

ARY LOCCI JUNIOR

ESTUDO BIOMÉTRICO E HISTOLÓGICO DO PROCESSO DE REPARO EM FERIDAS CUTÂNEAS, PROVOCADAS NA REGIÃO DORSAL DE RATOS, SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE. INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA (685 E 780 nm)

ARY LOCCI JUNIOR

ESTUDO BIOMÉTRICO E HISTOLÓGICO DO PROCESSO DE REPARO EM FERIDAS CUTÂNEAS, PROVOCADAS NA REGIÃO DORSAL DE RATOS, SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE. INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA (685 E 780 nm)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do "Campus" de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**. (Área de Concentração : Periodontia).

Orientador: Prof. Titular Valdir Gouveia Garcia

**ARAÇATUBA – SÃO PAULO
2003**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

L811e Locci Junior, Ary
Estudo biométrico e histológico do processo de reparo em feridas cutâneas, provocadas na região dorsal de ratos, submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade. Influência da associação de dois diferentes comprimentos de onda (685 e 780 nm) / Ary Locci Junior. – Araçatuba : [s.n.], 2003
138 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2003
Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1.Cicatrização de feridas. 2.Lasers em baixa intensidade.

Black D64
CDD 617.601

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	17
LISTA DE TABELAS.....	21
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	39
3 PROPOSIÇÃO.....	74
4 MATERIAL E MÉTODO.....	76
5 RESULTADOS.....	83
6 DISCUSSÃO.....	111
7 CONCLUSÃO.....	118
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
ANEXOS.....	134
RESUMO.....	136
ABSTRACT.....	138

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fragmento circular de pele em dorso de rato, realizado com auxílio de um "PUNCH" 77
- Figura 2** - Aparelho laser de baixa potência Laser Beam 500 78
- Figura 3** - Aplicação puntual do laser em contato, com tempos equivalentes de aplicação em cada área 79
- Figura 4** - Vetores médios do Grupo 3 dias avaliados em dois períodos de mensuração. 85
- Figura 5** - Vetores médios do Grupo 7 dias avaliados em dois períodos de mensuração. 87
- Figura 6** - Vetores médios do Grupo 14 dias avaliados em dois períodos de mensuração. 89
- Figura 7 - Grupo I (Controle). 3 dias.** Discreta proliferação do epitélio junto à borda da ferida e presença de crosta. HE. Original 63x. 92
- Figura 8 - Grupo I (Controle). 3 dias.** Tecido conjuntivo pouco diferenciado com fibroblastos e capilares neoformados. HE. Original 63x. 92
- Figura 9 - Grupo I (Controle). 3 dias.** Evidenciando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x. 93
- Figura 10 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias.** Proliferação epitelial mais pronunciada quando comparada ao grupo I e presença de faixa eosinófila imediatamente abaixo da crosta. HE. Original 63x. 93
- Figura 11 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias.** Tecido conjuntivo mais desenvolvido com menor número de macrófagos e linfócitos quando comparado ao grupo I. HE. Original 63x. 94
- Figura 12 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias.** Mostrando pequenos feixes de fibras colágenas irregulares no

	tecido conjuntivo. Tricômio de Masson. Original 63 x.	94
Figura 13	- Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Proliferação epitelial mais pronunciada quando comparada aos grupos anteriores. HE. Original 63x.	95
Figura 14	- Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Mostrando a ausência de faixa eosinófila abaixo da crosta, observada nos grupos anteriores, e tecido conjuntivo com as mesmas características. HE. Original 63x.	95
Figura 15	- Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Evidenciando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x.	96
Figura 16	- Grupo I (Controle). 7 dias. Mostrando discreta proliferação do epitélio junto à borda da ferida e presença de espessa camada de crosta. HE. Original 63x.	98
Figura 17	- Grupo I (Controle). 7 dias. Evidenciando tecido conjuntivo pouco organizado. HE. Original 63x.	98
Figura 18	- Grupo I (Controle). 7 dias. Feixes de fibras colágenas nas áreas mais afastadas da superfície da ferida. Tricrômico de Masson. Original 63x.	99
Figura 19	- Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Epitélio recobrando parcialmente a ferida cirúrgica. HE. Original 63x.	99
Figura 20	- Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Tecido conjuntivo mais desenvolvido quando comparado ao grupo anterior com fibroblastos e capilares neoformados. HE. Original 63x.	100
Figura 21	- Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Evidenciando feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo. Tricrômico de Masson. Original 63x.	100
Figura 22	- Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias. Epitélio recobrando parcialmente a ferida cirúrgica. HE. Original 63x.	101

- Figura 23 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias.** Tecido conjuntivo rico em capilares neoformados e fibroblastos em número moderado. HE. Original 63x. 101
- Figura 24 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias.** Evidenciando feixes de fibras colágenas sem muita organização. Tricrômico de Masson. Original 63x. 102
- Figura 25 - Grupo I (Controle). 14 dias.** Epitélio recobrindo parcialmente a ferida cirúrgica e pequena quantidade de crosta. HE. Original 63x. 104
- Figura 26 - Grupo I (Controle). 14 dias.** Evidenciando tecido conjuntivo com fibroblastos em número moderado, orientados paralelamente à superfície do epitélio. HE. Original 63x. 104
- Figura 27 - Grupo I (Controle). 14 dias.** Mostrando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x. 105
- Figura 28 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias.** Epitélio pouco diferenciado recobrindo a ferida cirúrgica e ausência de crosta. HE. Original 63x. 105
- Figura 29 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias.** Tecido conjuntivo rico em fibroblastos que estão dispostos paralelamente à superfície do epitélio. HE. Original 63x. 106
- Figura 30 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias.** Mostrando fibras colágenas em maior quantidade quando comparadas ao grupo anterior. Tricrômico de Masson. Original 63x. 106
- Figura 31 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias.** Mostrando fibras colágenas em maior quantidade quando comparadas ao grupo anterior. Tricrômico de Masson. Original 63x. 107
- Figura 32 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias.** Epitélio bem desenvolvido recobrindo a ferida

- cirúrgica com ausência de crosta. HE. Original 63x. 107
- Figura 33 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias.**
Tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos. HE. Original 63x. 108
- Figura 34 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias.**
Mostrando feixes de fibras colágenas em maior quantidade que o grupo I. Tricrômico de Masson. Original 63x. 108
- Figura 35 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias.**
Evidenciando feixes de fibras colágenas em maior quantidade que o grupo I. Tricrômico de Masson. Original 63x. 109

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias e desvios-padrão do Grupo – 3 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 3 dias, segundo os grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm. 84
- Tabela 2** - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 3 dias, avaliado em dois momentos, 0 hora e 3 dias, segundo os grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII). 84
- Tabela 3** - Médias e desvios-padrão do Grupo – 7 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 7 dias, segundo os grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm. 86
- Tabela 4** - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 7 dias, avaliado em dois momentos, 0 hora e 7 dias, segundo os grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII). 86
- Tabela 5** - Médias e desvios-padrão do Grupo – 14 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 14 dias, segundo os grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm. 88
- Tabela 6** - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 14 dias, avaliado em dois momentos, 0 hora e 14 dias, segundo os grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII). 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACTH: hormônio adenocorticotrófico.

ATP: trifosfato de adenosina

Comprimento de onda: distância entre dois pontos correspondentes em uma onda eletromagnética, medida em micrômetros ou nanômetros.

Densidade energética: quantidade de energia aplicada em uma área, expressa em Joules por centímetro quadrado (Joules/cm²).

DNA: ácido desoxirribonucléico.

Emissão contínua: um Laser que continuamente emite energia.

FCS: fator de crescimento de colônias celulares (soro de feto de bezerro).

Hertz (Frequência): número de oscilações completas de uma onda por segundo, e expresso em Hertz ou pulsos por segundo.

HSP-70: proteína citosólica importante na importação de proteínas para as mitocôndrias.

Joule: uma unidade de energia, abreviada como J.

Laser AsGa: Laser de Arsênio-Gálio.

Laser AsGaAl: Laser de Arsênio-Gálio-Alumínio.

Laser Er:YAG: Laser de Érbio, Ítrio, Alumínio, Granada.

Laser HeNe: Laser de Hélio-Neônio.

Laser Ho:YAG: Laser de Hólmio, Ítrio, Alumínio, Granada.

Laser Nd:YAG: Laser de Neodímio, Ítrio, Alumínio, Granada.

Laser pulsado: um Laser que emite energia em intervalos fixos.

Laser: acrônimo de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação).

LPL: Low Power Laser (laser em baixa intensidade).

Milijoule: Joule dividido por 1000, a abreviatura é mJ.

Monocromático: uma única frequência de comprimento de onda (uma única cor).

mW: milionésima parte do Watt.

Nanômetro (nm): bilionésima parte do metro, utilizada para medir comprimento de onda. Abreviação: 10^{-9} metros.

PVPI: polivinilpirrolidona – iodo.

RNA m: ácido ribonucleico mensageiro.

Tempo de exposição: período total em que o tecido é exposto à energia Laser. Expresso em minuto por segundo.

Watt: unidade de potência. Um Watt é igual a um Joule por segundo.

DADOS CURRICULARES

Ary Locci Junior

NASCIMENTO.....: 04 de março de 1966
NATURALIDADE.....: São Paulo/SP

FILIAÇÃO.....: ARY LOCCI
GILDA ANGELINA LOCCI

1985/1989.....: Curso de Graduação
Universidade Paulista – UNIP

1993/1994.....: Curso de Especialização em
Periodontia na Universidade
Paulista – UNIP

1998/2000.....: Curso de Especialização em
Implantodontia na Universidade
Metodista de Piracicaba – UNIMEP

2001/2003.....: Curso de Pós-Graduação em
Periodontia na Faculdade de
Odontologia de Araçatuba - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedicatória

À Deus,

arquiteto de todo o Universo, pela chance que me concedeu, de expandir meu espírito e minha consciência e, por ter me mostrado claramente, a necessidade de me deixar ser apenas um instrumento de sua vontade; e, em sua infinita bondade, ter estado sempre presente, seja manifestando-se nas pessoas que estiveram nessa maravilhosa jornada ou mesmo em situações onde as dificuldades do caminho se mostravam extremamente penosas... e nessas horas, o sopro divino me inspirava a prosseguir, polindo e ampliando a minha fé.

Sou grato enormemente, meu Deus, por ter colocado, muitas vezes, o rosto do teu amado filho em meus sonhos e em meus pensamentos, olhando-me com a ternura necessária, fazendo-me lembrar que também sou seu filho e, por isso, nada me faltará durante o cumprimento dos planos que elaboraste para mim...

Aos meus pais Ary Locci e Gilda Angelina Locci,

que me ensinaram, acima de tudo, a amar, que é uma das maiores
heranças deixadas para um filho.
Portanto, tenho grande orgulho de dizer que amo vocês tão intensamente,
que tudo aquilo construído por mim é feito, de forma a representar um
monumento em homenagem a vocês.

À minha querida irmã Malena Locci Marafanti,

que sempre representou um ponto de equilíbrio, onde encontro paz,
amor, carinho e compreensão.
Estendo essa dedicação ao meu cunhado Eduardo Amora Marafanti, cuja
integridade e capacidade de viver, em todos os aspectos, contagia as
pessoas ao seu redor.

Dedico também, à minha tia "Cida" (in memorian) e aos meus avós (in memorian),

que, com certeza, de onde estão, olharam e olham por mim...

À minha querida namorada Angélica Marquezim Lopes,

que, de uma forma sutil e delicada, mostrou-me o quanto é fascinante descobrir o potencial do amor e esperança, que por muitas vezes, ficam encobertos por nossos medos.

Por isso e por tudo aquilo, que tenho certeza, que esse ser humano e essa mulher maravilhosa ainda há de oferecer para iluminar a minha vida, posso dizer, com honestidade, que é ótimo e extremamente gratificante estar de corpo e alma nesse relacionamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, na pessoa do Sr. Prof. Dr. Francisco Antônio Bertoz,

que nos ofereceu as condições para que essa pós-graduação fosse realizada;

Ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto,

pela estimável colaboração na Análise Histológica e documentação fotográfica desse trabalho;

À Prof.^a Mariê Oshiiwa, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Marília – UNIMAR,

pela sua disponibilidade para a realização da Análise Estatística do presente trabalho;

Aos Professores da Disciplina de Periodontia, Dr. Valdir Gouveia Garcia, Dr. Álvaro Francisco Bosco, Dr^a. Maria José Hitomi Nagata, Dr. Glauco Issamu Miyhara e Dr. José Ricardo Kina,

pelos ensinamentos e apoio dado durante todo o curso, mostrando sempre a competência e os valores profissionais de cada um;

Aos colegas do Mestrado em Periodontia, Angélica Marquezim Lopes, Cristiane Mota Leite, Joseane Maria Dias Bosco, Luciana Liarte Gasparini Ribeiro e Luís Gustavo Nascimento de Melo,

cujas convivências foram de valor inestimável;

Aos amigos Maurício Cardoso e Agnaldo Coelho Farias,

pelo convívio e companheirismo, que ficarão marcados por toda a minha vida;

Aos funcionários da Disciplina de Periodontia, Antônia Ferreira Artioli e Claudiomiro Pereira,

pela colaboração e carinho demonstrado durante todo o curso;

Aos técnicos de laboratório da Faculdade de Odontologia de Lins-UNIMEP, Elemir Fabiano Chiapara e Demerval Aparecido Peixoto,

pela disposição e ajuda prestada no desenvolvimento experimental e laboratorial dessa dissertação;

Às secretárias da Pós-Graduação, Adélia Barreto Claro da Silva e Marina Midori Sakamoto,

pela paciência e ajuda prestada, que foi de grande auxílio durante o curso;

A todas as funcionárias da biblioteca, Isabel Pereira de Matos, Helena Otsuki, Izamar da Silva Freitas, Marina Alves dos Santos, Maria Cláudia de Castro Benez, Luzia Anderline, Cláudia de Souza Frare, Ivone Rosa de Lima e Alexandra Bento,

pela grande amizade, carinho e dedicação nos levantamentos bibliográficos, necessários para a elaboração desse trabalho; assim como, pela competência e despreendimento que nos serviram;

À Prof. Luciana Guiotti,

pela atenção dispensada para a revisão gramatical desse trabalho;

À Srta. Andréa Oliveira de Almeida,

pela amizade e paciência oferecida na digitação dessa dissertação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

Ao Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia,

pela grande disposição que me recebeu como orientado nesse curso, mostrando-me, de uma forma muito amigável e próxima, o seu valor como professor, pesquisador e orientador.

Agradeço, por ter aberto as portas de sua própria casa, recebendo-me de forma tão amistosa, que me fez sentir como sendo um integrante de sua família.

Estendo também o meu agradecimento à sua companheira Leticia Helena Theodoro, pelas valiosas contribuições na elaboração desse trabalho;

Aos amigos da Polícia Militar de São Paulo (CPI-5),

que me apoiaram e souberam compreender as minhas ausências; em especial ao Cap Dent PM Carlos Alberto Justo e aos meus auxiliares Sgt PM Francisco de Assis Theodoro e Sgt Fem PM Marlei M. O. Santos, pela paciência e pela disposição de me ajudarem durante essa jornada;

Aos meus comandantes Cel PM João Oliveira Verlangieri, Ten Cel PM Alfonso Ferrante Bruno, Ten Cel PM Domingues Vanderlei Galeazzi,

por terem proporcionado condições para que eu pudesse dispor de tempo para o desenvolvimento do curso e da elaboração desse trabalho;

Aos queridos amigos Cel PM Miguel Peixoto Frisene, Cel PM Augusto Cunha e Cel PM João Sacomano,

pela amizade, apoio e incentivo nos momentos em que eu mais precisava;

Agradeço também, a um grande amigo, Orlando Antônio Truffa,

Que sempre me apoiou e me mostrou a importância do bom profissional. A sua pessoa, sem dúvida, foi um grande marco em minha vida.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

Epígrafe

*“Nenhum raio de sol jamais é perdido,
mas a erva que ele desperta para a vida,
precisa de tempo para crescer;
e nem sempre é garantida a sua colheita.
Todo trabalho que vale alguma coisa,
é feito em confiança.”*

Albert Schweitzer

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Segundo Robbins et al. (1996)⁷¹ vários estímulos exógenos e endógenos são capazes de gerar agressão celular, ou também de provocar uma reação complexa no tecido conjuntivo vascularizado, denominada de *inflamação*.

Os eventos da reparação ocorrem um pouco mais tarde em relação aos passos iniciais da inflamação, mas há uma considerável quantidade de reações em que ocorre sobreposição. Por exemplo, a fagocitose é uma reação defensiva, mas é um importante evento logo no início do processo reparador, enquanto a fibroplasia é um processo fundamental tanto na inflamação crônica quanto na reparação. Dessa maneira, pode-se dizer que uma das primeiras funções do processo inflamatório é reparar o tecido lesado (Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹. Pode-se, então, verificar que, depois de um estímulo exógeno, como o que ocorre após uma injúria tecidual cuja dilaceração na pele expõe o tecido conjuntivo, podendo esta injúria ocorrer de forma acidental ou programada de forma cirúrgica, uma seqüência ordenada de eventos biológicos ocorre. A reparação da ferida, que se estende até o tecido conjuntivo inicia-se através de um processo inflamatório e pode ser dividida em três fases distintas (Viljanto, 1964)⁹³:

Fase destrutiva ou exsudativa;

Fase proliferativa ou reparativa;

Fase de maturação ou de formação de cicatriz.

A **fase destrutiva**, segundo Viljanto (1964)⁹³, caracteriza-se pela saída do sangue dos vasos injuriados e dos fluídos dos tecidos que acabam coagulando na superfície da ferida. Os fragmentos de tecidos e remanescentes celulares ficam sobre a ferida resultante, seguidos por vasodilatação e reação inflamatória local. Nesta fase, ocorre aumento significativo de células injuriadas. A fase exsudativa termina após remoção de todo material necrótico da ferida.

A **fase proliferativa ou reparativa** caracteriza-se pelas células do tecido conjuntivo, fibroblastos e seus progenitores mesenquimais, dividindo-se e invadindo a cavidade da ferida (Viljanto, 1964;⁹³ Ross, 1968;⁷⁵ Robbins et al., 1996;⁷¹ Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹. Pode-se observar a dilatação e aumento da permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos ao lado do tecido injuriado (Ryan & Mojno, 1977;⁷⁸ Robbins et al., 1996;⁷¹ Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹. O aumento do fluxo sanguíneo, resultante da vasodilatação, leva à alteração da cor e da temperatura da área, sendo que a vasodilatação envolve primeiro as arteríolas e depois os capilares e vênulas, estas estruturas envolvidas na resposta à agressão constituem a microcirculação (Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹. Os números de capilares e arteríolas aumentam e são mais

numerosos entre 32 horas até oito dias após a execução da ferida (Viljanto, 1964;⁹³ Ross, 1968;⁷⁵ Gabbiani, 1977;²⁹ Robbins et al., 1996)⁷¹. O tecido de granulação preenche a ferida gradualmente e, então, ocorre a reepitelização logo, em seguida.

Na **fase de maturação**, a vascularização e a celularização do tecido injuriado diminuem enquanto cresce a quantidade de fibras colágenas. Proliferação fibroblástica e subsequente deposição de colágeno intercelular resultam numa cicatriz de tecido conjuntivo, a qual contém principalmente fibras colágenas maduras (Viljanto, 1964;⁹³ Robbins et al., 1996;⁷¹ Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹.

Dois tipos de cicatrização podem ocorrer de acordo com a perda de tecido provocada pela injúria: *cicatrização por primeira intenção* (primária) e por *segunda intenção* (secundária) (Robbins et al., 1996)⁷¹. A cicatrização por primeira intenção ocorre, como exemplo, quando de uma incisão cirúrgica, onde as bordas são aproximadas e mantidas por suturas. Contudo, quando a perda celular e tecidual é mais extensa, o processo de reparação é mais complicado e é chamado de cicatrização por segunda intenção. Neste tipo de cicatrização, ocorre um grande crescimento de tecido de granulação, a partir da margem da ferida, a fim de completar o reparo.

A cicatrização secundária difere da cicatrização primária em vários sentidos:

1) Inevitavelmente grandes defeitos teciduais apresentam de início, uma quantidade maior de fibrina e de restos necrótico e exsudato a serem removidos. Conseqüentemente, a reação inflamatória é mais intensa.

2) Formam-se quantidades muito maiores de tecido de granulação.

3) É possível que o aspecto que mais claramente diferencia a cicatrização primária da secundária seja o fenômeno de contração da ferida, verificado nas grandes feridas de superfície. Defeitos amplos em pele de coelhos são reduzidos de 5 a 10% de seu tamanho original em aproximadamente seis semanas, e isso se deve, em grande parte, à presença de miofibroblastos (Robbins et al., 1996)⁷¹.

Segundo Pollack (1979)⁶⁵, o sangue que penetra na ferida, imediatamente após sua execução, forma uma rede de fibrina que inicialmente teria a capacidade de unir de forma fraca as bordas da ferida e desenvolver importante papel na epitelização e migração fibroblástica. A formação de crosta ocorre devido à desidratação, ao ressecamento superficial da ferida e à coagulação do sangue. Após 12 horas da criação da ferida, inicia-se o processo de epitelização, ocorrendo modificações no arranjo da morfologia e na função das células epiteliais, sendo que elas interrompem sua função de formação de queratina e passam a processar diferentes funções de multiplicação e de migração celular. Bullough &

Laurence (1964)¹⁴ citam a importância da rede de fibrina na orientação e migração das células.

Segundo Montandon et al. (1977)⁵⁸, em feridas profundas e largas, a epitelização se desenvolve a partir da periferia, nas margens da ferida. Por outro lado, em feridas superficiais e rasas, a epitelização se processa desde os apêndices epidermais (foliculos pilosos e glândulas sudoríparas). Trowbride & Emling (1996)⁹¹ relatam que o processo de epitelização envolve três atividades por partes das células epiteliais:

- Migração - para fazer uma ponte entre as margens;
- Multiplicação - para repor células perdidas;
- Manutenção - para restaurar a função.

No processo de migração, as células do epitélio de revestimento migram para dentro e cruzam a ferida. Isso começa após poucas horas da lesão instalada. Para isso, as células se desprendem de suas vizinhas e começam a se mover independentemente. As células nas extremidades finas do epitélio migrante transformam-se, de células epiteliais normais em células cheias de lisossomos e ativamente fagocíticas. Esse processo permite a estas células ingestão e digestão de fibrina e de outros materiais, ocasionando, então, sua entrada na ferida.

Uma vez que as células de uma extremidade entrem em contato com as células da extremidade oposta, novos desmossomos são formados e estas células se transformam em células normais da camada

basal do epitélio. No processo de multiplicação, há proliferação das células, então mais células tornam-se viáveis para migração. Isso ocorre entre as células basais, 1 a 2 mm da margem da ferida. Por fim, a proliferação e maturação das células que migraram através da ferida, resultam em formação de um novo epitélio pavimentoso estratificado, e, em virtude disso, a função é restaurada.

Ainda segundo Montandon et al. (1977)⁵⁸ a partir do momento em que massas de células epiteliais de lados opostos se encontram, formando rapidamente desmossomos, estas células começam a retornar à sua forma e à função normal, passando a secretar queratina, enquanto o tecido conjuntivo continua o processo de maturação e de contração. Segundo estes autores, a ferida cirúrgica sofre uma contração no seu tamanho de forma centrípeta, guiada pelas suas bordas, em direção à sua porção central, formando uma cicatriz de tamanho menor do que o da ferida inicial.

Experimentalmente foi demonstrado em animais, que a contração da ferida prossegue a uma taxa bastante uniforme, de aproximadamente 0,6 a 0,75 mm por dia, independentemente de seu tamanho (Peacock & Van Winkle, 1976)⁶⁴, embora sua forma possa influenciar a taxa de contração, pois ferimentos esféricos não se contraem tão rapidamente quanto os retangulares ou estelares (Pollack, 1979)⁶⁵.

A contração da ferida ocorre parcialmente devido à presença de uma forma especial de fibroblasto, denominado miofibroblasto, o qual tem, como característica predominante, a capacidade contrátil. Esta característica é decorrente da presença de proteínas contráteis dentro do miofibroblasto, chamadas actina (Gabbiani et al., 1971;³³ Pollack, 1979;⁶⁵ Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹. Pode-se, então, mais precisamente dizer, que as bases destes fibroblastos modificados são bandas bem desenvolvidas de microfilamentos contráteis compostos de actina e de proteínas actinoassociadas presentes no citoplasma celular.

Enquanto os miofibroblastos possuírem a função secretora de fibrinogênese da elastina e do colágeno, serão eles os responsáveis pela contração da ferida. (Gabbiani & Ryan, 1974;³² Gabbiani, 1977;²⁹ Lipper et al., 1980;⁴⁴ Robbins et al. 1996)⁷¹.

Os miofibroblastos em conjunto com um sistema filamentosso polarizado no citoplasma, também apresentam inúmeras junções com os miofibroblastos vizinhos ou com a lâmina basal adjacente. As junções são capazes de transmitir contrações a outros miofibroblastos, assim como ao estroma, a fim de que todo o tecido conjuntivo seja afetado quando as células se contraem (Gabbiani et al., 1972;³¹ Ryan et al., 1974;⁷⁷ Lipper et al., 1980;⁴⁴ Alberts et al., 1997;² Junqueira & Carneiro 1999)⁴¹.

Segundo Trowbridge & Emling (1996)⁹¹, inicialmente há uma fase “lag” de aproximadamente 10 a 14 dias antes que a força de tensão, na reparação da ferida, aumente significativamente. Subseqüentemente, a força de tensão aumenta de forma rápida e eventualmente 70 a 80% da força da pele normal é readquirida. Entretanto, a maior parte das feridas, envolvendo a pele, jamais recupera sua tensão original.

Após a completa reparação da ferida, os finos microfilamentos de actina e miosina gradualmente desaparecem do citoplasma dos miofibroblastos e, normalmente, nenhum contato entre os fibroblastos é encontrado nos tecidos normais (Gabbiani, 1979;³⁰ Rungger-Brandle & Gabbiani, 1983)⁷⁶.

O processo de reparação de feridas é um fenômeno complexo e, como dito anteriormente, constitui uma série de eventos ordenados, incluindo, segundo Robbins et al. (1996)⁷¹ a indução de um processo inflamatório agudo pelo ferimento, seguido pela regeneração de células parenquimatosas, a síntese de proteínas da matriz extracelular, o remodelamento de tecido conjuntivo e dos componentes parenquimatosos, a colagenização e a aquisição de força pela ferida.

Ao longo dos anos, todo este processo vem sendo estudado pelas ciências biológicas no sentido de se entender cada passo deste processo que, segundo Garcia (1992)³⁴, tem como objetivo

esclarecer os diferentes aspectos do tecido de granulação, da epitelização na neoformação tecidual, bem como, os possíveis efeitos de medicamentos sistêmicos e/ou tópicos capazes de interferir no processo de reparação do tecido injuriado.

Muitos fatores podem influenciar o processo de reparação, por exemplo, nos casos onde ocorre um processo infeccioso e onde ocorrem perdas de proteínas (Stockhausen & Felbier, 1972)⁸⁸. A aplicação tópica de glicina, aminoácido importante para os tecidos em reparação, também foi citada por Neunhoefer (1947)⁶¹ como uma importante substância que, por possuir alto índice de absorção local, poderia suprir as necessidades destes tecidos em formação.

Muitos trabalhos foram realizados visando a verificar meios que pudessem acelerar a reparação por segunda intenção, principalmente àqueles em que a aplicação tópica de medicamentos era utilizada. Medicamentos tópicos, utilizando glicina, mostraram resultados favoráveis (Bronner & Fargel, 1951)¹³, assim como produtos onde existe a associação de antibióticos com aminoácidos (Stockhausen & Felbier, 1972;⁸⁸ Carvalho & Okamoto, 1977)¹⁷.

Segundo Raphael (1965)⁶⁷, o processo de reparação tecidual poderá ser prejudicado, caso exista uma ocorrência infecciosa na ferida. Para o autor, o uso de neomicina poderia interferir na infecção melhorando a evolução do processo de reparo. Outros autores utilizam a

associação de antibióticos (Neomicina e Bacitracina) e aminoácidos (glicina cisteína e DL - treonina), (Dormanns, 1972;²⁶ Rosenkruzer, 1972;⁷⁴ Wolf 1972;⁹⁵ Stockhausen & Felbier, 1972;⁸⁸ Jansch & Ahrens, 1974)³⁹, agentes antibacterianos, como Nebacetin e Gingilone, também foram utilizados (Carvalho & Oliveira, 1990)¹⁸.

Guzmán Valdivia et al. (2000)³⁶ mostraram a eficácia da associação de colágeno com gentamicina sobre feridas infectadas (tratamentos de feridas em cirurgia abdominal infectadas), demonstrando uma redução significativa do nível de infecção e uma diminuição do tempo de cicatrização.

Reimer et al. (1997)⁶⁹, utilizando uma formulação de um hidrogel com 3% PVP-I lipossômico como anti-séptico de feridas, observaram processo de cicatrização com melhor qualidade inclusive com um tecido de granulação mais suave, menor inflamação, menor contração na ferida e reação hiperqueratótica evidente.

A utilização de fatores de crescimento tecidual fornecido de forma tópica sobre as feridas em cicatrização, mostrou um ganho no processo de reparo (Puolakkainen et al., 1995;⁶⁶ Sohn et al., 2001;⁸⁶ Currie et al., 2001)²⁵. Drogas naturais também têm sido estudadas no processo de reparação de feridas, elas têm sido utilizadas através da irrigação, como o extrato hidroalcoólico de própolis a 10% (Magro-Filho, 1988)⁵⁰ ou através da aplicação tópica da associação confrei, mel e

própolis em comparação com creme de calêndula (Carvalho et al., 1991)¹⁹.

Segundo Zelante & Nardy (2001)⁹⁸, a arnica montana pode ser indicada em forma de tintura ou dinamizada homeopaticamente por via sistêmica atuando nos mediadores da inflamação e modulando a intensidade da resposta inflamatória, possibilitando, dessa forma, uma reparação de feridas mais rápida e com maior qualidade.

Com o advento do laser, em meados de 1960, por Theodore Maiman⁵¹, uma nova opção surgiu para realização de procedimentos cirúrgicos e terapêuticos tanto na área médica quanto na odontológica.

Mello & Mello (2001)⁵² classificam os lasers quanto ao seu meio ativo e quanto ao seu uso em:

QUANTO AO MEIO ATIVO:

- Laser a **gás**: CO₂, He-Ne, Argônio, Excimer;
- Laser **sólido**: Rubi, Nd:YAG, Er:YAG e ErCr:YSGG, Ho:YAG;
- Laser **semicondutor**: Cristais semicondutores: laser de Diodo (AsGa, AsGaAl);
- Laser **líquido**: Dye laser (laser de corante): rodamina;

- Laser **combinado**: He-Ne + Diodo; Diodo no visível e infravermelho próximo; Nd:YAG e Er:YAG; Nd:YAG e CO₂.

QUANTO AO USO:

1. **Cirúrgico** (considerados lasers de alta potência):

- Rubi;
- Nd:YAG (Neodímio, Ítrio, Alumínio, Granada);
- Er:YAG (Érbio, Ítrio, Alumínio, Granada);
- Ho:YAG (Hólmio, Ítrio, alumínio, Granada);
- CO₂;
- Diodo no infravermelho;
- Argônio;
- Excimer;

Combinado: CO₂ + Nd:YAG.

Combinado: Er:YAG e Nd:YAG.

2. **Terapêutico** (são lasers de baixa potência utilizados para a bioestimulação tecidual)

- He-Ne
- Diodo (AsGa – AsGaAl)
- Laser combinado – He-Ne + Diodo

3. **Preparo cavitário** : Er:YAG

4. **Prevenção de cárie** : Nd:YAG
5. **Polimerização de resina** : laser de argônio
6. **Diagnóstico** : He-Ne e Diodo (principalmente de AsGa e AsGaAl).

Ainda segundo Mello & Mello (2001)⁵² as indicações dos lasers de baixa potência seriam auxiliar no reparo tecidual, na analgesia para aliviar a dor, controlar a inflamação e o edema, e atuar significativamente na velocidade da cura, na cicatrização de processo normal ou crônico. Para estes fins, têm sido empregados com mais frequência, na prática clínica os lasers de: GaAlAs (Arseneto de Gálio Alumínio) e de He-Ne (Hélio e Neônio).

Muitos trabalhos enfocam o efeito positivo dos lasers de baixa intensidade nos eventos de reparação tecidual. Alguns fatores podem interferir sobre esses eventos. Dentre estes fatores estão: o tamanho da área, diâmetro da fibra, densidade de energia aplicada, tempo de exposição, modo de aplicação e o comprimento de onda entre outros.

No entanto, poucos são os trabalhos que demonstram a associação de diferentes comprimentos de onda aplicados sobre uma mesma ferida visando a otimizar os eventos no processo de reparo tecidual em feridas abertas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Muitas publicações discutiram os efeitos que os lasers de baixa potência oferecem para o processo de reparo em feridas abertas. Na realidade, uma grande variedade de protocolos para a aplicação deste tipo de laser tem sido discutida. Estas variações estão representadas por diferentes modelos experimentais utilizados para estudos, até mesmo, diferentes parâmetros referentes às variáveis físicas de aplicação desta terapia, como por exemplo, o tempo de exposição, comprimento de onda, densidade de energia e outros.

Poucos, porém, são os trabalhos que enfocam a otimização do reparo tecidual em feridas abertas irradiadas com comprimentos de ondas diferentes, ou seja, numa mesma lesão, recebendo irradiação de Laser com dois comprimentos de ondas visando a otimizar os eventos biológicos da reparação tecidual. Estes fatos podem ser observados na revisão de literatura que passamos a apresentar.

Já há algum tempo, os pesquisadores têm demonstrado preocupação e interesse em desenvolver pesquisas capazes de contribuir com a possibilidade de utilização do laser de baixa potência na modulação dos processos que envolvem a reparação tecidual (Mester et al., 1971;⁵⁶ Mester, 1973;⁵³ Mester et al., 1976;⁵⁵ Kana, 1981;⁴² Jongsma et al., 1983;⁴⁰ Abergel et al., 1984;¹ Hunter et al., 1984;³⁸ Lyons et al., 1987;⁴⁹

Anneroth et al., 1988;⁵ Nemeth, 1993;⁶⁰ Conlan et al., 1996;²⁴ Garcia et al., 1996)³⁵.

Mester et al. (1968)⁵⁴, utilizando laser de rubi com 694,3 nm, aplicado em feridas abertas provocadas mecanicamente em camundongos, estudaram os eventos da reparação. Verificaram que, com a aplicação do laser, ocorria estimulação não só da fagocitose e crescimento de pelos, mas também do processo de reparação. Observaram também que o maior efeito foi obtido quando empregaram duas exposições, por semana, utilizando 1,1 J/cm² de energia. Mostraram também que as feridas irradiadas sofriam uma contração tecidual de aproximadamente 50% no seu diâmetro após sete dias, e que, decorrido 14 dias após a aplicação do laser as feridas mostravam-se com a reparação mais completa, se comparadas às feridas do grupo controle. Demonstraram que a reparação tecidual iniciou-se nas bordas da ferida e que o grupo submetido ao laser resultou em uma cicatriz menor e mais regular.

Mester et al. (1971)⁵⁶ estudaram o processo de reparação em feridas mecanicamente induzidas e feridas obtidas através de queimaduras de terceiro grau provocadas na região dorsal de camundongos e submetidas à ação do laser de rubi, com comprimento de onda de 694,3 nm, e doses energéticas de 0,5 a 10 J/cm², trabalho no qual variou também o número de aplicação (1, 2, ou 3), durante um

período de 14 dias. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição à radiação laser de baixa intensidade também estimula a cicatrização de feridas por queimaduras de terceiro grau induzidas por eletrocoagulação, sendo que a dose de 1 J/cm² foi a mais marcante no processo de estimulação; que doses repetidas estimulam o grau de cicatrização por granulação nas feridas induzidas por queimaduras. Os autores comentaram que a cicatrização de feridas estimuladas por radiação laser envolve um aumento no padrão de crescimento epitelial, o qual pode eventualmente ser um ponto para o início de crescimento neoplásico.

Vejrosta et al. (1975)⁹² realizaram um estudo com 16 coelhos em cujas línguas foram provocadas feridas. Foi utilizado laser de rubi, de 694,3 nm, 10 mW de potência e densidade de energia de 0,5, 1 e 2 J/cm². A aplicação da radiação foi feita por uma única exposição das feridas ao laser. Os autores verificaram os efeitos da radiação sobre o processo de ferida e concluíram que histologicamente ocorria uma completa reparação da ferida aos 4 dias de pós-operatório, sendo que, na observação clínica, a cicatriz formada é bem menos evidente no grupo submetido ao laser, em média 90% dos casos. Concluíram também que a densidade de energia considerada ótima foi de 0,5 a 1,5 J/cm².

Kana et al. (1981)⁴² realizaram estudos para determinar se radiação de baixa potência poderia afetar a cicatrização de feridas em ratos, para tal avaliação usaram métodos descritivos, histológicos e

morfológicos. Utilizaram dois tipos de laser: laser de baixa potência de He-Ne, de 632,8 nm, 25 mW de potência e laser de Argônio de 514,5 nm de potência. Utilizaram aplicações diárias, durante 17 dias, com densidade energética de 4, 10 e 20 J/cm². Os resultados foram obtidos através de observações clínicas e documentação fotográfica além de dosagem de hidroxiprolina do tecido cicatricial, determinada no 18º dia de pós-operatório. Os resultados demonstraram que a radiação de He-Ne e Argônio provocou efeito estimulante sobre a síntese do colágeno, determinando um efeito máximo quando empregaram 4 J/cm² de energia. Esta ação estimulante do laser se mostrava maior no período de 3 a 12 dias e se caracteriza por fechamento mais rápido da ferida com elevada epitelização da área tratada. Estes fatos eram mais evidentes nas feridas tratadas com He-Ne. Quando as feridas foram submetidas a 20 J/cm² de potência, demonstravam ligeiro retardo do processo de reparação, porém, em nenhuma ferida tratada com laser, houve inibição completa da síntese de colágeno. O laser de Argônio estimulou a síntese de colágeno inclusive em feridas contra-laterais não irradiadas, fato não observado com o laser de He-Ne. Os autores acreditaram que esta observação possa ser um efeito fotobiológico próprio do comprimento de onda do emissor laser.

Surinchak et al. (1983)⁹⁰ estudaram os efeitos do laser de baixa potência de He-Ne no fechamento primário por contração de feridas

e a resistência dessas feridas à tração das bordas de incisão em coelhos. Dois estudos foram realizados para determinar o efeito da radiação laser em feridas de espessura total circulares em pele que fechou primariamente por contração. Dois estudos adicionais foram realizados para verificar os efeitos de diferentes energias de laser na resistência à tração em vários tempos pós-operatórios. O laser utilizado foi o de He-Ne de 50 mW de potência máxima e com comprimento de ondas de 632,8 nm. No estudo 1, foram realizadas incisões circulares de espessura total na região dorsal de 8 coelhos, lesões essas criadas uma de cada lado da linha sagital mediana do animal. As feridas experimentais receberam exposição por 30 minutos a cada 3 dias, totalizando uma dose de 1,1 J/cm². No estudo 2, 26 coelhos sofreram feridas como no estudo anterior, metade do grupo controle e experimental teve a crosta removida no terceiro dia e a exposição do laser foi duas vezes ao dia por 3 minutos, com potência de 50 mW, sendo que a dose energética foi de 2,2 J/cm². No estudo 3, foram realizadas incisões em dorso de ratos, suturadas por grampos. Essas lesões foram expostas a laser de He-Ne de 50 mW duas vezes ao dia por 3 minutos durante 14 dias. A dose foi de 2,2 J/cm² e a amostra das lesões foram colhidas no 14^o dia e avaliadas em relação à sua resistência e à tração. No estudo 4, os animais foram preparados, como no estudo 3, sendo que o grupo experimental recebeu exposição de 5 minutos duas vezes ao dia com laser de He-Ne de 50 mW, sendo que, em

cada exposição, os animais receberam dose de 4,5 J/cm² e no 14^o pós-operatório os animais foram sacrificados e a resistência à tração das lesões foram determinadas. Os autores obtiveram os seguintes resultados: no estudo 1 e 2, nenhuma diferença estatística foi notada no padrão de cicatrização entre o grupo controle e irradiado. No estudo 3 (2,2 J/cm²), demonstrou 55% de aumento da resistência à tração sobre o grupo controle até o 14^o dia de pós-operatório, reduzindo para 16% aos 28 dias. No estudo 4 (4,5 J/cm²), produziu um aumento não significativo, na faixa de 17%, na resistência à tração no 14^o dia pós-operatório. Os autores relataram a necessidade de mais estudos para definir quais seriam as condições de exposição ótima que resultasse em uma significativa aceleração da cicatrização de feridas.

Benedicenti (1983)⁷ estudou, em 32 ratos, o efeito do laser de 904 nm de comprimento de onda sobre a microcirculação capilar, venosa e arterial em mesentério de ratos. Observou que o laser promoveu aumento da velocidade do fluxo sanguíneo, além de promover elevada vasodilatação e redução no tempo de hemostasia em aproximadamente 10%.

Benedicenti & Licata (1983)⁹ estudaram o efeito bioestimulativo do laser de 904 nm de comprimento de onda, sobre 100 microorganismos unicelulares, o "Paramecium Aurélia", divididos em dois lotes: No lote A, com 50 microorganismos, foi irradiado, durante 4

minutos, com laser infravermelho de 904 nm, potência média de 30 mW, 6000 Hz de frequência. No lote B, também com 50 microorganismos, não houve tratamento com laser. Observaram que, no grupo tratado com laser, havia redução do tempo para o aparecimento de mitose em aproximadamente 98% dos microorganismos, ou seja, o tempo de divisão celular mostrava-se bem mais reduzido (8 horas), se comparado com o lote B (14 horas em média) que não sofreu tratamento com laser.

Benedicenti & Giovannoni (1983)⁸, em estudo contínuo ao trabalho de Benedicenti & Licata (1983)⁹, tomaram o lote A de "Paramecium Aurelia" que recebeu uma dose de radiação laser, e, conseqüentemente, após divisão celular, mostrava 100 microorganismos, subdividiram em dois grupos: No grupo 1, as amostras de 50 microorganismos foram irradiadas com laser novamente, de 904 nanômetros, por 10 minutos. O grupo 2 não foi submetido ao tratamento com laser. Observaram que havia uma aceleração na velocidade de mitose dos microorganismos ocorrendo em média 6 mitoses no período de 24 horas, ou seja, 1 mitose cada 4 horas, quando se aplicava o laser pela segunda vez. Concluíram também que o tratamento com o laser não provocou mutações nem alterações funcionais no "Paramecium Aurélia".

Passi et al. (1984)⁶³ não verificaram diferenças clínicas e histológicas significativas com o uso do laser de 904 nanômetros, de 15

mW de potência, aplicados diariamente, durante 6 dias, em mandíbulas de ratos, submetido à técnica do retalho de espessura total.

Hunter & Leonard (1984)³⁸, utilizando laser de baixa potência de He-Ne, realizaram estudo em porcos, a fim de avaliar o efeito do laser no processo de reparação de feridas abertas induzidas nestes animais. A frequência utilizada foi de 80 Hz, energia de 0,96 J/cm² e tempo de exposição de 15 segundos por dia, seguindo este protocolo de aplicação até que as feridas fossem consideradas clinicamente reparadas. Os resultados obtidos pelos autores foram favoráveis no grupo irradiado com laser, pois notou-se um processo de fechamento mais rápido nas feridas irradiadas, o que levou os autores à conclusão de que o laser promove uma aceleração no processo de reparação, e isso ocorria principalmente nos momentos iniciais do reparo. Os mesmos autores não puderam, contudo, demonstrar efeitos significativos em estágios mais avançados do processo.

Escola et al. (1985)²⁸ estudaram, através de microscopia eletrônica, os efeitos da radiação laser de He-Ne de 6 mW de potência sobre o tecido gengival humano. As aplicações de laser foram feitas em feridas de extrações dentais e tiveram duração de 1 minuto. Foi feita uma avaliação imediata e, 2 dias após a aplicação do laser, revelou-se um efeito benéfico da radiação na formação de colágeno e na vascularização da área, conseqüentemente promovendo uma reparação mais precoce e

com melhor qualidade. Foi observado também, um aumento no volume das mitocôndrias nos fibroblastos, o que resultaria numa produção maior de colágeno. Os autores acreditam que a ação imediata do laser sobre a vascularização, favorecendo a neoformação vascular, deve-se à degranulação de mastócitos no tecido gengival, processo este que levaria a uma liberação de mediadores químicos, principalmente histamina, capaz de promover uma vasodilatação na área e aumento da permeabilidade vascular, favorecendo, dessa maneira, a diapedese.

Re & Viterbo (1985)⁶⁸ citam os principais efeitos do laser de baixa potência. Dentre esses, destaca-se o aumento da proliferação fibroblástica, aumento da atividade fagocitária e a estimulação do metabolismo celular. Também comentam os efeitos sobre a vasodilatação periférica (capilar e arteriolar), ação antiedematosa e antiinflamatória, além de mostrarem ação antiálgico e antibacteriana. O efeito antiinflamatório e analgésico do laser de baixa potência foi explicado por Roccia, em artigo publicado em 1982, e citado por Re & Viterbo (1985). Este autor sugere que o laser, atuando sobre fibras amielínicas, gera impulsos que seguem para o hipotálamo via sistema nervoso autônomo e que, passando pela hipófise, promove a formação de Beta-lipoproteínas, elevando o índice do ACTH, com conseqüente aumento do nível dos corticóides, que terá ação antiinflamatória e aumento do nível de Beta-endorfina no sangue que promoverá um efeito analgésico.

Miotti et al. (1985)⁵⁷ estudaram a ação do laser com comprimento de onda de 904 nanômetros e 15 mW de potência, em feridas abertas bilaterais, em mandíbulas de 8 ratos e, em feridas cutâneas, realizadas em um grupo de 30 animais. A aplicação do laser teve duração de 1 minuto e foi feita diariamente durante 6 dias. Os resultados histológicos não mostraram diferenças entre as feridas mandibulares tratadas com laser daquelas que não receberam irradiação. Por outro lado, 84% das feridas cutâneas tratadas com laser tiveram o processo de reparação mais acelerado, sendo que este processo foi mais evidente no período entre 2º e 3º dias.

Schenck et al. (1985)⁸⁰, utilizando microscopia eletrônica, verificaram alterações do tecido gengival humano irradiado com laser de He-Ne com potência de 2 mW. Cento e vinte segundos, após a aplicação do laser, os autores relataram mudanças intracelulares nas células epiteliais sendo que, aumentado o tempo de exposição ao laser, estas modificações intracelulares tornaram-se mais evidentes. Concluíram que estas modificações causadas pela irradiação com laser de baixa potência sustentam a hipótese de que este tipo de luz estimularia diferentes sistemas celulares, levando a uma aceleração do processo reparacional.

Saperia et al. (1986)⁷⁹ realizaram estudos em que submeteram, à irradiação de laser de baixa potência de He-Ne de 632,8 nm de comprimento de onda, feridas abertas em pele de porcos para

verificar o seu processo de reparo frente à ação a esse tipo de laser. As aplicações foram realizadas durante 28 dias, 3 a 4 vezes por semana, sendo o tempo de exposição foi de 5 minutos, utilizaram potência de 1,5 mW. Verificaram uma aceleração do processo de reparação do grupo que recebeu tratamento com laser e, que neste mesmo grupo, nos intervalos de 17 a 28 dias, o nível de procolágeno tipo I e tipo III alcançaram altos níveis no tecido cicatricial.

Dyson & Young (1986)²⁷ investiram em camundongos, o efeito da terapia laser sobre feridas abertas, utilizando aparelho "Mid-laser" denominado "Mix-5" que apresenta, no seu interior, 5 lasers de He-Ne de comprimento de onda 632,8 nm, de emissão contínua, potência de pico de 6.5 mW e potência média de 4,5 mW; e 1 laser semiconductor de comprimento de onda de 904 nm potência de pico de 5 W, potência média de 0,2 mW e 0,4 mW e duração de pulso de 200 nanosegundos. As aplicações foram feitas utilizando-se frequências de pulso de 700 e 1.200 Hz, com tempo de exposição de 15 minutos ao dia. Os resultados obtidos através de biópsias realizadas diariamente até o final do experimento, que durou 11 dias, demonstraram que o laser de média potência "Mid-laser" interfere favoravelmente na reparação de feridas e que entre os grupos tratados com laser, existem diferenças entre as duas frequências empregadas, tanto na contração tecidual quanto na

quantidade total das células; sendo que os efeitos foram mais evidentes quando utilizaram frequência de 700 Hz.

Lyons et al. (1987)⁴⁹ estudaram a resistência à tração, o conteúdo colágeno e a avaliação histológica de feridas provocadas em camundongos e submetidas à ação do laser de baixa potência de He-Ne, de 632,8 nm de comprimento de onda e 300 segundos de exposição, com densidade energética de 1,22 J/cm², durante o período de 2 meses. Os resultados demonstraram, do ponto de vista clínico, que o processo de cicatrização foi igual em ambos os grupos. A epitelização mostrou-se igual nos dois grupos, na fase inicial do reparo, mas, na oitava semana, a cicatriz do grupo experimental era mais evidente; em relação à força de tensão, esta foi maior no grupo experimental na primeira e segunda semana, sendo que na terceira, quarta e oitava semana não houve diferença estatística entre os grupos. Portanto, o laser favoreceu a formação da cicatriz funcional, e as propriedades de tensão na oitava semana foram similares. Em relação à concentração de colágeno, esta foi significativamente aumentada na segunda e quarta semana, após a irradiação laser, demonstrando, dessa forma, o efeito benéfico de laser He-Ne no processo de reparação.

Chomette et al. (1987)²¹ realizaram estudo em 9 pacientes, nos quais utilizaram o laser de He-Ne, 632,8 nm de comprimento de onda, 6 mW de potência em tecido gengival. Após a

aplicação do laser, realizaram 72 biópsias nos intervalos de 5, 15 minutos 1 hora e 24 horas após a irradiação do laser. Um grupo permaneceu sem nenhum tratamento, sendo, portanto, mantido como grupo controle. Os autores observaram após 1 hora do tratamento laser, alterações na concentração do nível de enzimas dos fibroblastos, sendo que estas células apresentavam maior concentração de enzimas oxidativas, leucinas aminopeptidases, e teste elevadíssimo de RNA. Na microscopia eletrônica, os fibroblastos apresentavam-se com suas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso aumentados, e em maior número.

Chomette et al. (1987)²², utilizando o mesmo tipo de laser do experimento acima relatado (Laser de He-Ne, 632,8 nm, 6 mW de potência), estudaram o processo de reparação de tecido gengival em 14 pacientes. O tempo de exposição, nesse estudo, foi de 3 minutos e as biópsias realizadas 1, 8, 14 e 21 dias após a aplicação do laser. Observaram que a reparação do grupo tratado ocorreu de forma mais rápida (14 dias) enquanto no grupo controle, essa reparação levou 21 dias. Relataram que o processo de reparo submetido à irradiação laser é caracterizado por um aumento no número de novos vasos sanguíneos e pelo aumento de fibras colágenas, além do aumento da atividade enzimática dos fibroblastos. Relataram que, quando o processo de reparação é perturbado por um processo inflamatório mais agudo, o que geralmente promove a abertura da ferida, com uma conseqüente

formação de quelóide cicatricial, o laser poderia ser usado, trazendo efeitos positivos no processo de reparo.

Longo et al. (1987)⁴⁵ avaliaram os efeitos da aplicação do laser de diodo, de Arseneto de Gálio e Alumínio, de 804 nm, em feridas experimentais, utilizando diferentes frequências e comparando-o com a utilização de fitoestimulantes, que é um extrato vegetal conhecido por suas propriedades de ação sobre regeneração tecidual. A metodologia empregada utilizou grupos experimentais com 8 ratos cada um, com lesões provocadas na região dorsal dos animais. O grupo 1 foi o controle; o 2 recebeu tratamento somente com fitoestimulantes; o 3, laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (3000Hz, 10mW/cm², 5 minutos) , o 4 laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (1500Hz, 5mW/cm², 10 minutos). A densidade de potência usada foi de 3,6 W/cm²/ (3 J). O tratamento foi realizado durante 5 dias, sendo que os ratos foram sacrificados no quinto dia. Os resultados mostraram que os grupos 2 e 3 apresentaram significativa aceleração no processo de re-epitelização e cicatrização das feridas quando comparados com o grupo controle. No aspecto histológico, o grupo tratado com laser, grupo 3, teve o tempo de regeneração mais avançado, embora não possa ser observada uma completa re-epitelização, sendo que, abaixo do tecido epitelial, houve uma grande quantidade de tecido fibroblástico sem exsudato e/ou o processo inflamatório proliferativo. O grupo 4 (1500 Hz) mostrou o processo de reparo menos

avançado que o grupo 3, tanto histológico quanto macroscopicamente, em que foi observado o tecido fibroblástico deficiente e, nas camadas mais profundas, uma reação inflamatória exsudativa de menor intensidade. O Grupo 2 (fitoestimulante) mostrou a cicatrização em estágios ainda iniciais, sendo que o exame histológico revelou regeneração epitelial inicial nas bordas da ferida, abaixo do tecido epitelial exsudato inflamatório abundante com quase nenhum tecido fibroblástico. E o grupo controle mostrou um processo de reparo, na fase inicial, com evidente reação exsudativa tanto em camadas mais profundas quanto em camadas superficiais, sem evidências de regeneração epidermal ou tecido fibroblástico.

Anneroth et al. (1988)⁵ avaliaram o efeito do laser de baixa potência no processo de reparação de feridas abertas provocadas em ratos. Utilizaram 14 ratos sendo que cada rato recebeu duas feridas, realizadas por intermédio de um "punch", na região dorso-caudal, bilateralmente ao plano sagital mediano do animal. As lesões, de um lado, foram irradiadas com uma única exposição de 8 minutos de laser de Arseneto de Gálio com comprimento de onda de 904 nm, potência de saída de 0.5 mW, frequência de pulso de 500 Hz, com duração de pulso de 200 nanosegundos. As feridas contralaterais não receberam nenhuma aplicação de laser (Grupo controle). A ponta da fibra ótica distanciou-se 5 mm da superfície das feridas. Cada lesão foi examinada diariamente, tanto

macroscopicamente como histologicamente. Os autores não observaram diferenças significativas entre os dois grupos ao exame clínico, cujos parâmetros analisados foram: sinais de sangramento, infecção, formação e perda de crosta e formação epitelial. Foi observada a formação de crosta em 13 ratos cuja perda ocorreu entre os dias 6 e 12. Histologicamente também não houve diferenças entre os grupos e os sinais de inflamação mostraram-se iguais nas feridas irradiadas e não irradiadas. Este trabalho, portanto, não confirmou que o uso do laser de baixa potência infravermelho promove a estimulação do processo de cicatrização de feridas.

Strang et al. (1988)⁸⁹ apresentam detalhada revisão enfocando a utilização de laser de baixa potência na área odontologia. Neste artigo, os autores se referem ao feixe de luz produzido pelos aparelhos, como aqueles que apresentam as seguintes características principais: feixe de luz altamente colimado, monocromático e coerente. Citam também, que o efeito da radiação laser sobre o tecido depende primariamente do comprimento de onda empregado, da energia depositada por unidade de área do tecido e do tempo de exposição, sendo que os comprimentos de ondas menores que 450 nm geram efeitos predominantemente fotoquímicos. Os autores discorrem sobre a capacidade da utilização dos lasers de baixa potência na aceleração nos processos de reparo tecidual, concluindo que as variações de efeitos

registradas nos estudos sobre este tipo de terapia são decorrentes da variabilidade de protocolos usados em situações clínicas e experimentais, o que causa incertezas sobre o verdadeiro potencial benéfico do laser na reparação de feridas.

Braverman et al. (1989)¹² realizaram estudos para verificar os efeitos de bioestimulação da irradiação de laser de He-Ne de 632,8 nm e do laser infravermelho de 904 nm sobre o processo de reparo de feridas, em pele de dorso de 72 coelhos, sendo estes divididos aleatoriamente em 4 grupos: 1) não irradiados; 2) irradiados com laser de He-Ne com 1,65 J/cm²; 3) laser infravermelho pulsado com 8,25 J/cm²; 4) irradiados com ambos os lasers. Os animais foram irradiados diariamente por 21 dias e as medidas das feridas foram feitas a partir de fotografias em intervalos periódicos. Os autores encontraram diferenças significativas entre os grupos irradiados e o grupo controle em relação à resistência do tecido cicatricial e a forças de tração, sendo que esta diferença também foi observada nas feridas não irradiadas contralaterais, que receberam irradiação no mesmo animal. Tal fato levou os pesquisadores a conclusão de que é possível que os lasers utilizados possam provocar um estímulo na liberação de fatores teciduais para dentro da circulação sistêmica, fato este que explicaria o porquê de as feridas irradiadas e não irradiadas de um mesmo animal terem a sua resistência à tração aumentada em relação ao grupo controle. Histologicamente, quase nenhuma diferença foi

encontrada no padrão final da cicatrização ou na área de tecido colágeno, sendo o crescimento da área epidermal irradiada com laser de He-Ne maior do que a região não irradiada, mesmo esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Soares et al. (1989)⁸⁵ avaliaram a reparação tecidual das feridas cutâneas abertas provocadas de ratos e submetidas à irradiação com o laser de He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm, potência de 4 mW, na dose diária de 2,7 J/cm² durante 10 minutos, iniciando-se as aplicações logo após a realização das lesões. Os resultados obtidos, do ponto de morfológico e histométrico, possibilitaram concluir que a reparação tecidual evoluiu de forma mais rápida nas feridas irradiadas e em todas as fases de observação quando comparadas com as do Grupo controle, sendo a proporção de fibroblastos, no grupo irradiado com laser, significativamente maior no 7^o dia, menor no décimo quarto dia e sem diferença significativa no vigésimo primeiro dia em relação ao grupo controle. A proporção de fibras colágenas, no grupo irradiado com laser, foi significativamente maior nos 7, 14 e 21 dias de reparação quando comparada ao grupo controle.

Basford (1989)⁶ relatou que os resultados dos efeitos fotobiológicos são percebidos de forma mais intensa e com maior previsibilidade, em modelos experimentais, utilizando culturas de células. Os efeitos "in vivo", principalmente em humanos, ainda são muito

contraditórios e, segundo o autor, isto se deve pelo fato de a irradiação interagir mais com as células do que com o tecido, o que dificultaria uma maior penetração do feixe de laser. A conclusão foi de que o uso da terapia com laser de baixa potência, ainda não poderia substituir outras terapias já bem conceituadas no que diz respeito às técnicas de estimulação de feridas em processo de reparo.

Schneider et al. (1990)⁸³ realizaram estudos em fibroblastos gengivais humanos em estágios iniciais de culturas celulares. Para tal, submeteram-nos à aplicação de laser de He-Ne, com comprimento de onda de 632,8 nm, com potência de 10 mW, e tempo de aplicação de 10 minutos, com energia de 1,2 J/cm². Quatro grupos foram avaliados: Grupo controle, no qual não recebeu tratamento com laser; e os demais grupos receberam exposição do laser, 1, 2 e 3 vezes. O experimento durou 14 dias, sendo que o grupo que recebeu uma aplicação teve um crescimento de fibroblastos de forma transitória. O grupo, no qual as células receberam duas exposições, teve uma estimulação maior no crescimento dos fibroblastos e o grupo, com três exposições, teve um significativo aumento na multiplicação dos fibroblastos em aproximadamente duas vezes a mais que do grupo que recebeu apenas uma aplicação.

Hass et al. (1990)³⁷ estudaram o efeito bioestimulatório da irradiação do laser de He-Ne sobre o aumento da proliferação e motilidade

de queratinócitos humanos. Para estudar o efeito do laser sobre a motilidade, irradiou cultura de queratinócitos com $0,8 \text{ J/cm}^2$. Fazendo três aplicações em um período de 20 horas, utilizou a técnica de videocinemasocopia com medida seqüencial quantitativa da borda principal da cultura de queratinócitos, obteve, após 20 horas da irradiação, um resultado que mostrou significativa diferença na migração da amostra irradiada. Em média a amostra irradiada migrou $12 \mu\text{m/h}$, enquanto que a não irradiada migrou $4 \mu\text{m/h}$. Para o estudo da proliferação de queratinócitos, a cultura foi irradiada com doses simples ou múltiplas de diferentes intensidades ($0,4$ a $7,2 \text{ J/cm}^2$) e avaliada 72 horas após a irradiação. Tanto a cultura irradiada quanto a não irradiada não apresentaram diferenças significativas na proliferação de queratinócitos em nenhuma das aplicações realizadas. O autor concluiu, portanto, que o efeito bioestimulativo da irradiação de laser de He-Ne poderia ser ampliada incluindo o aumento da motilidade dos queratinócitos "in vitro".

Rood et al. (1992)⁷² utilizaram o laser de baixa intensidade de He-Ne a fim de verificar possíveis alterações na diferenciação de queratinócitos humanos normais. Os autores irradiaram culturas subconfluentes de queratinócitos em três tempos diferentes, dentro de um período de 24 horas, utilizando intensidade de energia de $0,8$, 3 e $7,2 \text{ J/cm}^2$. Observaram que não houve alterações nos parâmetros analisados (crescimento, diferenciação celular, número de

células, formação de grânulos citoplasmáticos, atividade transglutaminase) entre os grupos irradiados e não irradiados. O grupo irradiado com 7,2 J/cm² não obteve sua síntese de queratina alterada quando comparado com controle, quando comparado ao controle. Concluíram que a irradiação de baixa intensidade aumenta a migração de queratinócitos, promovendo uma cicatrização da ferida, sem alterar a integridade ou a função da epiderme, que migraria para cobrir a área ferida.

Rezvani et al. (1992)⁷⁰ realizaram estudo para verificar os benefícios da terapia com laser na prevenção de necrose dérmica tardia em pele de porco. Após aplicação de alta dose de raio X (dose de 23,4 Gy de raio-X) havendo o desenvolvimento de 100% de necroses dérmicas após 10 a 16 semanas de irradiação. Nesses locais, após a irradiação X, a região foi submetida ao tratamento com laser de Arseneto de Gálio e Alumínio com múltiplos comprimentos de onda (660, 820, 880 e 950 nm), com três exposições por semana a partir da 4^a a 10^a semana ou da 6^a a 16^a após o momento da irradiação X, sendo que os locais foram expostos à luz pulsada de 2,5 Hz ou 5 kHz. A densidade de energia usada com luz pulsada de 5 kHz foi de 0,22, 0,54, 1,08, 2,16, 4,32 e 10,8 J/cm². O tratamento com luz pulsada de 2,5 Hz aplicado, a partir da 6^a a 10^a semana ou o tratamento de 5 kHz (a partir da 4^a a 10^a da irradiação) não tiveram um efeito significativo na incidência ou na latência no desenvolvimento de necrose dérmica isquêmica, independentemente do

tempo de exposição de cada tratamento. Com a luz pulsada de 5 kHz, nenhum efeito foi observado, contudo, a incidência de necrose dérmica foi significativamente reduzida (52%) nos campos irradiados, que receberam tratamento com luz de 5 kHz, a partir da 6^a a 16^a semana, após irradiação. O tratamento com luz, por somente três dias, imediatamente após a irradiação X, com luz de 5 kHz, nenhum efeito benéfico foi observado. Os autores concluíram, portanto, que o laser quando aplicado apropriadamente, no tempo ideal, no momento certo e com a intensidade de energia correta, poderia ser útil na prevenção de lesões dérmicas tardias induzida por raio-X.

Nemeth (1993)⁶⁰ relatou que o uso da terapia do laser de baixa potência era discutível até aquela data, sendo visto ainda com certo grau de ceticismo. Relatou também que os tecidos irradiados com laser de baixa potência reagem diferentemente do que quando recebem laser de alta potência, não apresentando efeitos biológicos atribuídos à elevação de altas temperaturas; na verdade, as variações dessa modalidade de terapia de baixa potência levariam a variações de 0,1 a 0,5° C. Relata, ainda, que o estudo da terapia do laser de baixa potência são objetos de considerável controvérsia principalmente quando se considera o tempo de exposição, diferentes tipos de fontes de laser que incluem He-Ne, Arseneto de Gálio, e a forma como eles são usados (diferentes comprimentos de onda, doses, técnicas, modelos de estudo). Em relação

a experimentos “*in vivo*” o autor relata que as pesquisas feitas em animais, como ratos e coelhos, mostraram resultados benéficos no processo de reparo, porém, quando as pesquisas são feitas em animais que guardam uma semelhança de pele mais próxima à humana, os resultados parecem ser nulos. O autor ainda se refere ao mecanismo que o laser poderia afetar na estimulação do reparo de feridas no aspecto celular (fagocitoses por leucócitos, estimulação de colágenos e procolágenos tipo I e III, aumento de células aderentes com afinidade com o fibroblasto).

Bisht et al. (1994)¹⁰ estudaram o efeito bioestimulativo da radiação laser com vários parâmetros no processo de cicatrização, avaliando o padrão de fechamento da ferida e tensão cicatricial em feridas abertas na pele de ratos, os quais receberam duas lesões no dorso criados por um “punch” de forma circular com diâmetro de 8 mm. Cada lesão foi feita bilateralmente ao plano sagital mediano, sendo que as feridas do lado direito foram mantidas como controle e as do esquerdo irradiadas diariamente por 17 dias, com intensidade de energia de 4 J/cm² e tempo de exposição de 5 minutos. Foram realizados estudos macroscópicos e histológicos e o total de colágeno na cicatriz foi estimado no 17^o dia pós-operatório, através de dosagem de hidroxiprolina. Na avaliação histológica, foram observadas infiltração leucocitária, neovascularização, proliferação fibroblástica, epitelização e colagenização. As observações

macroscópicas mostraram que o grupo teste apresentou um menor tempo no fechamento da ferida e, essa diferença, foi devido à rápida e à prematura epitelização. Histologicamente as feridas irradiadas mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle, no que diz respeito à infiltração leucocitária, à neovascularização e à proliferação fibroblástica até o 9º dia, o que mostra tecido de granulação mais abundante nas feridas experimentais, durante o período inicial de cicatrização. O estudo mostra que não houve nenhuma diferença significativa nas feridas experimentais e controles a partir do 12º dia, exceto na colagenização e na proliferação fibroblástica. O estudo qualitativo e quantitativo de colágeno, no 17º dia, mostrou uma significativa diferença entre o grupo experimental e de controle, sendo que a quantidade de hidroxiprolina, nas feridas experimentais, foi significativamente maior que no controle, sugerindo um tecido cicatricial mais forte no grupo tratado com laser. O aumento da hidroxiprolina indiretamente mostra uma ampliação da atividade metabólica de fibroblastos e, portanto, aumento da produção de colágeno.

Garcia et al. (1996)³⁵ analisaram histologicamente o reparo de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos submetidas à irradiação laser de Arsênio e Gálio, infravermelho de emissão pulsada, com 904 nm de comprimento de onda e potência média de emissão ajustável entre 0,5 e 3,5 mW, com frequência de repetição

ajustável entre 500 e 3700 W. As feridas provocadas no dorso, do lado esquerdo do animal, foram consideradas do grupo controle ficando sem tratamento, enquanto que as do lado direito, foram denominadas experimentais. As aplicações foram feitas diretamente sobre as feridas em 8 localizações distintas. As feridas experimentais foram irradiadas imediatamente com o laser na frequência de 2100 Hz, potência de 2 mW, sendo 12 segundos de aplicação por ponto, totalizando um tempo de exposição de 108 segundos, o que leva a uma deposição de energia de 3 J/cm². Os sacrifícios dos animais foram realizados no 3^o, 7^o e 14^o dia. Os autores concluíram que as feridas experimentais (laser) mostraram uma reparação mais evoluída do que as do grupo controle, com uma elevada taxa de migração epitelial e acentuada proliferação fibroblástica e vascular. Os eventos biológicos observados foram mais evidentes no 3^o e 7^o dia, e a evolução do quadro agudo para o crônico ocorreu de forma mais rápida.

Yu et al. (1996)⁹⁷ elaboraram um experimento, utilizando laser de baixa potência de He-Ne, para verificar se este tipo de irradiação estimularia a liberação de interleucina 1- α e interleucina 8 em cultura de queratinócitos humanos, submetidas a densidades energéticas de 0,5, 1,0 e 1,5 J/cm². O resultado revelou um significativo aumento na produção de interleucina 1- α e interleucina 8 e suas respectivas expressões no mRNA no grupo tratado com laser de He-Ne, quando **comparado ao grupo**

controle não irradiado, sendo esta produção maior sob irradiação de 1,5 J/cm², mostrando que este tratamento é dose-dependente. Este estudo demonstrou também a evidência de que este tipo de irradiação poderia agir no aspecto celular e molecular, desencadeando uma ação citoquímica, através da liberação das interleucinas citadas, as quais estimulariam a motilidade e a proliferação de queratinócitos, aumentando o processo de cicatrização de feridas.

Cambier et al. (1996)¹⁵ avaliaram o laser de baixa potência na cicatrização de feridas retardadas (queimaduras) em pele de dorso de ratos. Foram utilizados dois tipos de lasers, um grupo com 10 animais foi tratado com laser de He-Ne e o outro grupo, igualmente formado, foi tratado com laser de Arseneto de Gálio. Cada animal recebeu duas feridas, sendo uma irradiada 5 vezes por semana durante 6 semanas e a outra servindo de controle. O grupo I (He-Ne) recebeu uma dose de 0,750 J/cm² e o grupo II (Arseneto de Gálio), 0,210 J/cm². O diâmetro das feridas foram medidas nos dias 1, 10, 20, 30 e 42. Não foi possível observar nenhum efeito estimulatório na cicatrização da ferida em ambos os grupos quando comparados com as feridas controles, sendo que o grupo I, no dia 20, apresentou uma diferença estatisticamente pequena em comparação às feridas controle, porém, no contexto geral do processo cicatricial, tal diferença foi irrelevante.

Conlan et al. (1996)²⁴, apresentaram revisão mostrando os estudos que enfatizam os princípios básicos da bioestimulação, na cicatrização de feridas, por vários lasers de baixa energia. Na revisão, os autores apresentam o mecanismo de ação da bioestimulação em relação ao efeito do laser sobre a proliferação celular, sobre a síntese de colágeno e sobre a migração dos queratinócitos. Chamam também a atenção que o modelo experimental “*in vivo*” e “*in vitro*” assim como os valores referentes ao tempo de irradiação, à densidade de energia e ao comprimento de ondas, são importantes na avaliação do grau de bioestimulação verificada com a utilização do laser de baixa energia.

Yamamoto et al. (1996)⁹⁶, usando laser de He-Ne com comprimento de onda de 632,8 nm e potência de saída de 8,5 mW, estudaram “*in vitro*”, o efeito da irradiação sobre a síntese de procolágeno em fibroblastos humanos. O efeito positivo do laser de baixa potencia foi observado no meio contendo soro pobre em nutrientes, com um aumento na síntese de procolágeno de 50% (com irradiação de 3 minutos.), enquanto que, no meio contendo soro de feto de bezerro (FCS), não houve alteração significativa. Neste mesmo experimento, os autores usaram dexametosona e azul de metileno nos meios de culturas por serem inibidores conhecidos da produção de procolágeno no nível pre-translacional da síntese do RNAm, e processo mediado pelo cGMP respectivamente. O efeito do laser não foi bloqueado pela dexametosona

(3% inibição), mas foi bloqueado pelo azul de metileno (40% inibição). Os dados, em virtude disso, sugerem que alguns fatores em FCS poderiam interferir, com o aumento do efeito do laser, sobre a síntese de procolágeno e poderiam agir como um estimulador direto da síntese de procolágeno. Parece provável que o efeito aumentado do laser poderia ocorrer no nível translacional ou pré-translacional, o qual não é afetado pela dexametasona e cGMP, ou ainda poderia estar envolvido na síntese de procolágeno em fibroblastos.

Allendorf et al. (1997)³ utilizando irradiação com laser de He-Ne com densidade de energia de 1,2 e 4 J/cm², estudaram, em dois diferentes modelos experimentais em ratos, o mecanismo de bioestimulação de feridas, avaliando, em um dos modelos, a contração da ferida e, no outro, a resistência à tração dos tecidos em cicatrização irradiados. O laser de He-Ne, no modo contínuo, foi utilizado com potência de saída de 4 mW e luz coerente com comprimento de onda de 632,8 nm. Os autores não obtiveram resultados que mostrassem efeito benéfico do laser no processo de bioestimulação da ferida quando compararam os grupos experimentais com os controles.

Lowe et al. (1998)⁴⁶, utilizando laser de Arseneto de Gálio e Alumínio (GaAlAs) com comprimento de onda de 890 nm, frequência de 270 Hz e potência máxima de saída de 300 mW, estudaram o efeito da terapia do laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas na pele de

camundongos, feridas estas provocadas por radiação X de 20 Gy. Os grupos experimentais receberam aplicação de laser 3 vezes por semana, com diferentes densidades de energia (0,18 , 0,54 , 1,45 J/cm²) sendo que estas aplicações foram feitas 72 horas após os animais serem submetidos à radiação X (área irradiada foi na região dorsal dos animais). A irradiação com Raio-X, provocou atraso significativo na cicatrização das feridas; nos grupos irradiados com laser, utilizando-se 0,18 J/cm² e 0,54 J/cm², observaram que não houve efeito sobre a cicatrização da ferida. Porém, utilizando-se da irradiação laser com 1,45 J/cm², perceberam uma significativa inibição do processo cicatricial, demonstrando, dessa forma, o efeito estimulatório putativo da radiação laser *in vivo*, revelando também o efeito inibitório potencial nas exposições à alta irradiação.

Bisht et al. (1999)¹¹ avaliaram os efeitos bioestimulatórios da radiação laser de baixa intensidade na cicatrização de feridas em pele de ratos. Para este estudo, utilizaram laser de He-Ne com densidade de energia de 4 J/cm² aplicados diariamente por um tempo de 5 minutos. As feridas produzidas com incisões lineares foram em número de duas, na região dorsal de ratos e posicionada bilateralmente à linha média, sendo imediatamente suturadas. As feridas do grupo controle fecharam com 7 dias, enquanto as do grupo experimental levaram 5 dias para cicatrizar, a resistência tração, a epitelização mais precoce, a reação fibroblástica mais

acentuada, a infiltração leucocitária e neovascularização também foram mais evidentes nas feridas irradiadas.

Lucroy et al. (1999)⁴⁸ descreveram o uso do laser de baixa intensidade no tratamento de uma ferida crônica, por retalho total na pele de cães. As feridas foram irradiadas no animal acordado, utilizando laser de Argônio de 630 nm de luz vermelha térmica. As irradiações foram feitas uma vez por dia, durante 4 dias consecutivos e, as mudanças correspondentes às áreas da superfície das feridas foram medidas por análise computadorizada de imagens digitais. Os autores observaram que as feridas diminuíram em tamanho, durante o curso do tratamento com o laser, estando completamente cicatrizadas aos 21 dias, sem nenhuma complicação pós-operatória, concluindo, então, que os lasers de baixa intensidade poderiam ser usados no tratamento de feridas crônicas.

Walker et al. (2000)⁹⁴ estudaram o efeito da irradiação laser com vários tempos de exposição no processo de cicatrização, na pele de camundongos. Este estudo incluiu duas fases, sendo que, na fase 1, 36 ratos foram aleatoriamente separados em três grupos experimentais, portanto 12 ratos em cada grupo. Todos os grupos tiveram uma área bem definida no dorso, exposta a raio-X de 20 Gy. Setenta e duas horas após a irradiação, foram feitas feridas no dorso dos animais, sendo que todas as feridas foram filmadas 3 vezes por semana até o seu fechamento total. Os grupos 2 e 3 foram tratados com irradiação laser de 0,5 e 1,5 J/cm²

respectivamente 3 vezes por semana. O laser utilizado foi de Arseneto de Gálio e Alumínio, com comprimento de onda de 660 nm, 5 kHz, potência de 15 mW. Na fase 2 do experimento, dois grupos experimentais foram incluídos, cada grupo com 12 animais, e um protocolo idêntico descrito na fase 1 foi realizado. Os ratos do grupo 2 dessa fase foram tratados com uma exposição de 4 J/cm². Os resultados demonstraram que o tratamento com 0,5 , 1,5 e 4 J/cm² não mostrou efeitos benéficos no padrão de fechamento da ferida, concluindo que os achados mostraram poucas evidências no efeito estimulatório da terapia de laser de baixa intensidade “*in vivo*” nos parâmetros investigados.

Amir et al. (2000)⁴ estudaram a influência da irradiação de laser de He-Ne na viabilidade de retalhos de pele de rato utilizando uma energia total de 2.9 J/cm², e uma frequência de aplicação de cinco dias do pós-operatório. Este estudo demonstrou que, nos grupos irradiados com laser de baixa potência, a sobrevivência do retalho frente a problemas isquêmicos foi maior do que no grupo controle. O exame histológico mostrou grande proliferação de capilares e fibroblastos nas áreas irradiadas.

Schlager et al. (2000)⁸² estudaram a cicatrização de queimaduras provocadas no dorso de ratos e tratadas com laser de baixa intensidade de 670 nm de comprimento de onda. Uma das feridas foi irradiada com laser com a densidade de energia de 2 J/cm², enquanto a

outra ferida, no outro lado, não foi tratada. Avaliações macroscópicas das feridas foram tomadas diariamente no 10^o, 20^o e 30^o dia. Dez animais por tempo pós-operatório foram sacrificados e as feridas avaliadas histologicamente. Os resultados obtidos tanto histologicamente quanto macroscopicamente não mostraram nenhum efeito benéfico desse tipo de aplicação do laser no processo de cicatrização de feridas retardadas, quando comparado ao grupo controle.

Schlager et al. (2000)⁸¹ avaliaram o uso de laser diodo com 635 nm e 690 nm de comprimento de onda sobre o processo de cicatrização de queimaduras provocadas em dorso de ratos. O experimento envolveu 30 ratos, divididos em três grupos: Grupo A – controle (sem nenhum tratamento); Grupo B – uma das duas feridas irradiadas com 690 nm e outra servindo como controle (intensidade de energia 1,5 J/cm², potência máxima do laser 30mw); Grupo C – uma das feridas irradiadas com 635 nm e a outra servindo como controle (potência máxima 12 mW, densidade de energia 1,5 J/cm²). As irradiações foram feitas imediatamente após a indução das feridas (queimaduras), continuando diariamente por um período de 30 dias. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa no diâmetro da ferida no primeiro dia, sendo que só foi possível observar o fechamento da ferida a partir do sexto dia e, mesmo assim, não houve diferenças significantes entre o grupo laser e o controle. Em relação ao grau de edema e vermelhidão,

não ocorreram diferenças dentro do próprio grupo e entre os grupos. O tratamento com laser, segundo os autores, não proporcionou, portanto, nenhuma influência visível nos ratos.

Stadler et al. (2001)⁸⁷ investigaram o efeito da irradiação laser de baixa potência sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas, em camundongos diabéticos. As feridas foram irradiadas com laser de 830 nm de comprimento de onda, com 79 mW/cm² e densidade de energia de 5,0 J/cm². Os resultados obtidos demonstraram que o efeito positivo do laser varia de acordo com o período em que foi realizado o tratamento (se 0 a 4 ou 3 a 7 dias após a confecções das feridas). Após o 11^o dia, houve um aumento significativo da resistência à tração nas feridas irradiadas com o laser em comparação às do grupo controle, não havendo diferença significativa quanto à resistência à tração aos 21 dias.

Capon et al. (2001)¹⁶ estudaram a utilização de laser diodo de 815 nm no processo de reparação visando à aceleração no fechamento da ferida e melhora no nível de cicatrização. Foram utilizados, para este estudo, um total de 25 ratos, com quatro incisões de pele na área dorsal, sendo que cada ferida teve uma boa coaptação das bordas com sutura absorvível. Duas incisões receberam aplicação de laser com os seguintes parâmetros: 1,5 W, 3 segundos, diâmetro do "spot" de 3 mm, densidade de energia de 145 J/cm². Ambas feridas do grupo controle foram fechadas com técnica de sutura convencional, a duração do

fechamento de cada ferida foi notada para cada grupo. Os resultados foram obtidos a partir de exames clínicos, estudos histológicos e medidas da força de tração que foram feitas no dia 3, 7, 15 e 21, após a cirurgia. Também foi determinada a ativação de proteínas inflamatórias HSP70, através de exames imunocitoquímicos realizados nos dias 1 e 7. Como resultado, observaram que este tipo de terapia a laser acelerou o processo de fechamento da ferida em quatro vezes em relação à sutura convencional e, que no grupo do laser, a cicatrização foi acelerada resultando em cicatriz mais discreta do que no grupo controle. Em relação aos aspectos histológicos, os resultados obtidos foram os melhores com uma reparação tanto no nível dérmico como no epidérmico mais precoce. Em relação à força de tração, o grupo irradiado foi de 30 a 58% maior do que o grupo controle, no dia 7 e 15, e a expressão de HSP70 foi marcadamente notada nas estruturas da pele examinadas após a exposição a laser. Este trabalho mostrou, portanto, a habilidade do laser de diodo de 815 nm em acelerar o fechamento da ferida e promover uma melhora do processo de cicatrização de feridas, porém os autores afirmam que os mecanismos de tais fenômenos não estão ainda totalmente esclarecidos.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, constitui propósito do presente estudo avaliar do ponto de vista biométrico e histológico, em feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos, a influência da associação de dois diferentes comprimentos de onda de emissores lasers em baixa intensidade (685 e 780 nm) sobre os eventos da reparação tecidual.

4. MATERIAL E MÉTODO

4. MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – (CEEA), da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (**Anexo 1**).

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) machos, com peso médio variando de 160 e 220 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia do “Campus” de Araçatuba, UNESP. Os animais apresentavam condições de saúde adequada para serem submetidos aos experimentos propostos, foram mantidos em gaiolas individuais e tratados com ração e água “*ad libitum*”, antes e durante o período experimental.

Após a anestesia geral, com Ketamina (Francotar[®] Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda, Roseira, São Paulo), aplicada por via intramuscular na dosagem de 0,2 ml/kg de peso corporal do animal os ratos foram tricotomizados na porção média da região dorsal. Nesta área, com o auxílio de um “PUNCH” de aproximadamente 8 milímetros de diâmetro foi removido um fragmento circular de pele de cada animal (FIGURA 1).



FIGURA 1 – Fragmento circular de pele em dorso de rato realizado com auxílio de um "PUNCH"

A seguir, os animais foram divididos em 3 Grupos, de 24 animais cada um, (Quadro I), que receberam os seguintes tratamentos:

Nos animais do *Grupo I* ($n=24$), também chamado de Grupo Controle, as feridas não receberam nenhum tipo de tratamento.

Nos do *Grupo II* ($n=24$), as feridas foram submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade, com comprimentos de onda de 685 nm.

Nos do *Grupo III* ($n=24$), as feridas foram submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade, com comprimento de onda de 685 nm e a seguir, submetidas à aplicação do laser de 780 nm.

O equipamento laser utilizado no presente estudo foi o laser de diodo semiconductor de Arseneto de Gálio (LASER BEAM 500, Rio de Janeiro, Brasil) (FIGURA 2) com comprimento de onda de 685 nm

(visível) e 780 nm (infravermelho), diâmetro do spot de saída de 2 mm² e potência de saída 50 mW, com modo de aplicação contínuo ou interrompido.

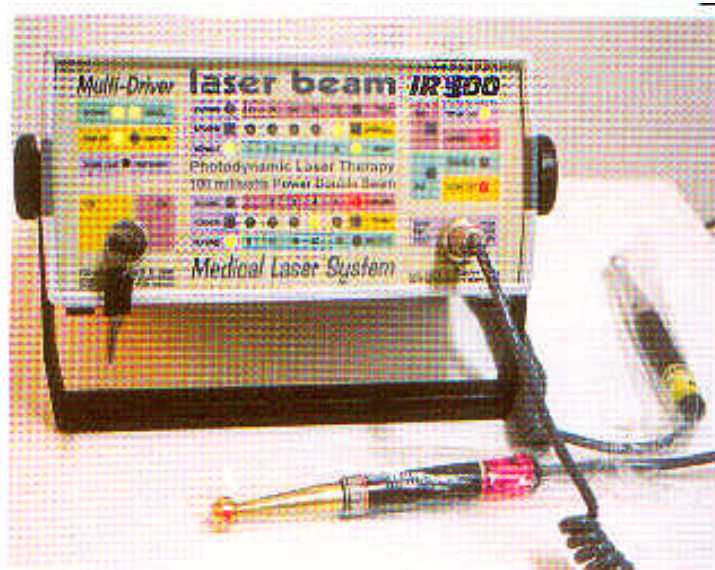


FIGURA 2 – Aparelho Laser de Baixa Potência
LASER BEAM 500

Nas feridas dos animais do Grupo II, o laser com comprimento de onda de 685 nm foi aplicado, no modo contínuo, de forma pontual, em contato com a ferida, durante 80 segundos, totalizando uma densidade de energia de 200 J/cm².

Nas feridas dos animais do Grupo III, o laser com comprimento de onda de 685 nm foi aplicado no modo contínuo, de forma pontual, em contato com a ferida, durante 40 segundos, totalizando uma densidade de energia de 100 J/cm^2 e, imediatamente após, foram submetidas também à aplicação do laser de comprimento de onda de 780 nm, no modo contínuo, de forma pontual (FIGURA 3), em contato com a ferida, durante 40 segundos, totalizando uma densidade de energia de 100 J/cm^2 .

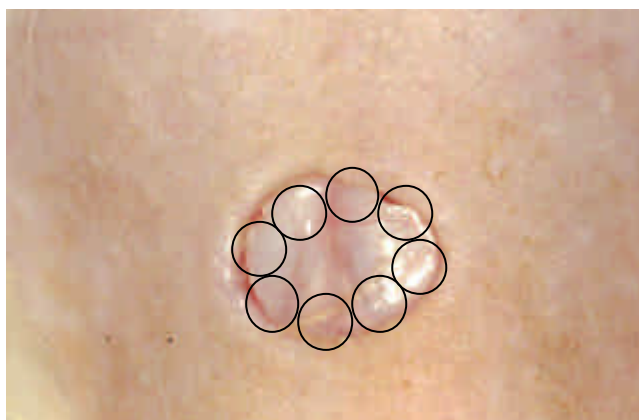


FIGURA 3 – Aplicação pontual do laser em contato, com tempos equivalentes de aplicação em cada área

Para a análise biométrica, todas as feridas dos Grupos I, II e III, imediatamente após a sua execução e nos períodos de 3, 7 e 14 dias

de pós-operatório, foram medidas o seu diâmetro no sentido transversal ao plano sagital mediano, realizado por intermédio de um paquímetro digital (STARRET® - São Paulo, Brasil) e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. Após obtidas as médias e os desvios-padrão dos Grupos I, II e III, nos períodos de 0, 3, 7 e 14 dias, os dados mensurados foram avaliados através do procedimento estatístico multivariado de análise de perfil para grupos independentes (Morrison, 1976)⁵⁹ através do programa computacional Perfil (Rosa, 1994)⁷³.

Decorridos 3, 7 e 14 dias do ato cirúrgico e pós-aplicação do laser, os animais, em número de 8 para cada grupo, foram sacrificados por inalação excessiva de éter sulfúrico. A biópsia foi cuidadosamente obtida, de tal forma que se envolvesse parte da pele adjacente às bordas da ferida e do tecido cicatricial em sua profundidade. As peças obtidas permaneceram em formalina a 10% por um período mínimo de 24 horas. A seguir, sofreram o trâmite laboratorial de rotina e, foram incluídas em parafina, orientadas de forma a permitir a realização de cortes transversais, semi-seriados com 6 micrômetros de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson para a análise histológica.

Quadro I – Distribuição dos animais segundo grupos e tempos operatórios.

	3 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
Grupo I (Controle)	8 animais	8 animais	8 animais
Grupo II (Laser 685 nm)	8 animais	8 animais	8 animais
Grupo III (Laser 685 + Laser 780 nm)	8 animais	8 animais	8 animais

5. RESULTADO

5. RESULTADO

5.1. RESULTADO BIOMÉTRICO

A Tabela 1 representa a média e desvios-padrão das medidas das feridas obtidas imediatamente a sua execução e no período de 3 dias pós-operatório nos Grupos I, II e III. Na análise dos resultados estatísticos, através da análise multivariada de perfis, pôde-se verificar que não houve diferenças biométricas estatisticamente significantes entre os Grupos I, II e III no período de 3 dias ($p > 0,05$), entretanto houve uma diferença estatisticamente significativa na redução do diâmetro da ferida entre os períodos de 0 e 3 dias ($p < 0,01$) (Tabela 2, Figura 4).

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão do Grupo – 3 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 3 dias, segundo os Grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm

Grupo	Momentos	
	Hora	3 dias
Controle	10,81 ± 0,77	8,61 ± 0,57
Laser 685 nm	11,01 ± 1,27	8,30 ± 1,40
Laser 685+780 nm	11,35 ± 0,95	8,56 ± 0,77

Tabela 2 - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 3 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 3 dias, segundo os Grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII)

Hipótese estatística	Resultado do teste estatístico (nível descritivo)	Conclusão
Paralelismo entre os perfis	F = 2,91 (p > 0,05)	Existe semelhança entre os perfis.
Coincidência entre os perfis	F = 0,21 (p > 0,05)	GI = GII = GIII
Efeito do momento	F = 556,46 (p < 0,01)	0 hora > 3 dias para os grupos

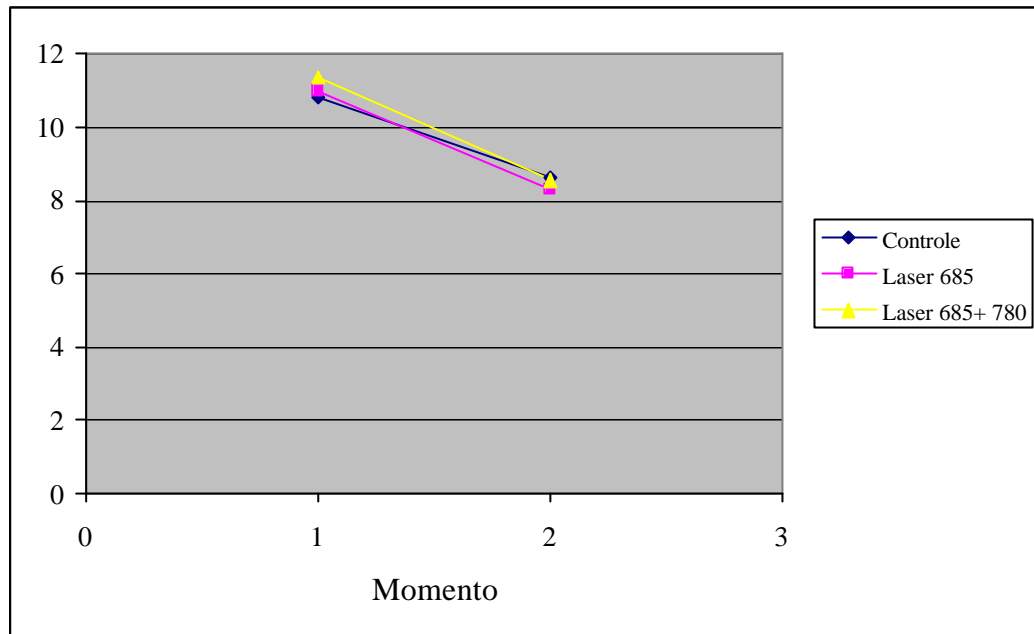


FIGURA 4 - Vetores médios do Grupo 3 dias avaliados em dois períodos de mensuração.

A tabela 3 representa a média e desvios-padrão das medidas das feridas obtidas imediatamente a sua execução e no período de 7 dias pós-operatório nos Grupos I, II e III. Na análise dos resultados estatísticos, através da análise multivariada de perfis, pôde-se verificar que não houve diferenças biométricas estatisticamente significantes entre os Grupos I, II e III no período de 7 dias ($p > 0,05$), contudo, houve uma diferença estatisticamente significativa na redução do diâmetro da ferida entre os períodos de 0 e 7 dias ($p < 0,01$) (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão do Grupo – 7 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 7 dias, segundo os Grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm.

.Grupo	Momentos	
	0 hora	7 dias
Controle	9,80 ± 0,51	7,09 ± 0,83
Laser 685 nm	9,88 ± 0,50	6,86 ± 0,31
Laser 685+780 nm	9,96 ± 1,37	6,66 ± 0,52

Tabela 4 - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 7 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 7 dias, segundo os Grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII).

Hipótese estatística	Resultado do teste estatístico (nível descritivo)	Conclusão
Paralelismo entre os perfis	F = 0,95 (p > 0,05)	Existe semelhança entre os perfis.
Coincidência entre os perfis	F = 0,14 (p > 0,05)	GI = GII = GIII
Efeito do momento	F = 291,93 (p < 0,01)	0 hora > 7 dias para todos os grupos

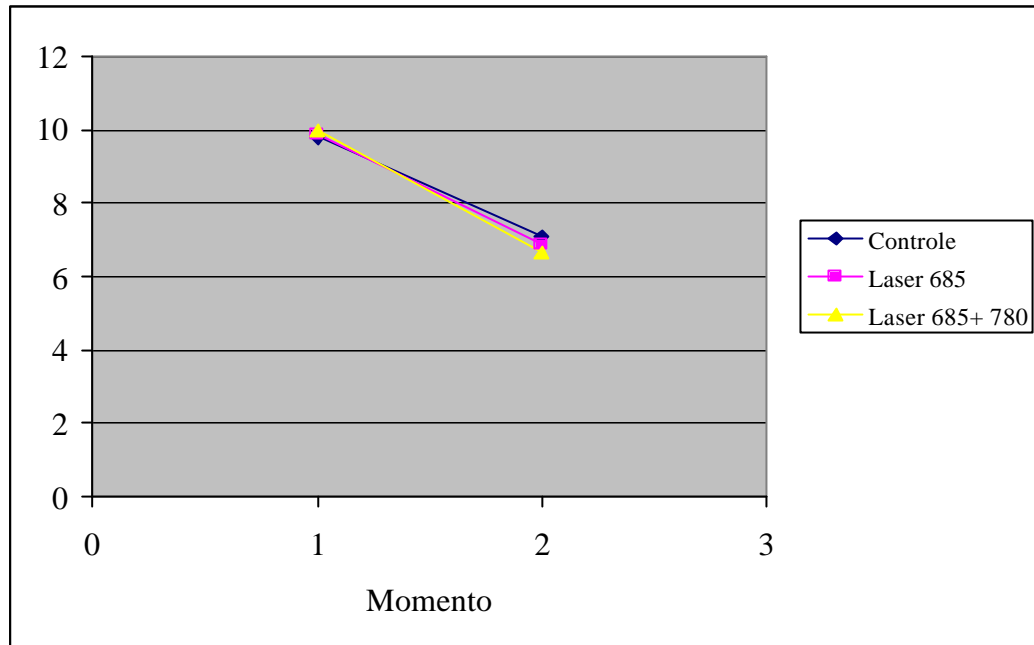


FIGURA 5 - Vetores médios do Grupo 7 dias avaliados em dois períodos de mensuração.

A tabela 5 representa a média e desvios-padrão das medidas das feridas obtidas imediatamente a sua execução e no período de 14 dias pós-operatórios nos Grupos I, II e III. Na análise dos resultados estatísticos, através da análise multivariada de perfis, pôde-se verificar que houve diferenças biométricas estatisticamente significantes entre os Grupos I, II e III no período de 14 dias ($p < 0,01$). Sendo que a média do Grupo I foi estatisticamente maior que a do Grupo II e que a do Grupo II, foi estatisticamente maior que a do Grupo III ($G_I > G_{II} > G_{III}$), o que demonstra que houve maior redução do diâmetro das feridas no Grupo III do que no Grupo controle e no Grupo II (Tabela 6; Figura 6).

Os dados da tabela 6 também demonstram que houve uma redução estatisticamente significativa no diâmetro das feridas entre o período de 0 e 14 dias e que não houve diferenças estatisticamente significantes entre o diâmetro inicial das feridas (0 hora) entre os Grupos I, II e III ($p > 0,05$)

Tabela 5 - Médias e desvios-padrão do Grupo – 14 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 14 dias, segundo os Grupos controle, Laser 685 nm e Laser 685 + 780 nm.

Grupo	Momentos	
	0 hora	14 dias
Controle	10,87 ± 0,85	5,15 ± 0,90
Laser 685 nm	11,11 ± 0,48	4,02 ± 0,89
Laser 685+780 nm	9,91 ± 0,82	1,99 ± 0,25

Tabela 6 - Resultado da análise multivariada de perfis do Grupo – 14 dias, avaliados em dois momentos, 0 hora e 14 dias, segundo os Grupos controle (GI), Laser 685 nm (GII) e Laser 685 + 780 nm (GIII).

Hipótese estatística	Resultado do teste estatístico (nível descritivo)	Conclusão
Paralelismo entre os perfis	$F = 7,01$ ($P < 0,05$)	Não existe semelhança entre os perfis.
Efeito do momento em cada grupo	GI: $F = 184,42$ ($P < 0,01$) G2: $F = 284,18$ ($P < 0,01$) G3: $F = 354,20$ ($P < 0,01$)	0 hora > 14 dias
Efeito de tratamento em cada momento	0 hora: $F = 2,59$ ($P > 0,05$) 14 dias: $F = 36,99$ ($P < 0,01$)	GI = GII = GIII GI > GII > GIII

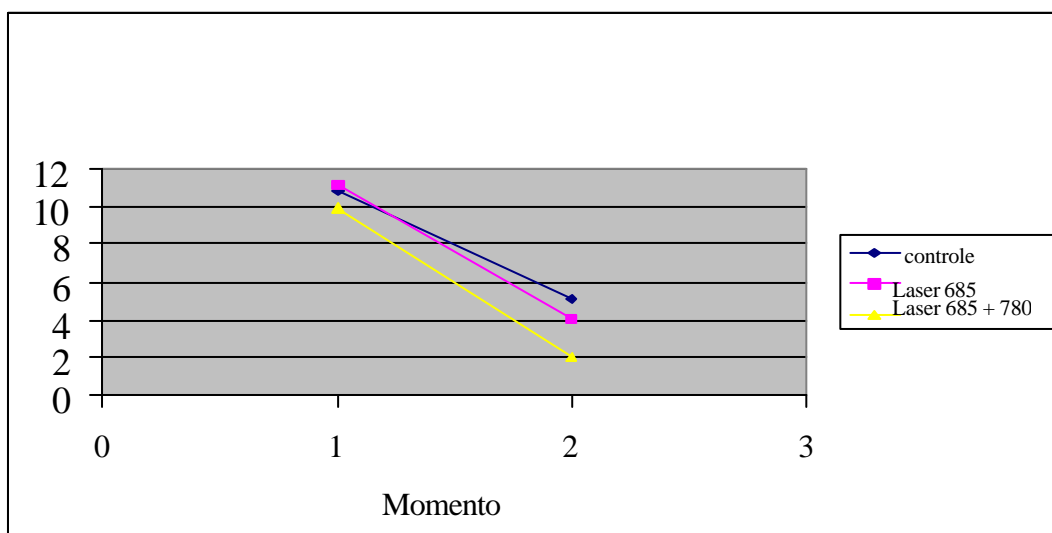


FIGURA 6 - Vetores médios do Grupo 14 dias avaliado em dois períodos de medição

5.2. RESULTADO HISTOLÓGICO

Na descrição dos resultados serão consideradas, principalmente, duas áreas:

- A)** Área superficial envolvendo as bordas e porção central da ferida;
- B)** Área de tecido conjuntivo situado abaixo da porção superficial da ferida.

3 DIAS

Grupo I (Controle). O epitélio mostra discreta proliferação junto às bordas da ferida cirúrgica. Sobre a superfície da ferida, observa-se moderada camada de crosta (Figura 7) que mostra restos celulares principalmente de polimorfonucleares neutrófilos. Logo abaixo, nota-se camada de tecido degenerado eosinófilo. O tecido conjuntivo situado abaixo desta camada eosinófila é pouco diferenciado, exibindo fibroblastos e capilares neoformados (Figura 8). Macrófagos e linfócitos, em número moderado, podem ser observados na região. Neste mesmo tecido conjuntivo, evidencia-se pequenos feixes de fibras colágenas irregulares (Figura 9).

Grupo II (Laser 685 nm). Em todos os espécimes o epitélio apresenta proliferação ligeiramente mais pronunciada quando comparada ao grupo anterior (Figura 10). A superfície da ferida é coberta por espessa camada de crosta mostrando restos celulares, notadamente de polimorfonucleares neutrófilos. Logo abaixo, observa-se uma faixa ocupada por estrutura eosinófila (Figura 10). O tecido conjuntivo abaixo desta superfície é ligeiramente mais desenvolvido e apresenta menor número de macrófagos e linfócitos que aquele observado no grupo anterior (Figura 11). Nota-se, ainda, pequenos feixes de fibras colágenas irregulares neste tecido conjuntivo (Figura 12).

Grupo III (Laser 685 + 780 nm). Em todos os espécimes, a proliferação epitelial junto às bordas da ferida é mais pronunciada quando comparada aos grupos anteriores (Figura 13). Sobre a superfície da ferida, nota-se, também, camada de crosta constituída por restos celulares notadamente de polimorfonucleares neutrófilos. Por outro lado, os espécimes deste grupo são caracterizados pela ausência da camada de estrutura eosinófila notada nos Grupos I e II (Figura 14). O tecido conjuntivo situado abaixo da crosta, é rico em capilares neoformados e apresenta, praticamente, as mesmas características

observadas nos grupos anteriores (Figura 14). O tecido conjuntivo mostra ainda, pequenos feixes de fibras colágenas (Figura 15).

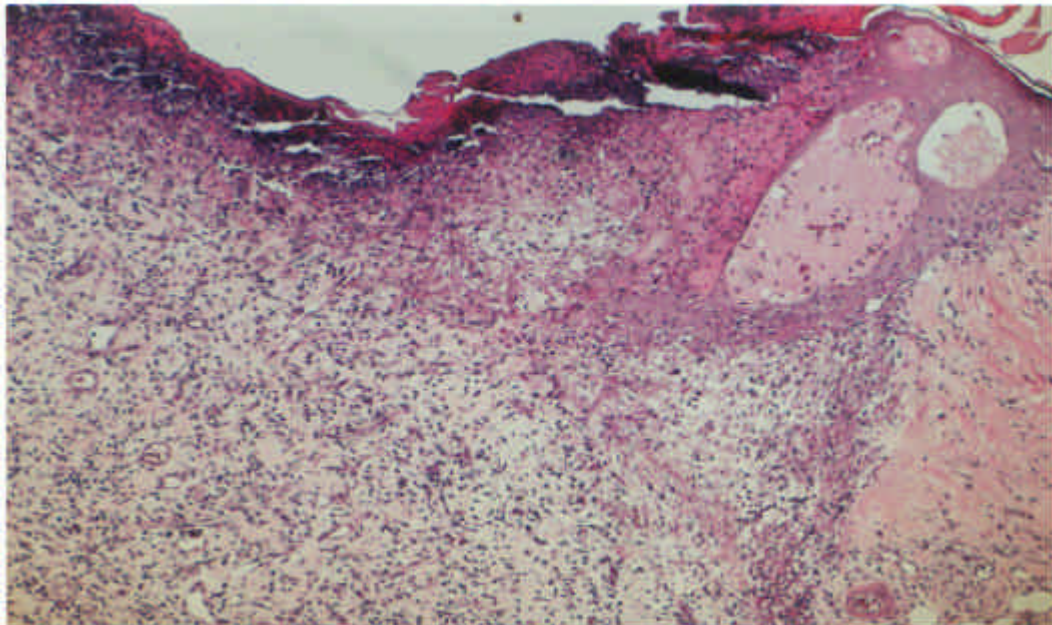


FIGURA 7 - Grupo I (Controle). 3 dias. Discreta proliferação do epitélio junto à borda da ferida e presença de crosta. HE. Original 63x.

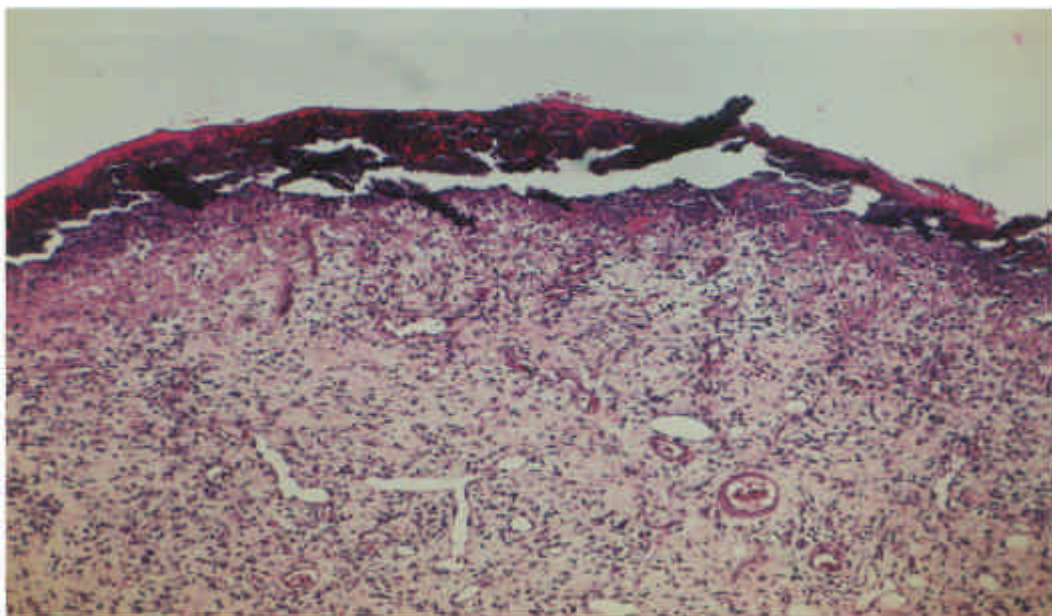


FIGURA 8 - Grupo I (Controle). 3 dias. Tecido conjuntivo pouco diferenciado com fibroblastos e capilares neoformados. HE. Original 63x.

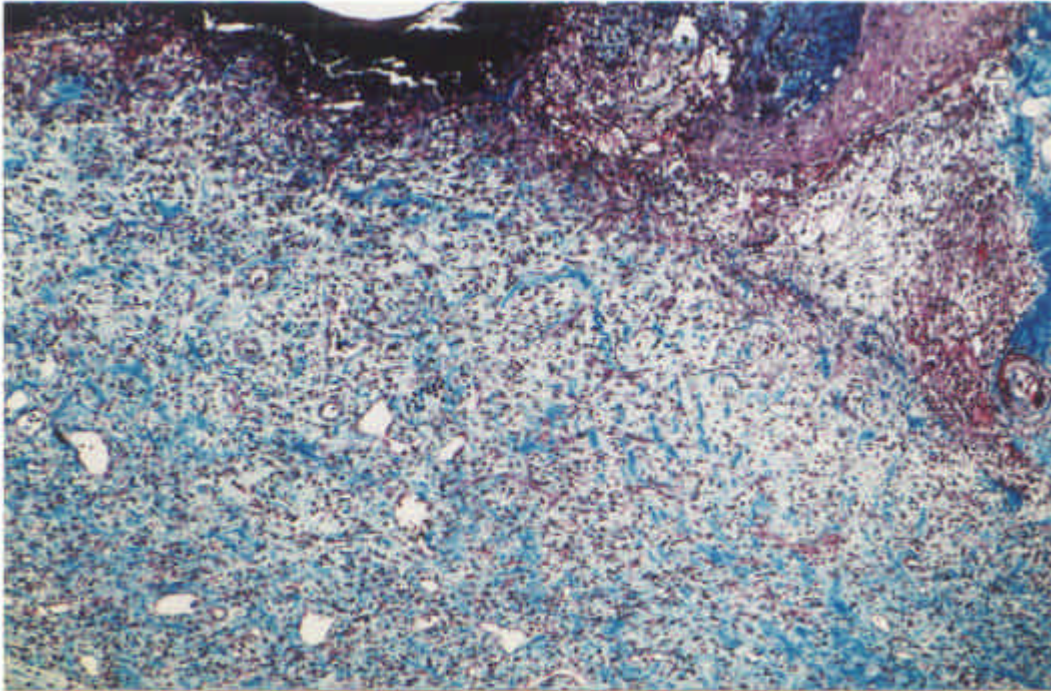


FIGURA 9 - Grupo I (Controle). 3 dias. Evidenciando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x.

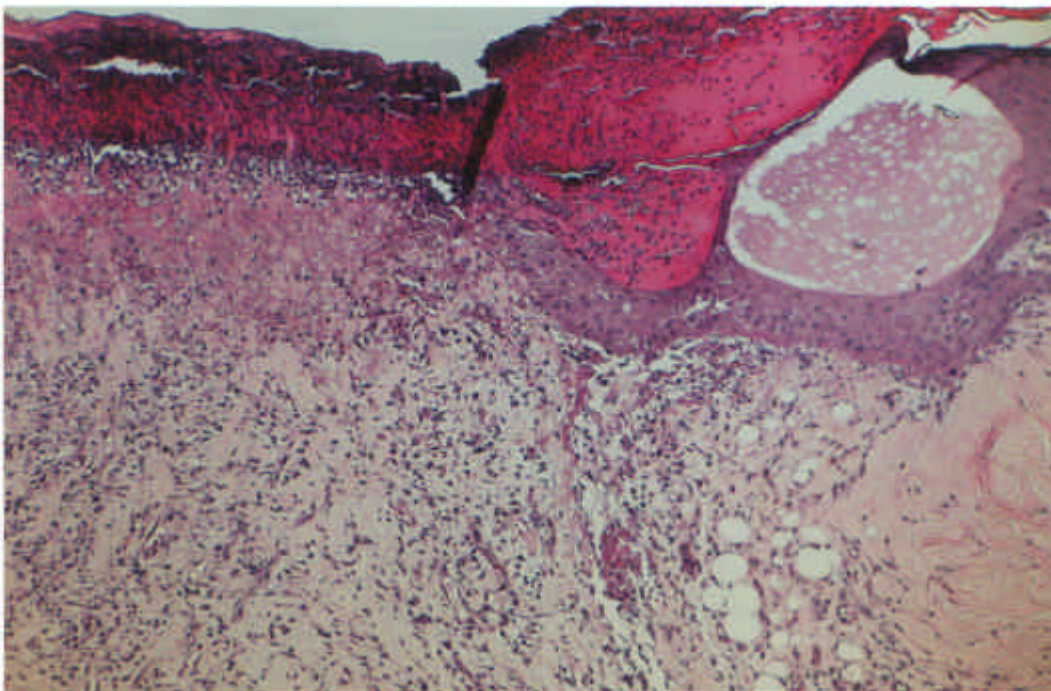


FIGURA 10 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias. Proliferação epitelial mais pronunciada quando comparada ao Grupo I e presença de faixa eosinófila imediatamente abaixo da crosta. HE. Original 63x.

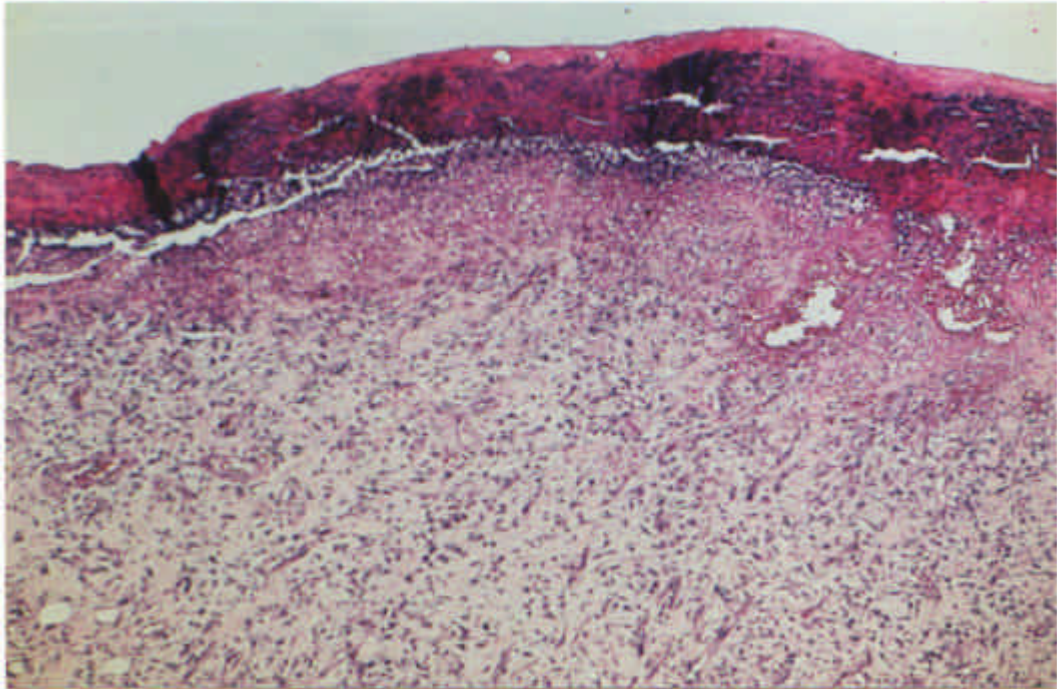


FIGURA 11 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias. Tecidos conjuntivos mais desenvolvidos com menor número de macrófagos e linfócitos quando comparados ao Grupo I. HE. Original 63x.

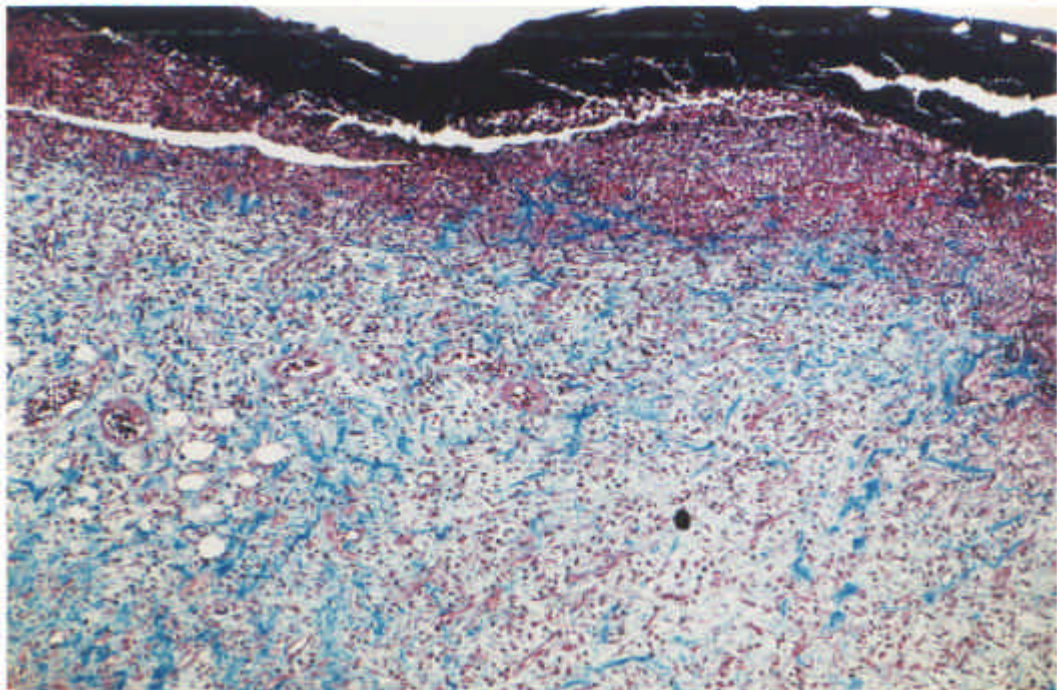


FIGURA 12 - Grupo II (Laser 685 nm). 3 dias. Mostrando pequenos feixes de fibras colágenas irregulares no tecido conjuntivo. Tricrômico de Masson. Original 63x.

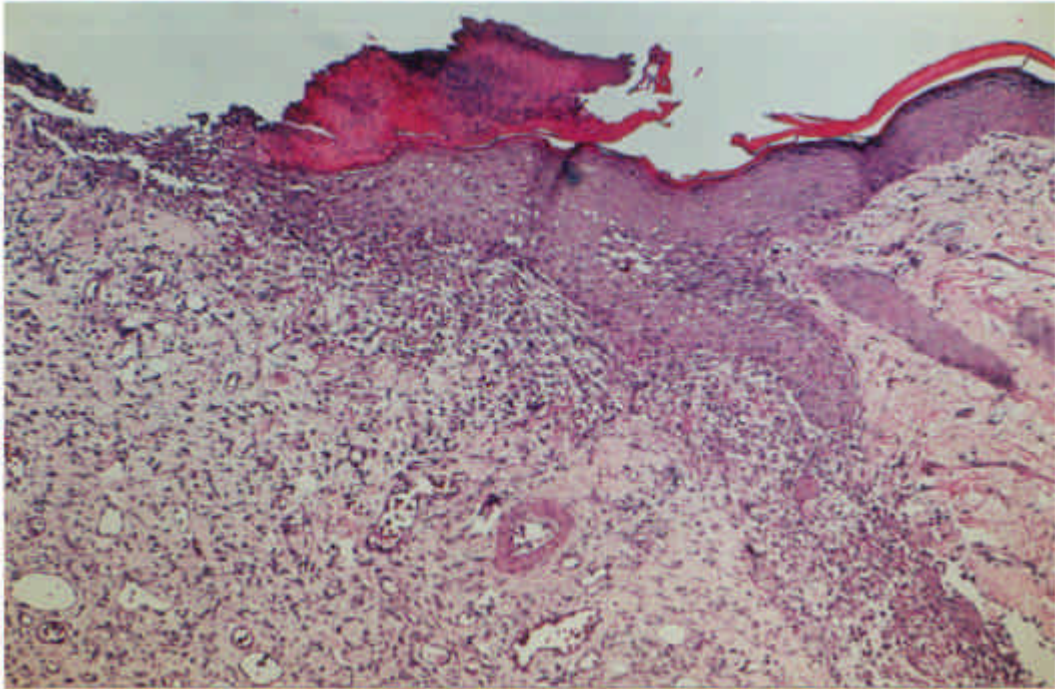


FIGURA 13 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Proliferação epitelial mais pronunciada quando comparada aos grupos anteriores. HE. Original 63x.

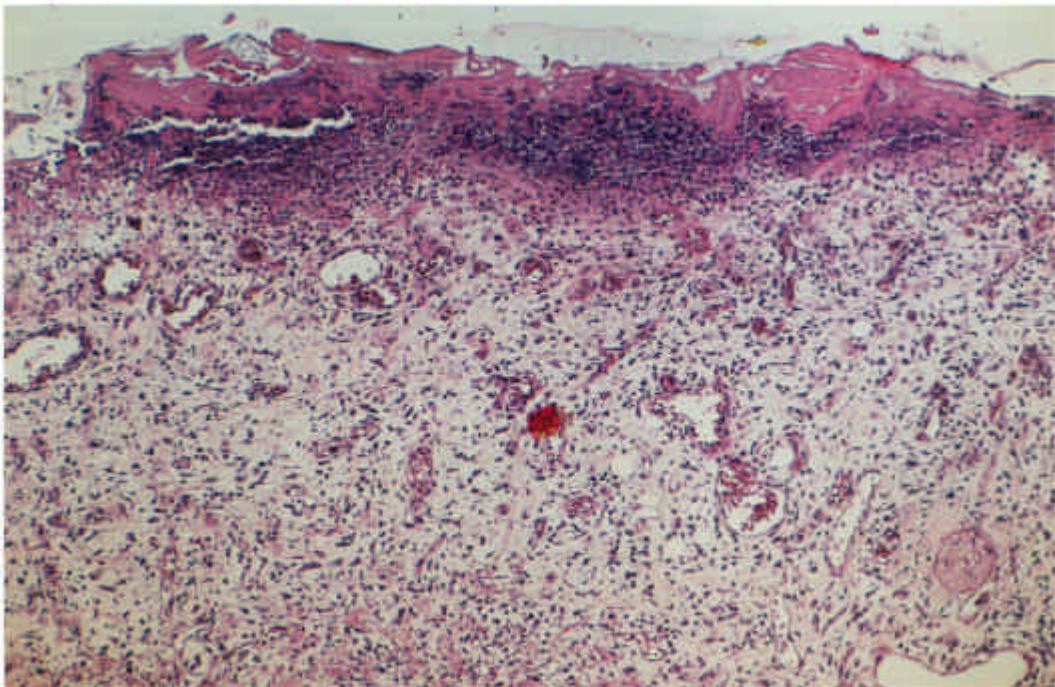


FIGURA 14 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Mostrando a ausência de faixa eosinófila abaixo da crosta, observada nos grupos anteriores e tecido conjuntivo com as mesmas características. HE. Original 63x.

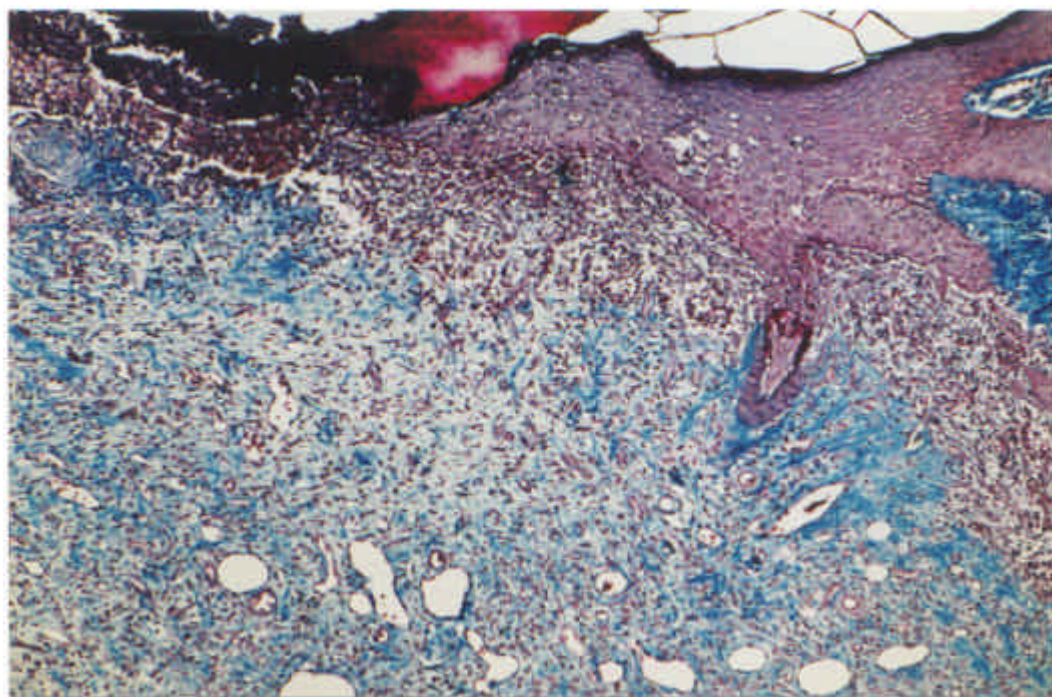


FIGURA 15 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 3 dias. Evidenciando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x.

7 DIAS

Grupo I (Controle). Decorridos 7 dias, o epitélio mostra discreta proliferação (Figura 16) na maioria dos espécimes. Em alguns casos, recobre aproximadamente, um quarto da superfície da ferida cirúrgica. Sobre a ferida, persiste, ainda, espessa camada de crosta constituída por restos celulares e tecido degenerado (Figura 16). O tecido conjuntivo abaixo desta superfície com crosta é pouco organizado (Figura 17), notando-se capilares e fibroblastos em número moderado ao lado de numerosos linfócitos e macrófagos. Nas áreas mais profundas, este tecido

conjuntivo apresenta, em alguns casos, feixes de fibras colágenas (Figura 18).

Grupo II (Laser 685 nm). O epitélio recobre, aproximadamente um terço da ferida cirúrgica (Figura 19). A presença da crosta é constante nas áreas não cobertas pelo epitélio, notando-se restos celulares e tecido degenerado. O tecido conjuntivo abaixo do epitélio é rico em capilares neoformados e fibroblastos, mostrando-se mais desenvolvido que aquele observado no grupo anterior (Figura 20). Observam-se, ainda, feixes de fibras colágenas neste mesmo tecido conjuntivo (Figura 21).

Grupo III (Laser 685 + 780 nm). Em alguns casos, o epitélio recobre, aproximadamente, a metade da ferida cirúrgica (Figura 22). Em outros, a neoformação epitelial é mais discreta. Sobre a ferida cirúrgica, observa-se a presença de crosta constituída de restos celulares e tecido degenerado. Logo abaixo, evidencia-se tecido conjuntivo rico em capilares neoformados e fibroblastos em número moderado (Figura 23) ao lado de alguns macrófagos e linfócitos. Neste tecido, nota-se, ainda, feixes de fibras colágenas sem muita organização (Figura 24).

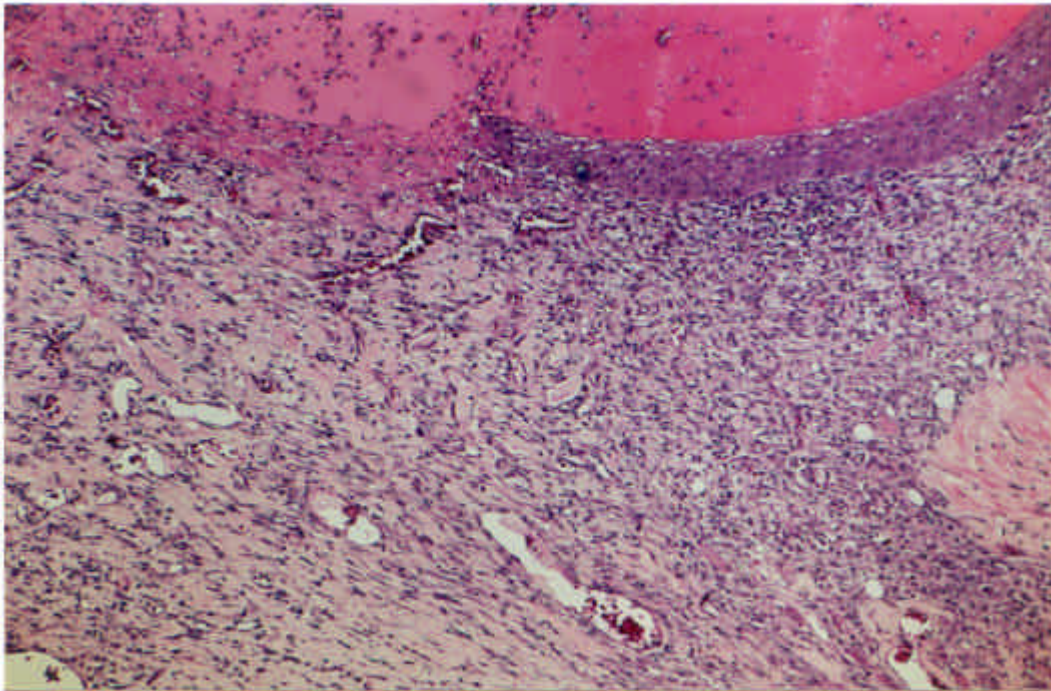


FIGURA 16 - Grupo I (Controle). 7 dias. Mostrando discreta proliferação do epitélio junto à borda da ferida e presença de espessa camada de crosta. HE. Original 63x.

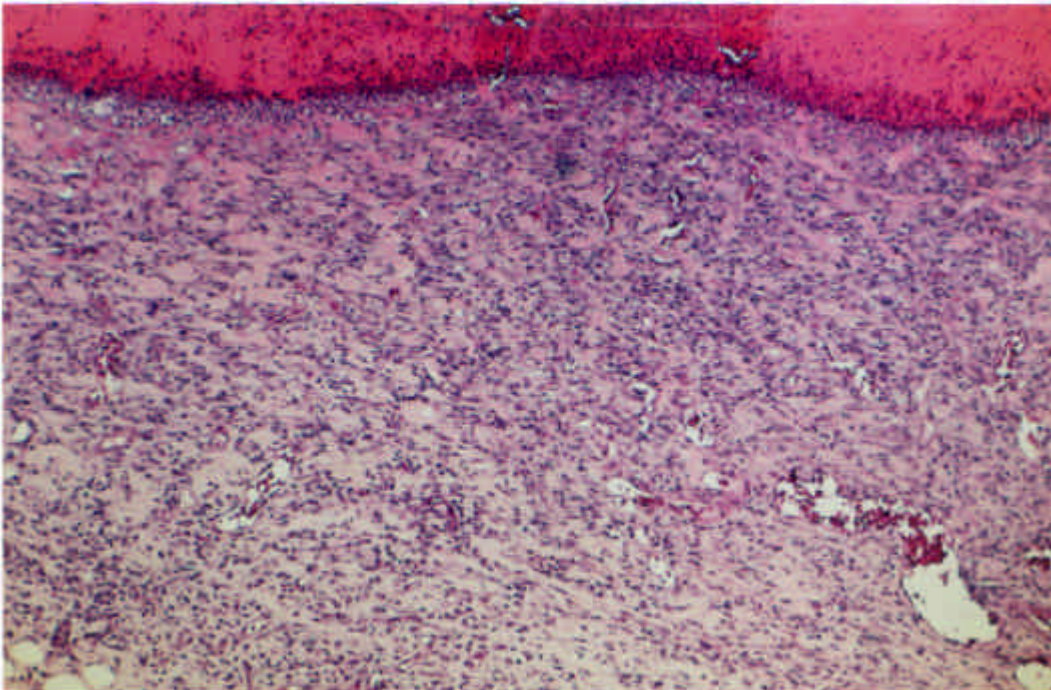


FIGURA 17 - Grupo I (Controle). 7 dias. Edivenciando tecido conjuntivo pouco organizado. HE. Original 63x.

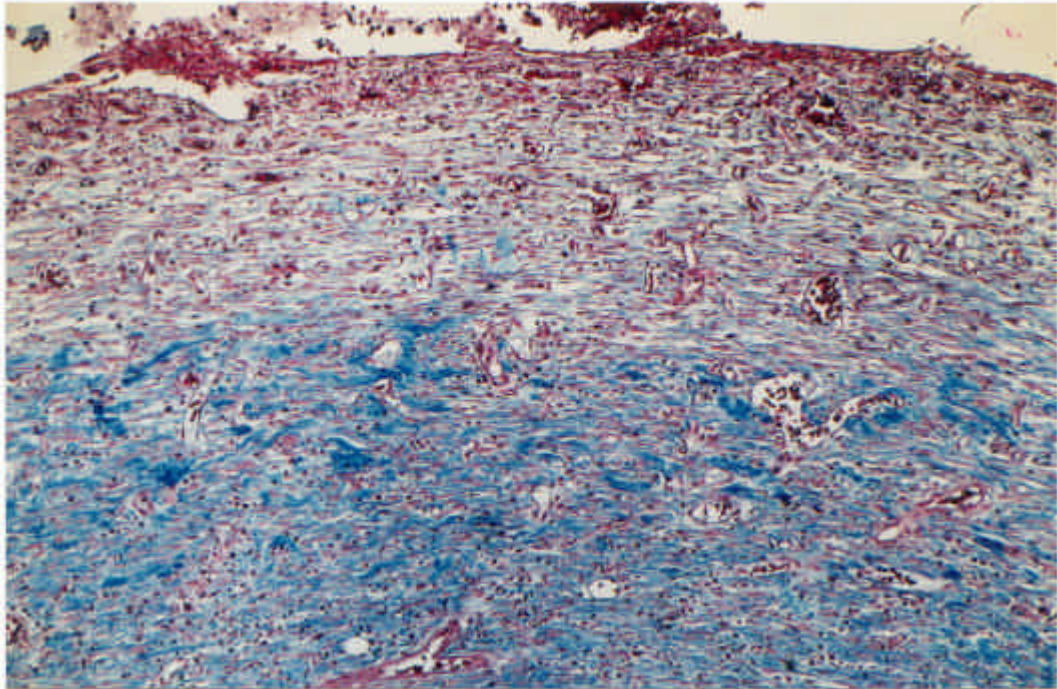


FIGURA 18 - Grupo I (Controle). 7 dias. Feixes de fibras colágenas nas áreas mais afastadas da superfície da ferida. Tricrômico de Masson. Original 63x.

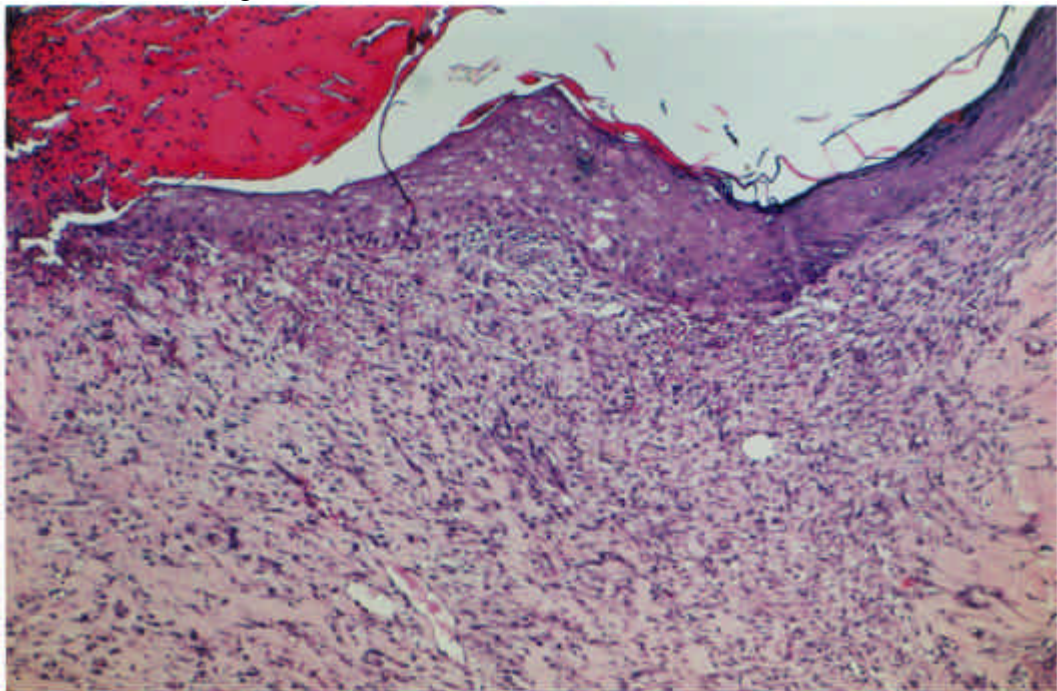


FIGURA 19 - Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Epitélio recobrimdo parcialmente a ferida cirúrgica. HE. Original 63x.

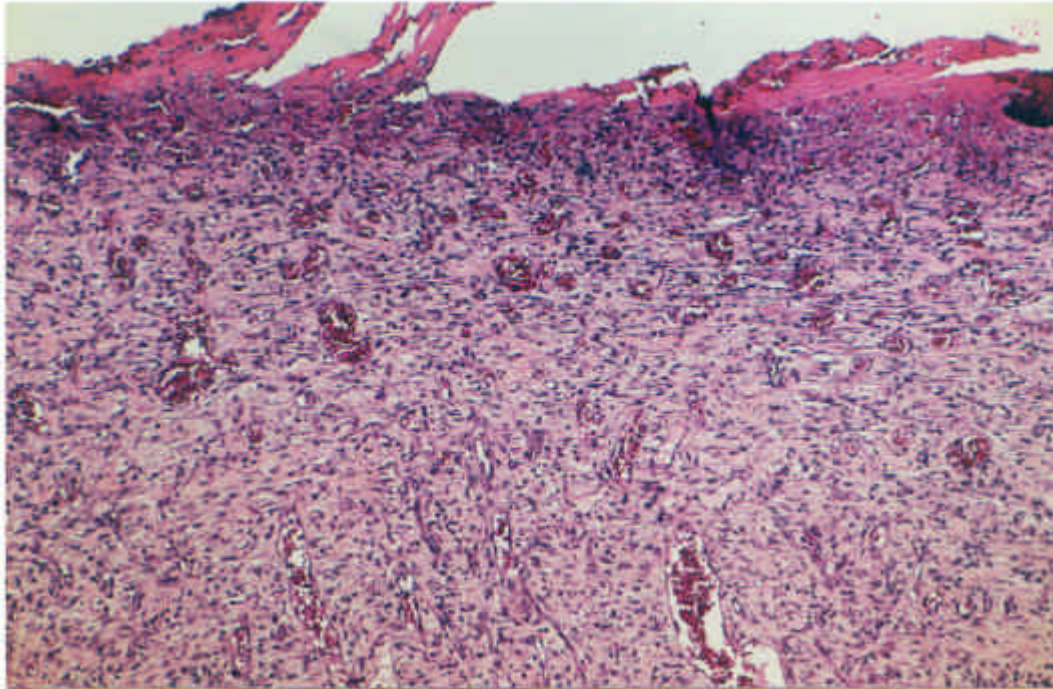


FIGURA 20 - Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Tecido conjuntivo mais desenvolvido quando comparado ao grupo anterior com fibroblastos e capilares neoformados. HE. Original 63x.

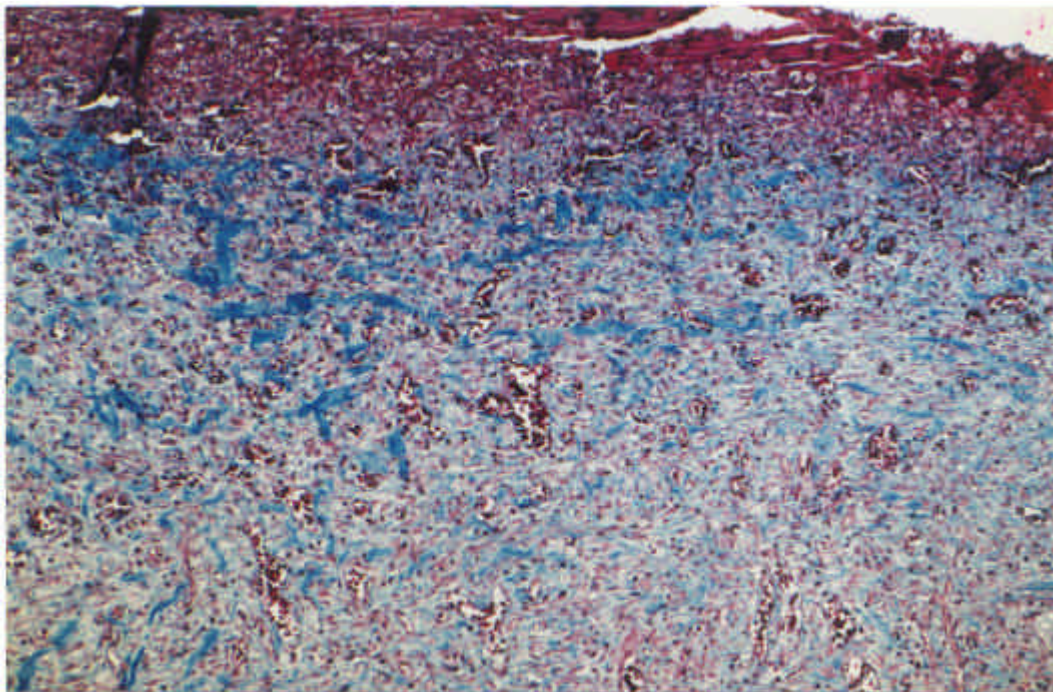


FIGURA 21 - Grupo II (Laser 685 nm). 7 dias. Evidenciando feixes de fibras colágenas no tecido conjuntivo. Tricrômico de Masson. Original 63x.

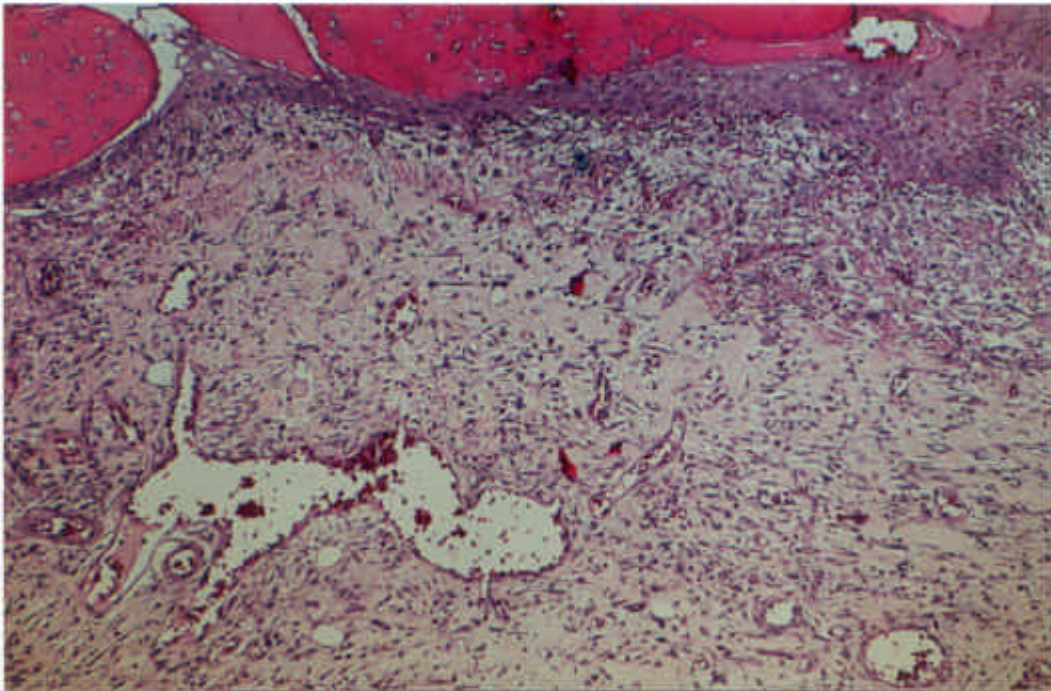


FIGURA 22 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias. Epitélio recobrimdo parcialmente a ferida cirúrgica. HE. Original 63x.

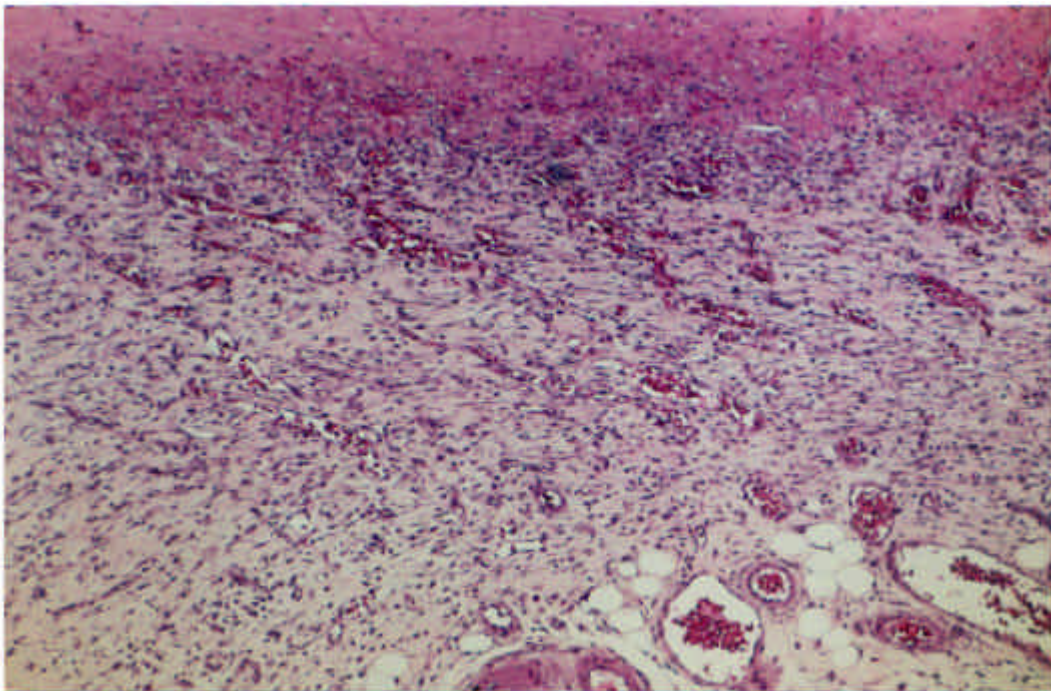


FIGURA 23 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias. Tecido conjuntivo rico em capilares neoformados e fibroblastos em número moderado. HE. Original 63x.

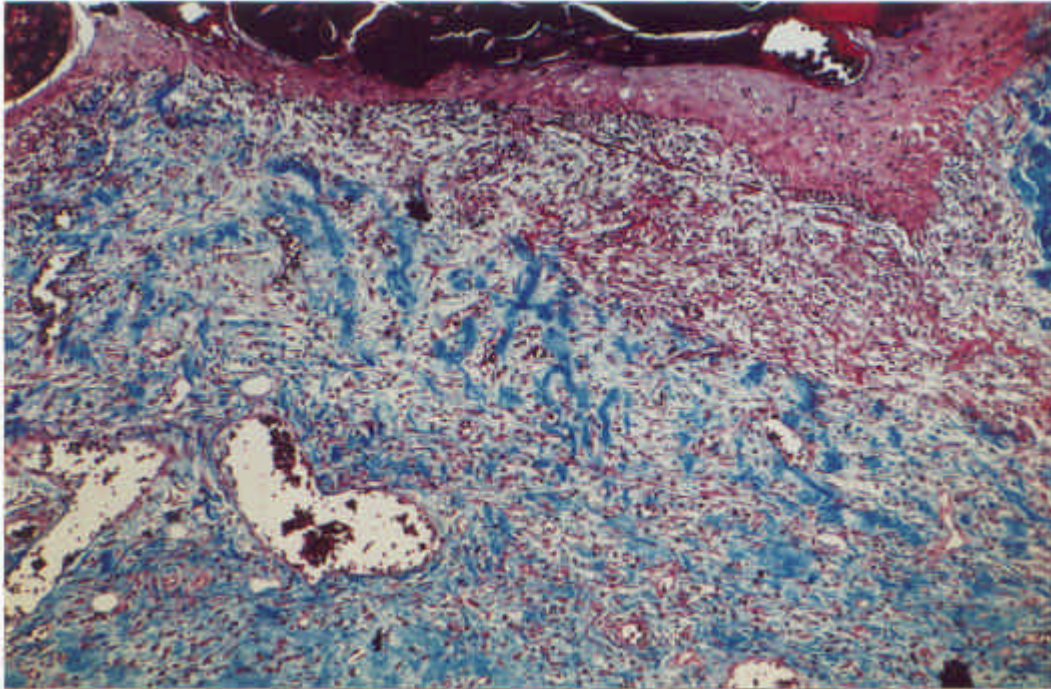


FIGURA 24 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 7 dias. Evidenciando feixes de fibras colágenas sem muita organização. Tricrômico de Masson. Original 63x.

14 DIAS

Grupo I (Controle). O epitélio, pouco diferenciado, recobre, aproximadamente, a metade da ferida cirúrgica (Figura 25). Num dos espécimes, no entanto, o epitélio recobre dois terços desta ferida. Em alguns pontos, observa-se a permanência de pequena quantidade de crosta constituída de restos celulares e tecido degenerado (Figura 25). O tecido conjuntivo, abaixo do epitélio, apresenta fibroblastos em número moderado que estão orientados paralelamente à superfície da ferida (Figura 26). Alguns macrófagos e linfócitos podem ser evidenciados neste

tecido conjuntivo. Além disso, pequenos feixes de fibras colágenas podem ser notados nesta região (Figura 27).

Grupo II (Laser 685 nm). O epitélio, com exceção de um caso, recobre totalmente a ferida cirúrgica, notando-se a ausência da crosta (Figura 28). O tecido conjuntivo, abaixo do epitélio, exibe elevado número de fibroblastos que estão dispostos paralelamente à superfície do epitélio (Figura 29). Discreto número de linfócitos e macrófagos podem ser observados na região. Notam-se, ainda, feixes de fibras colágenas, neste tecido conjuntivo, em maior quantidade quando comparadas ao grupo anterior (Figuras 30 e 31).

Grupo III (Laser 685 + 780 nm). O epitélio bem desenvolvido recobre totalmente a ferida cirúrgica com ausência de crosta, em todos os espécimes. O tecido conjuntivo abaixo do epitélio é bem desenvolvido paralelamente à superfície do epitélio (Figuras 32 e 33). No tecido conjuntivo, observam-se, ainda, feixes de fibras colágenas em maior quantidade que o Grupo I com orientação paralela à superfície do epitélio (Figuras 34 e 35).

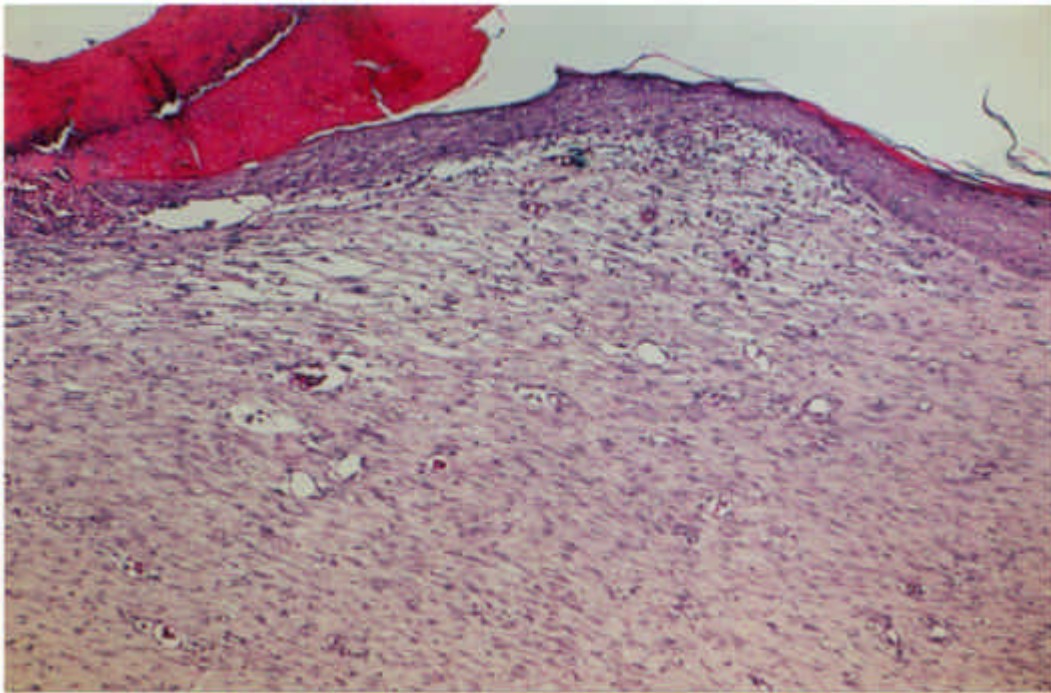


FIGURA 25 - Grupo I (Controle). 14 dias. Epitélio recobrando parcialmente a ferida cirúrgica e pequena quantidade de crosta. HE. Original 63x.

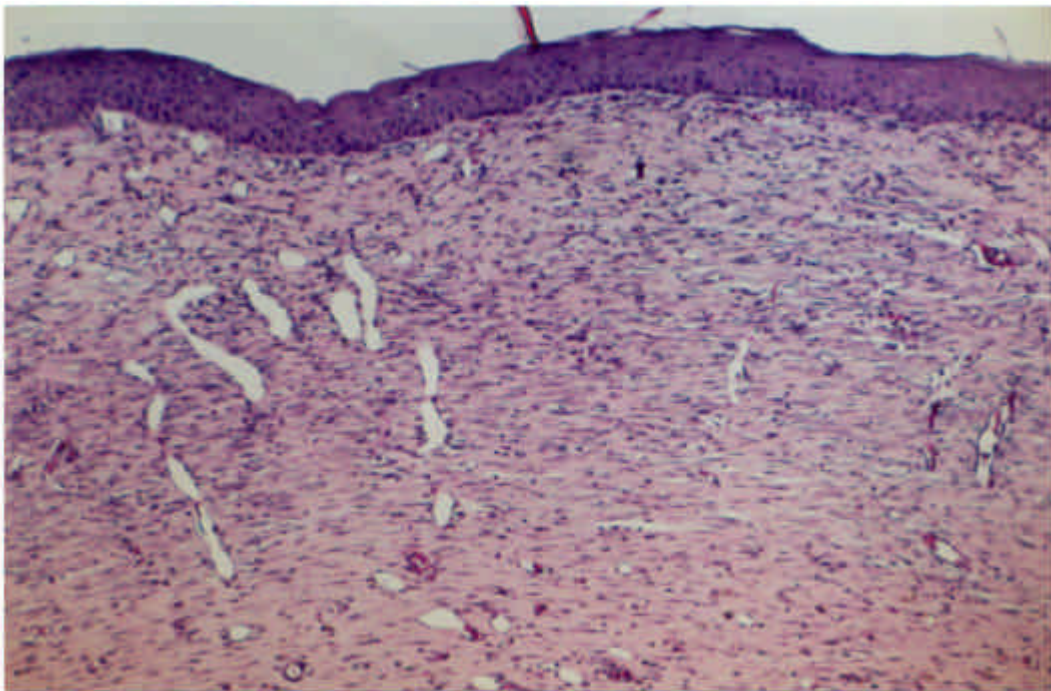


FIGURA 26 - Grupo I (Controle). 14 dias. Evidenciando tecido conjuntivo com fibroblastos em número moderado orientados paralelamente à superfície do epitélio. HE. Original 63x.

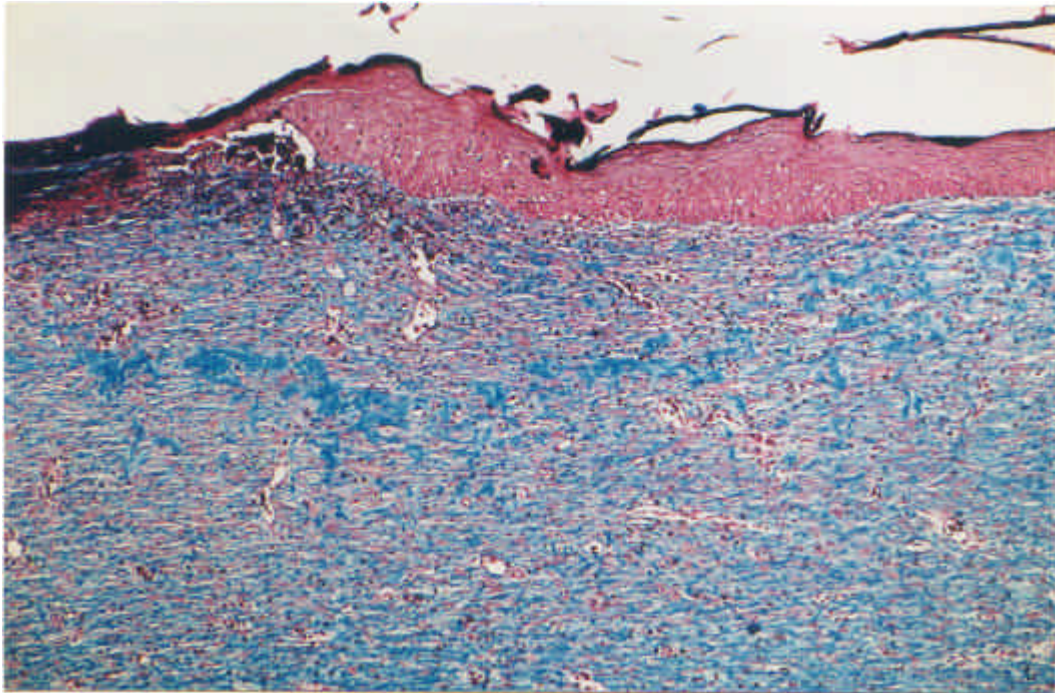


FIGURA 27 - Grupo I (Controle). 14 dias. Mostrando pequenos feixes de fibras colágenas. Tricrômico de Masson. Original 63x.

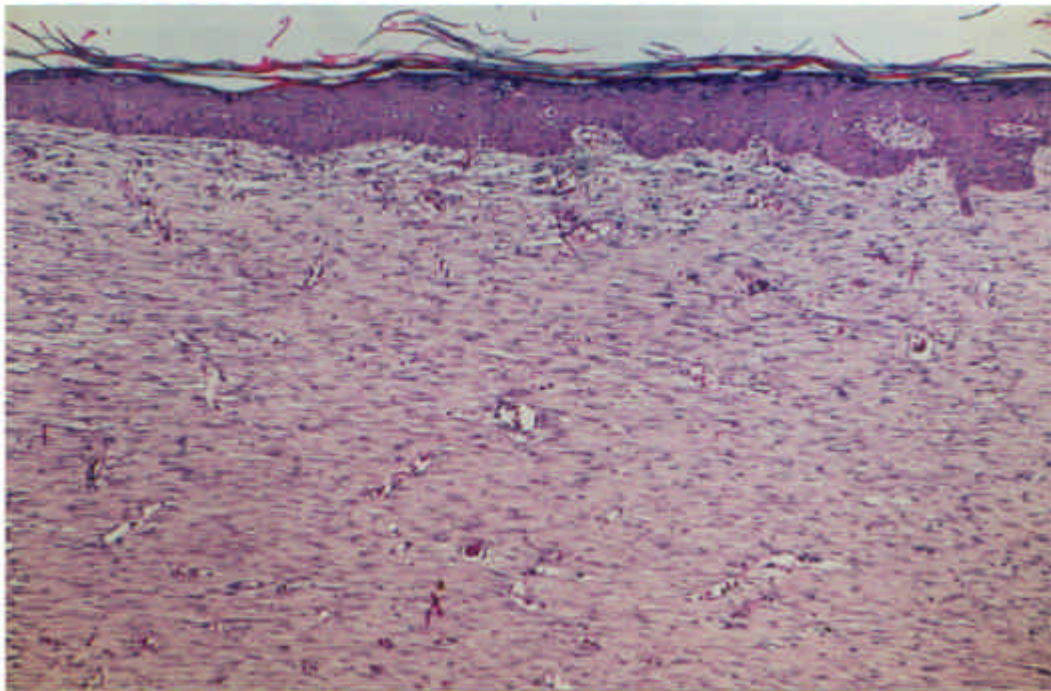


FIGURA 28 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias. Epitélio pouco diferenciado recobrando a ferida cirúrgica e ausência de crosta. HE. Original 63x.

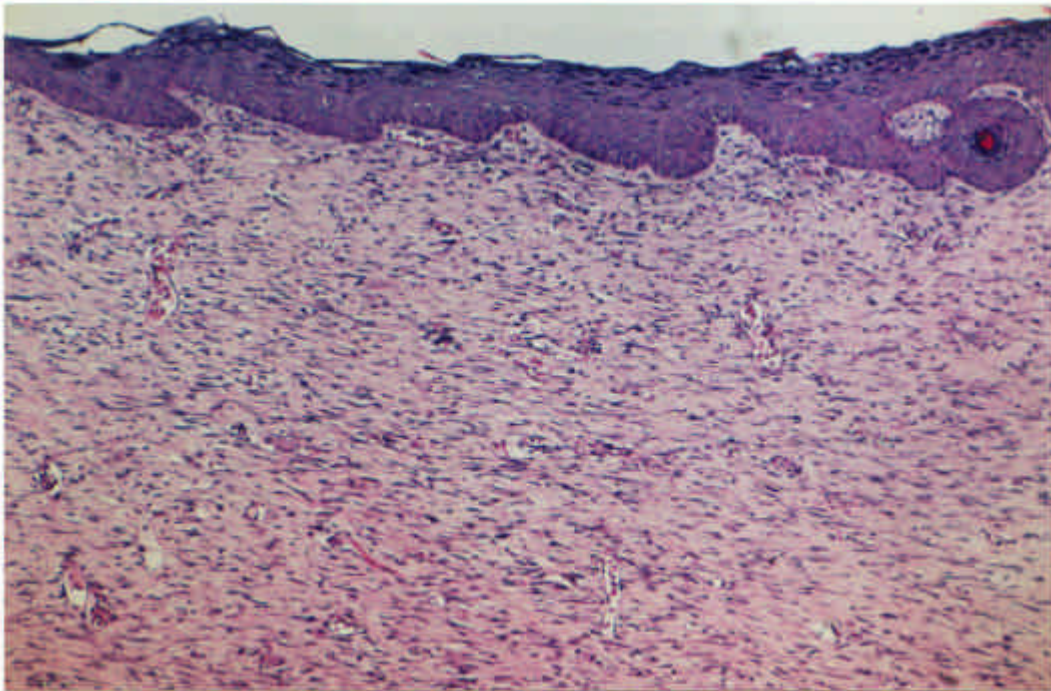


FIGURA 29 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias. Tecido conjuntivo rico em fibroblastos que estão dispostos paralelamente à superfície do epitélio. HE. Original 63x.

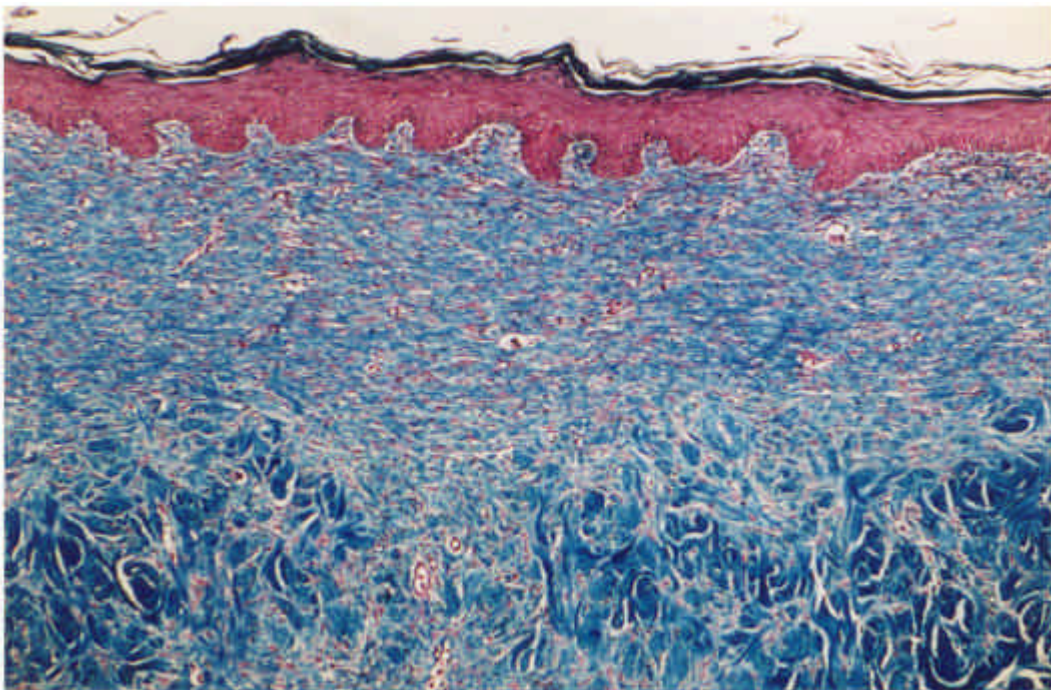


FIGURA 30. Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias. Mostrando fibras colágenas em maior quantidade quando comparada ao grupo anterior. Tricrômico de Masson. Original 63x.

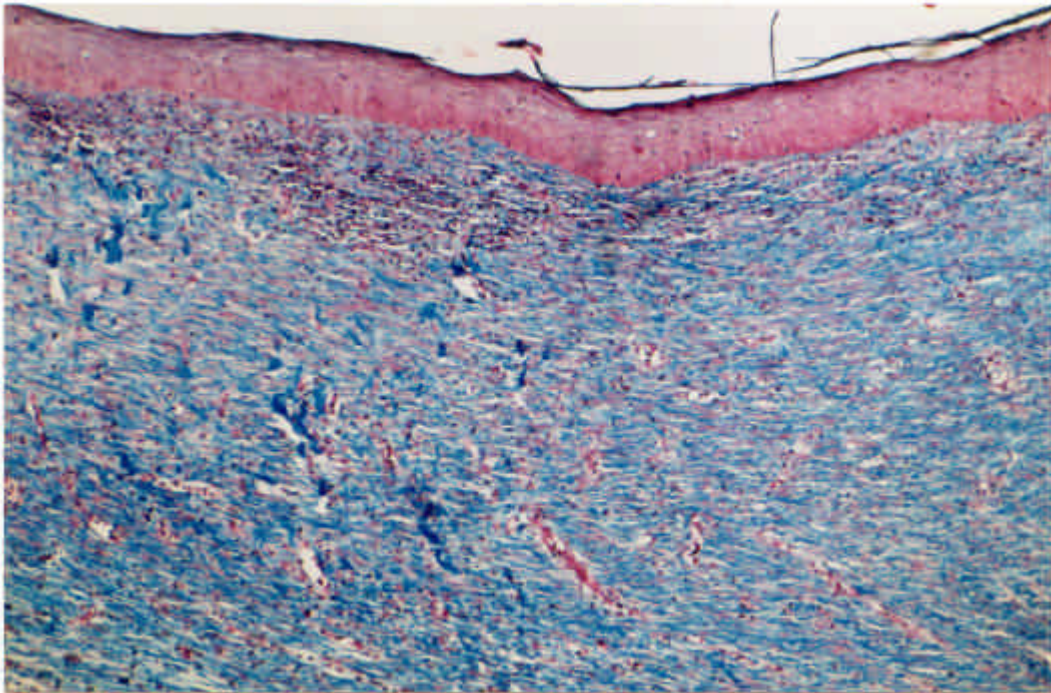


FIGURA 31 - Grupo II (Laser 685 nm). 14 dias. Mostrando fibras colágenas em maior quantidade quando comparada ao grupo anterior. Tricrômico de Masson. Original 63x.

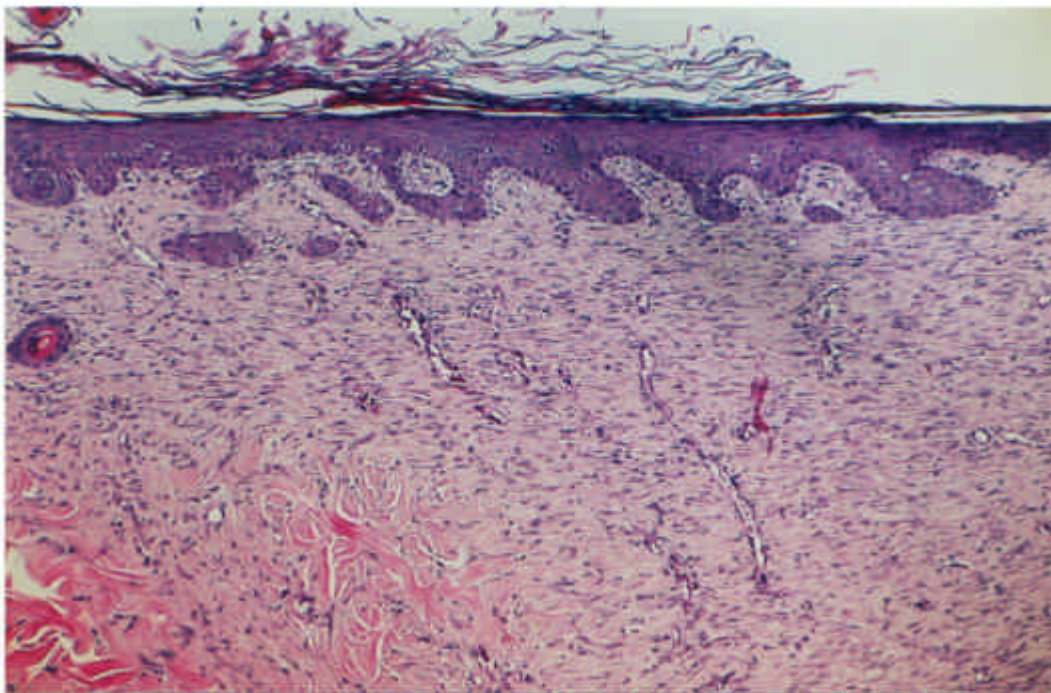


FIGURA 32 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias. Epitélio bem desenvolvido recobrendo a ferida cirúrgica com ausência de crosta. HE. Original 63x.

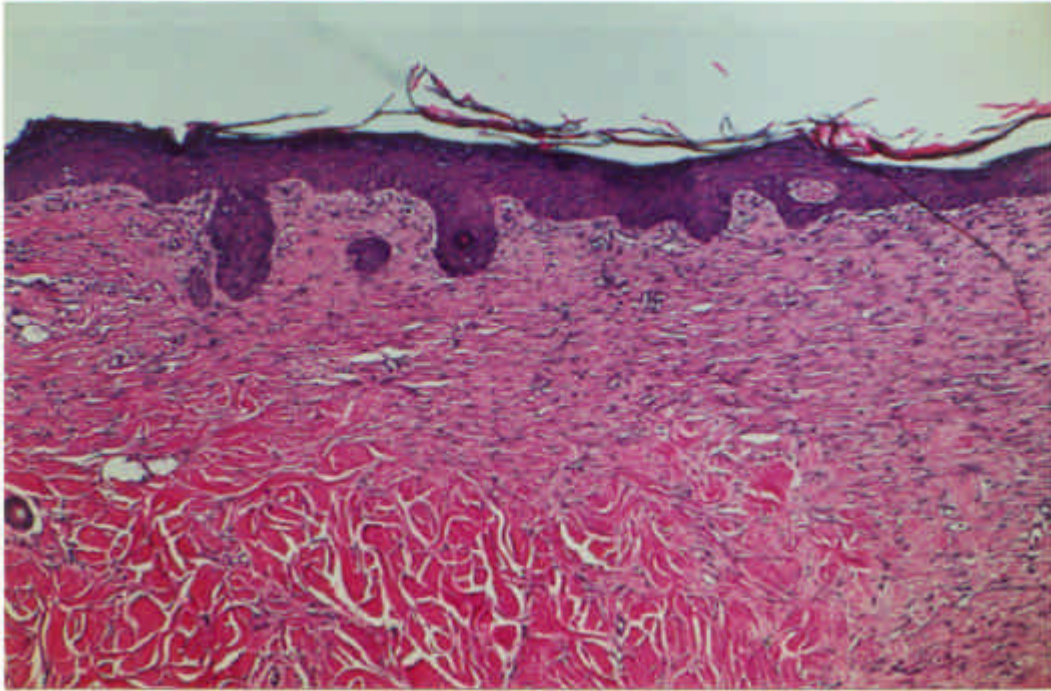


FIGURA 33 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias. Tecido conjuntivo bem desenvolvido com moderado número de fibroblastos. HE. Original 63x.

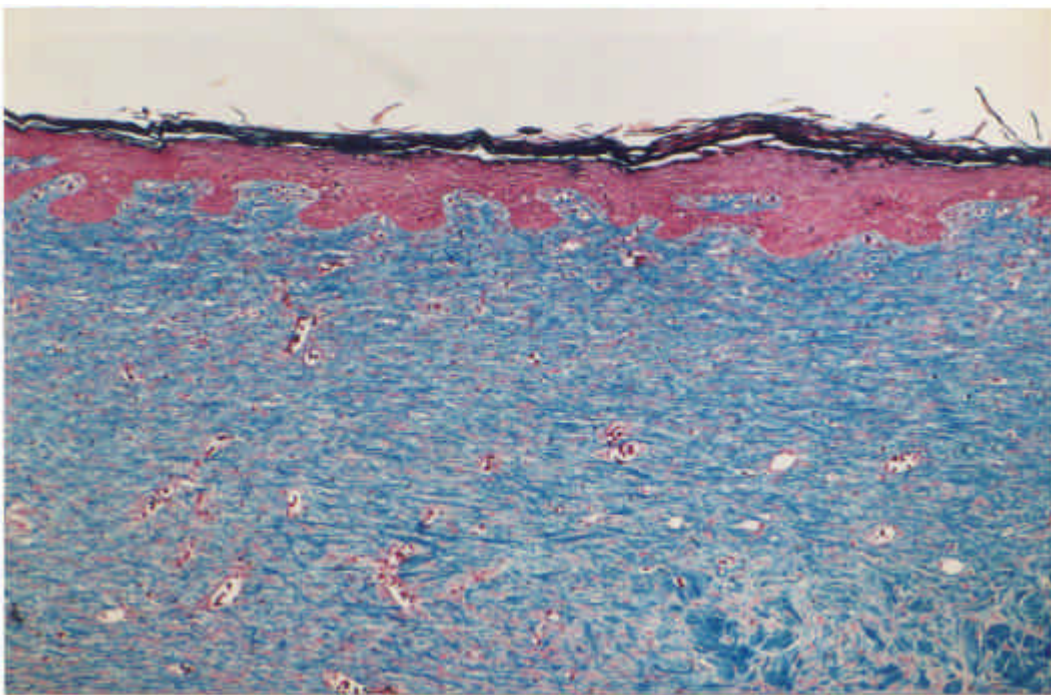


FIGURA 34 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias. Mostrando feixes de fibras colágenas em maior quantidade do que os do Grupo I. tricrômico de Masson. Original 63x.

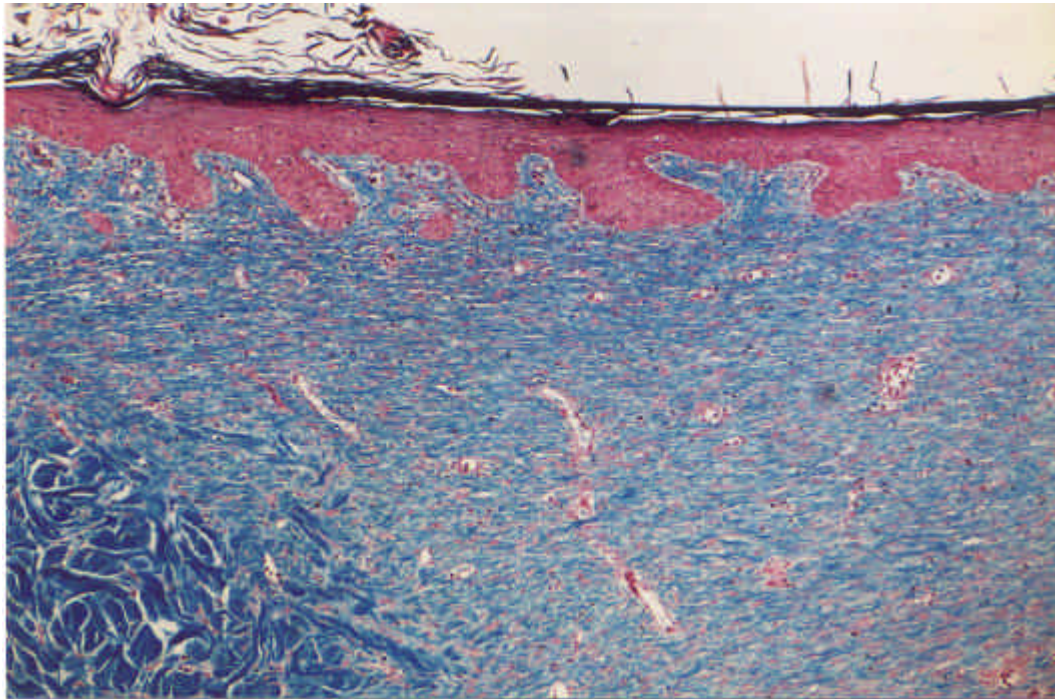


FIGURA 35 - Grupo III (Laser 685 + 780 nm). 14 dias. Evidenciando feixes de fibras colágenas em maior quantidade do que os do Grupo I. Tricrômico de Masson. Original 63x.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Na análise dos resultados obtidos, no presente estudo, observamos que as feridas tratadas com laser, quer com um único comprimento de onda, de 685 nm (Grupo II) ou tratadas com a associação de dois comprimentos onda, 685 e 780 nm (Grupo III), demonstraram do ponto de vista histológico, em todos os períodos estudados, aceleração do processo de reparo e, do ponto de vista biométrico, maior grau de contração tecidual, mais evidente no período de 14 dias, quando comparadas às controles (Grupo I).

Muito embora raras são as citações encontradas na literatura que corroboram nossos resultados, principalmente os encontrados nas feridas do Grupo III, nas quais observamos a efetividade da associação de diferentes comprimentos de onda, aplicada na mesma sessão, sobre a reparação de feridas abertas (Braverman et al. 1989;¹² Rezvani et al. 1992)⁷⁰, há de se ressaltar os inúmeros trabalhos que documentaram a efetividade do laser em baixa intensidade sobre eventos da reparação tecidual (Mester et al., 1971;⁵⁶ Mester et al, 1976;⁵⁵ Kana et al., 1981;⁴² Hunter et al., 1984;³⁸ Escola et al., 1985;²⁸ Saperia et al., 1986;⁷⁹ Dyson & Young, 1986;²⁷ Lyons et al., 1987;⁴⁹ Longo et al., 1987;⁴⁵ Braverman et al., 1989;¹² Soares et al., 1989;⁸⁵ Schneider et al., 1990;⁸³ Bisht et al., 1994;¹⁰ Garcia et al., 1996;³⁵ Bisht et al., 1999;¹¹ Lucroy et al.,

1999;⁴⁸ Walker et al., 2000;⁹⁴ Amir et al., 2000;⁴ Stadler et al., 2001;⁸⁷ Capon et al., 2001)¹⁶ enquanto que outros, ainda questionam a efetividade ou não do laser em baixa intensidade (Anneroth et al., 1988;⁵ Cambier et al., 1996;¹⁵ Allendorf et al., 1997;³ Schlager et al., 2000)^{81, 82}.

No entanto, ficou evidente, no presente trabalho, que o laser influenciou diferentes eventos biológicos envolvidos na reparação, como aumento da vascularização da área, migração epitelial mais diferenciada, proliferação celular e formação de tecido de granulação cicatricial mais precoces observadas nas feridas do Grupo II e mais evidentes, nas do Grupo III. Estes achados corroboram os de outros pesquisadores como os de Mester et al. (1971)⁵⁶, Kana et al. (1981)⁴², Benedicenti (1983)⁷, Soares et al. (1989)⁸⁵, Bisht et al. (1994)¹⁰, Garcia et al. (1996)³⁵ e de Bisht et al. (1999)¹¹.

Por outro lado, o aumento da vascularização da área tratada com laser, observada também por outros pesquisadores (Benedicenti, 1983;⁷ Chomette et al., 1987;^{21, 22} Garcia, 1992;³⁴ Amir et al., 2000)⁴ se deve provavelmente, à capacidade do laser em baixa intensidade promover angiogênese (Benedicenti, 1983;⁷ Garcia, 1992)³⁴, e degranulação de mastócitos (Escola et al., 1985)²⁸, liberando mediadores químicos como a histamina, que possui elevado efeito vasodilatador facilitando a diapedese dos elementos sanguíneos para a área injuriada. Tal fato provavelmente possa justificar o moderado número de

macrófagos e linfócitos, presentes nas feridas do Grupo III, no período de 7 dias.

Deve-se ainda ser considerado que, com o aumento da vascularização da área injuriada, promovida pela ação do laser em baixa intensidade, promoverá, segundo alguns autores, maior tensão de oxigênio na área (Saperia et al., 1986;⁷⁹ Schenck et al., 1985;⁸⁰ Garcia et al., 1996)³⁵ e, conseqüentemente, poderá também se tornar um fator capaz de interferir na velocidade de diferenciação de tecido de granulação cicatricial, importante para a rápida migração epitelial, também evidenciado no presente estudo.

Na análise comparativa entre as feridas tratadas com laser (Grupo II e III) e as controles (Grupo I), observamos que os eventos biológicos foram bem mais diferenciados nas feridas tratadas com a associação do comprimento de onda de 685 e 780 nm (Grupo III), quando comparadas às feridas tratadas com exposição única ao comprimento de onda de 685 nm (Grupo II) e às controles, não tratadas (Grupo I) e se caracterizaram por proliferação epitelial mais pronunciada, tecido conjuntivo cicatricial mais desenvolvido, com infiltração celular crônica precoce e formação de feixes de fibras colágenas, dispostos paralelamente à superfície da ferida, mais precoces que as do Grupo II e I, além de evidenciar ausência de crosta na maioria dos espécimes.

Tal fato provavelmente possa ser justificado ao entendermos que a aplicação do laser infravermelho de 780 nanômetros, imediatamente após do comprimento de onda de 685 nanômetros, possibilitou um aumento adicional na fotobioestimulação tecidual, corroborando aos relatos de Clayman & Kuo (1997)²³. Segundo estes autores, a absorção por cromóforos teciduais de um fóton de luz de um comprimento de onda poderá excitar a molécula e, estando a molécula em estado de excitação, poderá torná-la mais susceptível à absorção de um outro fóton de luz de um outro comprimento de onda. E, dessa forma, a absorção combinada de fótons de comprimentos de onda diferentes poderá gerar a transferência de grande quantidade de energia para a célula tratada, e, conseqüentemente, aumentar o metabolismo e função celular.

Na análise comparativa entre os nossos resultados e os de Braverman et al. (1989)¹², observamos que estes autores, ao utilizarem laser de 632,8 nm e 904 nm, isolados ou associados, notaram aumento da resistência à tração nas feridas irradiadas com laser e nas contra-laterais não irradiadas, e do ponto de vista histológico, não observaram diferenças no padrão final da cicatrização entre as feridas tratadas e não com laser. Assim acreditamos que nossos resultados refletem o real efeito da associação de dois comprimentos de onda, 685nm e 780 nm, na mesma ferida, uma vez que utilizamos apenas uma ferida para cada animal

enquanto que Braverman et al (1989)¹², ao utilizarem duas feridas contralaterais no dorso de cada animal, tornaram possível a irradiação da ferida experimental atingir a ferida controle, isto sem deixar de considerar o efeito do laser, via sistêmica, sobre as feridas controles.

Na análise biométrica das medidas realizadas nas feridas do Grupo I, II e III, realizadas imediatamente após a sua execução e nos períodos de 3, 7 e 14 dias, observamos que não houve diferença significativa entre os tempos de 3 e 7 dias, para nenhum dos dois grupos tratados com Laser (Grupo II e III), mostrando-se maior grau de contração das feridas tratadas com laser em comparação às controles, somente no período de 14 dias, sendo que as do Grupo III demonstraram maior grau de contração que as do Grupo II e estas, maior do que as controles (Grupo I).

Estes achados se devem, provavelmente, a dois envoltimentos: primeiro pela capacidade do laser promover a transformação dos fibroblastos normais em miofibroblastos conforme está fartamente demonstrado na literatura (Gabbiani et al. 1971;³³ Pollack, 1979;⁶⁵ Trowbridge & Emling, 1996)⁹¹ e, por outro lado, que a associação de diferentes comprimentos de onda, possa ter contribuído para promover maior diferenciação de miofibroblastos, no período de 14 dias, nas feridas do Grupo III, corroborando, dessa forma, os achados histológicos observados nas feridas do Grupo III, que evidenciou tecido conjuntivo

bem desenvolvido, com feixes de fibras colágenas dispostos paralelamente à superfície da ferida, estando a ferida completamente reparada.

Embora os mecanismos de ação dos lasers, em baixa intensidade sobre os eventos da reparação tecidual, não estejam totalmente esclarecidos, alguns mecanismos são discutidos na literatura, como por exemplo, a capacidade do laser ter maior grau de absorção por enzimas mitocondriais (Olson et al. 1981)⁶²; interferir na cadeia respiratória da célula, em uma reação de oxiredução (Karu, 1988)⁴³; maior absorção da luz laser por porfirinas endógenas fotoinduzindo a liberação de oxigênio singlete (Lubart et al., 1990)⁴⁷ ou interferir, por meio de modificações fotofísicas, no fluxo de cálcio na membrana celular, o que poderia promover bioestimulação da célula (Smith, 1991)⁸⁴. Muito embora com metodologia utilizada no presente estudo, não tenhamos condições de esclarecer os mecanismos envolvidos capazes de elucidar a ação do laser em baixa intensidade sobre resposta biológica diferenciada encontrada no presente estudo, há de se entender a necessidade de realização de novos estudos sobre o assunto.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos com a metodologia empregada, parece-nos apropriado concluir que:

- As feridas tratadas com laser (Grupo II e III) evidenciaram resultados histológicos mais diferenciados que as controles (Grupo I);
- As feridas tratadas com a associação de dois comprimentos de onda (Grupo III) demonstraram reparação mais diferenciada que as controles (Grupo I) e as tratadas com um só comprimento de onda (Grupo II);
- Do ponto de vista biométrico, o maior grau de contração foi observado nas feridas do grupo III, seguido das do grupo II, no período de 14 dias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABERGEL, R.P., LAM, T.S., MEEKER, C.A. Biostimulation of procollagen production by low energy lasers in human skin fibroblast culture. *Clin. Res.*, v.31, p.567-572, 1984.
2. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. Adesão célula-célula e matrix extracelular. In: _____. *Biologia molecular da célula*, 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.950-1006.
3. ALLENDORF, J.D., BESSLER, M., HUANG, J., KAYTON, M.L., LAIRD, D., NOWYGRAD, R., TREAT, M.R. Helium-neon laser irradiation at fluences of 1, 2, and 4 J/cm² failed to accelerate wound healing as assessed by both wound contracture rate and tensile strength. *Lasers Surg. Med.*, v.20, n.3, p.340-5, 1997.
4. AMIR, A., SOLOMON, A.S., GILER, S., CORDOBA, M., HAUBEN, D.J. The influence of helium-neon laser irradiation on the viability of skin flaps in the rat. *Br. J. Plast. Surg.*, v.53, n.1, p.58-62, 2000.
5. ANNEROTH, G., HALL, G., RYDEN, H., ZETTERQUIST, L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Brit. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.26, n.1, p. 12-7, 1988.
6. BASFORD, J.R. Low-energy laser therapy: Controversies and new research findings. *Lasers Surg. Med.*, v.9, n.1, p.1-5, 1989.

* Baseado na:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Biblioteca. *Normas para publicação da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas.

7. BENEDICENTI, A. La valutazione dell'effetto della luce laser 904 nm nella circolazione ematica in vivo (Protocollo sperimentale su mesentere di ratto Sprague Dowley). *Paradontol. Stomatol. (Nuova)*, v.22, n.1, p.37-46, 1983.
8. BENEDICENTI, A., GIOVANNONI, P. La biostimolazione del laser infrared 904 nm su esseri unicellulari parameci (Nota II). *Paradont. Stomat. (Nuova)*, v.22, n.1, p.61-78, 1983.
9. BENEDICENTI, A., LICATA, F.G. La biostimolazione del laser infrared 904 nm su esseri unicellulari parameci (Nota I). *Paradontol. Stomatol. (Nuova)*, v.22, n.1, p.47-60, 1983.
10. BISHT, D. GUPTA, S.C., MISRA, V., MITAL, V.P., SHARMA, P. Effect of low intensity laser radiation of healing of open skin wounds in rats. *Indian J. Med. Res. V.100*, p.43-6, 1994.
11. BISHT, D., MEHROTA, R., SINGH, P.A., ATRI, S.C., KUMAR, A. Effect of helium-neon laser on wound healing. *Indian J. Exp. Biol.*, v.37, p.187-9, 1999.
12. BRAVERMAN, B., MCCARTHY, R.J., IVANKOVICH, A.D., FORDE, D.E., OVERFIELD, M., BAPNA, M.S. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg. Med.*, v.9, p.50-8, 1989.
13. BRONNER, H., FARGEL, H. local therapy with aminoacetic acid. *Munch Med. Wschr.*, v.93, p.602, 1951.
14. BULLOUGH, W.S., LAURENCE, E.B. Mitotic control by internal secretion: The role of the chalone-adrenalin complex. *Exp. Cell Re.*, v.33, p.176-194, 1964.

15. CAMBIER, D.C., P.T., GUY G, VANDERSTRAETEN, Ph.d., MUSSEN, M.J., Ph.D., SPANK, J.T., P.T. Low-power laser and healing of burns: a preliminary assay. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.97, n.3, p.555-8, 1996.
16. CAPON, A., SOUIL, E., GAUTHIER, B., SUMIAN, C., BACHELET, M., BUYS, B., POLLA, B.S., MORDON, S. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815nm Diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med.*, v.28, n.2, p.168-75, 2001.
17. CARVALHO, A.C.P., OKAMOTO, T. Cicatrização cutânea após aplicação tópica da associação antibióticos-aminoácidos. Estudo clínico e histológico em ratos. *Ars. Cvr. Odontol.*, v.4, n.2, p. 27-33, 1977.
18. CARVALHO, P.S.P., OLIVEIRA, G.M. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de nebacetin e gingilone em feridas infectadas: estudo clínico e histológico em ratos. *Rev. Odontol. UNESP*, v.19, n.1, p. 75-84, 1990.
19. CARVALHO, P.S.P., TAGLIAVINI, D.G., TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação confrei, própolis e mel em feridas infectadas: estudo clínico e histológico em ratos. *Rev. Ci. Biomed. São Paulo*, v.12, p.39-50,1991.
20. CASTRO, D.J., ABERGEL, R.P., MEEKER, C., DWYER, R.M., LESAVOY, M.A., UITTO, J. Effects of the Nd: YAG laser on DNA synthesis and collagen production in humam skin fibroblast cultures. *Ann Plast. Surg.*, v.11, n.3, p.214-22, 1983.
21. CHOMETTE, G., AURIOL, R.M., ZEITOUN, R., MOUSQUES, T. Effect du soft laser sur lé tissu conjonctif gingival. I. Effect sur les

- fibroblastes. Etudes d'histoenzymologie et de microscopie eletronique. *J. Biol. Buccale*, v.15, n.1, p.45-9, 1987.
22. CHOMETTE, G., AURIOL, R.M., ZEITOUN, R., MOUSQUES, T. Effect du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II. Effect sur la cicatrisation. Etude en microscopie optique, histoenzymologie et microscopie electronique. *J. Biol. Buccale.*, v.15, n.1, p. 51-7, 1987.
 23. CLAYMAN, I., KUO, P. Lasers in maxillofacial surgery and dentistry. New York: Thieme, 1997. 188 p.
 24. CONLAN, M.J., RAPLEY, J.W., COBB, C.M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *J. Clin. Periodontol.*, v.23, n.5, p.492-6, 1996.
 25. CURRIE, L.J., SHARPE, J.R., MARTIN, R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr. Surg.*, v.108, n.6, p.1713-26, 2001.
 26. DORMANN, H.H. Tropical treatment of skin diseases and infected wounds with a new antibiotic aminoacid preparation. *Z. Allgemeinmed*, v.48, n.2, p. 80-1, 1972.
 27. DYSON, M., YONG, S. Effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med. Sci.*, v.1, p.125-30, 1986.
 28. ESCOLA, R., LU, R., ESCOLA, M.J. Contribution à l'étude ultrastructural de tissus gingivaux irradiés au soft-laser Hélium-Néon. *Chir. Dent.* v.55, n.276, p. 113-9, 1985.
 29. GABBIANI, G. Reparative process in mammalian wound healing: the role of contractile phenomena. *Int. Rev. Cytol.*, v. 48, p.187-219, 1977.

30. GABBIANI, G. The role of contractile proteins in wound healing and fibrocontractive diseases. *Methods. Achiev. Exp. Pathol.*, v.9, p. 187-206, 1979.
31. GABBIANI, G., HIRSCHL, B.J., RYAN, G.B., STATKOV, P.R., MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ: a study of structure and function. *J. Exp. Med.*, v.135, n.4, p.719-34, 1972.
32. GABBIANI, G., RYAN, G.B. Development of a contractile apparatus in epithelial cells during epidermal and liver regeneration. *J. Submicr. Cytol.*, v.6, p. 143-57, 1974.
33. GABBIANI, G., RYAN, G.B., MAJNE, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*_(Basel), v.27, n.5, p. 549-51, 1971.
34. GARCIA, V. G. Comportamento de feridas cutâneas submetidas à ação do raio Laser: estudo clínico, biométrico e histológico em ratos. Araçatuba, 1992. 107p. Tese (Livre-Docência. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
35. GARCIA, V.G., OKAMOTO T., KINA, J.R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com Laser. Estudo histológico em ratos. *Rev. Odontol. UNESP*, São Paulo, v.25, n.1, p. 37-48, 1996.
36. GUZMÁN, V.G.G., GUERRERO, T.S., LLUCK, M.C., DELGADO, F.J. Effectiveness of collagen-gentamicin implant for treatment of "dirty" abdominal wounds. *World J. Surg.*, v.23, n.2, p.123-6, 2000.
37. HASS, A.F, ISSEROFF, R.R., WHEELAND, R.G., ROOD, P.A., GRAVES, P.J. Low-energy helium-neon laser irradiation increases the motility of cultured human keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, v.94, n.6, p.822-6, 1990.

38. HUNTER, J., LEONARD, L., WILSON, R., Snider, g., Dixon, j. Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. *Lasers Surg. Med.*, v.3, n.4, p.285-90, 1984.
39. JANSCH, H., AHRENS, L. Clinical use of Cicatrex in surgery. *Z. Allgemeinmed*, n.10, v.50, p. 501-2, 1974.
40. JONGSMA, F.H., BOGAARD, A.E., VANGEMERT, M.J. Is closure of open skin wounds in rats accelerated by argon laser exposures? *Lasers Surg. Med.*, v.3, N.1, p.75-80, 1983.
41. JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. Tecido Conjuntivo. In: _____. *Histologia Básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.72-97, 1999.
42. KANA, J.S., HUTSCHENREITER, G., HAINA, D., WAIDELICH, W. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch. Surg.*, v.116, n.3, p.293-6, 1981.
43. KARU, T.I. Molecular mechanisms of therapeutic effect of low-intensity laser irradiation. *Laser Life Sci.*, v.2, p.53-74, 1988.
44. LIPPER, S., KAHN, L.B., REDDICK, R.L. The myofibroblast. *Pathol. Ann.*, v.15, pt.1, p.409-49, 1980.
45. LONGO, L., EVANGELISTA, S., TINACCI, G., SESTI, A.G. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904nm on healing of experimental wounds. *Lasers Surg. Med.*, v.7, n.5, p.444-7, 1987.
46. LOWE, A.S., WALKER, M.D., O'BYRNE, M., BAXTER, G.D., HIRST, D.G. Effect of low intensity monochromatic light therapy (890nm) on a radiation-impaired, wound healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.*, v.23, n.5, p.291-8, 1998.

47. LUBART, R., MALIK, Z., RACHKIND, S., FISHER, T. A possible mechanism of low level laser-living cell interaction. *Laser Ther.*, v.2, p.65068, 1990.
48. LUCROY, M.D., EDWARDS, B.F., MADEWELL, B.R. Low-intensity laser light-induced closure of a chronic wound in a dog. *Vet. Surg.*, v.28, n.4, p.292-5, 1999.
49. LYONS, R.F., ABERGEL, R.P., WHITE, R.A., DWYER, R.M., CASTEL, J.C., UITTO, J. Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann. Plast. Surg.*, v.18, n.1, p.47-50, 1987.
50. MAGRO FILHO, O. *Reparação de alvéolo dental e de ferida cutânea após irrigação com solução de própolis: estudo histológico em ratos*. Araçatuba, 1988. 83p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
51. MAIMAN, T.H. Stimulated optical radiation in rubi. *Nature*, v.187, p.493-4, 1960.
52. MELLO, J.B., MELLO, G.P.S. Tipos de laser e indicações. In: ____ *Laser em odontologia*. São Paulo: Ed. Santos, 2001. cap.4, p.39-51.
53. MESTER, E., KORENYI-BOTH, A., SPIRY, T., SCHER, A., TISZA, S. Stimulation of wound healing by means of laser rays. Clinical and electron microscopical study. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, v.14, N.1, p347-54, 1973.
54. MESTER, E., LUDÁNY, G., SELLYEI, M., SZENDE, B., TOTA, J.G. The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. *Laser Rev.*, v.1, p.3, 1968.

55. MESTER, E., NAGYLUCSKAY, S., DOKLEN, A., TISZA, S. Laser stimulation of wound healing. *Acta Chir. Acad. Sci. Hung.*, v.17, N.1, p.49-55, 1976.
56. MESTER, E., SPIRY, T., SZENDE, B., TOTA, J.G. Effect of Laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.*, v.122, n.4, p. 532-5, 1971.
57. MIOTTI, A., PASSI, P., TERRIBILE WIEL MARIN, V., MIOTTI, F., MUSAJO, F. Sperimentazione di um laser infrarosso a 904 nm. *Atual. Dent.*, v.29, n.1, p.24-7, 1985.
58. MONTANDON, D., D'ANDIRAN, G., GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. *Clin. Plast. Surg.*, v.4, n.3, p. 325-46, 1977.
59. MORRISON, D.F. Multivariate statistical methods. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1976. 415p.
60. NEMETH, A.J. Lasers and wound healing. *Dermatol. Clin.*, v.11, n.11, p.783-9, 1993.
61. NEUNHOEFER, O. I. influence of glicocoll on wound healing. *Dtsch. Gesunch-Wes.*, v.2, p.311, 1947.
62. OLSON, J.E., SCHIMMERLING, W, TOBIAS, C.A Laser action spectrum of reduced excitability in nerve cells. *Brain Res.*, v. 204, n.2, p.436-40, 1981.
63. PASSI, P., TERRIBILE WIEL MARIN, V., MIOTTI, F., MUSAJO, F., MIOTTI, A., GOBBATO, S., FAVERO, G.A. Gli effetti della luce laser 904 nanometri su lesione indotte nella mandibola del ratto. *Rev. Ital. Stomat.*, v.53, N.6, p. 449-56, 1984.
64. PEACOCK, E.E., VAN WINKLE, W. *Wound repair*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1976. 526P.

65. POLLACK, S.V. Wound healing: A review. I. The biology of wound healing. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, v. 5, n.5, p.389-93, 1979.
66. PUOLAKKAINEN, P.A., TWARDZIK, D.R., RANCHALIS, J.E., PANKEY, S.C., REED, M.J., GOMBOTZ, W.R. The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) depends on the topical delivery system. *J.Surg. Res.* v.58, n.3, p.321-9, Mar, 1995.
67. RAPHAEL, A. Emprego tópico dos antibióticos em dermatologia. In: LACAZ, C.A. *Antibióticos*. Sao Paulo: Prociex, 1965. 609p.
68. RE, F., VITERBO, S. Analisi degli effetti biologici dei soft-laser. *Minerva Stomatol.*, v.34, p.357-9, 1985.
69. REIMER, K., FLEICHER, W., BROGMANN, B., SCHREIRER, H., BURKHAR, P., LANZENDORFER, A., GUMBEL, H., HOEKSTRA, H., BEHRENS-BAUMANN, W. Povidone – iodine liposomes an overview. *Dermatology*, V.195, Supl.2, p.93-9, 1997.
70. REZVANI, M., NISSAN, M., HOPEWELL, J.W., VAN DEN AARDWEG, G.J., ROBBINS, M.E., WHITEHOUSE, E.M. Prevention of X-Ray-Induced late dermal necrosis in the pig by treatment with multi-wavelength light. *Lasers Surg .med.*, v.12, n.3, p.288-93, 1992.
71. ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S., KUMAR, V. Inflamação e reparo. In: _____. *Patologia estrutural e funcional*. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 3, p. 45 – 83.
72. ROOD, P.A., HAAS, A.F., GRAVES, P.J., WHEELAND, R.G., ISSEROFF, R.R. Low-energy helium-neon laser irradiation does not alter human keratinocyte differentiation. *J. Invest Dermatol.*, v.99, n.4, p.445-8, 1992.

73. ROSA, G.J.M. *Desenvolvimento de aplicativo para a análise de perfil na experimentação zootécnica*. Botucatu, 1994. 72p. Dissertação (Mestrado em Zootécnica/Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade Estadual Paulista.
74. ROSENKRAUZER, R. Dermatological agent amino acids for external application. *Arzt. Praxis.*, v.24, p.253, 1972.
75. ROSS, R. The fibroblast and wound repair. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, v. 43, n.1, p. 51-96, 1968.
76. RUNGGER-BRANDLE, E., GABBIANI, G. The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathologic processes. *Am. J. Pathol.*, v.110,n.3, p. 361-92, 1983.
77. RYAN, G.B., CLIFF, W.J., GABBIANI, G., IRLÉ, C., MONTANDON, D., STATKOV, P.R., MAJNO, G. Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum. Pathol.*, v.5, p.55-67, 1974.
78. RYAN, G.B., MAJNO, G. Acute inflammation: a review. *Am. J. Pathol.*, v.86, n.1, p.185-276, 1977.
79. SAPERIA, D., GLASSBERG, E., LYONS, R.F., ABERGEL, R.P., BANEUX, P., CASTEL, J.C., DWYER, R.M., UITTO, J. Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helin-neon laser. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, v.138, n.3, p.1123-8, 1986.
80. SCHENCK, P., PORTEDER, H., ZETNER, K. Electron microscopy studies of the oral mucosal epithelium after irradiation with a He-Ne laser. *Dtsch Z. Mund. Kiefer Gesichtschir*, v.9, n.4, p.278-83, 1985.

81. SCHLAGER, A., KRONBERGER, P., PETSCHKE, F., ULMER, H. Low-power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635nm and 690nm) and a placebo group. *Laser surg. Med.*, v.27, n.1, p.39-42, 2000.
82. SCHLAGER, A., OEHLER, K., HUEBNER, K.U., SCHMUTH, M., SPOTL, L. Healing of burns after treatment with 670nm low-power laser light. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.105, n.5, p.1635-9, 2000.
83. SCHNEIDER, N.P., SOUDRY, M., REMUSAT, M., FRANQUIM, J.C., MARTIN, P.M. Modificações da dinâmica de crescimento e ultraestrutura após tratamento com laser Hélio-Neon de fibroblastos gengivais. *Odontol Hoje*, v.9, p.403-17, 1990.
84. SMITH, K.C. The photobiological basis of low level laser radiation therapy, *Laser Ther.*, v.3,p.19-24, 1991.
85. SOARES, J.H., TARDIVO, J.P., GOLDENBERG, S., KATZ, S., MOURA, L.A.R. Aspectos morfológicos e histométricos da reparação tecidual das feridas cutâneas de ratos após irradiação com o laser de Hélio-Nêonio. *Acta Cir. Bras.*, v.4, n.2, p.56-60, 1989.
86. SOHN, R.L., MURRAY, M.T., SCHWARZ, K., NYITRAY, J., PURRAY, P., FRANKO, A.P., PALMER, K.C, DIEBEL, L.N.; DULCHAVISKY, S.A. In vivo particle mediated delivery of mRNA to mammalian tissues: ballistic and biologic effects. *Wound Repair Regen.*, v.9, n.4, p.287-96, 2001.
87. STADLER, I., LANZAFAME, R.J., EVANS, R., NARAYAN, V., DAILEY, B., BUEHNER, N., NAIM, J.O. 830nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model. *Lasers Surg. Med.*, v.28, n.3, p.220-6, 2001.

88. STOCKHAUSEN, G., FELBIER, R. Local wound treatment of using amino acids and antibiotics. *Med. Monatsschr.*, v.26, n.5, p. 225-9, 1972.
89. STRANG, R., MOSELEY, H., CARMICHAEL, A. Soft lasers have they a place in dentistry? *Br. Dent. J.*, v.165, n.6, p.221-5, 1988.
90. SURINCHAK, J.S., ALAGO, M.L., BELLAMY, R.F., STUCK, B.E., BELKIN, M. Effects of low-level energy lasers on the healing of full-thickness skin defects. *Laser Surg. Med.*, v.2, n.3, p.267-74, 1983.
91. TROWBRIDGE, H.O., EMLING, R.C. Regeneração e Cicatrização. In: _____. *Inflamação, uma revisão do processo*, 4. ed., São Paulo: Quintessence, São Paulo, 1996, cap. 7, p. 137-152.
92. VEJROSTA, Z., LUKLOVÁ, L., HORNOVÁ, J., DOUBEK, J. Laser radiation in healing oral cavity wounds. *Src. Méd.*, v.48, n.6/7, p. 569-76, 1975.
93. VILJANTO, J. Biochemical basis of tensile strength in wound healing. An experimental study with viscose cellulose sponges on rats. *Acta. Chir. Scand.* v. 333, supl., p 1-101, 1964.
94. WALKER, M.D., RUMPF, S., BAXTER, G.D., HIRST, D.G., LOWE, A.S. Effect of low-intensity laser irradiation (660nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murine skin. *Lasers Surg. Med.*, v.26, n.1, p.41-7, 2000.
95. WOLF, S. Cicatrex, a new preparation for local wound treatment. *Therapiewoche*, v.22, p.2832, 1972.
96. YAMAMOTO, Y., KONO, T., KOTANI, H., KASAI, S., MITO, M. Effect of low-power laser irradiation on procollagen synthesis in human fibroblasts. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, v.14, n.3, p.129-32, 1996.

97. YU, H.S., CHANG, K.L., YU, C.L., CHEN, J.W., CHEN, G.S. Low-energy helium-neon Laser irradiation stimulates interleukin-1 and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, v.107, n.4, p.593-6, 1996.
98. ZELANTE, P.M., NARDY, R.O. Arnica e o processo inflamatório, miasmas na cavidade bucal. 1. Ed. São Paulo: Editora LR Cópias, 2001.

ANEXOS

ANEXO 1

**ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal
(CEEA)**

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSOS DE ODONTOLOGIA E DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**ESTUDO HISTOMÉTRICO E HISTOLÓGICO DO PROCESSO DE REPARO EM FERIDAS CUTÂNEAS, PROVOCADAS NA REGIÃO DORSAL DE RATOS, SUBMETIDAS AO TRATAMENTO COM LASER EM BAIXA INTENSIDADE: Influência da associação de diferentes comprimentos de onda (685 e 780 nm)**”, sob responsabilidade do PROF. TITULAR VALDIR GOUVEIA GARCIA e ARY LOCCI JÚNIOR está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado “**AD REFERENDUM**”

Araçatuba, 20 de janeiro de 2003

Adelina M.S.

Profa. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente

RESUMO

LOCCI JUNIOR, A. *Estudo biométrico e histológico do processo de reparo em feridas cutâneas, provocadas na região dorsal de ratos, submetidas ao tratamento com laser em baixa intensidade. Influência da associação de diferentes comprimentos de onda (685 e 780 nm).* Araçatuba, 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista

RESUMO: O objetivo do estudo foi avaliar, histologicamente e biometricamente, a influência da associação de diferentes comprimentos de onda de lasers em baixa intensidade, sobre o processo de reparo em feridas cutâneas abertas provocadas no dorso de ratos. Foram utilizados 72 ratos, os quais foram divididos em 3 grupos com 24 animais cada, sendo: Grupo I – controle (sem tratamento); Grupo II (tratamento com laser 685 nm) e grupo III (tratamento com laser 685 seguido do laser 780 nm na mesma sessão). O laser foi utilizado de modo contínuo e em contato de forma pontual, ponteiros de 50 mW, durante 80 s, nas feridas do grupo II e 40 s (laser 685 nm) mais 40 segundos (laser 780 nm) nas do grupo III, totalizando 4 J de energia e densidade energética de 200 J/cm² em ambos os grupos. O diâmetro das feridas foram medidas em 0 h, 3, 7 e 14 d de pós-operatório e, os dados foram submetidos à análise estatística. Nos intervalos de 3, 7 e 14 d, 8 animais de cada grupo foram sacrificados e as peças foram submetidas a processamento histológico e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina e tricrômico de Massom. Concluiu-se: 1) Grupo II e III evidenciaram resultados histológicos mais diferenciados que Grupo I; 2) Grupo III demonstrou reparação mais diferenciada que o Grupo I e o Grupo II; 3) do ponto de vista biométrico, o maior grau de contração foi observado nas feridas do Grupo III, seguido das do grupo II e I, no período de 14 dias.

Palavras-chave: laser em baixa intensidade, cicatrização de feridas

ABSTRACT

LOCCI JUNIOR, A. Biometric and histological study of the healing process in cutaneous wound, provoked at the dorsum of rats, submitted to low intensity laser treatment. The influence of associations of two different wave-length (685 and 780 nm). Araçatuba, 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT: This investigation aimed to study, histologically, the influence of association of different wave-length of low intensity laser on the healing process in cutaneous wound provoked at the dorsum of rats. Seventy-two rats, 3 groups of 24 animals each, were used, namely: Group I – control (without treatment); Group II (treatment with laser of 685 nm) and Group III (treatment with laser of 685 nm associated with laser of 780 nm in the same session). In Group II, the laser was applied continuously with a point of contact of 50 mW during 80 s. In Group III, the laser of 685 nm was applied and, followed with laser of 780 nm for 40 s in each application. A total of 4 J of energy and 200 J/cm² of energetic density were applied in both groups. The diameter of the wound was measured at baseline, 3, 7 and 14 post-operative days and the results were submitted to statistical analysis. At intervals of 3, 7 and 14 days, 8 animals of each group were sacrificed and the pieces were submitted to histological processing and were stained by hematoxiline and eosine and Massom's tricromic techniques. It was concluded that: 1) Group II and III showed histological results statistically different from Group I; 2) Group III demonstrated a statistically differentiated healing in comparison to Group I and II; 3) at the point of view of biometrics, the greatest degree of contraction was observed in Group III, followed by Group II and I, at the period of 14 days.

Key words: low intensity laser, wound healing