

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

MARCELLO GAIETA VANNUCCI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULATÓRIO LOCAL E À DISTÂNCIA POR
LASERTERAPIA INFRAVERMELHA E VERMELHA NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM DORSO DE RATOS**

Porto Alegre

2012

Catálogo na Publicação

V271e Vannucci, Marcello Gaieta

Avaliação do efeito biomodulatório local e à distância por laserterapia infravermelha e vermelha na cicatrização de feridas cutâneas em dorso de ratos / Marcello Gaieta Vannucci. – Porto Alegre, 2012.

56 f.

Tese (Doutorado) – PUCRS. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial
Orientadora: Profª Drª Marília Gerhardt de Oliveira.
Co-orientadora: Profª Drª Adriana Etges.

1. Odontologia. 2. Cirurgia Bucomaxilofacial. 3. Cicatrização de Feridas. 4. Reparação Tecidual. 5. Laser - Terapia. 6. Terapia Fotodinâmica. 7. Ratos - Experiências. I. Vannucci, Marcello Gaieta. II. Oliveira, Marília Gerhardt de. III. Etges, Adriana. IV. Título.

CDD 617.52

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza, CRB 10/1441

MARCELLO GAIETA VANNUCCI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULATÓRIO LOCAL E À DISTÂNCIA POR
LASERTERAPIA INFRAVERMELHA E VERMELHA NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM DORSO DE RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção de título de Doutor em Odontologia com área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Dra. Marília Gerhardt de Oliveira

Coorientadora: Dra. Adriana Etges

Porto Alegre

2012

O Saber

***Se alguém não sabe,
E não sabe que não sabe...
É tonto. Fuja dele.***

***Se alguém não sabe,
E sabe que não sabe...
É humilde. Ensine-o.***

***Se alguém sabe,
E não sabe que sabe...
Está dormindo. Desperte-o***

***Se alguém sabe,
E sabe que sabe...
É sábio. Siga-o***

Provérbio Chinês

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Sergio (*in memorian*) e Myrian pelo seu amor e apoio incondicional durante à minha constante formação.

À Renata por seu amor, apoio, dedicação e companheirismo não só nesta, mas, como em várias outras jornadas e por sua paciência, compreensão em todos os momentos difíceis, possibilitando minha evolução tanto profissional como ser humano.

À vocês dedico os meus sinceros sentimentos de amor, respeito e admiração.

Agradecimentos

À Profa. Dr^a Marília Gerhardt de Oliveira por ter acreditado em meu potencial como aluno de Doutorado em cirurgia Buço Maxilo Facial da PUCRS. Por ter possibilitado através de sua orientação com disciplina e firmeza de propósitos, meu desenvolvimento como aluno pesquisador dentro do programa de pós-graduação e sempre disposta a sanar minhas dúvidas sempre que possível e principalmente pela oportunidade de uma boa convivência tanto no âmbito pessoal como profissional.

Ao Prof.Dr.João Batista Blessman Weber por sua importante contribuição durante a elaboração e término do projeto de tese tão fundamental à condução dos trabalhos. Por sua amizade e disposição sempre durante minha formação no programa de Pós-Graduação da PUCRS.

À Profa. Dr^aAdriana Etges da UFPel pela paciência desde o início de nosso projeto, durante a elaboração das lâminas e posteriormente às análises, sempre com rigor , precisão e orientação durante as leituras das lâminas propiciando um aprendizado único.

Ao Sr.Roberto e toda a equipe de funcionários do Biotério da UFPel responsáveis pela criação e manutenção dos animais utilizados neste experimento os meus sinceros agradecimentos.

Às técnicas Ivana e Silvana do Laboratório de Histopatologia Bucal da UFPel pela confecção da lâminas, meus sinceros agradecimentos.

Ao Sr.Arno Steiger do IDEIAPUC pelas fotografias dos cortes histológicos e orientações para leitura das imagens capturadas.

Ao Prof.Dr.João Feliz de Moraes pelas orientações durante toda a etapa de elaboração do projeto e pelas análises estatísticas realizadas.

Ao Prof.Dr.Mário Bernardes Wagner, por seus brilhantes ensinamentos durante o curso de bioestatística, confecção dos gráficos e por sua amizade.

À todos os Professores da Pós-Graduação em que tive a feliz oportunidade de conviver, meus sinceros agradecimentos pela transmissão de seus conhecimentos que me possibilitaram um excelente aprendizado neste período.

À todos os colegas da Pós-Graduação e em especial, Diego Blaya, Jefferson Paes, Wâneza, Sandra Hüning, Paulo Eduardo Kreisner, Ângelo Freddo, Bia Vogt, Gisela Grandi por sua amizade sincera, parceria e principalmente pelo apoio e oportunidades desde minha chegada à Porto Alegre. À vocês, meus amigos, meus mais sinceros agradecimentos.

À amiga Eliete Doncato Brasil, por sua contribuição nas correções e ajustes das normas deste trabalho.

Ao Shihan Wagner Bull meu mestre na arte do AIKIDO que através de seus ensinamentos vêm me orientando sempre no caminho para atingir melhor discernimento, serenidade e relaxamento, elementos necessários e impreteríveis na minha formação como cirurgião e como ser humano.

Ao professor doutor José Poli Figueiredo, coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS, pelo seu contínuo esforço para atender aos alunos e buscar o aprimoramento de programa de pós-graduação.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia, por meio do CNPq, por acreditar e investir, através do programa de bolsas, nos alunos do Programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCRS e contribuir para a formação de novos docentes e pesquisadores.

E por fim, agradeço aos pequenos no tamanho, mas com grandeza na importância, aos animais do Biotério da UFPeI, que através do sacrifício de suas vidas contribuíram através deste trabalho para o avanço da ciência.

SUMÁRIO

Resumo.....	1
Introdução.....	2
Metodologia.....	3
Resultados.....	9
Discussão.....	17
Conclusões.....	20
Referências.....	21
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Methodology.....	27
Results.....	33
Discussion.....	41
Conclusions.....	44
References.....	45

AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOMODULATÓRIO LOCAL E À DISTÂNCIA POR LASERTERAPIA INFRAVERMELHA E VERMELHA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM DORSO DE RATOS

MARCELLO GAIETA VANNUCCI - Bolsista CNPq

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE
Prof. Dr. JOÃO BATISTA BLESSMANN WEBER
Prof. Dr. JOÃO FELIZ DUARTE MORAES

Profa. Dra. ADRIANA ETGES – Co-orientadora
Profa. Dra. MARÍLIA GERHARDT DE OLIVEIRA - Orientadora

RESUMO

Objetivos: Este estudo tem por objetivo verificar o efeito biomodulatório pelos *lasers* vermelho e infravermelho interferem no processo cicatricial de ferimentos localizados no ponto de aplicação e a distância deste. **Materiais e Métodos:** Foram realizados três ferimentos circulares, sendo um na região cranial, um na região medial e um na região caudal em dorso de ratos. Para este estudo experimental foram analisados 45 animais divididos em três grupos, onde 15 animais não foram aplicados nenhum tipo de laser (Grupo I), 15 animais foram aplicados laser infravermelho (Grupo II) e 15 animais laser vermelho (Grupo III). O período de observação foi de três, cinco e sete dias. Assim, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A; B; C), de acordo com período de observação. Para os grupos II e III a dose de energia, durante as irradiações foi de 8J/cm² 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 irradiações. **Resultados:** Houve maior presença de edema e processo inflamatório agudo nos primeiros dias avaliados e quantitativamente não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de redução das feridas intra e inter-grupos. **Conclusões:** A fototerapia por laser de baixa potência infravermelha apresentou um efeito biomodulatório positivo nos períodos iniciais de cicatrização e reparo em feridas no dorso de ratos. A fototerapia por laser de baixa potência vermelha apresentou, nos períodos iniciais analisados, maior processo inflamatório agudo, o que pode ser devido ao menor comprimento de onda que atinge as camadas mais superficiais da ferida.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica, reparação tecidual, modelo animal, angiogênese.

1 INTRODUÇÃO

O processo de reparo de feridas é um fenômeno biológico fundamental, e que 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. Apresenta complexidade biológica e bioquímica e seu início ocorre logo após a injúria¹.

O reparo de ferimentos em tecidos moles é dividido 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 e são acompanhados por notável proliferação endotelial. A última fase, por sua vez, corresponde à migração epitelial¹.

O efeito de biomodulação propiciado pelo Laser em baixa intensidade tem sido estudado desde os seus primórdios quando os primeiros estudos da aplicabilidade biológica do laser se iniciaram². 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 sistêmicos³.

Estudos foram realizados para definir a dose ideal no tratamento de feridas cutâneas no dorso de ratos. Utilizaram, ainda, diferentes lasers com distintos comprimentos de onda⁴. Os comprimentos de onda (λ) de 660nm, 820nm e 870nm estimulam os macrófagos a liberar fatores que promovem uma maior proliferação de

fibroblastos. No entanto, o laser com $\lambda = 880\text{nm}$ inibe a liberação de tais substâncias estimuladoras da proliferação celular⁵.

Com efeito, a terapia fotodinâmica através do laserterapia de baixa potência pode após estudos comprovados em animais ser complementar em seres humanos⁶⁻⁸. Portanto apesar dos resultados conflitantes observados na literatura científica apresentada em todos estes anos, é de suma importância que pesquisas neste campo sejam de caráter minucioso e criterioso visando reduzir potenciais vieses e direcionar de forma mais coerente a aplicação ou não do laser em situações específicas. Assim a comunidade científica contribuirá de maneira significativa para a aplicabilidade clínica do laser de baixa potência como método seguro, eficiente e eficaz no reparo de feridas cirúrgicas.

Esta pesquisa objetivou verificar se os *lasers* (vermelho; infravermelho) podem interferir na cicatrização de ferimentos localizados no ponto de aplicação e a distância deste, e se existir, qual tipo de irradiação apresenta melhor efeito biomodulatório em feridas padronizadas no modelo animal rato.

2 METODOLOGIA

Esta pesquisa respeita os princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas para a prática didático-científica da vivisseção dos mesmos, de acordo com a Lei 11.794/2008 (Brasil). A pesquisa foi aprovada pelo CEUA-PUCRS sob protocolo 10/00170.

O modelo animal utilizado foi rato albino da espécie *Rattus norvegicus*, classe *Mammalia*, ordem *Roedentia*, da linhagem *Wistar*, macho, com peso variando de 200 a 250 gramas, clinicamente sadio. Durante o período experimental, os

animais foram alimentados com dieta sólida, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção, e água *ad libitum*.

Os animais foram selecionados aleatoriamente, pesados e divididos em três grupos distintos (I; II; III), com quinze animais em cada um, totalizando 45. 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 foi de três, cinco e sete dias. Assim, cada grupo foi subdividido em três subgrupos (A; B; C), de acordo com período de observação. As gaiolas receberam etiquetas, durante todo o período de estudo, conforme o grupo ao qual pertenceu cada animal. Para a identificação dos animais, foram utilizadas marcações na cauda, realizadas com caneta de tinta permanente, onde o número de marcas indicou o número do respectivo animal.

Procedimento cirúrgico

Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de peso corpóreo do animal, do sedativo, analgésico e relaxante muscular Cloridrato de Xilazina 2% e 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal do anestésico geral Cloridrato de Ketamina 10%. 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* metálico com 1cm de diâmetro e com ranhuras de 1mm em sua superfície para marcação da profundidade de penetração 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 lâmina de bisturi de nº 15, associada com a pinça tipo Adson-Brown, foi usada para remover, 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 A e 1 B).

O grupo I foi utilizado como controle e não foi irradiado com laser.

No grupo II foi utilizado o *laser* infravermelho (GaAl)As, com potência de 50mW e comprimento de onda de 830nm, com emissão contínua.

No grupo III foi utilizado *laser* vermelho (In-Ga-Al-P) com λ de 685 nm, diâmetro=0,2 mm², no modo pontual e emissão contínua.

Para os grupos II e III a dose de energia, durante as irradiações foi de 8J/cm² 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 irradiações.

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

O *laser* LASER THERA LASE[®] (DMC Equipamentos São Paulo, Brasil) 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* após esses procedimentos, os animais foram mantidos em condições adequadas de temperatura (25°C), umidade e ventilação, bem como foi anotadas as datas da cirurgia e das irradiações.

Para a obtenção das amostras, os animais foram mortos aos três, cinco e sete dias de pós-operatório, respeitando as normas expressas na Lei Arouca vigente no Brasil (Lei 11.794/2008).

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) totalizando 135 amostras.

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 a microtomia com cortes de 5 μ m foram assim destinados à técnica de coloração histológica HE. A cada 20 lâminas observadas, o examinador repetiu, individual e separadamente, a observação de 10 lâminas, comparando as medidas obtidas entre ambas as observações e aplicando o teste *Kappa* intra-examinador a fim de verificar a veracidade das medidas. Para quantificar o grau de concordância para os resultados dos testes *Kappa* aplicados.

Foi utilizado um microscópio da marca Olympus BX[®] 50 F₃, com uma ocular de 10X de aumento e objetivas de 3,2X e 10X de aumento. As lâminas foram identificadas com um código para garantir que, durante a leitura, o examinador desconhecesse a qual grupo pertencia cada lâmina observada.

Por serem representativos do processo de cicatrização, estabeleceu-se como critérios de avaliação: presença ou não de, edema, hemorragia, hiperemia

,linfócitos, neutrófilos, fibroblastos, necrose e corpo estranho, de acordo com os seguintes critérios:

Edema: presente ou ausente (valor 0, valor 1), observado pela presença de líquido extracelular e pelo maior espaçamento entre os constituintes do tecido analisado; Hiperemia: contagem do número de vasos sanguíneos abertos, onde atribuiu-se o valor 1 (um), ou seja, hiperemia leve, atribuiu-se o valor 2 (dois) ou hiperemia moderada, atribuiu-se o valor 3 (três), ou seja, hiperemia avançada; se não forem observados vasos sanguíneos abertos, atribuiu-se o valor 0 (zero), correspondente a ausência de hiperemia; Hemorragia: presente (valor 1) ou ausente(valor 0), caracterizado pela presença de pelo menos 1(uma) hemácia fora do interior dos vasos sanguíneos;células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos), sendo estabelecido o seguinte critério: se o número de neutrófilos/linfócitos corresponder até 10% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 1(um), ou seja, resposta celular inflamatória leve; se o número de neutrófilos/linfócitos corresponder até 50% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 2 (dois) ou resposta celular inflamatória moderada; e se o número de neutrófilos/linfócitos corresponder a mais de 50% sobre o total da área analisada, atribuiu-se o valor 3 (três), ou seja, resposta celular inflamatória avançada; Fibroblastos: considerou-se a morfologia celular dos fibroblastos, onde se verificou a disposição das mesmas em relação à camada basal do epitélio; sendo consideradas 2 situações: fibroblastos paralelos ou perpendiculares a camada basal do epitélio, onde a primeira foi *sugestiva* de maior produção de fibroblastos, melhor qualidade e maior tempo cicatricial, e, a segunda, de menor produção de fibroblastos, qualidade inferior e menor tempo de cicatrização; Corpo estranho: presença ou ausência; não era esperada a presença de corpo estranho nas amostras; entretanto, como a ferida

ficou exposta ao meio, encontrou-se corpo estranho em apenas uma amostra; Necrose: presente ou ausente; este item foi observado através da perda da seletividade tintorial e perda da morfologia celular.

Para a realização da Histomorfometria cada lâmina foi fotografada junto ao Idéia-PUCRS, onde inicialmente padronizou-se o tamanho da ferida cirúrgica de 10mm, em pixels (Figuras 1 A e 1 B), e, para tanto, fotografou-se com um gabarito para que o mesmo fosse a matriz da distância entre os dois pontos da ferida cirúrgica. Para obtenção das imagens dos cortes histológicos foi utilizado um Estereomicroscópio marca DF Vasconcellos, modelo MC-M31 equipado com uma objetiva de 300 mm de comprimento focal e com o revólver de aumentos na posição 16X o que corresponde a um aumento de observação de 6,5X. A câmera de vídeo Digital utilizada foi uma Motican 2500 e a captura das imagens com 5 mega pixels. Tomamos como referência um objeto com dimensões conhecidas (padrão de calibração) e com esse padrão o software foi devidamente calibrado. Assim sendo, foi traduzido o intervalo de uma determinada quantidade de pontos em medida. Após a calibração a cada intervalo de medida entre dois pontos nas imagens capturadas de cada lâmina, o software traduziu a quantidade de pontos em medida. Para avaliação do processo inflamatório avaliou-se resposta crônica inflamatória através da presença de centros necróticos, formação de matriz através da proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas.

Análise estatística

Foram analisados os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Kruskal-Wallis para a comparação de mais de dois grupos independentes, em uma análise não-paramétrica. Para análise dos dados obtidos foi constituído um modelo de análise de comparação das médias, onde foi observado o efeito experimento: comparação entre os grupos experimentais e o controle; o efeito tempo: comparação entre os períodos de três, cinco e sete dias; o efeito localização: comparação entre as localizações dos ferimentos; o efeito apenas entre as feridas cranial e caudal dos grupos experimentais: comparação entre grupos, locais e tempos.

3 RESULTADOS

3.1 Análise qualitativa dos fatores inflamatórios entre as feridas comparadas intra e inter-grupos controle, irradiados por laser infravermelho e irradiados por laser vermelho

Após a confecção das amostras analisou-se individualmente cada corte histológico correspondente a cada ferimento e foi realizada uma análise descritiva para se verificar o nível e o padrão inflamatório em cada grupo. No grupo controle, observou-se que houve um padrão inflamatório leve nos três períodos avaliados. Observou-se um padrão agudo e avançado nos período de 3 dias e crônico entre 5 e 7 dias com presença predominantemente de linfócitos nas feridas cranial, medial e caudal. No grupo II, onde foi aplicado o laser infra-vermelho (830nm), observou-se um padrão de processo inflamatório leve nos primeiros dias, na região cranial, com predominância de processo inflamatório crônico e presença de linfócitos e neutrófilos. Houve presença de até 10% de infiltrado inflamatório, com predominância de linfócitos para a ferida cranial, neutrófilos para a ferida medial e

linfócitos para a caudal e um padrão misto entre o moderado e avançado nas feridas cranial, medial e caudal tanto para as aplicações no período de 3 dias, quanto para os de 5 e 7 dias. No grupo III, onde foi aplicado o laser vermelho (685nm) foi observado um padrão inflamatório leve nos períodos de 3, 5 e 7 dias na ferida cranial, com presença predominante de neutrófilos. Na ferida medial observou-se um padrão equânime de presença de neutrófilos/linfócitos e um nível inflamatório avançado para os períodos de 3, 5 e 7 dias. Na ferida caudal observou-se maior presença de linfócitos durante os 3, 5 e 7 dias e uma maior presença de processos inflamatórios crônicos, porém, ocorreu a presença de graus inflamatórios moderados e avançados ocorreram de maneira equânime.

Em seguida foram realizadas comparações entre os fatores quantitativos e qualitativos intra e inter-grupos controle, laser infra-vermelho e laser vermelho nos três períodos avaliados. No grupo de 3 dias nenhuma comparação foi estatisticamente significativa quanto ao edema, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos (cranial, $p=0.667$, medial, $p=0.333$, caudal, $p=0.667$). No período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo quanto ao edema, sendo o ferimento cranial, $p=0.352$, o medial, $p=0.667$ e o caudal, $p=0.648$. No período de 7 dias, também não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial, $p=0.132$, medial, $p=0.352$ e caudal, $p=0.333$.

Quando comparou-se o fator hiperemia, no período de 3 dias nenhuma comparação foi estatisticamente significativa, sendo que (cranial, $p=0.323$, medial, $p=0.570$, caudal, $p=0.317$). No período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo quanto ao edema, no ferimento cranial, $p=0.338$, medial, $p=0.207$ e caudal, $p=0.448$. No período de 7 dias, também não se observou

nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial, $p=0.093$, medial, $p=0.564$ e caudal $p=0.338$.

Ao comparar-se o fator hemorragia, no período de 3 dias nenhum resultado foi estatisticamente significativo, no ferimento cranial, não observou-se diferença entre os grupos (cranial, $p=0.667$, medial, $p=0.352$ e, no caudal, não foi possível calcular).

Para o período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, sendo no ferimento cranial, $p=0.352$, no medial, $p=0.370$ e no caudal, $p=0.370$. No período de 7 dias, também não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial, $p=0.370$, medial, $p=0.667$ e caudal $p=0.648$.

Ao compararmos o fator grau de inflamação para o período de 3 dias, não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos ($p=0.414$, medial, $p=0.136$, caudal, $p=0.609$). No período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, sendo o ferimento cranial, $p=0.423$, o medial, $p=0.600$ e o caudal, $p=0.270$. No período de 7 dias, também não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial, $p=0.238$, medial, $p=0.406$ e caudal $p=0.290$.

Ao se comparar tipo de fibroblastos, no período de 3 dias não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos (cranial, $p=0.179$, medial, $p=0.179$, caudal, $p=0.630$). Para o período de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, sendo o ferimento cranial, $p=0.333$, o medial, $p=0.333$ e o caudal, $p=0.648$. No período de 7 dias, observou-se diferença estatisticamente significativa nas

comparações, sendo cranial, $p=0.040$ e não significativa nas regiões medial, $p=0.382$ e caudal $p=0.167$. Ao se comparar a presença ou não de corpo estranho, no período de 3 dias, não se observou nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos (região cranial, $p=0.333$, região medial, $p=0.333$ e caudal, $p=0.095$). Para o período de 5 dias, não foi observado nenhum resultado significativo quanto ao edema, sendo apenas possível comparação estatística sobre o efeito no ferimento medial, $p=0.333$.

O fator necrose, nas comparações entre o período de 3 dias não permitiu observação de nenhum resultado estatisticamente significativo, sendo que, no ferimento cranial, não se observou diferença entre os grupos (cranial, $p=0.370$ e medial, $p=0.333$), sendo apenas estatisticamente significativa no ferimento caudal, $p=0.022$. No período avaliado de 5 dias não foi observado nenhum resultado significativo, sendo o ferimento cranial, $p=0.648$, o medial, $p=0.333$ e, no ferimento caudal, não houve possibilidade de análise estatística.

Para o período de 7 dias, não observou-se diferença estatisticamente significativa nas comparações, sendo cranial, $p=0.333$, nas regiões medial, $p=0.370$ e caudal, $p=0.648$.

3.2 Análise comparativa dos valores histomorfométricos entre as feridas craniais intra e inter-grupos nos grupos controle, com irradiação infravermelha e irradiação vermelha

Após análise entre os grupos entre apenas a ferida cranial, não houve diferenças significativas entre as medidas entre os bordos das feridas após o períodos de cicatrização em análise. Entretanto, houve diferença entre o 3° e o 7° dia relativo ao tamanho da ferida. Ao compararmos as feridas cranial vs. caudal, desconsiderando o efeito tempo para verificarmos se a distância entre a ferida onde

foi aplicado o laser (cranial) e à distância (caudal) pudessem apresentar diferenças nos tempos de cicatrização, não foi observado diferença significativa propiciado pela distância entre uma ferida e outra. Ao analisarmos separadamente em cada grupo a ferida cranial vs. caudal observamos que no grupo controle o resultado não foi estatisticamente significativo ($p=0.732$), no grupo infravermelho não foi estatisticamente significativo mas pôde ter havido uma interação ($p=0.092$), e no grupo com laser vermelho também não apresentou diferença significativa ($p=0.846$).

Ao considerarmos o efeito tempo no grupo controle não observamos diferença estatisticamente significativa no grupo avaliado durante o período de 3 dias ($p=0.155$), 5 dias ($p=0.443$) e 7 dias ($p=0.959$). No grupo irradiado com laser infravermelho não observamos diferença entre as medidas nos tempos em 3 dias ($p=0.208$), 5 dias ($p=0.974$) e 7 dias ($p=0.183$). No grupo irradiado com laser vermelho não encontramos diferença estatisticamente significativa no tempo em 3 dias ($p=0.243$), encontramos diferença estatisticamente significativa no período de 5 dias ($p=0.016$) e não significativa no período de 7 dias ($p=0.972$).

3.3. Análise comparativa entre as medidas histomorfométricas das feridas cranial vs. caudal entre os grupos irradiados com laser infravermelho e laser vermelho

Quando comparamos os valores das medidas histomorfométricas entre os bordos das feridas irradiadas pelo laser infravermelho com as irradiadas pelo laser vermelho no período de 3 dias não foi encontrado diferença significativa, respectivamente com $p=0.956$ e $p=0.909$.

Quando analisamos o período de 5 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre as feridas cranial vs. caudal, respectivamente $p=0.643$ e $p=0.075$, porém este valor pode sugerir uma interação. Após os 7 dias também não houve

diferença estatisticamente significante, com $p=0.848$ e $p=0.185$. Entre os grupos as comparações entre o tamanho das feridas cranial vs. caudal não apresentaram diferenças na redução de seu tamanho, mostrando que independe do grupo analisado. Quando se avaliou o tamanho da redução da ferida entre os grupos não houve diferença significativa, $p=0.254$, bem como entre os tempos, $p=0.652$. Não houve interação entre os grupos vs. dias mostrando que independe do laser aplicado e do tempo, com $p=0.095$. Portanto, para o tempo utilizado neste estudo não foi possível observar alterações significativas entre as medidas craniais e caudais.

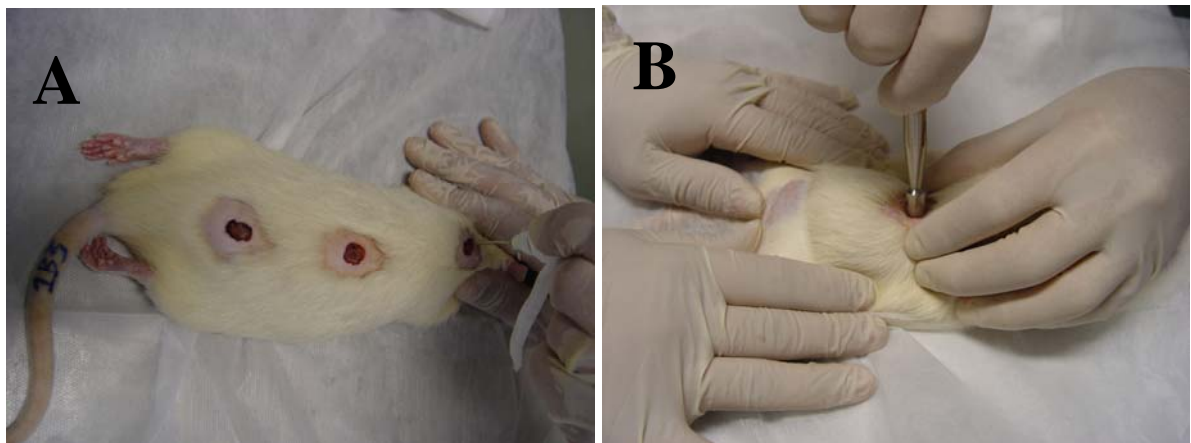


Figura 1 - Procedimento experimental. (A) feridas nas regiões cranial, medial e caudal. (B) As feridas foram realizadas através de movimento circular.

Tabela 1- Médias dos valores das medidas histomorfométricas (mm) entre as bordas das feridas nos grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 dias.

Dias	G1			G2			G3		
	cranial	medial	caudal	cranial	medial	caudal	cranial	medial	caudal
3 dias	6.8±1.8	7.5±1. 4	8.5±2. 1	7.5±1. 0	7.0±1. 2	6.5±1. 3	5.1±0. 3	7.5±1.6	6.4±0. 9
5 dias	6.1±0.8	6.9±0. 8	6.3±1. 5	6.4±1. 0	5.0±0. 7	6.4±1. 1	5.8±0. 4	6.7±0.3	7.5±0. 3
7 dias	6.1±1.3	6.9±1. 1	6.9±0. 8	6.0±0. 7	4.7±1. 2	4.8±0. 9	5.4±1. 7	6.1±0.4	6.1±1. 7

G1:grupo controle; G2:laser infravermelho; G3:laser vermelho; os valores estão expressos em média e desvio padrão.

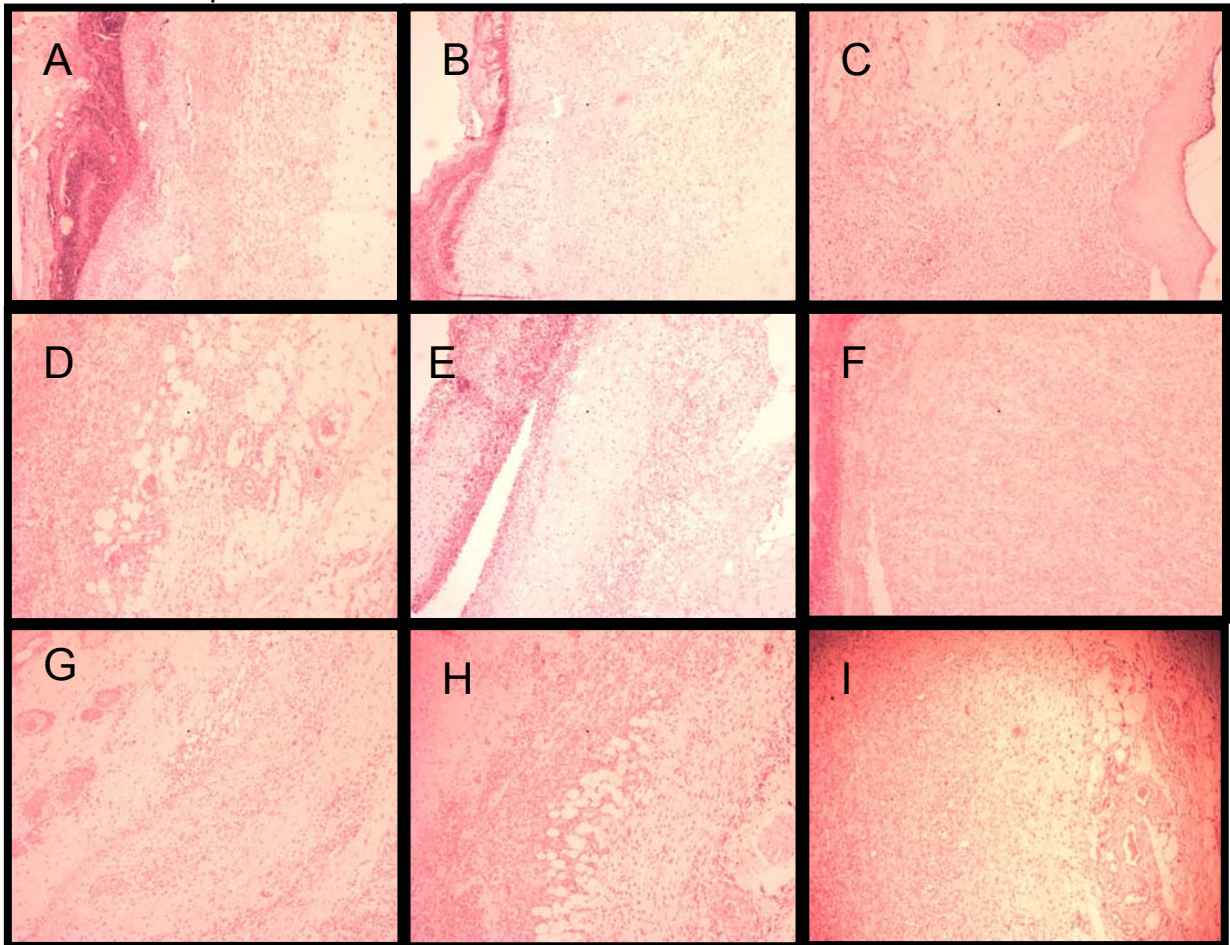


Figura 2 - Fotomicrografia das amostras (bar=40x) fixadas com hematoxilina-eosina nos 3 grupos analisados. Todas as imagens mostram as feridas craniais, nos 3 5 e 7 dias. (A,B,C) grupo controle (I); (D,E,F) grupo irradiado com laser infravermelho (II); e (G,H,I) grupo irradiado com laser vermelho (III). Observar intensa atividade inflamatória no 5 dia no grupo com laser infravermelho e vermelho.

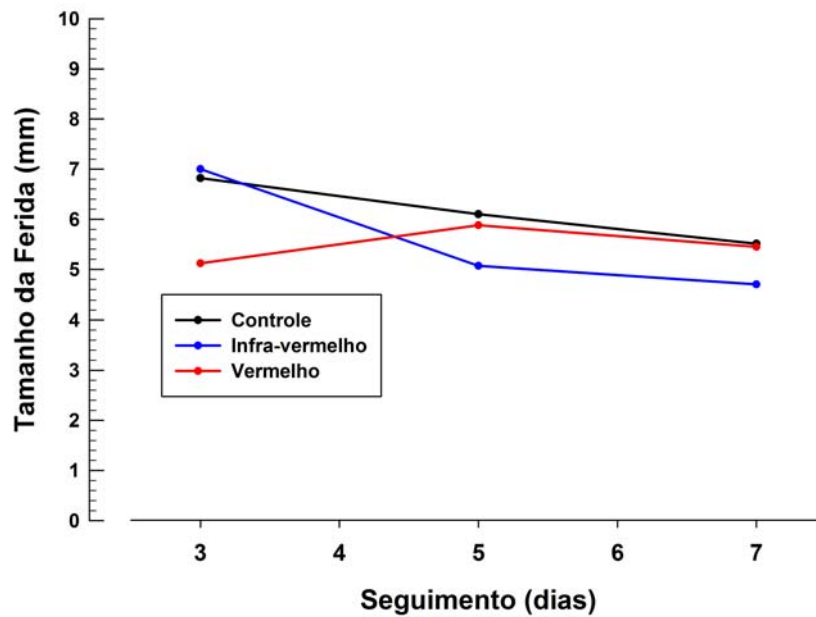


Gráfico 1- comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região cranial

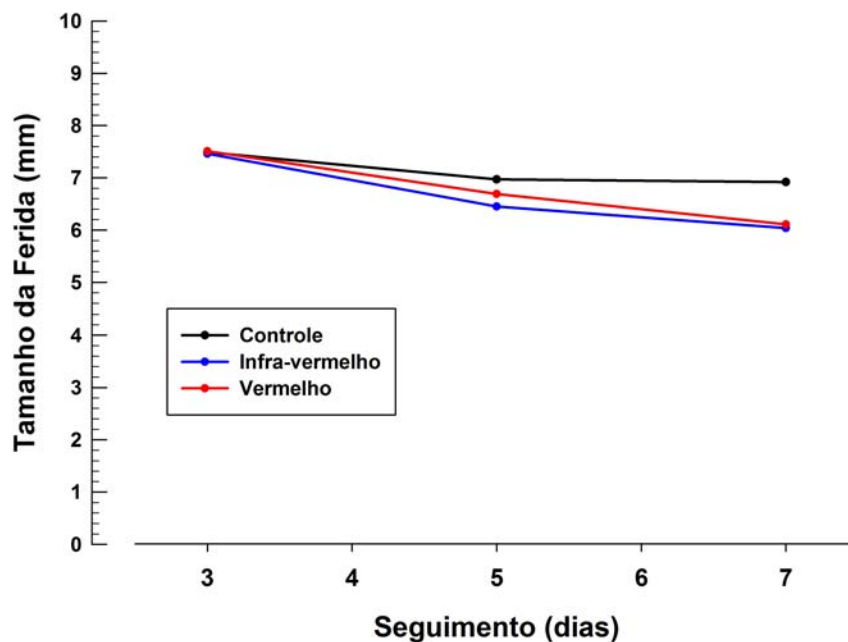


Gráfico 2 - comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região medial

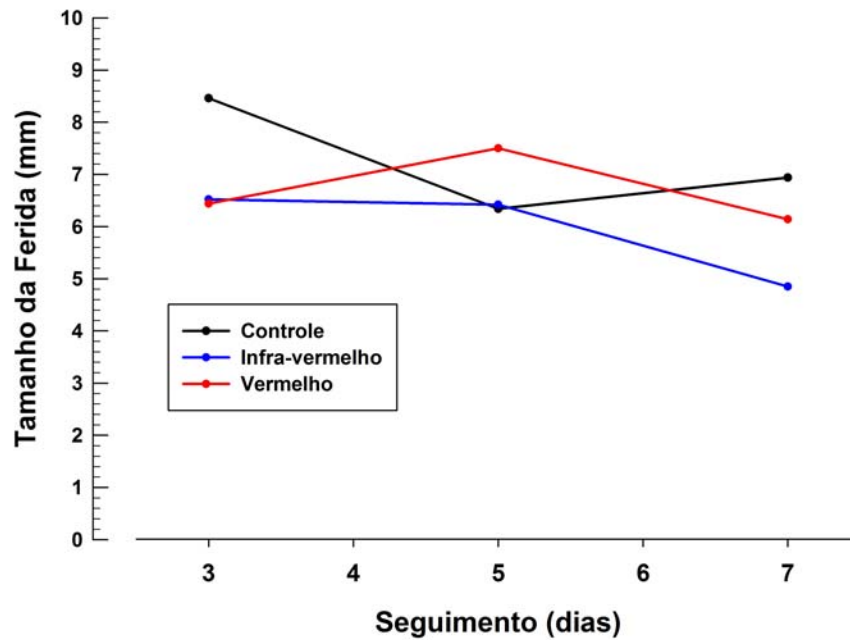


Gráfico 3 - comparações entre os grupos controle, infravermelho e vermelho durante 3, 5 e 7 na região caudal

4 DISCUSSÃO

A terapia fotodinâmica mediante por laser de baixa potência apresenta inúmeras indicações e aplicações mostrado mediante à vários estudos prévios apesar dos resultados ainda contraditórios presentes na literatura. As razões são diversas, pois envolvem variações nos períodos de tempo avaliados, área irradiada e frequência, tipo de laser irradiado (pulsátil vs.contínuo) e diferentes modelos animais estudados.³²

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito local e à distância através da fototerapia por laser infravermelho (830 nm) e vermelho (685 nm) em feridas no dorso de ratos.

Os achados no presente estudo não demonstraram que a irradiação com doses de 8 J/cm^2 possibilitasse uma associação positiva na redução das distâncias entre as bordas das feridas nos grupos irradiados no modelo animal rato.⁹⁻¹¹ Ainda é observado na literatura que os resultados se mostram muito contraditórios quando é analisado as propriedades do laser de baixa potência, bem como seu efeito bioestimulatório ou inibitório devendo haver cuidado nas interpretações dos resultados obtidos^{4,10,12,13}. A variabilidade dos comprimentos de onda utilizados, diferentes potências, diferentes doses e diferentes tempos de análise contribuem para estes resultados¹⁴.

Neste estudo optou-se pela aplicação do laser na região cranial por ser mais inervada e vascularizada com o objetivo de se obter um maior estímulo em sua cicatrização, bem como as feridas distantes do ponto de aplicação. Assim poderia induzir uma maior biomodulação tanto local quanto à distância nas feridas mediais e caudais, porém este efeito não foi significativo quando comparados os valores das medidas inter-grupos. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no que se refere ao período de cicatrização ou à formação de crosta. Durante o período de observação, nenhuma ferida apresentou sinais de infecção. O exame histológico também não mostrou diferença morfológica óbvia entre as feridas tratadas e as não-tratadas que o uso da laserterapia de baixa potência pode melhorar o processo de cicatrização de feridas.¹⁵ Em contrapartida o estudo objetivando comparar o efeito do *laser* de baixa intensidade no processo de cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos e não-diabéticos utilizando *laser* de HeNe ($\lambda = 632.8\text{nm}$) de Rabelo, Villaverde, Nicolau, SalgadoC, Melo e Pacheco¹⁶ demonstra que os animais tratados possuíam processos inflamatórios menos intensos que os animais não-tratados. Ao realizarmos a análise descritiva, nossos achados corroboram com os achados

importantes de outros autores¹⁷ em que no grupo controle houve maior presença de infiltrado linfoplasmocitário e discreta presença de edema e hiperemia.

Ao contrário dos grupos irradiados com laser infravermelho (830 nm) e vermelho (685 nm) observamos maior quantidade de edema e hiperemia em estágios moderados e avançados, o que sugere o maior comprimento de onda do laser infravermelho age nas camadas mais profundas atingindo com mais intensidade o tecido conjuntivo comparativamente ao laser vermelho que possui menor comprimento de onda. Estes resultados estão em acordo aos estudos de Mendez, Pinheiro, Pacheco, Nascimento e Ramalho¹⁹ e Weber, Pinheiro, Oliveira, Oliveira e Ramalho.²⁰

A deposição de colágenos nos 5 primeiros dias, o que envolveu também o grupo de 3 dias apresentaram deposição de colágenos mais irregular e nas camadas mais profundas do tecido conjuntivo contrapondo-se à outros resultados onde foi concluído que as lesões irradiadas apresentaram reepitelização acelerada quando comparadas com o grupo controle²¹.

A derme 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. Em nosso estudo foi observado uma redução mais expressiva das distâncias entre os bordos das feridas nos intervalos dos períodos entre 3 e 7 dias no grupo irradiado por laser infravermelho (830 nm) comparado ao laser vermelho (685 nm) corroborando com outros achados.^{22,23} Apesar das doses utilizadas em nosso estudo terem sido preconizadas de acordo com o intervalo entre 1-50 J/cm², o uso de diferentes doses se deve ao fato de que até o presente momento não existe uma conclusão para qual dosimetria

há uma melhor dose-resposta tecidual e ainda é necessário futuras investigações.^{24,26-31}

Isto envolve um complexo mecanismo de reação tecidual resultante da absorção do laser emitido sob determinadas doses e a seqüência de eventos que envolvem todos os processos bioquímicos altamente complexos. Faz-se necessário que equipes de diferentes especialidades estejam envolvidas neste processo de análises descritiva, qualitativa e quantitativa relacionados à biologia celular para assim nortearmos um protocolo onde a laserterapia poderá agir de modo mais eficiente e eficaz.

5 CONCLUSÕES

Apesar da não significância dos resultados obtidos localmente e à distância entre as feridas cutâneas, clinicamente a fototerapia por *laser* de baixa potência infravermelha apresentou um efeito biomodulatório positivo nos períodos iniciais de cicatrização e reparo em feridas no dorso de ratos. A fototerapia por *laser* de baixa potência vermelha apresentou, nos períodos iniciais analisados, maior processo inflamatório agudo, o que pode ser devido ao menor comprimento de onda que atinge as camadas mais superficiais da ferida.

REFERÊNCIAS

- 1 Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery* 2005;23(2):37-42.
- 2 Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med.* 2005 Jul;37(1):46-52.
- 3 Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power Laser irradiation on suture during bone regeneration in midpalatal expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997 May; 111 (5):525-32.
- 4 Al-Watban FAH, Zhang XY. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Therapy* 1999;11(1):6-10.
- 5 Al-Watban FAH, Zhang XY. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(1):15-18.
- 6 Henriques AC, Cazal C, de Castro JF. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online]. 2010;37(4):295-302.
- 7 Braiman-Wiksman L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum R. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicologic Pathology.* 2007 Oct;35(6):767-79.
- 8 Brugnera JR. Biomodulatory effect of laser therapy-clinical indications. *Dentistry Braz Dent J.* 2004;Suppl 15:60.
- 9 Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low-intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med* 1998;23(5):291-8.
- 10 Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.* 2000;26(1):41-47.
- 11 Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13.
- 12 Kana J, Htschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density Laser radiation on healing of open wounds in rats. *Arch Surg.* 1981;(116):293-296.
- 13 Lagan KM, McKenna T, Witherow A, Johns J, McDonough SM, Baxter GD. Low-intensity laser therapy/combined phototherapy in the management of chronic venous ulceration: a placebo-controlled study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Jun;20(3):109-116.

14 Whinfield AL, Aitkenhead I. The light revival: does phototherapy promote wound healing? a review. *Foot*. 2009 Jun;19(2):117-124.

15 Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1999 Feb;26(1):12-17.

16 Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo MS, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg*. 2006;(24)4:474-479.

17 Nascimento PM, Pinheiro AL, Salgado MA, Ramalho, LM. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. *Photomed. Laser Surg*. 2004;(22):513–518.

18 Gál P, Vidinský B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg*. 2006 Aug;24(4):480-488.

19 Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento, PM, Ramalho, LM. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J. Clin. Laser Med. Surg*. 2004 Feb;22(1):19-25.

20 Weber JB, Pinheiro AL, Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg*. 2006(24):38-44.

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

22 Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JB et al. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(6):929-935.

23 Matic M, Lazetic B, Poljacki M, Djuran V, Matic M, Gajinov Z. Influence of different types of electromagnetic fields on skin reparatory processes in experimental animals. *Lasers Med Sci*. 2009(24):321-327.

24 Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J. Invest. Med*. 2000 Sep;48(5):312-326.

25 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*. 1974; Suppl:261-265.

26 Mester E, Mester AE, Mester A. The biomedical effect of laser application. *Lasers Surg Med*. 1985;5(1):31-9.

27 Mester AF, Mester A. Wound healing. *Laser Therapy*. 1989;1(1):7.

- 28 Webb C, Dyson M, Lewis W H. Stimulatory effect of 660nm low level laser energy on hypertrophic scar derived fibroblast: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg Med.* 1998;22(5):294-301.
- 29 Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblast. *Lasers Surg med.* 2002 Oct;31(4):263-267.
- 30 Medrado AR, Pugliesi LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low-laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-244.
- 31 Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004 Mar;41(2):147-154.
- 32 Bayat M, Azari A, Golmohammadi M G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomed Las Surg.* 2010;28(4):465-470.



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

Ofício 122/10 – CEUA

Porto Alegre, 24 de junho de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00170, intitulado: **"Efeito sistêmico da laserterapia vermelha (In-Ga-Al-P) e infravermelha (GaAl)As no reparo de feridas em dorso de ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


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

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

PUC

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

**ANALYSIS OF LOCAL AND DISTANT BIOMODULATORY EFFECTS BY RED
AND INFRARED LASERTHERAPY ON CUTANEOUS WOUNDS HEALING ON
THE DORSUM OF RATS**

ABSTRACT

Objectives: This study aims to verify whether the red and infrared *lasers* can interfere with the healing process of wounds located at the point of application and at distance. **Materials and methods:** Three circular wounds were conducted, one in the cranial region, another one in the medial region and a third one in the caudal region on the dorsum of rats. For this experimental study 45 animals, divided into three groups, were investigated: in 15 animals any kind of *laser* was applied; in 15 animals infrared *laser* was used; and in 15 animals red *laser* was used. The observation period was three, five, and seven days. Thus, each group was divided into three subgroups (A, B, C) in accordance with the observation period. For groups II and III the amount of energy during the irradiation was $8\text{J}/\text{cm}^2$ after the surgery and every 48 hours, totalizing, depending on the time of death of the animal (three, five or seven days), two, three or four irradiations. **Results:** We found presence of edema in the early stages and We found no statistical significance when we compared the reduction percentual of the healed wounds. **Conclusions:** Phototherapy by low power infrared laser showed a positive biomodulatory effect in the early periods of healing and repair of wounds in the back of rats. The therapy by low power red laser presented, in the initial periods analyzed, higher acute inflammation process, which may be due to a shorter wavelength that affects the upper layers of the wound.

Keywords: photodynamic therapy, tissue regeneration, animal model, angiogenesis.

1 INTRODUCTION

The process of wound repair is a fundamental biological phenomenon, which covers all aspects of cell proliferation, cell differentiation, synthesis and secretion of proteins, proteoglycans and other extracellular substances, as well as inflammation in its various parameters. It presents biochemical and biological complexity and its onset occurs soon after injury ¹.

The repair of soft tissue injury is divided into three phases: inflammatory, proliferative, and maturation. The inflammatory phase is understood as the increase in capillary permeability and blood cell flow to the region of the wound. During the second stage, fibroblasts flow into the wound site and are accompanied by remarkable endothelial proliferation. The last phase corresponds to the epithelial migration ¹.

The biomodulatory effect brought by low intensity laser has been studied since its beginning when the first studies of the biological applicability of the laser first started². Most *in vivo* researches demonstrate the action of non-ablative laser on collagen synthesis and remodeling the number of fibroblasts, diameter and tensile strength of the treated wounds, the viability of the treated grafts, vascularization, vasodilation, lymphatic system, the immune and antibacterial effect as well as their systemic effects³.

Studies were performed to define the optimal dose for the treatment of skin wounds on the dorsum of rats. Different lasers with different wavelengths were also used⁴. The wavelengths of 660nm, 820nm, and 870nm stimulate the macrophages to release factors which promote a greater proliferation of fibroblasts. However, the

laser $\lambda = 880\text{NM}$ inhibits the proliferation of such substances that stimulate cell proliferation⁵.

Indeed, photodynamic therapy using low level laser may, after confirmed in animal studies, be complementary to human being in specific situations⁶⁻⁸. Therefore, despite conflicting results observed in the scientific literature presented in all these years, it is critical that researches in this field are decaudaled and insightful in order to reduce potential bias and to direct more consistently the application or not of lasers in specific situations. Thus, the scientific community will contribute significantly to the clinical applicability of low power laser as a safe, efficient, and effective method in the repair of surgical wounds.

This study aimed to verify whether the lasers (red, infrared) can interfere in the healing of wounds located at the application point and at distance, and if so, to what type of irradiation the body responds systemically better on standardized wound in rat animal model.

2 Methodology

This research meets the ethical principles of animal experimentation, as well as the standards for the didactic-scientific practice of their vivisection, according to the Law 11.794/2008 (Brazil). The study was approved by CEUA-PUCRS under protocol 10/00170.

The animal model used was albino rat species *Rattus norvegicus*, class Mammalia, order Roedentia, genealogy Wistar, male, weighing 200-250 grams,

clinically healthy. During the experimental period the animals were fed a solid diet, except for the first 24 hours after the intervention, and water *ad libitum*.

The animals were randomly selected, weighed, and divided into three distinct groups (I, II, III), with fifteen animals each, totaling 45. The specimens were kept in plastic cages with metal roof and floor lined by pine sawdust.

In all groups, the observation period was three, five, and seven days. Thus, each group was divided into three groups (A, B, C) in accordance with the observation period. The cages were labeled throughout the study period, as the group to which each animal belonged. For the animal identification, it was used a caudal marking system, made with a permanent ink pen, in which the number of marks indicated the animal number.

Surgical Procedure

Prior to surgery, the animals underwent general anesthesia by intraperitoneal injection containing 0.025 ml/100g of the animal's body weight of the sedative, analgesic and muscle relaxant Xylazine hydrochloride 2%, and 0.05 ml/100g of the animal's body weight of the general anesthetic ketamine hydrochloride 10%. Once the anesthesia was applied, the animals were submitted to trichotomy of the dorsal region by plucking the hair. The sterilization was carried out in the region with chlorhexidine digluconate 2%. The surgical area was isolated with sterilized fenestrated surgical drape of TNT (nonwoven fabric), adapted to the procedure. The metal punch of 1cm in diameter and 1mm grooves on its surface to mark the depth of penetration was positioned perpendicularly to the skin surface in the trichotomized area along the median line and around the animal's head, promoting rotary motion to facilitate penetration of the blade at a depth of 1 mm, with a diameter of 1 cm,

corresponding to the measurements of the instrumentation used. Subsequently, the scalpel blade No. 15, associated with Adson-Brown forceps, was used to remove gently the amount of fabric needed to produce a lesion of 1 mm deep and 1 cm wide, and this procedure was repeated at a distance of 7 cm from the first wound and again at 7cm from the second (Figure 1 A and 1 B). Group I was used as control and it was not irradiated with laser. With group II it was used infrared laser (GaAl)As, with a power of 50mW and a wavelength of $\lambda = 830\text{nm}$, with continuous emission. With group III it was used red laser (In-Ga-Al-P) with $\lambda 685 \text{ nm}$, $\varnothing = 0.2 \text{ mm}^2$, in the punctual mode and continuous emission.

For groups II and III the amount of energy during the irradiation was $8\text{J}/\text{cm}^2$ after the surgery and every 48 hours, totalizing, in accordance with the time of death of the animal (three, five or seven days), two, three or four irradiations.

In all groups receiving laser applications it was established that only the wound near the head would receive irradiation. It was also established that the application would be accurately done in the center of the wound.

The laser *LASER THERA LASE*[®] (DMC Equipment São Paulo, Brazil) was applied following the Brazilian regulations, in secluded location, with international characters and symbols for the area in use or presence of irradiation, observing safety procedures recommended on the laser light treatment. After these procedures, the animals were maintained under appropriate conditions of temperature (25°C), humidity, and ventilation and the dates of surgery and irradiation were recorded.

To obtain the samples, the animals were killed at three, five, and seven days postoperatively, respecting the rules expressed in Arouca Law in force in Brazil.

The three established lesions per animal were dissected in the form of an ellipse, with a scalpel blade No. 15, establishing a safety margin to avoid damaging the part. The removed material was fixed in buffered formalin solution at 10% for 48 hours. Each container was labeled with the number of the animal and its respective group and area (1 - cranial, 2 - medial, 3 - caudal), totalizing 135 samples.

After the fixing period of 48 hours, the tissue specimens were processed according to the routine for paraffin embedding.

The blocks submitted to inclusion were identified and submitted to microtomy. Incisions of 5 μm were thus intended for histological HE staining technique. Every 20 slides observed, the examiner repeated, individually and separately, the observation of 10 slides comparing the measurements obtained from both observations and applying the Kappa test intra-examiner, to verify the accuracy of the measurements, to quantify the level of agreement with the results of the Kappa tests applied.

An Olympus® microscope BX 50 F3 was used, with a 10X increase eyepiece and objective of 3.2X and 10X magnification. The slides were identified with a code to ensure that, during reading, the examiner was unaware of which group each slide observed would belong.

For being significant to the healing process, the presence or absence of hyperemia, edema, hemorrhage, lymphocytes, neutrophils, fibroblasts, necrosis, and foreign body was established as the evaluation criteria, according to the following standards: Edema: present or absent (value 0, value 1); observed by the presence of extracellular fluid and the greater spacing between the constituents of the examined tissue. Hyperemia: by counting the number of open blood vessels; if the number of blood vessels corresponded to up to 10% of the total area examined, it was given the

value 1 (one), meaning mild hyperemia; if the number of blood vessels matched between 10 and 50% of the total area examined, it was given the value 2 (two), meaning moderate redness; and if the number of blood vessels correspond to more than 50% of the total area examined, the value assigned was 3 (three), meaning advanced hyperemia; if no open blood vessels were observed, the value assigned was 0 (zero), corresponding to absence of hyperemia. Hemorrhage: present (value 1) or absent (value 0), characterized by at least 1 (one) red blood cell outside the interior of the blood vessel; Inflammatory cells (neutrophils and lymphocytes), setting the following criteria: if the number of neutrophils / lymphocytes corresponded to up to 10% of the total area examined, it was given the value 1 (one), meaning mild inflammatory cell response; if the number of neutrophils / lymphocytes matched between 10 and 50% of the total area analyzed, it was given the value 2 (two), meaning moderate inflammatory cell response; and if the number of neutrophils / lymphocytes corresponded to more than 50% of the total area examined, the value assigned was 3 (three), meaning advanced inflammatory cell response. Fibroblasts: the fibroblast cell morphology was taken into account, in which their arrangement in relation to the epithelial basal layer was inspected, considering two situations: fibroblasts parallel or perpendicular to the basal layer of the epithelium, in which the first was *suggestive* of higher fibroblast production, better quality, and longer scar, and; the second, of lower production of fibroblasts, lower quality, and less healing time. Foreign body: present or absent; it was not expected the presence of foreign body in the samples; however, as the wound was exposed to the environment, foreign body was found in one sample. Necrosis: present or absent; this item was observed by the loss of tinctorial selectivity and the loss of cellular morphology.

To perform the Histomorphometry, each slide was photographed with the Ideia-PUCRS, where initially the size of the surgical wound of 10mm was standardized in pixels, and, therefore, photographed with a template so that it was the matrix of distance between two points on the wound. To obtain images of sections a stereomicroscope was used, trademark DF Vasconcellos, model MC-M31, equipped with focal lens length 300 mm and with the revolving nosepiece in the position 16X, which corresponds to an increase of 6.5 X in the observation . The video camera used was a Digital Motican 2500 and the images were captured with 5 mega pixels resolution. An object with known dimensions (calibration standard) was taken as reference and with that standard the software was properly adjusted. Therefore, the interval of a certain amount of points under measurement was converted. After the adjustment, each interval measured between two points on the captured images of each slide, the software converted the number of points into a measurement. For the inflammatory process evaluation, the chronic inflammatory response was assessed by the presence of necrotic centers, matrix formation through fibroblast proliferation, and collagen deposition.

Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov and Kruskal-Wallis tests were analyzed to compare more than two independent groups, in a non-parametric analysis. For the analysis of the damage obtained, an analysis model was made in order to compare the means, in which the effect of the experiment was analyzed: comparison between experimental and control groups; the effect of time: comparison between the periods of three, five, and seven days; the effect of location: comparison between the locations of injuries; the effect between only the cranial and caudal wounds of the groups: comparison between groups, locations, and times.

3 RESULTS

3.1- Qualitative analysis of inflammatory factors of the compared wounds intra and inter-group control, irradiated by infrared laser, and red laser

Once the samples were prepared, each histological section corresponding to each wound was analyzed individually, and a descriptive analysis was performed to inspect the level of inflammation and inflammatory pattern in each group. In the group control, a mild inflammatory pattern was observed during the three periods of evaluation. A sharp pattern was observed in the first few days and a chronic pattern from 5 to 7 days with the predominantly presence of lymphocytes in cranial, medial, and caudal wounds. In group 2, which the infrared laser (830nm) was applied, a pattern of mild inflammatory process was observed in the early days, in the cranial region, with a predominance of chronic inflammation as well as the presence of lymphocytes and neutrophils. Where the laser was applied there was a predominance of lymphocytes to the cranial wound, neutrophils to the medial wound, and lymphocytes to the caudal wound, as well as a mixed pattern between moderate and advanced in the cranial, medial, and caudal wounds to both applications within 3 days and within 5 and 7 days. In group 3, which the red laser (685nm) was applied, a mild inflammatory pattern was observed for periods of 3, 5 and 7 days in the cranial wound, with a predominance of neutrophils. In the medial wound an equitable pattern was observed on the presence of neutrophils and lymphocytes as well as a moderate and advanced inflammatory level for periods of 3, 5 and 7 days. In the caudal wound there was a higher presence of lymphocytes during the 3, 5 and 7 days as well as a higher presence of chronic inflammatory processes; however, the presence of moderate and advanced inflammatory degrees occurred in an equitable manner. After performing the histological sections, the quantitative and qualitative factors

were compared among the control, infrared laser and red laser groups during the three periods evaluated. In the group of 3 days, no comparison was statistically significant related to edema, considering the cranial wound, there was no difference among the groups ($p=0.667$, medial, $p=0.333$, caudal, $p=0.667$). In the period of 5 days, no significant result was observed concerning the edema, with cranial wound, $p=0.352$, medial, $p=0.667$, and caudal, $p=0.648$. In the period of 7 days, no statistically significant difference was observed in the comparisons, with cranial, $p=0.132$, medial, $p=0.352$, and caudal $p=0.333$.

When comparing the factor hyperemia, within 3 days, no comparison was statistically significant, and in cranial wound, there was no difference among the groups ($p=0.323$, medial, $p=0.570$, caudal, $p=0.317$). In the period of 5 days, there was no significant result in cranial wound, $p=0.338$, medial, and caudal $p=0.207$, $p=0.448$. In the period of 7 days, no statistically significant difference in the comparisons was observed either, with cranial, $p=0.093$, medial, $p=0.564$, and caudal $p=0.338$. By comparing the hemorrhage factor, for the period of 3 days, no comparison was statistically significant in cranial wound, no difference was observed among the groups ($p=0.667$, medial, $p=0.352$, and, in the caudal group, it was not possible to calculate).

For the period of 5 days, no significant result was observed, with cranial wound, $p=0.352$, the medial, $p=0.370$ and the caudal, $p=0.370$. In the period of 7 days, no statistically significant difference in the comparisons was observed either, with cranial, $p=0.370$, medial, $p=0.667$, and caudal, $p=0.648$. By comparing the level of inflammation, for the period of three days, there was no statistically significant result, and in cranial wound there was no difference among groups (cranial, $p=0.414$, medial, $p=0.136$, caudal, $p=0.609$). In the period of 5 days, no significant result was

observed, with the cranial injury, $p=0.423$, the medial, $p=0.600$, and the caudal, $p=0.270$. In the period of 7 days, no statistically significant difference in the comparisons was observed either, with cranial, $p=0.238$, medial, $p=0.406$, and caudal $p=0.290$. When comparing the type of fibroblasts, in the period of 3 days, no statistically significant result was observed, and in cranial injury, there was no difference among groups (cranial, $p=0.179$, medial, $p=0.179$, caudal, $p=0.630$). For the period of 5 days, no significant results were observed, with the cranial injury, $p=0.333$, the medial, $p=0.333$, and the caudal, $p=0.648$. In the period of 7 days, there was a statistically significant difference in the comparisons, with cranial, $p=0.040$, and no significant difference in the medial region, $p=0.382$, and in the caudal region, $p=0.167$. Comparing the presence or absence of foreign body in the period of 3 days, there was no statistically significant result, and in the cranial injury, there was no difference among groups (cranial, $p=0.333$, medial, $p=0.333$, and caudal, $p=0.095$). For the period of 5 days, no significant results were observed, being possible only to perform a statistical comparison of the effect in the medial wound, $p=0.333$. The necrosis factor, in the comparisons between of 3 days period, no statistically significant result was observed, and in the cranial wound, there was no difference among groups (cranial, $p=0.370$, and medial $p=0.333$), being statistically significant only in the caudal wound, $p=0.022$. In the study period of 5 days, no significant result was observed, with the cranial wound, $p=0.648$, the medial, $p=0.333$, and, in the caudal wound, it was not possible to perform a statistical analysis. For the period of 7 days, there was no statistically significant difference in the comparisons, with the cranial, $p=0.333$, the medial, $p=0.370$, and the caudal, $p=0.648$.

3.2 Comparative analysis of histomorphometric values between the cranial wounds among and within groups in the groups control, with infrared irradiation and red irradiation

After analysis among the groups between only the cranial wound, there were no significant differences on the measurements between the edges of the wound after healing periods under analysis. However, there was some difference between 3 and 7 days regarding to the size of the wound. By comparing the cranial vs. caudal wounds, despite the effect of time to check if the distance between the wound where the laser was applied (cranial) and distance (caudal) could present any difference in healing time, there was no significant difference brought about by the distance between one and another wounded. When each group was analyzed separately cranial vs. caudal wound, it was noticed that in the group control the result was not statistically significant ($p=0.732$), the infrared group was not statistically significant but there might have been an interaction ($p=0.092$), and the red laser group did not show any significant difference ($p=0.846$).

By considering the effect of time in the group control, no statistically significant difference was noticed in the group evaluated during the period of 3 days ($p=0.155$), 5 days ($p=0.443$), and 7 days ($p=0.959$). In the group irradiated with infrared laser, no difference was observed between the time measurements in 3 days ($p=0.208$), 5 days ($p=0.974$), and 7 days ($p=0.183$). In the group irradiated with red laser, no statistically significant difference was found in time in 3 days ($p=0.243$), a statistically significant difference in 5 days ($p=0.016$), and not significant in the period of 7 days ($p=0.972$).

3.3. Comparative analysis of the histomorphometric measurements of cranial vs. caudal wounds between the groups irradiated with infrared laser and red laser

When the values of histomorphometric measurements between the edges of the wounds irradiated by infrared laser with the ones irradiated by red laser in the period of 3 days were compared, no significant difference was found, respectively with $p=0.956$ and $p=0.909$.

When the period of 5 days was analyzed, there was no statistically significant difference between the cranial vs. caudal wounds, respectively $p=0.643$ and $p=0.075$; however, this value may suggest an interaction. After the 7 days, there was no statistically significant difference, with $p=0.848$ and $p=0.185$. Among the groups the comparisons between the sizes of cranial vs. caudal wounds showed no differences in the reduction of their sizes, indicating that the type of group is not relevant. When the size of reduction of the wound among the groups was assessed, there was no significant difference, $p=0.254$, as well as between the times, $p=0.652$. There was no interaction between groups vs. days showing that the applied laser and time are not relevant, with $p=0.095$. Therefore, for the time used in this study, it was not possible to note significant changes between cranial and caudal measurements.

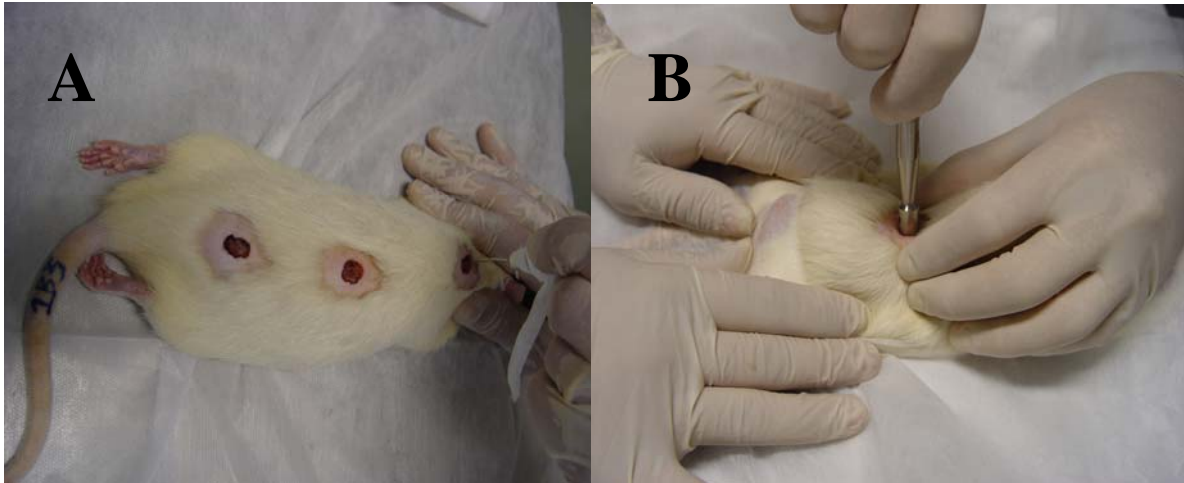


Fig.1. Experimental procedure. (A) wound created by using a punch with 1mm deep and 10mm in diameter. (B) Wounds were performed by circular motion.

Table 1- Average values of histomorphometric measurements (mm) between the edges of wounds in the groups control, infrared, and red for 3, 5 and 7 days.

Days	G1			G2			G3		
	cranial	medial	caudal	cranial	medial	caudal	cranial	medial	caudal
3 days	6.8±1.8	7.5±1.4	8.5±2.1	7.5±1.0	7.0±1.2	6.5±1.3	5.1±0.3	7.5±1.6	6.4±0.9
5 days	6.1±0.8	6.9±0.8	6.3±1.5	6.4±1.0	5.0±0.7	6.4±1.1	5.8±0.4	6.7±0.3	7.5±0.3
7 days	6.1±1.3	6.9±1.1	6.9±0.8	6.0±0.7	4.7±1.2	4.8±0.9	5.4±1.7	6.1±0.4	6.1±1.7

G1: group control, G2: infrared laser; G3: red laser; the values are expressed as medial and standard deviation.

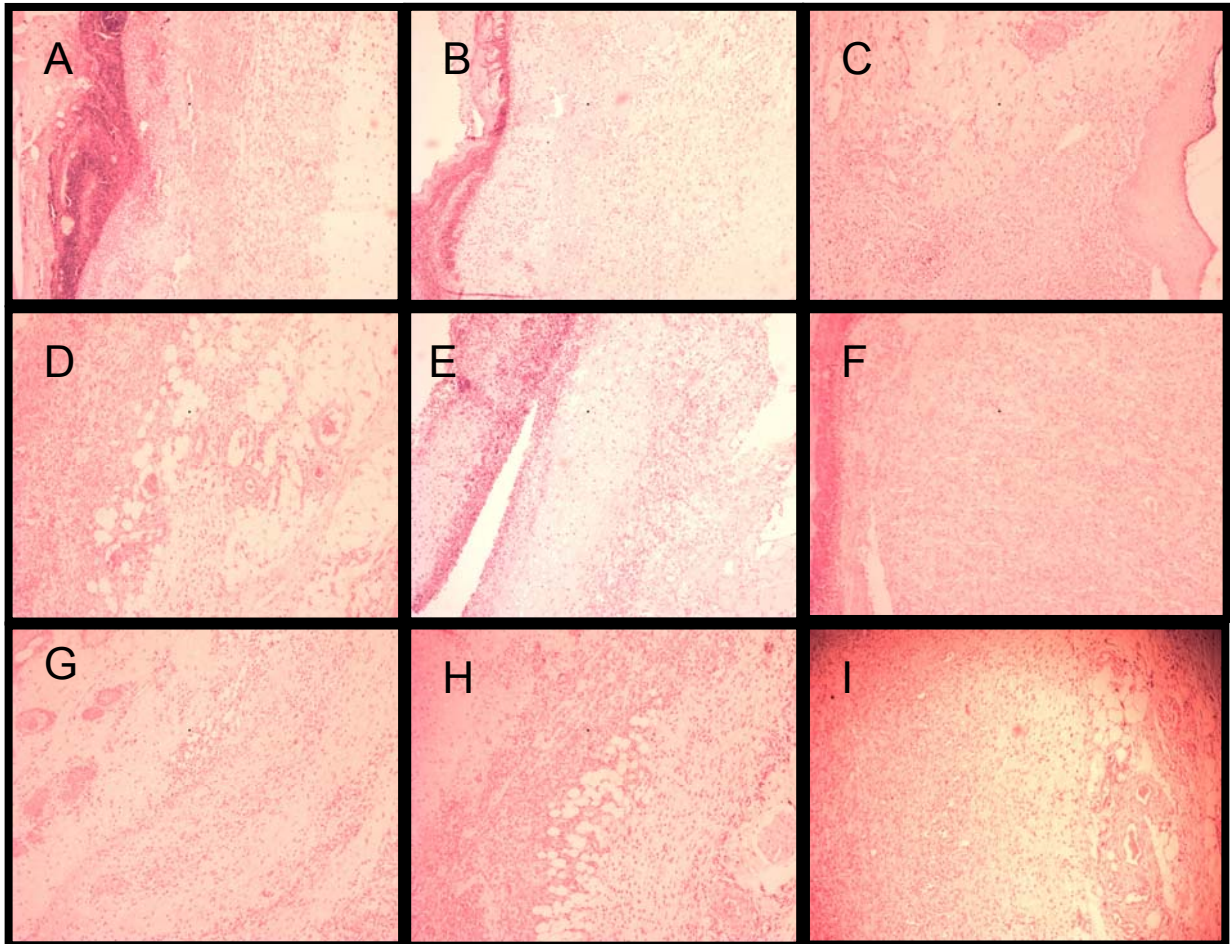
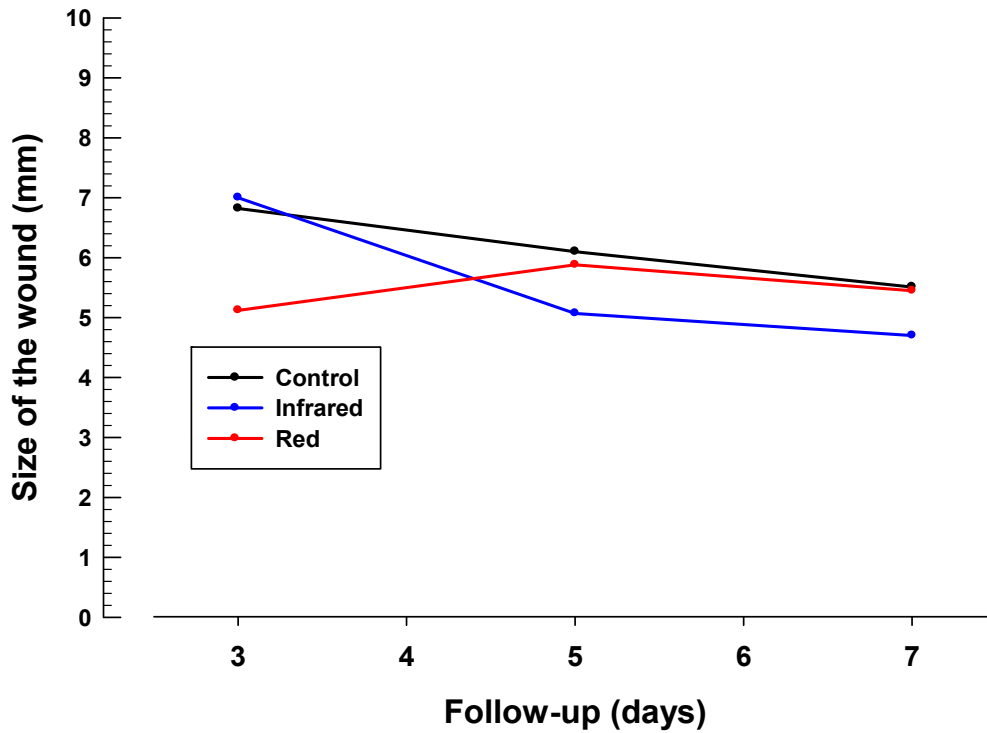
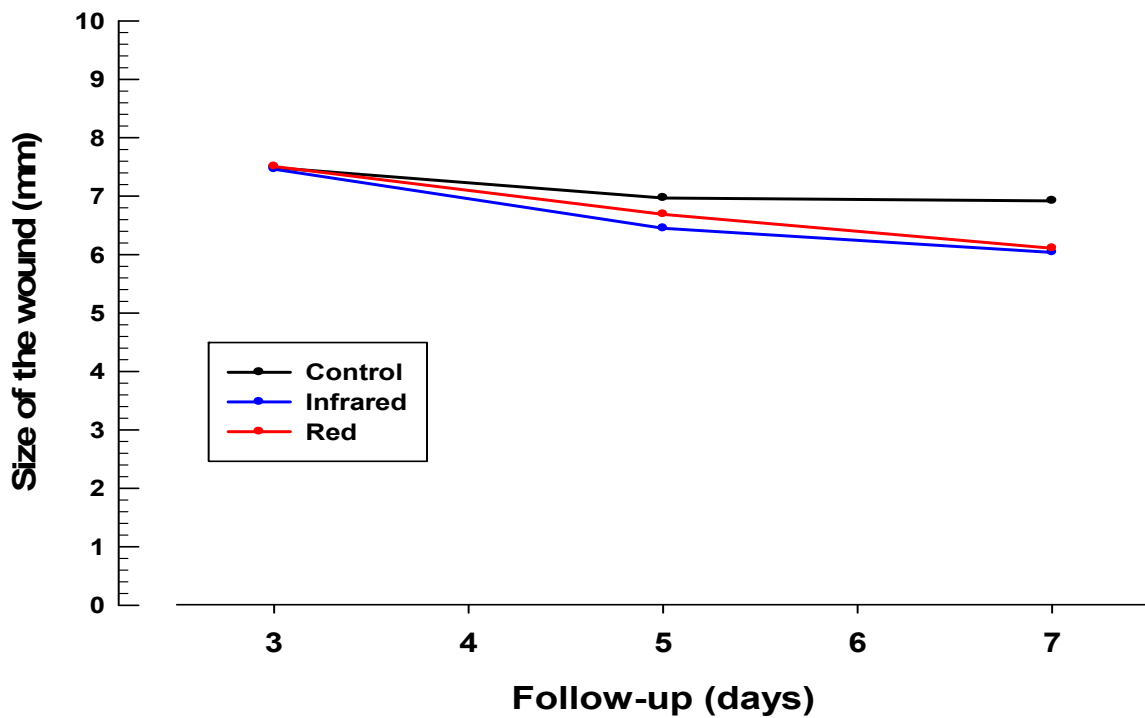


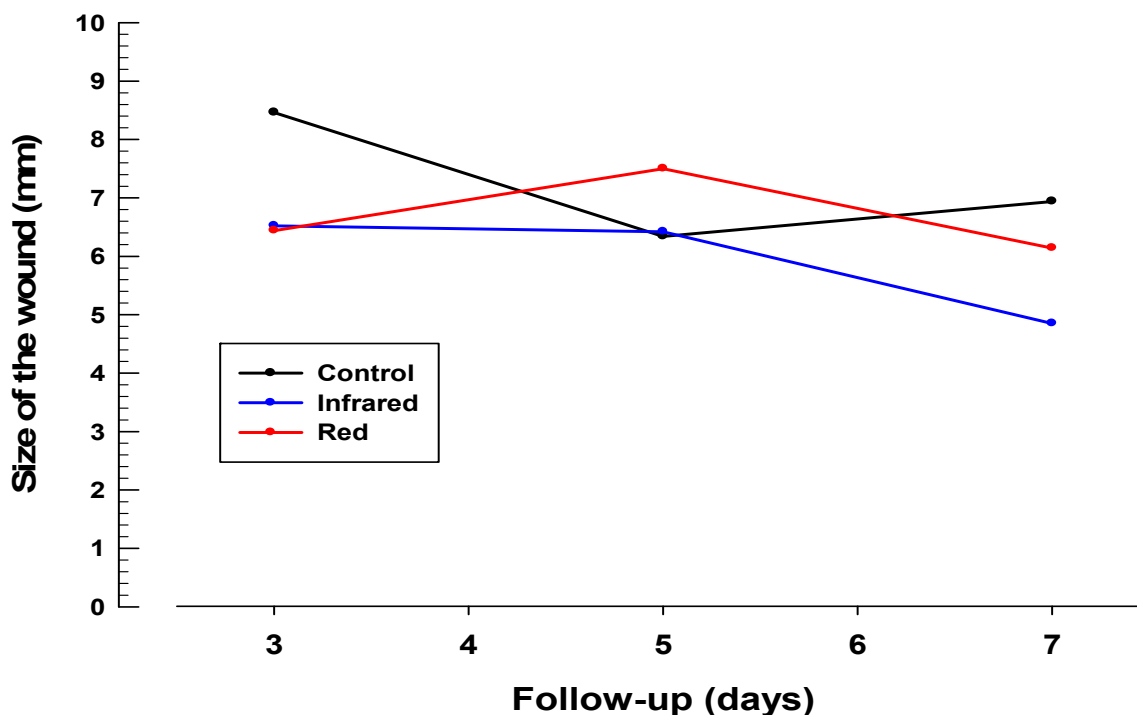
FIG.2. Photomicrograph of the samples (bar = 40x) fixed with hematoxylin-eosin in the 3 analyzed groups. All the images show the cranial wounds in the 3, 5 and 7 days. (A-C) group control (I); (D-F) group irradiated with infrared laser (II); and (G-I) group irradiated with red (III). Note the intense inflammatory activity in the 5th day in the group with infrared and red laser.



Graphic 1-Comparisons among the control, infrared, and red groups for 3, 5 and 7 in the cranial region



Graphic 2-Comparisons among the control, infrared, and red groups for 3, 5 and 7 in the medial region



Graphic 3-Comparisons among the control, infrared, and red groups for 3, 5 and 7 in the caudal region

4 DISCUSSION

The aim of this study was to investigate the local and distant effect via phototherapy by infrared (830 nm) and red laser (685 nm) in wounds on the dorsum of rats. This study was designed and conducted in accordance with bioethical principles and paradigms recommended and accepted worldwide, as well as the number of used animals was limited to 15 animals per group, with 5 animals in each subgroup. The findings in this study did not show that irradiation with doses of 8 J/cm² would enable a positive association in reducing the distance between the edges of wounds in irradiated groups in the rat animal model.⁹⁻¹¹

It is still evident in the literature that the results seem to be very contradictory when the properties of low power laser are analyzed, as well as its biostimulatory or inhibitory effect, to which careful interpretation of the final results should be given^{4,10,12,13}. The variability of the wavelengths used, different powers, different doses, and different times of analysis contributes to these results. Therefore, to demonstrate the possibilities of biomodulation offered by laser therapy both locally and distantly, several factors must be taken into consideration.¹⁴

In this study we opted for laser application in the cranial region for being a more innervated and vascularized area, with the objective of obtaining a greater stimulus in its healing, as well as having the wounds away from the application point. Thus a higher biomodulation could be induced both locally and distantly in the medial and caudal wounds, but this effect was not significant when compared to the inter-groups measurements. The results did not show any difference regarding the healing or sloughing period. During the observation period, no wound showed signs of infection. The histological examination showed no obvious morphological differences between treated and untreated wounds that the use of low level laser therapy may improve the healing process of wounds and these results confirm the study of Anneroth et al., 1999, opposed to another study aiming to compare the effect of low intensity laser in the process of wound healing in diabetic and non-diabetic rats, an experiment was performed using HeNe laser ($\lambda = 632.8\text{nm}$) by Rabelo et al. 2006 and it was perceived that the treated

animals had less intense inflammation processes than the animals that were not treated.^{15, 16}

When we performed a descriptive analysis, our findings corroborate the findings of other important authors to which the group control showed a higher presence of infiltrated lymphocytic and mild evidence of edema and hyperemia¹⁷. Unlike the groups irradiated with infrared (830 nm) and red 685 nm laser, we noticed higher amount of edema and hyperemia in moderate and advanced stages, suggesting the longer wavelength infrared laser acts on the deeper layers reaching with greater intensity the conjunctive tissue if compared to the shorter wavelength red laser. These results are in accordance with studies of Mendez et al., 2004¹⁹ and Weber et al. 2006²⁰. The deposition of collagen in the first 5 days, which also involved the 3-day group showed more irregular deposition of collagen and in the deeper layers of the connective tissue, in contrast with the other results which led to the conclusion that the irradiated lesions showed accelerated reepithelialization if compared to the control group²¹. The irradiated dermis had a higher amount of active fibroblasts than in the group control, and the laser irradiation reduced the local inflammation, besides, apparently, organizing collagen fibers in the repair areas. In our study, we observed a more significant reduction of the distances between the edges of wounds in periods of 3 to 7 days in the group irradiated by infrared laser (830 nm) when compared to red laser (685 nm) corroborating other findings.^{22, 23} Although the doses used in our study had been in according to classical studies that have suggested

the range of 1-50 J/cm² and with variation of the energy densities recommended previously and the use of different doses is due to the fact that up to this date there is no clear and definitive definition for which dosimetry there is a better tissue dose-response and it is still necessary further investigation.^{24, 26 - 31}

Photodynamic therapy using low power laser presents several directions and applications evidenced by the several previous studies, although still contradictory results may be found in the literature. The reasons are diverse, since they involve variations in the periods of time of the evaluation, irradiated area and frequency, type of irradiated laser (pulsed vs. continuous) and different animal models in study.³²

Further studies must be performed in order to check the real mechanism involving wound healing both animal and human model. This involves a complex mechanism of tissue reaction resulting from the absorption of laser beam emitted under certain doses and the sequence of events that involve all highly complex biochemical processes. Therefore, it is necessary that teams of different specialties are involved in the process of descriptive, qualitative, and quantitative analysis related to cell biology so that we may find a protocol in which laser therapy may act more efficiently and effectively.

5 Conclusions

Phototherapy by low power infrared laser showed a positive biomodulatory effect in the early periods of healing and repair of wounds in the back of rats. The therapy by low power red laser presented, in the initial periods analyzed, higher acute inflammation

process, which may be due to a shorter wavelength that affects the upper layers of the wound.

REFERENCES

- 1 Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. *Surgery* 2005;23(2):37-42.
- 2 Chow RT, Barnsley L. Systematic review of the literature of low-level laser therapy (LLLT) in the management of neck pain. *Lasers Surg Med.* 2005 Jul;37(1):46-52.
- 3 Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power Laser irradiation on suture during bone regeneration in midpalatal expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997 May; 111(5):525-32.
- 4 Al-Watban FAH, Zhang XY. The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Therapy* 1999;11(1):6-10.
- 5 Al-Watban FAH, Zhang XY. The comparison of effects between pulsed and CW lasers on wound healing. *J Clin Laser Med Surg.* 2004;22(1):15-18.
- 6 Henriques, ACG; Cazal, C and Castro, JF. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online]. 2010;37(4) pp. 295-302.
- 7 Braiman-Wiksmann L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum R. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicologic Pathology.* 2007 Oct;35(6):767-79.
- 8 Brugnera JR. Biomodulatory effect of laser therapy-clinical indications. *Dentistry Braz Dent J.* 2004;Suppl 15:60.
- 9 Lowe AS, Walker MD, O'Byrne M, Baxter GD, Hirst DG. Effect of low-intensity monochromatic light therapy (890 nm) on a radiation-impaired, wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg Med* 1998;23(5):291-8.
- 10 Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Hirst DG, Lowe AS. Effect of low-intensity laser irradiation (660 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.* 2000;26(1):41-47.
- 11 Pugliese LS, Medrado AP, Reis SRA, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):307-13.
- 12 Kana J, Htschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low-power density Laser radiation on healing of open wounds in rats. *Arch Surg.* 1981;(116):293-296.
- 13 Lagan KM, McKenna T, Witherow A, Johns J, McDonough SM, Baxter GD. Low-intensity laser therapy/combined phototherapy in the management of chronic venous

ulceration: a placebo-controlled study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Jun;20(3):109-116.

14 Whinfield AL, Aitkenhead I. The light revival: does phototherapy promote wound healing? a review. *Foot.* 2009 Jun;19(2):117-124.

15 Anneroth G, Hall G, Rydén H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999 Feb;26(1):12-17.

16 Rabelo SB, Villaverde AB, Nicolau R, Salgado MC, Melo MS, Pacheco MT. Comparison between wound healing in induced diabetic and nondiabetic rats after low-level laser therapy. *Photomed Laser Surg.* 2006;(24)4:474-479.

17 Nascimento PM, Pinheiro AL, Salgado MA, Ramalho, LM. A preliminary report on the effect of laser therapy on the healing of cutaneous surgical wounds as a consequence of an inversely proportional relationship between wavelength and intensity: histological study in rats. *Photomed. Laser Surg.* 2004;(22):513–518.

18 Gál P, Vidinský B, Toporcer T, Mokry M, Mozes S, Longauer F et al. Histological assessment of the effect of laser irradiation on skin wound healing in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006 Aug;24(4):480-488.

19 Mendez TM, Pinheiro AL, Pacheco MT, Nascimento, PM, Ramalho, LM. Dose and wavelength of laser light have influence on the repair of cutaneous wounds. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 2004 Feb;22(1):19-25.

20 Weber JB, Pinheiro AL, Oliveira MG, Oliveira FA, Ramalho LM. Laser therapy improves healing of bone defects submitted to autologous bone graft. *Photomed Laser Surg.* 2006(24):38-44.

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

22 Rodrigo SM, Cunha A, Pozza DH, Blaya DS, Moraes JF, Weber JB et al. Analysis of the systemic effect of red and infrared laser therapy on wound repair. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(6):929-935.

23 Matic M, Lazetic B, Poljacki M, Djuran V, Matic M, Gajinov Z. Influence of different types of electromagnetic fields on skin reparatory processes in experimental animals. *Lasers Med Sci.* 2009(24):321-327.

24 Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schon H, Schindl L. Low-intensity laser therapy: a review. *J. Invest. Med.* 2000 Sep;48(5):312-326.

25 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.* 1974; Suppl:261-265.

26 Mester E, Mester AE, Mester A. The biomedical effect of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5(1):31-9.

27 Mester AF, Mester A. Wound healing. *Laser Therapy.* 1989;1(1):7.

28 Webb C, Dyson M, Lewis W H. Stimulatory effect of 660nm low level laser energy on hypertrophic scar derived fibroblast: possible mechanisms for increase in cell counts. *Lasers Surg Med.* 1998;22(5):294-301.

29 Pereira AN, Eduardo CP, Matson E, Marques MM. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblast. *Lasers Surg med.* 2002 Oct;31(4):263-267.

30 Medrado AR, Pugliesi LS, Reis SR, Andrade ZA. Influence of low-laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2003;32(3):239-244.

31 Demir H, Balay H, Kirnap M. A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev.* 2004 Mar;41(2):147-154.

32 Bayat M, Azari A, Golmohammadi M G. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomed Las Surg.* 2010;28(4):465-470.



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

Ofício 122/10 – CEUA

Porto Alegre, 24 de junho de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00170, intitulado: **"Efeito sistêmico da laserterapia vermelha (In-Ga-Al-P) e infravermelha (GaAl)As no reparo de feridas em dorso de ratos"**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


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

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

PUC

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