard Blücher, São Paulo – SP, p.304, 2004.

TAGASHIRA, S; HARADA, H; KATSUMATA, T; ITOH, N; NAKATSUKA, M. Cloning of mouse FGF10 and up-regulation of its gene expression during wound healing. **Gene**, p. 197:399, 1997.

TATARUNAS, A. C; MATERA, J. M; DAGLI, M. L. Z. Estudo Clínico e Anatomopatológico da Cicatrização Cutânea no Gato Doméstico. Utilização do Laser de Baixa Potência GaAs (904 nm). **Acta Cir. Bras**, p.13, 1998.

THOMAZ, J.B.; HERDY, C.D.C.; OLIVEIRA, J.C.P. et al. Fundamentos da Cicatrização das Feridas. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 70, p. 65-72, 1996.

TÜNÉR, J; HODE, L. **Low Level Laser Therapy. Clinical Practice and Scientific Background**. Spjutvagen, Suécia: Prima Books, p. 393, 1999.

TY HOPKINS, J.; MCLODA, T.A.; SEEGMILLER, J.G.; BAXTER, G.D. Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study. **Journal of Athletic Training**, v. 39, p. 223-229, 2004.

WALKER, M.D; RUMPF, S; BAXTER, D; HIRST, D.G; LOWE, A.S. Effect of Low-Intensity Laser Irradiation (660 nm) on a Radiation-Impaired Wound-Healing Model in Murine Skin. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 26, p. 41-47, 2000.

WYSOCKI, A.B. Skin Anatomy, Physiology and Pathophysiology. **Wound Care Management**, v. 34, p. 777-196, 1999.