

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

**ANÁLISE DO EFEITO SISTÊMICO DA LLLT NO PROCESSO DE REPARO DE
FERIDAS EM DORSO DE RATOS**

SIMONE MARJA RODRIGO

Porto Alegre
2007

SIMONE MARJA RODRIGO

**ANÁLISE DO EFEITO SISTÊMICO DA LLLT NO PROCESSO DE REPARO DE
FERIDAS EM DORSO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, na área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
- Orientadora -

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
- Co-Orientador -

Porto Alegre
2007



Dedicatória

Dedicatória

Ao meu noivo, Diogo, pelo incentivo, intenso apoio e confiança, sobretudo durante o período de realização deste Curso.



Agradecimentos Especiais

Agradecimentos especiais

Aos meus pais, Johannes (*in memoriam*) e Cora, pela força, proteção e confiança para que este meu objetivo fosse alcançado.

Aos meus irmãos, Bruno e Martha, pelo apoio e incentivo para a realização do Curso de Pós-Graduação.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira, e ao co-orientador deste estudo, Prof. Dr. João Batista Weber, pelo excepcional exemplo de competência e dinamismo a mim disponibilizados, assim como a Daniel Humberto Pozza e a Diego Blaya, que, como equipe de trabalho, permitiram a realização desta pesquisa.



Agradecimentos

Agradecimentos

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Joaquim Clotet.

À Faculdade de Odontologia da PUCRS, por seu diretor, Prof. Marcos Túlio Mazzini Carvalho, pela oportunidade de ter realizado este tão bem-conceituado Curso.

Ao Ministério da Educação, por meio da CAPES, por acreditar e investir nos alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS e contribuir para a formação de novos docentes e pesquisadores.

À Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, e ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, coordenador da área de concentração CTBMF, pela dedicação que têm dispensado ao Curso de Pós-Graduação.

À Profa. Dra. Luciana Maria Pereira Ramalho, Prof. Dr. Edmar Santana e Prof. Dr. João Feliz Moraes pela atenção, disponibilidade e valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em CTBMF da PUCRS pelos ensinamentos técnicos e científicos e pela certeza do engrandecimento tanto pessoal quanto profissional oferecidos aos seus discentes.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da PUCRS e do Hospital São Lucas da PUCRS, os quais sempre demonstraram eficiência, integridade e respeito aos alunos, jamais medindo esforços no sentido de viabilizar o bom êxito da prática cirúrgica.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação pelo convívio agradável e gratificante.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



Resumo

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise histológica, a cicatrização por segunda intenção de ferimentos em pele de ratos submetidos, direta e indiretamente, à radiação com *laser* vermelho, infravermelho e a associação de ambos. Para tanto, foram empregados 36 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 200 a 250 gramas, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle, *laser* vermelho, *laser* infravermelho e *laser* vermelho e infravermelho, além de três subgrupos de acordo com o período de observação dos animais. Em cada animal, realizaram-se três ferimentos na região dorsal, padronizando-se, nos grupos experimentais, que aqueles mais próximos da cabeça seriam irradiados. Para a avaliação da reação tecidual e da cicatrização dos ferimentos, três animais de cada grupo foram mortos nos períodos de três, cinco e sete dias após a realização dos procedimentos cirúrgicos. O protocolo de irradiação foi estabelecido com intervalos de 48 horas, iniciando-se imediatamente após a cirurgia. Para análise histológica, executou-se o processamento de rotina para a técnica de HE. Os resultados obtidos demonstraram a ação sistêmica do *laser*, comparando-se os ferimentos cutâneos diretamente irradiados com os do grupo controle. A associação dos *lasers* resultou no mais evidente efeito sistêmico em processo de reparo tecidual, neste experimento.

Descritores¹: Bioestimulação com *laser*; terapia com *laser* de baixa intensidade; ratos, *Wistar*.

¹ Descritores em Ciência da Saúde (DeCS); disponível em <http://decs.bvs.br/> Acesso em 15 de outubro de 2007.



Abstract

ABSTRACT

The objective of the present study is to evaluate, through histological analysis, the cicatrization of second intention of injuries in mice's skin, when they were subjected straightly and not straightly, to the radiation with red, infrared laser and their association. There were used 36 male Wistar mice, with weight between 200 to 250 g, distributed in four groups, the control, red laser, infrared laser and red and infrared laser; and three sub-groups in accordance with the period of observation of the animals. In each animal were carried out three injuries in the dorsal region and it was standardized that the nearest injuries of the head would be radiated in the experimental groups. For the evaluation of the skin reaction and scarring of the injuries, three animals of each group were killed in the periods of 3, 5 and 7 days after fulfilled the surgical proceedings. The protocol of radiation was established by intervals of 48 hours, beginning immediately after the surgery. For histological analysis, the processing of routine was executed by the technique of HE. The results obtained showed the sistemic effect of the laser, comparing the cutaneous wounds straightly radiated with the control group. The association of the lasers resulted in the most evident sistemic effect in trial of tecidual repair, in this experiment.

Descriptors²: Laser Biostimulation; Low-Level Laser Therapy; Mices, Wistar

² Medical Subject Headings (MeSH), disponível em <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>
Acesso em 15 de outubro de 2007.



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Representação esquemática das áreas teciduais removidas.....	47
Figura 2 : Corte histológico de ferimento grupo controle de região medial, sete dias de pós-operatório; aumento de 150 vezes	53
Figura 3: Corte histológico de ferimento dorsal irradiado com <i>laser</i> infravermelho, sete dias de pós-operatório; aumento de 150 vezes.....	54
Figura 4: Corte histológico de ferimento dorsal irradiado com <i>laser</i> vermelho, aos sete dias de pós-operatório; aumento de 150 vezes	55
Figura 5: Corte histológico de ferimento dorsal irradiado com <i>laser</i> infravermelho e vermelho, aos sete dias de pós-operatório; aumento de 150 vezes	56



Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Organização dos grupos e tempos de observação.	44
Quadro 2 – Protocolo de irradiação com <i>laser</i> AsGaAl e InGaAlP (doses totais por grupo)	48
Quadro 3: Teste de Kolmogorov-Smirnov.....	56
Quadro 4: Média do grau de cicatrização em relação aos dias.	57
Quadro 5: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável dias.....	57
Quadro 6: Média do grau de cicatrização em relação aos grupos.....	58
Quadro 7: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável grupo	58
Quadro 8: Média do grau de cicatrização em relação ao local.	58
Quadro 9: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável local.	59
Quadro 10: Média do grau de cicatrização em relação a dia, local e grupo.	60
Quadro 11: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável dia, local e grupo.	61



Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
Co ²	dióxido de carbono
CTBMF	Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
CR	ceratina
CW	corrente contínua
E	epitelio
Er:YAG	érbio, ítrio, alumínio, granada
f	freqüência
FDA	Food and Drug Administration
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
Ga	gálio
GaAlAs	arseneto de gálio e alumínio
GaAs	arseneto de gálio
h	hora
HE	hematoxilina-eosina
HLLT	High Level Laser Therapy
HeNe	hélio-neônio
Ho:YAG	holmio, ítrio, alumínio, granada
Hz	Hertz
InGaAsP	fosfeto de índio-gálio-arsênio
J	<i>joule</i>
J/cm ²	<i>joule</i> por centímetro quadrado
J/m ²	<i>joule</i> por metro quadrado
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LED	Light-emitting diode
LLL T	Low Level Laser Ttherapy
m	metro
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
m/s	minutos por segundo
mW	miliwatts
mm	micrômetro
n.º	número
Nd:YAG	neodímio, ítrio, alumínio, granada
nm	nanômetro
O ²	oxigênio
P	potência
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
s	segundo

TCD	tecido conjuntivo denso
TG	tecido de granulação
TNT	tecido não tecido
W/cm ²	watts por centímetro quadrado
YAG	ítrio-alumínio-granada
λ	comprimento de onda
β	beta – letra grega
®	marca registrada
Ø	diâmetro da secção transversal da fibra óptica
%	por cento, porcentagem/percentagem, porcentual/percentual
°C	graus Celsius



Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISTA DE LITERATURA	26
2.1	Reparo tecidual	26
2.2	Laserterapia	28
2.3	Efeito do <i>laser</i> em tecidos moles.....	29
2.4	Efeito sistêmico do <i>laser</i>	34
3	PROPOSIÇÃO	40
4	METODOLOGIA	42
4.1	Respaldo ético da pesquisa	42
4.2	Paradigma	42
4.3	Variáveis.....	42
4.3.1	Variáveis independentes.....	42
4.3.2	Variável dependente.....	42
4.4	Configuração da amostra	43
4.5	Problema	43
4.6	Hipótese	43
4.7	Organização dos grupos	43
4.8	Critérios de inclusão / exclusão.....	44
4.9	Material cirúrgico	45
4.10	Técnica cirúrgica	46
4.11	Irradiação com o <i>laser</i> não-cirúrgico	47
4.12	Preparo das amostras	49
4.13	Processamento histológico estudo morfológico	49
4.14	Análise estatística	50
5	RESULTADOS.....	52
5.1	Resultados descritivos do exame microscópico	52
5.1.1	Grupo controle	52
5.1.2	Grupo <i>laser</i> infra-vermelho	53
5.1.3	Grupo <i>laser</i> vermelho	54
5.1.4	Grupo <i>lasers</i> infra-vermelho + vermelho.....	55
5.2	Análise estatística, semiquantitativa e descritiva, do exame microscópico	56
6	DISCUSSÃO.....	63
8	BIBLIOGRAFIA	71
9	ANEXOS.....	77
10	APÊNDICE.....	86



Introdução

1 INTRODUÇÃO

O reparo tecidual e a cicatrização de ferimentos na pele são processos complexos que envolvem uma série de eventos dinâmicos, incluindo coagulação, inflamação, formação de tecido de granulação, contração do ferimento e remodelação tecidual. Nas últimas décadas, inúmeros estudos e pesquisas foram realizados para investigar o uso da terapia à *laser* (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). A doutrina básica da laserterapia é que a luz monocromática tem um comprimento de onda capaz de afetar a conduta celular na ausência significativa de calor.

Muitos benefícios estão associados à biomodulação em laserterapia. Segundo Belkin e Schwartz (1989), os efeitos requerem um limiar de exposição à irradiação, ou seja, dependendo do efeito desejado é calculada a dosagem necessária. O limiar é específico, e cada tecido responde de maneira diferente a um determinado comprimento de onda. De acordo com a dosagem, é possível ter-se estimulação ou inibição de atividades bioquímicas, fisiológicas e proliferativas. Altas energias, dentro de limites específicos para cada combinação tecido-*laser*, podem gerar prejuízo; logo, os efeitos são dose-dependentes. Tal relação, todavia, não é simples, mas é relatada para a maioria das irradiações e dos parâmetros teciduais. Em decorrência da difusão sofrida pelo *laser* ao penetrar nos tecidos, uma pequena faixa de irradiação não-coerente apropriada pode ser suficiente para se obter biomodulação. Irradiar diretamente o tecido-alvo nem sempre é necessário, pois, em muitos casos, a irradiação transcutânea penetra profundamente, produzindo efeitos a distância. Por fim, um fator importante a ser considerado é que a irradiação local pode produzir efeitos sistêmicos.

Mester *et al.* (1974) e Trelles *et al.* (1983) atribuem o efeito sistêmico do *laser*, fora da área tratada, a fatores humorais. Mediante esse importante postulado, os autores citados preconizaram que, no tratamento, não é necessário irradiar toda a área lesada para a obtenção de um efeito uniforme.

Esta pesquisa, realizada em modelo animal rato, busca estudar se *lasers* (vermelho, infra-vermelho e sua associação) interferem na cicatrização de ferimentos localizados no ponto de aplicação, à distância deste e a qual tipo de irradiação o organismo responderia sistemicamente melhor.



Revista de Literatura

2 REVISTA DE LITERATURA

2.1 Reparo tecidual

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

O processo de reparo de feridas é um fenômeno biológico fundamental. Abrange todos os aspectos de proliferação celular, diferenciação celular, síntese e secreção de proteínas, proteoglicanos e outras substâncias extracelulares, assim como a inflamação em seus vários parâmetros. Todos esses fatores dependem do estado de saúde geral do indivíduo afetado (ROSS, 1971). Alguns elementos que podem interferir na velocidade do reparo de ferimentos são má nutrição, desnutrição, imunossupressão, idade avançada, diabetes, doenças malignas e isquemias decorrentes de doenças vasculares (JAMES, 1994).

Kwon e Laskin (1997) salientam a importância de se observarem os princípios gerais para cuidados de ferimentos. Para tanto, são imprescindíveis conhecimentos de anatomia regional e fisiologia, completa inspeção e palpação da lesão, debridamento de corpos estranhos e tecido necrótico, hemostasia meticulosa, manuseio cuidadoso do tecido, fechamento por planos, causando a mínima tensão tecidual e, quando possível, a aproximação das bordas.

É tradicional se estabelecer a distinção entre a cicatrização de um ferimento inciso, com margens apostas (cicatrização por primeira intenção), e um ferimento lacerado com bordas separadas (cicatrização por segunda intenção) (ROBBINS, 1969).

Fonseca e Walker (1991) e Barros e Souza (2000) dividem o reparo de ferimentos em tecidos moles em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. A fase inflamatória é traduzida pelo aumento na permeabilidade capilar e afluxo de células sangüíneas para a região da ferida. Durante a segunda fase, os fibroblastos afluem para o local da ferida acompanhados por notável proliferação endotelial. Já a última fase, por sua vez, corresponde à migração epitelial.

Na cicatrização de ferimentos em humanos, a hemorragia e a formação de um hematoma rico em fibrina e fibronectina são acompanhadas por inflamação aguda e dissolução do colágeno. No período de 24 horas após a lesão, as células epiteliais migram da epiderme adjacente e invadem o coágulo. Em ferimentos de bordas bem-aproximadas, dentro de 48 horas uma camada contínua de células epiteliais recobre o ferimento. No terceiro ou quarto dia, o tecido de granulação invade o ferimento e tem início a deposição de colágeno. No primeiro mês, há um paralelismo entre a resistência tênsil e o conteúdo de colágeno do ferimento. O tecido de granulação impede a migração epitelial em direção à profundidade do ferimento, ocorrendo degeneração dos esporões epiteliais iniciais. As células epiteliais, na superfície, dividem-se e se diferenciam, restaurando, assim, um epitélio estratificado. À medida que se dá a reorganização vascular no tecido de granulação, a cicatriz reduz a sua dimensão e altera sua cor de avermelhada para branca (ROBBINS, 1969).

Quando ocorre extensa perda de tecido ou simplesmente um fracasso na aproximação das bordas, o defeito é preenchido por tecido de granulação. Portanto, a principal diferença entre a cicatrização por primeira e segunda intenções é o grande defeito que deve ser preenchido na última e, conseqüentemente, o aumento do tempo de cicatrização (JAMES, 1994).

Becker, Adams e Levin (1999) indicam a cicatrização por segunda intenção como opção de tratamento após cirurgias de Mohs³. Em seus estudos, revisaram o resultado cirúrgico de 205 pacientes com ferimentos de Mohs em escalpo e frente que cicatrizaram por segunda intenção; desses, 38 apresentavam exposição óssea. A média de área de osso exposto era de 1.074 mm² e a média de tecido mole exposto alcançava de 1.575 mm². Todos os ferimentos cicatrizaram sem infecção ou interrupção tecidual. Os autores concluíram que a cicatrização tecidual por segunda intenção de ferimentos em escalpo e frente com exposição óssea é um método seguro e efetivo de manejo de ferimento após cirurgias de Mohs.

De acordo com os resultados obtidos por Gloster (2002), em uma análise do reparo por segunda intenção em região de vermelhão de lábio após cirurgia de Mohs para remoção de carcinoma de células escamosas, o reparo por segunda intenção deve ser fortemente considerado para o reparo de defeitos superficiais envolvendo mucosa labial e/ou mucosa de transição do lábio que não se estendam para a porção do músculo orbicular da boca. Esse tipo de cicatrização apresentou resultados estéticos de bons a excelentes em 12 dos 13 casos avaliados, sem impedimento funcional ou complicações pós-operatórias.

2.2 Laserterapia

A luz é uma forma de radiação, ou seja, energia propagada no tempo e no espaço na forma de ondas eletromagnéticas. Tais ondas caracterizam-se por possuírem um comprimento (λ) (definido como a distância entre as cristas da

³ De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica, a cirurgia de Mohs é uma técnica especial para a retirada de tumores de pele, que se caracteriza por ser extremamente conservadora, extraindo o mínimo de tecidos em volta do tumor. Isso é possível devido ao estudo completo das margens tumorais, que é realizado durante a cirurgia. O dermatologista retira o tumor e uma fina camada de tecido das margens laterais e profundas, a qual é submetida ao exame de congelação no criostato, durante a cirurgia. Após esse processamento, é realizado o exame no microscópio. Se houver algum fragmento comprometido, é feita nova retirada até que todas as margens estejam sem tumor.

onda) e uma frequência (definida pelo número de repetições ao longo do período de tempo). Comprimento e frequência são, assim, determinantes das propriedades físicas de uma onda. Quanto menor o comprimento de uma onda, maior a sua frequência e, como resultado, a sua energia (ROSENSHEIN, 1997).

Em 1916, o embasamento científico do uso de *laser* teve início com as teorias de Einstein (que se embasou na teoria quântica proposta por Plank, em 1900), nas quais foram estabelecidos os princípios da emissão estimulada de fótons, a partir do bombeamento de um meio ativo, elevando o átomo a um nível superior de energia. A emissão de energia ocorre quando o átomo retorna do seu estado orbital de excitação para um nível inferior. O excesso de energia é liberado na forma de um fóton (BRUGNERA e PINHEIRO, 1998).

As características fundamentais do *laser*, derivadas dos fenômenos físicos de sua produção, são: monocromaticidade, coerência, paralelismo e alto brilho. A monocromaticidade é alcançada porque todos os fótons têm o mesmo λ , a coerência, visto que todas as ondas encontram-se na mesma fase ao longo do tempo, o paralelismo, pela colimação das ondas ao longo do espaço e o alto brilho, pois toda a energia concentra-se em um único feixe. Tais características diferenciam o *laser* da luz comum, cujas ondas possuem comprimentos diversos, orientação dispersa no espaço e desordenada no tempo, dispersando a energia em todas as direções (ROSENSHEIN, 1997).

2.3 Efeito do *laser* em tecidos moles

A maioria das pesquisas *in vivo* demonstra a ação do *laser* não-ablativo sobre a síntese e a remodelação de colágeno, o número de fibroblastos, o diâmetro e a força de tração das feridas tratadas, a viabilidade dos enxertos tratados, a vascularização, a vasodilatação, o sistema linfático, os efeitos antibacteriano e imunológico, assim como os seus efeitos sistêmicos (RIGAU, 1996).

Trelles *et al.* (1983) constataram que a aplicação do *laser*, na dose de $2,4\text{J}/\text{cm}^2$ e na potência de 50mW, na língua de ratos, provocou um aumento de 30% da histamina em relação ao grupo controle. Já no grupo irradiado com o mesmo, porém na potência de 4mW, foi observado um aumento de 100% no nível de histamina em relação ao grupo controle. Os mesmos pesquisadores (TRELLES *et al.*, 1989a e 1989b), ao utilizarem cortes semifinos para microscópio e análise ultra-estrutural de língua de ratos irradiada, verificaram degranulação de mastócitos significativamente aumentada nos grupos tratados com terapia *laser* de baixa potência (LLLT).

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

Anneroth *et al.* (1988) avaliaram o efeito do tratamento com um *laser* infravermelho na cicatrização de feridas em ratos, tanto histológica quanto macroscopicamente. Para o estudo, empregaram 14 espécimes *Sprague-Dawley*, nos quais produziram duas feridas bilaterais, na região caudal de cada animal. Uma ferida em cada rato recebeu tratamento com radiação *laser*. A ferida contralateral foi mantida sem tratamento, servindo como grupo controle. O

período de observação total foi de 15 dias, sendo que, a cada dia, um animal era morto para avaliação. Os animais foram irradiados, diariamente, com um *laser* diodo (GaAs; λ 904nm), na frequência de 500Hz e na potência de 0,5mW, por um período de oito minutos e com uma distância de 5mm, até o momento da morte. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao período de cicatrização ou à formação de crosta. Durante o tempo de observação, nenhuma ferida apresentou sinais de infecção. O exame histológico também não mostrou diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e as não-tratadas. Com esse estudo, os autores não confirmaram que o uso de LLLT pode melhorar o processo de cicatrização de feridas.

Al-Watnaban e Zhang (1999) realizaram um estudo para definir a dose ideal no tratamento de feridas cutâneas no dorso de ratos. Utilizaram, ainda, diferentes *lasers* com distintos comprimentos de onda. Nas doses de 10, 20 e 30J/cm², aplicadas três vezes por semana, a que apresentou os melhores resultados foi a de 20J/cm². Em relação ao comprimento de onda, os melhores resultados obtidos foram os seguintes, nesta ordem crescente: HeNe (λ 632,8nm), AsGaAl (λ 780nm), argônio (λ 488-514nm), AsGaAl (λ 830nm), HeCd (λ 442nm) e criptônio (λ 640-670nm). A última constatação comprova que a profundidade de penetração do *laser*, a qual está relacionada com o comprimento de onda, não é proporcional aos efeitos biomodulatórios da laserterapia. Young *et al.* já haviam relatado, em 1989, que os comprimentos de onda de 660nm, 820nm e 870nm estimulam os macrófagos a liberar fatores que promovem uma maior proliferação de fibroblastos. No entanto, o *laser* com λ 880nm inibe a liberação de tais substâncias estimuladoras da proliferação celular.

Com base nos resultados obtidos por Al-Watnaban e Zhang (1999), outras pesquisas (MENDEZ, 2002; PINHO de OLIVEIRA, 2002) têm utilizado a dosagem de 20J/cm² para comparar o reparo de feridas cutâneas provocadas no dorso de ratos. Mendez (2002) constatou, ainda, que a associação entre os

comprimentos de onda de 685nm e 830nm ($10\text{J}/\text{cm}^2$ para cada um, totalizando $20\text{J}/\text{cm}^2$) foram os que promoveram os melhores resultados no reparo de feridas cutâneas pela análise óptica utilizada.

Maegawa *et al.* (2000) avaliaram o efeito da LLLT na microcirculação mesentérica de ratos *in vivo* e na concentração sistólica de cálcio em células musculares de vasos em ratos *in vitro*. O *laser* utilizado possuía um λ 830nm, sendo aplicada uma dose de $38,2\text{mW}/\text{mm}^2$. Os resultados mostraram uma potente dilatação nas arteríolas irradiadas, o que levou a um aumento marcante na circulação sangüínea arteriolar. Os autores concluíram que as alterações circulatórias observadas parecem ser mediadas largamente pela redução do íon cálcio intracelular em células musculares destes vasos.

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

Em estudo realizado em 2004, por Al-Watban *et al.* compararam efeitos dos *lasers* contínuo e pulsátil quando aplicados em ferimentos provocados em ratos e perceberam que a laserterapia pulsada, na dose e na freqüência apropriadas, pode levar à aceleração da cicatrização dos ferimentos. Em seus resultados, os autores mostraram que o melhor efeito na cicatrização dos ferimentos foi obtida na freqüência de 100Hz.

Maiya *et al.* (2005) realizaram estudo para avaliar o efeito da terapia *laser* HeNe na dinâmica da cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos. Os autores observaram que a fotoestimulação com LLLT, com correto comprimento de onda, pode melhorar o reparo tecidual por liberar fatores de crescimento dos

fibroblastos e facilitar o processo de reparo de ferimentos diabéticos. Na análise dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos, os ferimentos mostraram que o grupo tratado com *laser* cicatrizou de forma melhor e mais rápida quando comparado ao grupo controle.

Em um estudo *in vitro*, Azevedo *et al.* (2006) analisaram a influência de diferentes densidade do *laser* de baixa intensidade em fibroblastos gengivais humanos. As células foram cultivadas em déficit nutricional e irradiadas com *laser* de AsGaAl (λ 660nm; 2J/cm²). Três grupos foram formados: o primeiro não recebeu irradiação (controle), o segundo grupo recebeu irradiação de 10mW e intensidade de 142 mW/cm² e o terceiro grupo, 29 mW e 428mW/cm². Os autores observaram que o crescimento celular foi significativamente maior quando comparado com o grupo controle. O crescimento celular foi ainda maior no grupo dois, se comparado com o três, comprovando que a densidade influencia o crescimento celular de maneira inversamente proporcional.

Procurando comparar o efeito do *laser* de baixa intensidade no processo de cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos e não-diabéticos, Rabelo *et al.* (2006) realizaram um experimento utilizando *laser* de HeNe (λ 632.8nm). Utilizaram dois grupos de animais, controle e experimental, que, por sua vez, foram subdivididos em diabéticos e não-diabéticos, realizaram ferimentos na pele na região dorsal e avaliaram histologicamente em períodos de quatro, sete e 15 dias. Quando compararam os componentes teciduais (células inflamatórias, vasos e áreas de fibroblastos) perceberam que os animais tratados possuíam processos inflamatórios menos intensos que os animais não-tratados.

Para avaliar a cicatrização de ferimentos em pele de ratos, Araújo *et al.* (2007) planejaram um experimento no qual foram realizados dois ferimentos circulares em cada animal, sendo um deles irradiado com *laser* de HeNe (λ 632.8nm) e o outro o controle do próprio animal. Os ferimentos foram analisados nos períodos de um, cinco, oito, 12 e 15 dias de pós-operatório por análise

histológica. Os pesquisadores concluíram que as lesões irradiadas apresentaram reepitelização acelerada quando comparadas com o grupo controle. A dermis irradiada continha maior número de fibroblastos ativos que no grupo controle, e a radiação *laser* reduziu a inflamação local, além de, aparentemente, organizar as fibras de colágeno nas áreas de reparo.

2.4 Efeito sistêmico do *laser*

O efeito sistêmico do LLLT foi estudado por Rochkind *et al.* (1989). Para tanto, ratos com lesões nos sistemas nervosos periférico e central, feridas e queimaduras cutâneas foram irradiados com *laser* de HeNe, com λ 632,8nm, potência de 16mW e diferentes densidades de energia, por um período de 21 dias. A irradiação com *laser* foi realizada somente no lado direito dos animais, após a produção de feridas cutâneas bilaterais. Os autores observaram melhora no restabelecimento de ambos os sítios, quando comparados com o grupo controle, o qual não recebeu irradiação. Resultados similares foram obtidos em queimaduras bilaterais: a irradiação em uma das lesões também causou uma aceleração da cicatrização no sítio não-irradiado. Entretanto, no grupo controle, não-irradiado, todos os ratos sofreram necrose avançada na perna e gangrena bilateral. A irradiação em lesões por compressão do nervo ciático, no lado direito de um animal, com lesão bilateral, aumentou significativamente o potencial de ação na perna esquerda não-irradiada. A análise estatística mostrou uma diferença significativamente maior entre o grupo tratado com *laser* e o grupo controle, o qual não recebeu irradiação. Finalmente, o efeito sistêmico foi encontrado em segmentos da medula espinhal, correspondendo aos nervos ciáticos lesados. A degeneração retrógrada bilateral dos neurônios motores da medula espinhal esperada após a lesão bilateral dos nervos periféricos foi significativamente reduzida no grupo tratado com *laser*. Os autores concluíram que o *laser* HeNe exerceu um efeito sistêmico pronunciado, tanto na pele quanto nos tecidos adjacentes, bem como nos nervos periféricos severamente lesados,

bem como nas regiões correspondentes da medula espinhal. Ainda segundo os autores, os efeitos persistiram por longo período após a aplicação com *laser*. Os pesquisadores ressaltaram que os efeitos sistêmicos observados são relevantes em termos de aplicação clínica da laserterapia e para pesquisas básicas dos possíveis mecanismos envolvidos.

No mesmo ano (1989), Mester e Mester comprovaram o efeito sistêmico da laserterapia ao irradiar feridas provocadas por queimaduras *in vivo*. Os animais do grupo experimental receberam irradiação *laser* em apenas uma das duas feridas contralaterais provocadas; o grupo controle não recebeu laserterapia. Ambas as feridas do grupo experimental foram reparadas ao mesmo tempo, mas em um período de tempo menor do que as do grupo controle.

Seguindo a mesma linha de investigação, Braverman *et al.* (1989) avaliaram os efeitos bioestimuladores da irradiação com *laser* HeNe (λ 632,8nm), *laser* GaAlAs (λ 904nm) e de ambos combinados na cicatrização de feridas na pele de coelhos. Setenta e dois animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro serviu como controle e não recebeu irradiação, o segundo foi irradiado com *laser* HeNe ($1,65\text{J}/\text{cm}^2$), o terceiro com *laser* ArGaAl ($8,25\text{J}/\text{cm}^2$) e o quarto com uma combinação dos dois. As irradiações foram realizadas em uma das duas feridas dorsais, diariamente, durante 21 dias. Diferenças significativas foram encontradas, na força tênsil, em todos os grupos irradiados, tanto na lesão irradiada quanto naquela que não recebeu irradiação direta, quando comparados ao grupo controle. Nenhuma diferença foi encontrada no índice de cicatrização ou na área de colágeno. O crescimento da epiderme foi maior no grupo do *laser* HeNe, se comparado ao grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa. Assim, a irradiação com λ 632,8nm e 904nm, ou ambas combinadas, aumentou a força tênsil durante a cicatrização de feridas, com possibilidade de haver liberado fatores teciduais na circulação sistêmica, os quais aumentaram a força tênsil no lado oposto. Os

comprimentos de onda dos *lasers* HeNe e AsGaAl podem ser relativamente mais eficazes para a bioestimulação, se comparados com os *lasers* HLLT, o que se deve ao comprimento de onda do *laser* HeNe ser próximo à absorção máxima por vários pigmentos biológicos, como hemoglobina e citocromos mitocondriais, e o *laser* de AsGaAl poder penetrar no tecido por vários milímetros. Foi constatada uma biomodulação positiva de ambas as feridas dos grupos irradiados, o que não ocorreu no grupo controle, vindo, assim, ratificar a idéia do efeito sistêmico do *laser*.

Hall *et al.* (1994) avaliaram, também em ratos, o processo de cicatrização em feridas após laserterapia. Feridas standardizadas foram provocadas bilateralmente na porção caudal desses espécimes. Os animais foram divididos em dois grupos, com 19 exemplares em cada um. O grupo A foi irradiado com *laser* em um lado, destinando o lado oposto como controle para avaliação de possíveis efeitos sistêmicos. O grupo B recebeu uma irradiação placebo (luz convencional) em um dos lados; contralateralmente, não foi feito nenhum tratamento. A frequência utilizada foi de 500Hz e a potência, de 1mW. O *laser* foi utilizado perpendicularmente, a uma distância de 2mm. A dose diária foi de 0,2J/cm² e o período de observação total, de 21 dias. Dois animais de cada grupo foram mortos a cada dois dias, a partir do terceiro dia do experimento. Os resultados, tanto clínicos como histológicos, não mostraram diferenças durante todo o período de observação, quando da comparação dos grupos entre si. Os autores concluíram que a irradiação com *laser* não-ablativo, nos parâmetros utilizados na pesquisa, não exerceu influência no processo de cicatrização das feridas.

Em 2002, Schindl *et al.* realizaram um estudo para verificar o efeito sistêmico do LLLT na microcirculação cutânea de pacientes diabéticos. Para tanto, irradiaram úlceras ou gangrenas, sendo que a aplicação se deu, de forma randômica, em apenas um dos lados afetados. No grupo controle, o procedimento foi o mesmo, porém o *laser* permaneceu desligado durante o

tratamento (placebo). O *laser* utilizado foi de HeNe (λ 632,8nm e 30mW), com uma dose total de $30\text{J}/\text{cm}^2$, em uma única aplicação. Por meio de termografia infravermelha, os autores mediram a temperatura e a microcirculação locais, as quais foram significativamente maiores no local da irradiação *laser*.

Gal *et al.* (2006) avaliaram, histologicamente, o efeito da radiação *laser* na cicatrização de ferimentos em pele de ratos. Para tanto, realizaram dois cortes paralelos no dorso do animal, que foram imediatamente suturados. Após a cirurgia, um ferimento de cada rato foi irradiado com LLLT, λ 670nm e dose diária de $30\text{J}/\text{cm}^2$. O segundo ferimento não recebeu irradiação, servindo como controle do experimento. Os ferimentos foram avaliados em 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a cirurgia. Os autores perceberam, em seu estudo, que, quando comparados com os ferimentos não-irradiados, a estimulação por *laser* acelera a fase inflamatória, bem como as fases proliferativas e de maturação, estimulando, também, positivamente, a regeneração da epiderme lesada e o reparo do músculo estratificado lesado.

Outros investigadores (KANA, 1981; HUNTER *et al.*, 1984; BASFORD *et al.*, 1986, e SAPERIA *et al.*, 1986) não obtiveram melhores resultados em seus trabalhos, em grupo irradiado com LLLT, quando comparado com o lado não-irradiado. Tal fato se deve, provavelmente, aos autores terem utilizado a contralateralidade como controle, ou seja, o mesmo animal serviu de grupo experimental e de controle. Os resultados dessas pesquisas reforçam a idéia de que o *laser* não atua somente no local da irradiação, mas também sistemicamente.

In De Braekt *et al.* (1991), cientes dos efeitos sistêmicos do *laser*, irradiaram todas as áreas cruentas dos animais utilizados em sua pesquisa, quando avaliaram o efeito da laserterapia (AsGaAl; λ 830nm) na cicatrização e na contração da ferida, após realizarem cirurgia palatal em cães. A potência utilizada foi de 30mW e a dose por aplicação foi de $1\text{J}/\text{cm}^2$, com três aplicações

semanais e um total de 10 aplicações sistêmicas da irradiação *laser*. A cicatrização foi observada clinicamente até que a mesma se completasse. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na qualidade ou no grau de cicatrização entre os grupos controle e experimentais. Os autores concluíram que, macroscopicamente, a laserterapia, sob as condições utilizadas no estudo ora sob análise, não teve nenhuma influência na cicatrização ou na contração da ferida.

A laserterapia atua, ainda, nas funções endócrinas. Quando a adeno-hipófise é irradiada, as células tireoidianas e as hipofisárias demonstram um incremento de sua atividade. Tais resultados comprovam os possíveis efeitos sobre as glândulas secretoras (SMITH-AGREDA *et al.*, 1985; SARTI *et al.*, 1995). De acordo com esses autores, deve-se evitar a irradiação clínica em humanos diretamente sobre zonas glandulares, ainda que não haja nenhuma evidência clínica de que esse tipo de *laser* possa provocar hiperfunção glandular.



Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Esta pesquisa teve por objetivo verificar a ação sistêmica da laserterapia, λ 830nm (arseneto de gálio-alumínio; GaAlAs) e λ 685nm (fosfeto de índio-gálio-alumínio; InGaAlP), sobre o processo de reparo tecidos em feridas cutâneas padronizadas em dorso de ratos. Os objetivos específicos deste estudo foram:

- testar os efeitos sistêmicos dos *lasers*, comparando a ferida cutânea diretamente irradiada com as feridas cutâneas:
 - a. do grupo controle;
 - b. não diretamente irradiadas, no mesmo animal (grupos experimentais);
- verificar com qual irradiação *laser* o organismo responde sistemicamente melhor, considerando-se o processo de reparo das feridas cutâneas.



Metodología

4 METODOLOGIA

4.1 Respaldo ético da pesquisa

Respeitaram-se, aqui, os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 6.638/79 (GOLDIN, 1995) (Anexo A).

A presente pesquisa foi submetida à avaliação e aprovada pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia, sob nº. 0032/5 (ANEXO B).

4.2 Paradigma

Este estudo foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional, no *design* de estudo quase-experimental, com grupos de trabalho selecionados de forma aleatória e controle pós-teste (CAMPBELL e STANLEY, 1979).

4.3 Variáveis

4.3.1 Variáveis independentes

- a. *Laser* não-cirúrgico (THERA LASE[®])⁴, com λ 830nm (arseneto de gálio-alumínio; AsGaAl).
- b. *Laser* não-cirúrgico (THERA LASE[®]), com λ 685nm (fosfeto de índio-gálio-alumínio; InGaAlP).

4.3.2 Variável dependente

Processo de reparo tecidual nos modelos biológicos.

⁴ Thera Laser[®] DMC equipamentos.

4.4 Configuração da amostra

O modelo animal utilizado foi o rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, machos, com peso variando de 200 a 250 gramas, clinicamente saudáveis. Os animais foram obtidos na FEPPS (Fundação Estadual de Pesquisa e Produção na Saúde) e passaram por período de sete dias de ambientação no biotério de manutenção da instituição. Durante o período experimental, os animais foram alimentados com dieta sólida, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, e água *ad libitum*.

4.5 Problema

Existe efeito sistêmico dos lasers vermelho (λ 685nm, $\varnothing=0,2\text{mm}^2$, 20J/cm² e modo contínuo), infravermelho (λ 830nm, $\varnothing=0,2\text{mm}^2$, 20J/cm² e modo contínuo) e sua associação sobre o reparo nas feridas cutâneas distantes da zona irradiada?

4.6 Hipótese

Há um efeito sistêmico da laserterapia aplicada em tecido epitelial lesionado quando utilizados os comprimentos de onda testados (λ 685nm; λ 830nm; e associação).

4.7 Organização dos grupos

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em quatro grupos distintos, com nove animais em cada um, totalizando 36 animais (GOLDIN, 1995; ZAR, 1999). Os espécimes foram mantidos em gaiolas plásticas com cobertura metálica e assoalho forrado por serragem de pinho.

Em todos os grupos, o período de observação pós-operatório foi aos três, cinco e sete dias. Assim, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A, B e C), de acordo com período de observação (quadro 1).

Quadro 1: Organização dos grupos e tempos de observação.

GRUPO	PROCEDIMENTOS	SUBGRUPOS	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO
I	- CONTROLE - sem aplicação de <i>laser</i> (9 ratos)	1 – A	3 dias (3 ratos)
		1 – B	5 dias (3 ratos)
		1 – C	7 dias (3 ratos)
II	<i>laser</i> λ 830nm (9 ratos)	2 – A	3 dias (3 ratos)
		2 – B	5 dias (3 ratos)
		2 – C	7 dias (3 ratos)
III	<i>laser</i> λ 685nm (9 ratos)	3 – A	3 dias (3 ratos)
		3 – B	5 dias (3 ratos)
		3 – C	7 dias (3 ratos)
IV	<i>laser</i> λ 685nm e λ 830nm (9 ratos)	4 – A	3 dias (3 ratos)
		4 – B	5 dias (3 ratos)
		4 – C	7 dias (3 ratos)

As gaiolas receberam etiquetas durante todo o período do estudo, conforme o grupo ao qual iria pertencer cada animal. Para a identificação dos animais, foram utilizadas marcações na cauda, realizadas com caneta de tinta permanente, onde o número de marcas indicava o número do respectivo animal.

Os procedimentos de manipulação e alimentação foram realizados diariamente, durante todo o período do experimento, trocando-se a serragem e lavando-se as gaiolas com água e sabão a cada 48 horas.

4.8 Critérios de inclusão e exclusão

Para que os animais pudessem ser incluídos nos experimentos, deveriam:

- estar em bom estado nutricional;
- chegar ao final do período relativo aos seus grupos em bom estado de saúde;

- não apresentar complicações (infecções; necroses; debilitação do estado geral, trazendo problemas e desconforto ao animal durante o período dos testes), tanto no período pós-operatório quando no momento da morte.

4.9 Material cirúrgico

Os materiais de consumo empregados foram:

- hidrato de cloral a 10%;
- solução de formalina tamponada 10%;
- gaze estéril;
- solução de cloreto de sódio a 0,9%;
- campos estéreis de TNT;
- digluconato de clorexidina a 2%;
- seringas estéreis e descartáveis de 20ml;
- lâminas de bisturi, de nº. 15;
- fios de sutura tipo náilon 6-0 (Ethicon^{®5});
- compasso de ponta seca;
- régua e paquímetro de precisão (Mitutoyo^{®6});
- anestésico (Zoletil 50^{®7}).

Foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos cirúrgicos:

- mesa cirúrgica adaptada, com mantenedores de posição do rato em decúbito ventral;
- instrumental cirúrgico individualizado e esterilizado em autoclave;
- *punch* metálico com 1cm de diâmetro e com ranhuras de 1mm em sua superfície para marcação da profundidade de penetração;
- cabo de bisturi tipo Bard-Parker número nº. 3;
- porta-agulha tipo Mayo-Hegar;
- pinças tipo Adson-Brown;
- tesouras de ponta reta;

⁵ Ethicon[®] Johnson & Johnson

⁶ Série 500[®] Mitutoyo América Corporation

⁷ Zoletil[®] Virbac. SA

- aparelho de *laser* THERA LASE® (Anexo D).

4.10 Técnica cirúrgica

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

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal, por arrancamento dos pêlos. A assepsia da região foi realizada com digluconato de clorexidina a 2%. A área operatória foi isolada com campo cirúrgico fenestrado de TNT (tecido não-tecido) esterilizado, adaptado ao procedimento.

O *punch* foi posicionado perpendicularmente à superfície da pele, na região tricotomizada, junto à linha média e próximo à cabeça do animal, promovendo-se movimentos giratórios para facilitar a penetração da lâmina a uma profundidade de 1mm, com um diâmetro de 1cm, correspondendo às medidas do instrumental utilizado. Posteriormente, a região central demarcada foi pinçada com a pinça tipo Adson-Brown e com lâmina de bisturi de nº. 15, foi removida, delicadamente, a quantidade de tecido necessário à produção de uma lesão de 1mm de profundidade e 1cm de largura, sendo tal procedimento repetido a uma distância de 7cm da primeira ferida e novamente a 7cm da segunda (figura 1).

Os animais receberam, no pós-operatório, Amoxicilina 500mg diluída na água em que bebiam, sendo esta trocada a cada 24h, durante sete dias.

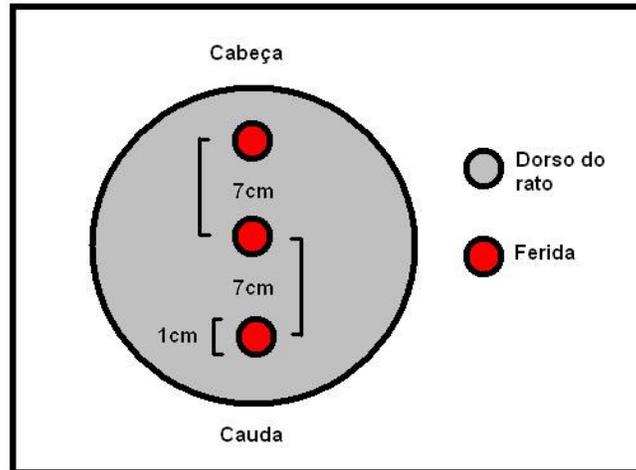


Figura 1 - Representação esquemática das áreas teciduais removidas

4.11 Irradiação com o *laser* não-cirúrgico

O *laser* utilizado no grupo II foi o infravermelho (AsGaAl), com λ 830nm $\text{Ø}=0,2\text{mm}^2$, no modo pontual e emissão contínua. Durante as sessões, a dose de irradiação foi de $20\text{J}/\text{cm}^2$, aplicada de forma pontual e contínua, logo após o término da cirurgia e a cada 48 horas, totalizando, na dependência da época da morte do animal (três, cinco ou sete dias), duas, três ou quatro aplicações.

No grupo III, foi utilizado o *laser* vermelho (InGaAlP) com λ de 685nm, $\text{Ø}=0,2\text{mm}^2$, no modo pontual e emissão contínua. A dose, durante as sessões, também foi de $20\text{J}/\text{cm}^2$, logo após o término da cirurgia e a cada 48 horas, totalizando, na dependência da época da morte do animal (três, cinco ou sete dias), duas, três ou quatro aplicações. As doses totais estão descritas no quadro 2.

No grupo IV, empregaram-se os dois tipos de *lasers* associados, no modo pontual e emissão contínua. Durante as sessões a dose também foi de $20\text{J}/\text{cm}^2$; inicialmente, o infravermelho com uma dose de $10\text{J}/\text{cm}^2$, e, logo após, o vermelho, com de $10\text{J}/\text{cm}^2$.

Em todos os grupos que receberam aplicações de *laser*, padronizou-se que somente a ferida próxima à cabeça receberia irradiação. Também foi estabelecido que a aplicação seria de forma pontual no centro do ferimento.

O *laser* foi aplicado seguindo as regulamentações brasileiras, em local isolado, com caracteres e simbologia internacionais para área em uso ou presença de radiação, observando-se os procedimentos de segurança recomendados para tratamento com luz *laser*.

Quadro 2 – Protocolo de irradiação com *laser* AsGaAl e InGaAlP (doses totais por grupo)

GRUPO	SUBGRUPOS	DOSE TOTAL
I	I – A	0
	I – B	0
	I – C	0
II	II – A	40 J/cm ²
	II – B	60 J/cm ²
	II – C	80 J/cm ²
III	III – A	40 J/cm ²
	III – B	60 J/cm ²
	III – C	80 J/cm ²
IV	IV – A	40 J/cm ²
	IV – B	60 J/cm ²
	IV – C	80 J/cm ²

Após esses procedimentos, os animais foram levados ao biotério da FEPPS e acomodados em gaiolas plásticas, mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação, identificados e numerados, de acordo com o grupo correspondente, bem como foram anotadas as datas da cirurgia e das irradiações.

4.12 Preparo das amostras

Para a obtenção das amostras, os animais foram mortos aos três, cinco e sete dias de pós-operatório, por meio da administração de uma dose letal (3-4ml) de hidrato de cloral a 10%, por via intraperitoneal.

As três lesões estabelecidas por animal foram dissecadas em forma de uma elipse, com uma lâmina de bisturi de nº. 15, estabelecendo-se uma margem de segurança para não danificar a peça. O material removido foi fixado em solução de formalina tamponada a 10%, durante 48 horas. Cada recipiente foi identificado com o número do animal e o do grupo e sua zona respectiva (1 – cranial; 2 – medial; 3 - caudal).

4.13 Processamento histológico e estudo morfológico

Após o período de fixação de 48 horas, os espécimes de tecidos foram processados, de acordo com a rotina para inclusão em parafina.

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

As amostras histológicas foram processadas na Universidade Federal da Bahia (UFBA) e, então, submetidas à análise descritiva comparativa em microscópio óptico⁸, com aumento de 150X, para análise do processo de reparo tecidual dos modelos biológicos. A observação da presença de células mononucleares foi empregada para avaliação da fase crônica do processo inflamatório. Estabeleceram-se a síntese de colágeno e a reepitelização como critérios para a observação do reparo tecidual nos modelos biológicos. O estudo do infiltrado inflamatório, da reepitelização e da síntese de colágeno foi avaliado pela coloração HE.

⁸ Zeiss® Axiolab.

Os dados obtidos na análise histológica foram organizados e tabulados. Analisaram-se os aspectos reepitelização, edema, hiperemia, hemorragia, fibroblastos, linfócitos, neutrófilos, necrose, corpo estranho e tecido conjuntivo de forma isolada e atribuíram-se valores de 0 (zero) e 1 (um) de acordo com o estágio da cicatrização, sendo 0 (zero) para estágios iniciais e 1 (um) para estágios avançados. Com a soma de tais valores, na análise de cada ferimento, foi obtida nesta pesquisa uma variante denominada grau de cicatrização. Segundo o grau de cicatrização de cada ferimento, foi possível realizar a análise estatística (Apêndice A).

4.14 Análise estatística

Foram realizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Kruskal-Wallis para a comparação de mais de dois grupos independentes, em uma análise não-paramétrica (VIEIRA, 2003).

Para análise dos dados obtidos constituiu-se um modelo de análise de comparação das médias, sendo analisados:

- efeito experimento: comparação entre os grupos experimentais e controle;
- efeito tempo: comparação entre os períodos três, cinco e sete dias;
- efeito localização: comparação entre as localizações dos ferimentos;
- efeito combinação: comparação entre grupos, locais, tempos.



Resultados

5 RESULTADOS

Durante o período de observação, os animais permaneceram saudáveis, com cicatrização normal no local operado, sem evidência de infecção.

5.1 Resultados descritivos do exame microscópico

Os resultados obtidos através da microscopia óptica para os grupos experimentais e controle estão de acordo com as estruturas avaliadas (fibras colágenas, infiltrado inflamatório neutrofílico e reepitelização), em todas as lâminas, e descritos a seguir.

5.1.1 Grupo controle

Os ferimentos realizados nos animais do grupo controle apresentavam-se na fase inicial da cicatrização na avaliação realizada ao terceiro dia pós-operatório. Constatou-se presença de tecido de granulação com intenso infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, além de área central de tecido conjuntivo fibrilar. Foram observados mastócitos na proximidade do tecido muscular. Com cinco dias de pós-operatório, os ferimentos permaneciam com as mesmas características de reparo, porém em estágio levemente avançado, sendo essa característica mais bem-observada nos ferimentos da região caudal.

Com sete dias, os ferimentos dos animais deste grupo estavam na fase final da cicatrização, com a formação completa do epitélio, fibroblastos alinhados perpendicularmente, sem edema intracelular (figura 2). Novamente as características foram mais acentuadas nos ferimentos caudais.



Figura 2: Fotomicrografia de ferimento medial do grupo controle, aos sete dias de pós-operatório, com aumento de 150X. Epitélio espessado (E), apresentando fitas de ceratina (CR). Observa-se área central com tecido de granulação (TG).

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.1.2 Grupo *laser infravermelho*

No terceiro dia, a cicatrização dos ferimentos deste grupo mostrou-se em estágio inicial, começando a reepitelização, presença de linfócitos, neutrófilos e necrose superficial. Edema e células sangüíneas apresentavam-se nos ferimentos de todas as regiões.

No quinto dia, observou-se presença de tecido de granulação com moderado infiltrado inflamatório, predominantemente mononuclear, além de área central de tecido conjuntivo fibrilar. Aos sete dias, percebeu-se que os ferimentos estavam em estágio final da cicatrização, com a formação completa de epitélio, que se apresentava levemente espessado em relação ao epitélio normal. Franca remodelação observada pela substituição do tecido de granulação, o qual mostrava moderada vascularização e discreto infiltrado inflamatório mononuclear, por tecido conjuntivo denso (Figura 3).

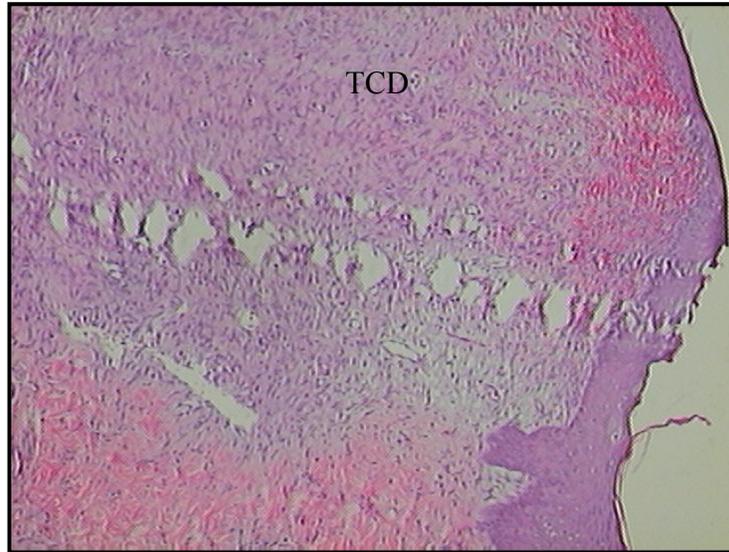


Figura 3: Fotomicrografia de ferimento dorsal irradiado com *laser* infravermelho, aos sete dias de pós-operatório, com aumento de 150X. Hemorragia superficial de permeio ao tecido conjuntivo denso (TCD) com moderado infiltrado mononuclear.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.1.3 Grupo *laser* vermelho

No terceiro dia de pós-operatório, as lesões cirúrgicas apresentavam-se cobertas por crosta. Histologicamente, observou-se moderado infiltrado inflamatório misto, predominantemente neutrofílico. Presença de fibrina superficialmente; na profundidade, formação de tecido de granulação, com intensa vascularização e vasodilatação, além de foco de extravasamento de hemácias. O quinto dia de pós-operatório foi caracterizado pela melhor organização das fibras colágenas e pela ausência de crosta em alguns ferimentos. O epitélio com invaginações na borda do espécime. No sétimo dia de pós-operatório, os ferimentos apresentavam-se com completa epitelização e espessamento, apesar de existir tecido de granulação com inúmeras células endoteliais e alguns capilares. Nesta fase, observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear e presença de mastócitos na proximidade do tecido adiposo (Figura 4).



Figura 4: Fotomicrografia de ferimento dorsal irradiado com *laser* vermelho, aos sete dias de pós-operatório, com aumento de 150X. Epitélio espessado (E) apresentando fitas de ceratina (CR). Franca substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso. Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.1.4 Grupo *lasers* infravermelho + vermelho

Os ferimentos irradiados com a combinação de *laser* infravermelho e vermelho apresentavam, no terceiro dia de pós-operatório, invaginação do epitélio, nas bordas do espécime, inclusive com anexos cutâneos nas adjacências. Infiltrado inflamatório intenso foi observado na proximidade da superfície, junto da área de solução de continuidade, com predominância de linfócitos e neutrófilos. No quinto dia, a epitelização apresentava-se incompleta no ferimento, além de ser observada intensa hemorragia superficial e presença de inúmeros vasos sanguíneos neoformados e congestionados. Proliferação intensa de células endoteliais e fibroblastos também foi verificada no período. Aos sete dias, os ferimentos apresentavam leve espessamento do epitelial em relação ao epitélio normal adjacente. Observou-se também formação de fâneros cutâneos, na área da lesão, e substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso; moderado infiltrado inflamatório mononuclear, além de moderada vascularização, na área do tecido de granulação (Figura 5).

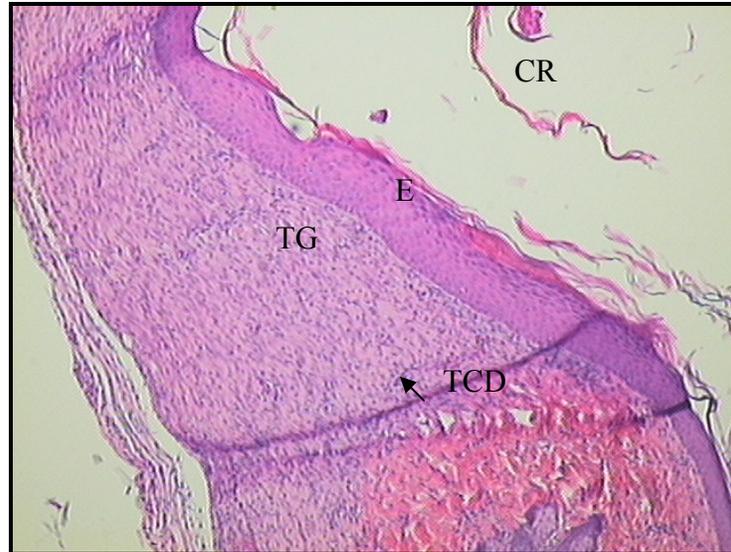


Figura 5: Fotomicrografia de ferimento dorsal irradiado com *laser* infravermelho e vermelho, aos sete dias de pós-operatório, com aumento de 150X. Epitélio espessado (E) apresentando fitas de ceratina (CR). Franca substituição do tecido de granulação (TG) pelo tecido conjuntivo denso (TCD) (seta), além de discreto infiltrado inflamatório mononuclear.

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

5.2 Análise estatística, semiquantitativa e descritiva do exame microscópico

Por meio da aplicação do teste de Kolmogorov-Smirnov para uma amostra, percebeu-se que o grau da cicatrização dos ferimentos não segue uma curva normal de probabilidade (quadro 3), sendo mais indicada a utilização de testes não-paramétricos, tipo Kruskal Wallis.

Quadro 3: Teste de Kolmogorov-Smirnov

		Grau de cicatrização
N		108
Parâmetros normais ^a	Média	2,4352
	Desvio padrão	2,03370
Valor extremo	Absoluto	,261
Diferenças	Positivo	,261
	Negativo	-,157
Kolmogorov-Smirnov Z		2,709
Significância		,000

a. Distribuição do teste é normal
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Ao se analisar o grau de cicatrização de acordo com os períodos sob estudo, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas na cicatrização dos ferimentos, de acordo com o teste Kruskal Wallis ($p=0,000$) (quadros 4 e 5). Observou-se que, no sétimo dia, os ferimentos apresentaram-se com o maior grau de cicatrização.

Quadro 4: Média do grau de cicatrização em relação aos dias.

	Dias	N	Média
Grau de cicatrização	3,00	36	41,10
	5,00	36	48,21
	7,00	36	74,19
	Total	108	

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Quadro 5: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável dias.

	Grau de cicatrização
Qui-Quadrado	23,606
Significância	0,000

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Analisando-se o grau de cicatrização de acordo com os tipos de *laser* estudados, percebeu-se que não ocorreu diferença estatística significativa na cicatrização dos ferimentos, de acordo com o teste Kruskal Wallis ($p=0,257$) (quadros 6 e 7). Os *lasers* que apresentaram melhores médias em relação ao grau de cicatrização foram do tipo vermelho e a associação dos *lasers* vermelho e infravermelho.

Quadro 6: Média do grau de cicatrização em relação aos grupos

Grupo		N	Média
Grau de cicatrização	Controle	27	51,93
	IV	27	46,09
	V	27	60,67
	IV+V	27	59,31
	Total	108	

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Quadro 7: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável grupo

	Grau de cicatrização
Qui-Quadrado	4,040
Significância	0,257

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007)

Ao se proceder à análise do grau de cicatrização, de acordo com os locais dos ferimentos estudados, observou-se que não ocorreu diferença estatística significativa na cicatrização dos ferimentos, de acordo com o teste Kruskal Wallis ($p=0,335$) (quadros 8 e 9). Porém, verificou-se que os ferimentos localizados na região média apresentaram melhor grau de cicatrização em relação aos outros locais. Os ferimentos na região em que ocorreu aplicação de *laser* (região dorsal) apresentaram a pior média.

Quadro 8: Média do grau de cicatrização em relação ao local

Local		N	Média
Grau de cicatrização	1	36	49,32
	2	36	59,92
	3	36	54,26
	Total	108	

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Quadro 9: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável local

	Grau de cicatrização
Qui-Quadrado	2,187
Singnificância	0,335

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Ao se analisar o grau de cicatrização em relação ao local dos ferimentos e em relação aos tempos estudados, foi possível perceber presença de diferenças estatísticas na cicatrização dos ferimentos: no terceiro dia, no ferimento caudal ($p=0,031$), e no sétimo dia, no ferimento caudal ($p=0,043$) (quadros 10 e 11). Verificou-se, ainda, que os ferimentos caudais com três dias de pós-operatório que melhor cicatrizaram foram os do grupo 4, nos quais estavam associados os *lasers* vermelho e infravermelho. Nos ferimentos caudais com sete dias, constatou-se que o grau de cicatrização foi mais alto nos ferimentos do grupo controle, no qual não houve aplicação de *laser*. O grupo que recebeu a associação dos *lasers* tipo vermelho e infravermelho apresentou o menor grau de cicatrização.

Quadro 10: Média do grau de cicatrização em relação ao dia, local e grupo

Dias	Local	Grupo	N	Média	
3	1	Grau de cicatrização	Controle	3	5,67
			IV	3	4,17
			V	3	7,67
			IV+V	3	8,50
			Total	12	
	2	Grau de cicatrização	Controle	3	3,83
			IV	3	5,17
			V	3	7,00
			IV+V	3	10,00
			Total	12	
	3	Grau de cicatrização	Controle	3	2,83
			IV	3	6,83
			V	3	5,50
			IV+V	3	10,83
			Total	12	
5	1	Grau de cicatrização	Controle	3	5,00
			IV	3	5,50
			V	3	8,67
			IV+V	3	6,83
			Total	12	
	2	Grau de cicatrização	Controle	3	7,50
			IV	3	4,67
			V	3	9,17
			IV+V	3	4,67
			Total	12	
	3	Grau de cicatrização	Controle	3	9,17
			IV	3	4,17
			V	3	8,33
			IV+V	3	4,33
			Total	12	
7	1	Grau de cicatrização	Controle	3	5,67
			IV	3	7,00
			V	3	5,50
			IV+V	3	7,83
			Total	12	
	2	Grau de cicatrização	Controle	3	6,83
			IV	3	4,17
			V	3	5,33
			IV+V	3	9,67
			Total	12	
	3	Grau de cicatrização	Controle	3	9,67
			IV	3	6,17
			V	3	8,17
			IV+V	3	2,00
			Total	12	

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).

Quadro 11: Teste estatístico Kruskal Wallis com variável dia, local e grupo

Dias	LOCAL		Grau de cicatrização
3	1	Qui-Quadrado	3,085
		Significância	0,379
	2	Qui-Quadrado	6,164
		Significância	0,104
	3	Qui-Quadrado	8,871
		Significância	0,031
5	1	Qui-Quadrado	2,417
		Significância	0,491
	2	Qui-Quadrado	3,996
		Significância	0,262
	3	Qui-Quadrado	5,095
		Significância	0,165
7	1	Qui-Quadrado	0,897
		Significância	0,826
	2	Qui-Quadrado	4,127
		Significância	0,248
	3	Qui-Quadrado	8,168
		Significância	0,043

Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2007).



Discussão

6 DISCUSSÃO

Com vistas a verificar a influência sistêmica do LLLT sobre os ferimentos que cicatrizam por segunda intenção, realizou-se este experimento em modelo animal rato. Para testar a existência ou não de diferença quanto à distância do efeito sistêmico em relação ao ponto de aplicação da luz *laser*, optou-se por realizar três ferimentos eqüidistantes e de mesmo diâmetro na região dorsal dos animais. Em todos os grupos experimentais, o *laser* foi aplicado no ferimento mais próximo da cabeça, visando à padronização. As lesões irradiadas e não-irradiadas por *lasers* vermelho, infravermelho e associação de ambos foram comparados entre si e com o grupo controle.

Como uma tendência mundial, com base no paradigma bioético, o número de animais utilizado na presente pesquisa foi reduzido a três por subgrupo, sendo que um estudo realizado por Hall *et al.* (1994) empregou um número ainda mais reduzido: dois animais em cada grupo.

Os resultados de várias investigações são notavelmente contraditórios, o que decorre, em parte, de diferentes indicações, assim como da grande variação nos parâmetros de irradiação e, mesmo, da dificuldade de mensuração dos possíveis efeitos pós-irradiação com a objetividade necessária. A existência de controvérsia deve-se também ao fato de o conhecimento teórico sobre o mecanismo de ação não poder ficar restrito apenas ao estudo para estabelecimento de critérios quanto aos efeitos; é necessário e importante também simplificar a avaliação e a interpretação dos resultados (Kana, 1981; Hunter *et al.*, 1984; Anneroth *et al.*, 1988; Al-Watnaban e Zhang, 1999; In De Braekt *et al.*, 1991; Vink *et al.*, 2003).

Durante a avaliação do presente experimento, percebeu-se que a aplicação de *laser* diretamente sobre os ferimentos estimulou a cicatrização dos

mesmos, assim como a daqueles localizados à distância do ponto de aplicação. Isto foi observado sobretudo na fase inicial do reparo das lesões, mas com maior intensidade quando utilizada associação de *lasers* vermelho e infravermelho. A partir daí, foi possível também questionar qual seria o real efeito de uma aplicação de *laser* sobre o organismo, considerando-se que a biomodulação promovida pelo *laser* em células no local de sua aplicação pode igualmente ocorrer em tecidos à distância do ponto de aplicação. Tal estimulação de células de outros locais é passível de aumentar o número de mitoses, além de modular a fisiologia celular nos mais diversos sítios (Rochkind *et al.*, 1989).

Observou-se que os ferimentos localizados no ponto de aplicação do *laser* apresentaram a pior média de cicatrização; sendo a melhor demonstrada na localização medial. Tal fato pode ocorrer devido à eventual manipulação de tecidos pela ponteira no momento de aplicação do *laser*, à administração de luz em excesso, aos traumatismos leves sobre a área do ferimento no animal em sua gaiola ou, ainda, durante a contensão para se realizar a irradiação.

Outro fato notório diz respeito à menor média de cicatrização alcançada pelos ferimentos irradiados com *laser* infravermelho, quando comparado às demais terapias testadas. Provavelmente, isso ocorra por ser um comprimento de onda que permite melhor penetração nos tecidos, não agindo suficientemente nas camadas superficiais como o epitélio. É possível que o *laser* vermelho, por possuir um maior comprimento de onda, constituiu fator determinante para que as áreas irradiadas apresentassem melhor média no grau de cicatrização, seguido pela associação dos *lasers* vermelho e infravermelho (Al-Watnaban e Zhang, 1999; Mendez, 2002).

As áreas irradiadas pelo *laser* vermelho apresentaram melhores médias de cicatrização, mesmo sem diferença estatisticamente significativa, mas com relevância na comparação com os grupos controle e *laser* infravermelho.

Histologicamente, foi possível verificar grande quantidade de tecido vascular e células sangüíneas, podendo-se afirmar que o *laser* atuou sobre a vascularização, aumentando-a. É importante considerar o mecanismo de redução do edema pelo *laser*, com dilatação dos vasos linfáticos, o que pode favorecer uma melhor cicatrização, por maior oxigenação para os tecidos em reparo. Novos experimentos poderão vir a elucidar a relevância do edema para a cicatrização por segunda intenção (Benedicenti, 1982; Trelles *et al.*, 1983; Miró *et al.*, 1984; Rigau, 1996; Maegawa *et al.*, 2000).

De acordo com Anneroth *et al.* (1988), o LLLT não interfere e/ou acelera a cicatrização de ferimentos; porém, o estudo desses pesquisadores foi realizado com apenas um grupo de animais, no qual, de um lado, ocorreu irradiação com *laser* e, do outro, afirmaram ser o controle. Não encontraram diferença estatística significativa na cicatrização dos ferimentos; contudo, o efeito sistêmico do *laser* foi desconsiderado na medida em que não delinearam um grupo de animais (o controle) sem que os mesmos recebessem irradiação, constituindo-se essa, então, uma possível causa da falta de diferença estatística entre os resultados da investigação sob análise. No experimento realizado na presente pesquisa, o grupo controle foi mantido sem qualquer aplicação de irradiação, para comparação com os animais em teste.

Já no experimento de Araújo *et al.* (2007), os ferimentos do grupo experimental e do controle foram realizados no mesmo animal, segundo os autores, com a finalidade de considerar a variabilidade individual de reparo dos ferimentos em pele. Acredita-se que o animal submetido a um experimento que visa à avaliação dos efeitos produzidos pela LLLT não pode ser o mesmo utilizado para o controle, em decorrência do efeito a distância do ponto de aplicação que o *laser* produz no organismo. A fim de verificar a variabilidade individual do espécime estudado, seria interessante a realização de pesquisa randomizada na qual o mesmo animal fosse submetido a um ferimento cruento e avaliada sua cicatrização, com e sem terapia *laser*, em momentos distintos. Tal

tipo de estudo permitiria inúmeros cruzamentos de informações, além de possibilitar a avaliação do efeito residual da terapia *laser*.

Na presente pesquisa, a aplicação de *laser* administrada foi de $20\text{J}/\text{cm}^2$ em cada sessão (λ 830nm e 685nm e $\text{Ø}=0,02\text{cm}^2$). Diferenças da dosimetria utilizada para LLLT foram encontradas na literatura, originando uma variável de grande significância para comparação entre os demais estudos (Bradley, 1997; Rosenshein, 1997). Na literatura encontra-se uma variação na dosimetria diária utilizada, entre $0,2\text{J}/\text{cm}^2$ (Hall *et al.*, 1994) e $30\text{J}/\text{cm}^2$ (Gal *et al.*, 2006), como, por exemplo, em investigação efetivada por Al-Watnaban e Zhang (1999), na qual os autores avaliaram a dose e o comprimento de onda ideal para o tratamento de feridas em dorso de ratos, com os melhores resultados alcançados com doses de $20\text{J}/\text{cm}^2$ e λ de 640-670nm.

Na pesquisa de In De Braekt *et al.* (1991), não foi obtida diferença clínica na cicatrização dos ferimentos realizados no palato de cães, porém a dose utilizada pelos autores foi relativamente baixa (a dose por aplicação foi de $1\text{J}/\text{cm}^2$). O *laser* utilizado nesse estudo foi o infravermelho. A utilização de *laser* vermelho ou a associação das terapias, nos primeiros dias, bem como a utilização de maior irradiação sobre os ferimentos, poderia acelerar a cicatrização, mas em sua fase inicial. O estudo de Mendez (2002) também constatou que a associação dos comprimentos de onda vermelha e infravermelha foi a que promoveu os melhores resultados no reparo de feridas cutâneas.

Pessoas com boa saúde raramente requerem tratamento para cicatrização de ferimentos, segundo Reddy *et al.* (2001). É possível que a luz tenha um efeito muito favorável em lesões com retardo na cicatrização, normalmente decorrente de complicações como má nutrição, imunossupressão, diabetes, doenças malignas, isquemias decorrentes de doenças vasculares ou

mesmo idade avançada (Ross, 1971; Zanini, 1990; James, 1994; Know e Laskin, 1997; Rabelo *et al.*, 2006).

Enfatiza-se que a produção de colágeno em ferimentos de diabéticos pode ser modulada por laserterapia, reforçando a importância do experimento realizado. O processo pelo qual a bioestimulação com *laser* facilita a produção de colágeno na cicatrização de ferimentos em diabéticos pode envolver uma variedade de mecanismos. No estudo realizado por Maiya *et al.* (2005), os achados histopatológicos mostraram aumento na proliferação de fibroblastos, capilares e epitelização. Isso indica que, provavelmente, o uso de *laser* no λ 638nm pode modular a proliferação celular e liberar os fatores de crescimento dos fibroblastos. O efeito sistêmico do LLLT foi também avaliado em úlceras e gangrenas de pacientes diabéticos em pesquisa realizada por Schindl *et al.* (2002), percebendo-se melhora significativa na microcirculação local. Na presente pesquisa, confirma-se que o *laser* não possui atuação somente no ponto de aplicação, mas também a distância, acelerando a cicatrização de ferimentos.

Observa-se uma grande necessidade de novas pesquisas voltadas à avaliação da eficácia terapêutica do LLLT em ferimentos que apresentem retardo no processo de cicatrização. O *laser*, além de seus efeitos biomodulatórios no local onde é aplicado, parece influenciar no funcionamento celular de todo o organismo. Assim, torna-se cada vez mais importante padronizar métodos de aplicação e avaliação de possível efeito sistêmico da terapia *laser*.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

A aplicação dos *lasers* $\lambda=830\text{nm}$ (arseneto de gálio-alumínio; GaAlAs) e $\lambda=685\text{nm}$ (fosfeto de índio-gálio-alumínio; InGaAlP) possui ação sistêmica sobre o processo de reparo em feridas cutâneas padronizadas para o presente experimento.

Neste estudo, o efeito sistêmico do *laser*, ficou demonstrado, no terceiro dia de pós-operatório, junto ao ferimento cutâneo localizado mais distalmente ao ponto de aplicação do *laser*.

A associação dos *lasers* vermelho e infravermelho, neste experimento, resultou no mais evidente efeito sistêmico em processo de reparo das feridas cutâneas produzidas no dorso dos ratos.



Bibliografía

8 BIBLIOGRAFIA⁹

AL-WATNABAN, F.A.H.; ZHANG, X.Y. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. **Laser Therapy**, v. 11, n. 1, p. 6-10, 1999.

AL-WATBAN, Farouk A.H.; ZHANG, X.Y. **The Comparison of Effects between Pulsed and CW Lasers on Wound Healing** Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, V. 22, n. 1, p 15-18, 2004.

ANNEROTH, G.; et al. The effect of low-energy infra-red Laser radiation on wound healing in rats. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 1, p. 12-17, 1988.

ARAÚJO, C. E.N. de; et al. Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds **Journal oh Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 87-96, 2007.

AZEVEDO, Luciane, Hiramatsu; EDUARDO, Fernanda de Paula; MOREIRA, Maria Stella; Eduardo, Carlos de Paula; Marques, Márcia Martins **Influence of different power of LILT on cultured human fibroblast growth** Laser Méd Sci v. 21,p. 86-89, 2006.

BARROS, J.J.; SOUZA, L.C.M. **Traumatismo Buco-Maxilo-Facial** 2.ed. São Paulo: Roca, 2000. 455p.

BASFORD, J. R.; HALLMAN, H. O.; SHEFFIELD, C. G.; MACKEY, G. L. Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy Laser and occlusion in wound healing in a swine model. **Arch Physi Med Rehabil**, v.67, p.151, 1986.

BECKER, G.D.; ADAMS, L.A.; LEVIN, B.C. Secondary intention healing of exposed scalp and forehead bone after Mohs surgery. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v.121, p. 751-754, 1999.

BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. New biological phenomena associated with Laser radiation. **Health Phys**, New, York, v. 56, n. 5, p. 687-690, May 1989.

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

⁹ De acordo com NBR 6.023: Informação e Documentação – Referências-Elaboração, de 2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro - RJ

BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared Laser irradiation on wound healing in rabbits. **Lasers Surg Med**, v.9, p.50-58, 1989.

CAMPBELL, D. T.; STANLEY, J. C. **Delineamentos experimentais e quase experimentais de pesquisa**. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária, 1979.

FELTRACO, D. **Estudo comparativo do efeito do açúcar e da neomicina na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. 1996. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Curso de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FONSECA, R.J.; WALKER, R.V. **Oral and Maxillofacial Trauma** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991. 650p.

GAL, P. et al. Histological Assessment of the Effect of Laser Irradiation on Skin Wound Healing in Rats **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 480-488, 2006.

GLOSTER H.M. The use of second-intention healing for partial-thickness Mohs defects involving the vermilion and/or mucosal surface of the lip. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**; v.47, p.893-897, 2002.

GOLDIN, J.R. **Pesquisa em saúde: normas leis e diretrizes**. 2. ed. Porto Alegre:HCPA, 1995. 85p.

HALL, G. et al. Effect of low level energy Laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swedish Dental Journal**, Stocholm, v. 18, n. 1, p. 29-34, 1994.

HUNTER, J.; et al. Effects of low energy Laser on wound healing in a porcine model. **Lasers Surg Med**, v.3, p.285-290, 1984.

IN DE BRAEKT, M.H. et al. Effect of low-level Laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 11,n. 5, p. 462-470, 1991.

JAMES, H. Wound dressings in accident and emergency departments. **Accident and Emergency Nursing**, v.2, p.87-93, 1994.

KANA, J. Effect of low-power density Laser radiation on healing of open wounds in rats. **Arch Surg**, v.116, p.293, 1981.

KWON, P.H.; LASKIN, D.M. **Clinician's Manual of Oral and Maxillofacial Surgery**. 2.ed. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, 1997. 420p.

LIEVENS, P.C. The effect of I.R. Laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system. **Laser Med Sci**, v.6, p.189-191, 1991.

MAEGAWA, Y.; et al. Effects of near-infrared low-level Laser irradiation on microcirculation. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 27, n. 5, p. 427-437, 2000.

MAIYA, G. A.; KUMAR, P.; RAO, L. **Effect of Low Helium-Neon (He-Ne) Laser Irradiation on Diabetic Wound Healing Dynamics** Photomedicine and Laser Surgery, Vol 23, Number 2, Pg 187-190, 2005.

MENDEZ, T.M.T.V. **Avaliação da influencia da dose e do comprimento de onda no processo de reparo subcutâneo de feridas submetidas a laserterapia.** São Jose dos Campos. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da UniVaP, 2002, 72p.

MESTER, E.; BACSY, E.; KORENYI, A.; KOVACS, I.; SPIRY, T. Clinical electron optic and enzyme-histochemical studies on the effect of Laser irradiation on wound healing. **Langenbecks Archv Chir Suppl**, v.261, 1974.

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

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

PINHO DE OLIVEIRA, R. A. **Efeitos da fototerapia na cicatrização de feridas cirúrgicas produzidas com o Laser de CO₂.** Porto Alegre. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia da PUCRS, 2002, 155p.

RABELO, S.B. et al. **Comparison between Wound Healing in Induced Diabetic and Nondiabetic Rats after Low-Level Laser Therapy** Photomedicine and Laser Surgery, v. 24, n. 4, p. 474-479, 2006.

REDDY, GK; STEHNO BITTEL, L; ENWEMEKA, CS, Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. **Wound Repair Regen**, 9:248-255 (2001)

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

ROBBINS, Stanley L. **Patologia.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969, 1440p.

ROCHKIND, S.; ROUSSO, M.; NISSAN, M.; VILLAREAL, M.; BARR-NEA, L.; REES, D. G. Systemic effects of Low-Power Laser irradiation on the peripheral

and central nervous system, cutaneous wounds, and burns. **Lasers Surg Med**, v.9, p.174-182, 1989.

ROSS, Russell: Wound healing: Recent progress – Future Directions **Journal of Dental Research** Supplement to v.50, n. 2, p.312-314, 1971.

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

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

SCHINDL, A. et al. Systemic effects of low-intensity Laser irradiation on skin microcirculation in patients with diabetic microangiopathy. **Microvascular Research**, v.64, p.240-246, 2002.

SHAFFER, M. et al. Effects of 780nm diode Laser irradiation on blood microcirculation: preliminary findings on time-dependent T1-weighted contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI). **J. Photochem. Photobiol.** v.54, p.55-60, 2000.

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

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

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

TRELLES, M. A.; et al. Clinical use of He-Ne Laser for wound healing. **J Bloodless Med Surg**, v. 7, n. 1, p. 3-7, 1989b.

VIEIRA, S. **Metodologia científica para a área de saúde**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. 192p.

VINK, E.M. et al. **Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation** *Laser Med Sci* (2003) 18: 95-99

ZANINI, Silvio A. **Cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial**. Rio de Janeiro: Revinter, 1990. 464p.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. London: Prentice-Hall, 1999. 870p.



Anexos

ANEXO A – Normas para prática didático-científica da vivissecção de animais¹⁰

Art. 01 – Fica permitida, em todo o território nacional, a vivissecção de animais, nos termos desta lei.

Art. 02 – Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art 03 – A vivissecção não será permitida:

- I – sem o emprego de anestesia;
- II – em centros de pesquisa e estudos não registrados em órgão competente;
- III – sem supervisão de técnico especializado;
- IV – com animais que não tenham permanecido mais de 15 dias em biotério legalmente autorizados;
- V – em estabelecimento de ensino de 1º e 2º graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 04 – O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando, durante ou após a vivissecção, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1º. – Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.

¹⁰ BRASIL. Lei 6.638 de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências.

Parágrafo 2º. – Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 05 – Os infratores da lei estarão sujeitos:

I – às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto-lei 3.688 de 03/10/1941, no caso de ser a primeira infração;

II – à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art. 06 – O poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I – o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos;

II – as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III – órgão e autoridades competentes para fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 07 – Esta Lei entra em vigor na data da sua publicação.

Art. 08 – Revogam-se as disposições em contrário.

ANEXO B – Protocolo da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



Comissão Científica e de Ética Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 30 de maio de 2005

O Projeto de: Pesquisa

Protocolado sob nº: 0032/05

Intitulado: *Análise do efeito sistêmico da laserterapia, vermelha (Fosfeto de Gálio-Alumínio-Índio-InGaAlP) e infravermelha (Arseneto de Gálio-Alumínio-GaAlAs), no processo de reparo de feridas em dorso de ratos.*

do(a) aluno(a): *Diego Segatto Blaya, Prof. Dr. João Blessmann Weber, Daniel Humberto Pozza, Profa. Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho, Prof. Dr. Edmar Santana*

Programa de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

do curso de: *Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial*

Nível: *Mestrado*

Orientado pelo(a): *Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira*

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 27 de maio de 2005.



Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

ME
Simone



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

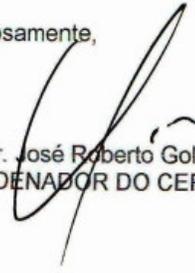
Ofício 0517/07-CEP

Porto Alegre, 14 de maio de 2007.

Senhor(a) Pesquisador(a):

Como é do seu conhecimento, não existe, em nível nacional, legislação que estabeleça critérios de utilização de modelos animais em projetos de pesquisa. Muitos pesquisadores encaminham seus projetos para avaliação por Comitê de Ética em Pesquisa de forma espontânea. Não há condições de proceder a avaliação de um projeto de pesquisa já realizado. Contudo, ao analisar o material encaminhado foi possível verificar que, se o projeto ao qual ele se refere, tivesse sido encaminhado para avaliação prévia pelo Comitê, o mesmo estaria em condições de ser aprovado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Marília Gerhardt de Oliveira
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C – Coloração com Hematoxilina – Eosina (H.E.)¹¹

1. Lavar em água corrente.
2. Imergir na hematoxilina por cinco minutos.
3. Mergulhar rapidamente no diferenciador (álcool 70° + HCl) duas ou três vezes.
4. Imergir em água por um minuto (quanto maior o tempo, mais intenso é o azul).
5. Imergir na eosina por 10 a 15 segundos.
6. Lavar rapidamente em água destilada.
7. Imergir em álcool 70° por um minuto.
8. Imergir em álcool 95° por um minuto, duas vezes.
9. Imergir no álcool absoluto por um minuto, duas vezes.
10. Lavar rapidamente em xilol.
11. Imergir em xilol (pode ser mantido no xilol até a montagem).

¹¹ Fonte: <http://icb.usp.br/~mlracz/LabVir/ecp/ecp.htm>, capturado em 26/09/2003.

ANEXO D – Relatório Espectrométrico



LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO E RADIOMETRIA
GRUPO DE FÍSICA DAS RADIAÇÕES – GFR
NÚCLEO DE PESQUISA EM INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM A MATÉRIA
CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM FÍSICA - PUCRS

1/3

Relatório Espectrorradiométrico

Nº 0006IEI/05 - GFR

Data 13/09/05

MEDIDA DE IRRADIÂNCIA ESPECTRAL E IRRADIÂNCIA

1. REQUERENTE

Razão Social/Nome: Faculdade de Odontologia da PUCRS – Marília Gerhardt de Oliveira
Endereço: Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 6
Cep: 90619-900
Cidade: Porto Alegre – RS
Telefone: 3320-3538

2. DESCRIÇÃO DOS ITENS ENSAIADOS ^[1]

A tabela 2.1 identifica as duas fontes lasers ensaiadas do seguinte equipamento:

- **Marca:** DMC.
- **Modelo:** Thera Laser.
- **Tensão:** 127 V.
- **Número de série:** TLSR0391.

2.1 Tabela de Identificação:

Código	Tipo	Potência	Obs.
0006IEI/05 – 01	Fonte Laser Vis	35 mW	---
0006IEI/05 – 02	Fonte Laser IR	100 mW	---

[1] Informações fornecidas pelo requerente.

3. INSTRUMENTO DE MEDIDA

- Espectrorradiômetro: Detecção espectral entre 250-1100 nm em intervalos de 1 nm, com largura de banda não excedendo a 2,5 nm.
- Certificado de Calibração nº 506074717 de 07/06/05.

4. MÉTODO DE MEDIDA

Método realizado de acordo com o Procedimento Técnico Interno de Medida de Irradiância Espectral Difusa.

- Distância fonte - detector: $(2,5 \pm 0,1)$ cm.
- Intervalos de medida: 400 - 800 nm e 750 - 1100 nm.

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 96A / 104
CEP 90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil
Home-page: www.pucrs.br/gfr E-mail: gfr@pucrs.br

Fone: (51) 3320-3682
Fax: (51) 3320-3616
CNPJ 88630413/0002-81



Relatório Espectrorradiométrico

Nº 0006IEI/05 - GFR

Continuação

Data 13/09/05

5. RESULTADO DAS MEDIDAS ^[2]

Tabela com Valores da Irradiância Difusa e Espectros das fontes identificadas pelo código da Tabela 2.1.

5.1 Tabela de Irradiância Difusa e Comprimento de Onda:

Código	Comprimento de Onda	Irradiância Difusa
0006IEI/05 – 01	683 nm	2,87 Wm ⁻²
0006IEI/05 – 02	829 nm	13,22 Wm ⁻²

5.2 Anexo I: Espectros da Irradiância Espectral Difusa x Comprimento de Onda, para as fontes de radiação identificada pelo código da Tabela 2.1.

[2] Observações:

- Incerteza das medidas: 251-400 nm : ± 4.0 %; 400-900nm: ± 3.3 %; 900-1000: ± 5.1%; 1000-1100: ± 8.0%.
- Para as medidas de irradiância de barreiras (filtros, óculos, tecidos, entre outros) será acrescida ao código da fonte empregada a seguinte identificação: letra A para a primeira barreira, letra B para segunda e assim, sucessivamente.
- Esse relatório espectrorradiométrico é válido exclusivamente para as amostras identificadas na Tabela 2.1, não sendo extensivo a quaisquer lotes, mesmo que similares.
- O relatório espectrorradiométrico não deve ser reproduzido sem prévia autorização.

Esclarecimento:

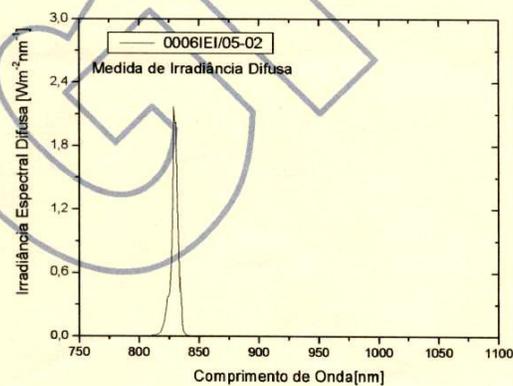
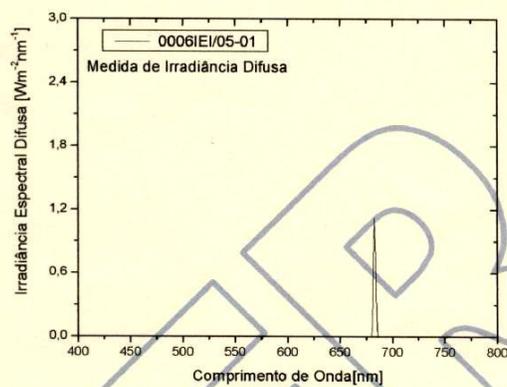
O presente Relatório Espectrorradiométrico nº 0006IEI/05 – GFR está inserido na rede de convênio-cooperação desse Laboratório com o solicitante desse serviço. Como consequência toda divulgação dessas medidas deverá ser acompanhada com a descrição: “Resultados concedidos pelo Grupo de Física das Radiações (GFR-PUCRS)”.

Porto Alegre, 13 de setembro de 2005.

Dra. M. R. Rizzatti
Coordenadora do GFR-PUCRS



ANEXO I (3/3)





Apêndice

Apêndice A

Ferimento	inc-0/total-1 Re-epitelização	sim-0/não-1 Edema	sim-0/não-1 Hiperemia	sim-0/não-1 Hemorragia	perp-1/paral-0 Fibroblastos	sim-0/não-1 Linfócitos	sim-0/não-1 Neutrófilos	sim-0/não-1 Necrose	sim-0/não-1 Corpo estranho	alt-0/normal-9 Conjuntivo	grau de cicatrização
C3-D1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C3-D3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
C3-M2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
C3-M3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C3-C2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C3-C3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C5-D1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C5-D2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C5-D3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
C5-M1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
C5-M2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
C5-M3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
C5-C1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	4
C5-C2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
C5-C3	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	4
C7-D1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2
C7-D2	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	7
C7-D3	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
C7-M1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	7
C7-M2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	6
C7-C1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	3
C7-C2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
C7-C3	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	7

Ferimento	inc-0/total-1 Re-epitelização	sim-0/não-1 Edema	sim-0/não-1 Hiperemia	sim-0/não-1 Hemorragia	perp-1/paral-0 Fibroblastos	sim-0/não-1 Linfócitos	sim-0/não-1 Neutrófilos	sim-0/não-1 Necrose	sim-0/não-1 Corpo estranho	alt-0/normal-9 Conjuntivo	grau de cicatrização
IV3-D1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV3-D2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV3-D3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV3-M1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
IV3-M2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
IV3-M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV3-C1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
IV3-C2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IV3-C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV5-D1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV5-D2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV5-D3	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2
IV5-M1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV5-M2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV5-M3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
IV5-C1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV5-C2	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	3
IV5-C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV7-D2	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	7
IV7-D3	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	8
IV7-M1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	3
IV7-M2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
IV7-M3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	3
IV7-C1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV7-C2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV7-C3	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	3

Ferimento	inic-0/total-1 Re-epitelização	sim-0/não-1 Edema	sim-0/não-1 Hiperemia	sim-0/não-1 Hemorragia	perp-1/paral-0 Fibroblastos	sim-0/não-1 Linfócitos	sim-0/não-1 Neutrófilos	sim-0/não-1 Necrose	sim-0/não-1 Corpo estranho	alt-0/normal-9 Conjuntivo	grau de cicatrização
V3-D1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
V3-D2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
V3-D3	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3
V3-M1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
V3-M2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
V3-M3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
V3-C2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
V3-C1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
V3-C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
V5-D1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
V5-D2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2
V5-D3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
V5-M1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
V5-M2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	3
V5-M3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
V5-C1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	4
V5-C2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
V5-C3	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2
V7-D1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	7
V7-D2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	6
V7-D3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
V7-M1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
V7-M2	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	6
V7-M3	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
V7-C1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
V7-C2	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	3
V7-C3	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	4

Ferimento	inic-0/total-1 Re-epitelização	sim-0/não-1 Edema	sim-0/não-1 Hiperemia	sim-0/não-1 Hemorragia	perp-1/paral-0 Fibroblastos	sim-0/não-1 Linfócitos	sim-0/não-1 Neutrófilos	sim-0/não-1 Necrose	sim-0/não-1 Corpo estranho	alt-0/normal-9 Conjuntivo	grau de cicatrização
IV+V3-D1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IV+V3-D2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
IV+V3-D3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
IV+V3-M1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
IV+V3-M2	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	7
IV+V3-M3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
IV+V3-C1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV+V3-C2	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	3
IV+V3-C3	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	3
IV+V5-D1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV+V5-D2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV+V5-D3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
IV+V5-M1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3
IV+V5-M2	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	4
IV+V5-M3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV+V5-C1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV+V5-C2	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	2
IV+V5-C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
IV+V7-D1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	7
IV+V7-D2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	8
IV+V7-D3	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
IV+V7-M1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	8
IV+V7-M2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	6
IV+V7-M3	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	6
IV+V7-C1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IV+V7-C2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
IV+V7-C3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1

Legenda C - controle 3 - 3dias D1 - ferida dorsal animal 1
V - laser vermelho 5 - 5 dias M1 - ferida mediana do animal 1
IV - laser infraverm. 7 - 7 dias C1 - ferida caudal do animal 1